



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

Título:

“Sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y a la tintura de propóleo. Estudio in vitro”

Tesis previa a la obtención
del título de Odontólogo

AUTOR: Vicente Javier Maza Jumbo

DIRECTORA: Odont. Esp. Susana Patricia González Eras

Loja – Ecuador

2018

CERTIFICACIÓN

Loja, 8 de Noviembre del 2018

Odont. Esp. Susana Patricia González Eras.

DIRECTORA DE TESIS

Certifica:

Que la presente tesis titulada **“Sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y a la tintura de propóleo. Estudio in vitro”**, elaborada por **Vicente Javier Maza Jumbo**, ha sido planificada y ejecutada bajo mi dirección y supervisión, por tanto y al haber cumplido con los requisitos establecidos por el Régimen Académico por la Universidad Nacional de Loja autorizo su presentación, sustentación y defensa ante el tribunal designado para el efecto.



Odont. Esp. Susana Patricia González Eras.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

El trabajo ha sido desarrollado con métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que la información, investigación, datos, criterios, análisis y conclusiones vertidos en el presente son de exclusiva responsabilidad del Autor y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja, a sus representantes jurídicos de posibles 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: Vicente Javier Maza Jumbo

Firma:



Cédula: 1104804818

Fecha: Loja, 8 de Noviembre del 2018

CARTA DE AUTORIZACIÓN

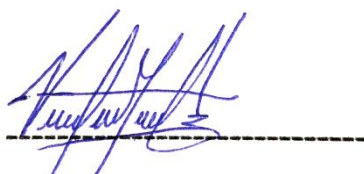
Yo, Vicente Javier Maza Jumbo, declaro ser el autor de la tesis titulada **“Sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y la tintura de propóleo mediante disco difusión. Estudio in vitro”**, como requisito para optar al título de Odontólogo; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre al mundo la reproducción 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 la red de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los ocho días del dos mil dieciocho.

Firma el autor.



Autor: Vicente Javier Maza Jumbo

Cédula: 1104804818

Correo electrónico: vijamaju@gmail.com

Teléfono: 072552271 **Celular:** 0994095270

DATOS COMPLEMENTARIOS

Directora de tesis: Odont. Esp. Susana Patricia González Eras

Tribunal de grado: Presidente: Odont. Deisy Patricia Saraguro Ortega, Mg. Sc.

Vocal 1: Odont. Esp. Tannya Lucila Valarezo Bravo

Vocal 2: Odont. Esp. Zulema de la Nube Castillo Guarnizo

DEDICATORIA

Con afecto y cariño dedico el presente trabajo de tesis a Dios por la vida y la salud; a mis padres quienes me dieron la vida, educación, apoyo y consejos, en especial a mi mamá; a mis hermanos por cada uno de sus consejos y frases de motivación que día a día y que mediante su perseverancia me enseñaron a luchar y conseguir mis objetivos, a mis tíos, primos que en todo momento estuvieron con las frases de motivación en mi formación profesional.

AUTOR

AGRADECIMIENTO

A la universidad, en cuyas aulas aprendí a crecer ética e intelectualmente y a cada uno de los docentes por su amistad, apoyo y conocimiento logrando en mí, para llevar a cabo mi meta y servir a la sociedad en cualquier situación y lugar.

A mi directora de tesis, Susana González, y director metodológico, Luis Morocho, por la guía, las enseñanzas y el tiempo dedicado en el presente estudio. Y de igual forma mi gratitud; a una persona especial que desde siempre me motivó y estuvo en cada momento dentro de mi formación profesional, gracias a sus palabras y motivación hizo que pueda realizar este trabajo de investigación, para aquellas personas que colaboraron de alguna u otra manera con sus conocimientos para poder salir adelante.

Finalmente, a mis compañeros de carrera, pacientes que han sido un pilar fundamental para que este sueño se haga realidad con sus motivaciones y consejos

AUTOR.

ÍNDICE

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
1. TÍTULO	1
2. RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
CAPITULO I.....	6
1. Tejidos periodontales.....	6
1.1. Entorno periodontal en salud.....	6
1.2. Enfermedad periodontal	7
CAPÍTULO II.....	13

2. Porphyromonas gingivales	13
2.1. Definición.....	13
2.2. Taxonomía.....	14
2.3. Morfología y estructura.....	14
2.4. Factores de virulencia.....	14
2.5. Fisiopatología.....	17
CAPÍTULO III	19
3. Tratamiento farmacológico.....	19
3.1. Antecedentes	19
3.2. Definiciones	20
3.3. Amoxicilina + ácido Clavulánico.....	20
CAPITULO IV	26
4. Propóleo en periodoncia	26
4.1. Composición.....	26
4.2. Características Organolépticas	26
4.3. Propiedades del propóleo	27
4.4. Mecanismo de Acción.....	27
CAPÍTULO V.....	29
5. Medios de cultivo	29
5.1. Clasificación de Medios de Cultivo	29
5.2. Siembra y transferencia de microorganismos	30
5.3. Métodos para incubar en anaerobiosis	30

5.4.	Tinción de gram	31
5.5.	Sensibilidad antimicrobiana	31
5.6.	Método de Kirby y Bauer	31
5.	METODOLOGÍA	33
6.	RESULTADOS	42
7.	DISCUSIÓN.....	46
8.	CONCLUSIONES	49
9.	RECOMENDACIONES	50
10.	REFERENCIAS	51
11.	ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre el halo inhibitorio del propóleo vs imipenem.	42
Tabla 2. Comparación Amoxicilina + ácido clavulánico vs Tintura de Propóleo.....	43
Tabla 3. Comparación amoxicilina + ácido clavulánico vs Imepenem.....	43
Tabla 4. Comparación entre los 3 grupos (ANOVA de un factor).....	44
Tabla 5. Comparaciones múltiples con la corrección de Tukey.....	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diferencia de crecimiento de los tres compuestos	45
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Preparación y esterilización de tintura de propóleo al 50%	34
Fig. 2 Preparación de Vitamina K	34
Fig. 3 Preparación de Hemina	35
Fig. 4 Viabilización de cepa ATCC 33227.....	35
Fig. 5 Siembra en Agar Sangre con Vitamina K y Hemina	36
Fig. 6 Preparación de Agar Sangre	36
Fig. 7 Preparación de Agar Muller Hinton y distribución en cajas Petri.....	37
Fig. 8 A. Siembra de cepa bacteriana luego de realizar la viabilización B. Crecimiento de colonias bacterianas a las 96 horas de incubación.....	38
Fig. 9 A. Desarrollo de Tinción de Gram B. Observación microscópica de bacteria Gram Negativa (<i>Porphyromonas Gingivalis</i>)	39
Fig. 10 Estándar de turbidez McFarland	40
Fig. 11 A. Material utilizado para impregnación de discos B. Impregnación de 20ul de etanol al 70%(control negativo) C. Impregnación de 20ul de Propóleo al 50% (control positivo).....	40
Fig. 12 A. Halo inhibitorio de Amoxicilina - Ácido clavulánico B. Halo inhibitorio de Propóleo.....	41

1. TÍTULO

Sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y la tintura de propóleo. Estudio in vitro.

2. RESUMEN

El desconocimiento del personal odontológico en la terapia antibiótica de las enfermedades periodontales ocasiona equívocamente resistencia antimicrobiana deteriorando la salud bucal. Objetivo: determinar la sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y a tintura de propóleo. Metodología: el estudio se realizó con la cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33227 viabilizada en agar sangre con vitamina k y hemina en un ambiente anaerobio incubadas a 37°C por 5 días y sometidas a las pruebas de sensibilidad mediante el método de Kirby Bauer realizado en cinco repeticiones y en dos grupos G1: Imipenem (control positivo), amoxicilina + ácido clavulánico (prueba) y disco en blanco (control negativo); G2: Imipenem (control positivo), tintura de propóleo al 50% (prueba) y disco con etanol 70% (control negativo), finalmente el análisis de los resultados se hizo la comparación del efecto de la tintura de propóleo y la amoxicilina + ácido clavulánico tomando como valor de línea base el efecto inhibitorio del control positivo mediante las pruebas comparativas de ANOVA y corrección de Tukey considerando un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$). Resultados: se pudo evidenciar efecto inhibitorio en el G1 para la amoxicilina + ácido clavulánico con un tamaño promedio de 52,8mm y G2 para la tintura de propóleo al 50%, con un tamaño de 15mm. Conclusión: En ambos casos se presentan halos inhibitorios para la amoxicilina + ácido clavulánico fue más efectiva, sin embargo en la prueba de la tintura de propóleo al 50% se lo puede considerar como método alternativo para la terapéutica en las enfermedades periodontales.

Palabras clave: *Porphyromonas gingivalis*, Combinación Amoxicilina-Clavulanato de Potasio, Pruebas de Sensibilidad Microbiana, Periodontitis, Gingivitis

ABSTRACT

The lack of knowledge of the dental staff in the antibiotic therapy of periodontal diseases causes erroneously antimicrobial resistance deteriorating oral health. Objective: to determine the sensitivity of a periodonto-pathogenic microorganism against a beta-lactam antibiotic and a propolis tincture. Methodology: the study was carried out with the bacterial strain *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33227 viable in blood agar with vitamin k and hemin in an anaerobic environment incubated 37°C for 5 days and subject to the sensitivity tests by the method of Kirby Bauer realized in five repetitions and in two groups G1: Imipenem (positive control), amoxicillin + clavulanic acid (test) and blank disk (negative control); G2: Imipenem (positive control), 50% propolis tincture (test) and 70% ethanol disk (negative control), finally the analysis of the results was made by comparing the effect of propolis tincture and amoxicillin + clavulanic acid taking as baseline value the inhibitory effect of positive control through the comparative tests of ANOVA and Tukey correction considering a level of significance of 95% ($p < 0.05$). Results: it was possible to demonstrate inhibitory effect in the G1 for amoxicillin + clavulanic acid of 52.8mm on average and G2 for propolis tincture at 50% 15mm average. Conclusion: In both cases, inhibitory haloes for amoxicillin are presented + clavulanic acid was more effective, however in the test of propolis tincture at 50% it may be considered as an alternative method for therapeutics in periodontal diseases.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, Combination Amoxicillin-Clavulanate Potassium, Microbial Sensitivity Tests, Periodontitis, Gingivitis

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales como la gingivitis y la periodontitis son comunes en todo el mundo provocando inflamación de los tejidos del periodonto, de origen multifactorial provocando la pérdida parcial o total de los dientes, se han determinado más de 50 especies de bacterias en su mayoría anaerobias estrictas de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Acinetobacter* y *Staphylococcus* todos ellos encuentran en los tejidos bucales el micro hábitat idóneo para su desarrollo.

Camarena, Anaya, Perez, & Mendoza, (2016), mencionan que se desconocen los mecanismos patogénicos responsables del inicio y progresión de las enfermedades periodontales pero la susceptibilidad del paciente colabora en la destrucción del ligamento periodontal y el hueso alveolar, además los productos de secreción bacteriana favorecen al inicio de la destrucción periodontal; por los métodos de biología molecular se han identificado de 800 a 1000 especies de bacterias aisladas de la cavidad oral entre las más patógenas están *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*. *Porphyromonas gingivalis* comprende doce especies pero tres se han aislado *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. asaccharolytica* famosas por producir un pigmento negro en sus colonias con medios que contengan sangre hemina y vitamina k, además considerada una bacteria periodontopatógena por excelencia se aísla del surco gingival especialmente cuando no hay buena salud periodontal especialmente asociado a periodontitis crónica (Guilarte & Perrone, 2013).

Las enfermedades periodontales son una serie de procesos patológicos de carácter infeccioso que afectan a los tejidos de soporte del diente, estos cuadros clínicos se engloban bajo la denominación de gingivitis conocida como la inflamación de los tejidos blandos que rodea al diente principalmente la encía sin extenderse al cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar, en cambio el término periodontitis se utiliza para definir la

inflamación de los tejidos de soporte del diente habitualmente un cambio progresivo destructivo con pérdida de hueso y ligamento periodontal (Rodríguez, Ureña, Alonso, Gonzalez, & Aguado, 2002).

La prevalencia de las enfermedades periodontales se basan en los signos de inflamación, la magnitud de la pérdida de inserción del ligamento por ello la periodontitis afecta a más del 70% de la población causando la pérdida del tejido de soporte que deriva a la pérdida de piezas dentales poniendo en riesgo la función y estética, este tipo de enfermedad se ve aumentada a partir de los 60 años cuando se combina la pérdida parcial y total de la dentición (Papapanou, 2015).

La utilización de la amoxicilina con ácido clavulánico adjunto con la terapia no quirúrgica periodontal ha obtenido resultados excelentes en el tratamiento con periodontitis agresiva localizada o generalizada deteniendo la pérdida de hueso alveolar, por el mismo modo los extractos de propóleo a nivel periodontal ha demostrado propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, anestésicas y cicatrizantes actuando a nivel de la placa supragingival y ayudando a la recuperación de los tejidos, estimulando la respuesta inmune local (Carranza, Newman, Takei, & Klokkevol, 1996 y Felitti, 2014).

Con los antecedentes indico la problemática de este estudio que recae en el desconocimiento de las terapias antibióticas por parte del personal odontológico, ocasionando resistencia antimicrobiana y fracaso en los tratamientos periodontales con medicamentos convencionales; es por esto que el principal objetivo de la investigación es determinar la sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y a tintura de propóleo mediante pruebas de sensibilidad con el método Kirby Bauer. Con ello justifico que realizar una correcta terapia antibiótica previene la resistencia a las cepas bacterias.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

CAPITULO I

1. Tejidos periodontales

1.1. Entorno periodontal en salud

El periodonto se forma de tejidos de soporte y protección (encía, ligamento periodontal, cemento y hueso radicular), cuyas características en salud es de importancia para entender las enfermedades periodontales (Carranza, Newman, Takei, & Klokkevol, 1996). Constituye una unidad de desarrollo, biológica y funcional que está sometida a cambios relacionados con alteraciones funcionales y del medio bucal, cuya función principal del periodonto consiste en unir el diente al tejido óseo y en mantener la integridad de la mucosa masticatoria (Lindhe & Lang, *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*, 2005).

La encía sana es rosa, firme, de márgenes finos y con una forma festoneada que le permite ajustarse al contorno de los dientes, su color puede variar según la cantidad de melanina en el epitelio, el grado de queratinización, la vascularización y la naturaleza fibrosa del tejido conjuntivo; donde su margen gingival es una superficie lisa de 1 a 2 mm que puede separarse del diente con una sonda a diferencia de la encía insertada que está unida firmemente al hueso alveolar con una superficie punteada como piel de naranja ocupando una anchura de 0 mm hasta 9 mm (Eley, Soory, & Manson, 2012).

El ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar forman parte del aparato de inserción del diente; donde el ligamento periodontal es tejido conectivo que rodea la raíz y conecta con el hueso, formado por fibras y células inmersas en sustancia fundamental; el cemento es un tejido calcificado que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica; y el proceso alveolar es la porción de los maxilares que forma y sostiene los alveolos dentarios; estructuras que se encuentran irrigadas por vasos apicales, vasos que penetran desde el

hueso alveolar y vasos anastomosantes de la encía (Carranza, Newman, Takei, & Klokkevol, 1996).

1.2. Enfermedad periodontal

“La enfermedad periodontal se caracteriza por la pérdida del balance que existe entre la relación bacteria – hospedero resultando en un proceso inflamatorio que destruye tejidos de protección y soporte. ... la proliferación de microorganismos en ambiente subgingival están asociados con enfermedad periodontal destructiva” (Botero, Arce, Jaramillo, & Contreras, 2003, p.41).

En efecto el Dr. Panos N. Papapanou, (2015) señala la enfermedad periodontal como: “cambios inflamatorios en las estructuras de soporte de los dientes: encías, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular; pueden causar destrucción tisular, reducción del soporte dental y, en última instancia, pérdida del diente” (p. 241). Agregando la National Intitute of Dental and Craniofacial (2013), que el sistema inmunitario del cuerpo lucha contra las bacterias existentes a medida que la placa se extiende y en respuesta natural contra la infección empieza a destruir hueso y tejido conjuntivo, debiendo tratarse para evitar la destrucción consecuente de hueso, encía, ligamento y cemento radicular.

Esta lesión inflamatoria causada por la acumulación no normal o desordenada de la placa dental se denomina gingivitis, la cual se manifiesta como alteraciones en el color y la textura de las encías, y suele acompañarse de sangrado con la estimulación mecánica y su acumulación prolongada causa inflamación gingival crónica, denominada periodontitis, que puede ocasionar la profundización gradual del surco gingival, la destrucción del ligamento periodontal y del hueso alveolar pero también puede ser causada por factores sistémicos, medicamentos o desnutrición; en ausencia de tratamiento, este proceso

destrutivo puede seguir avanzando y llegar a un punto en el cual los tejidos restantes son insuficientes para retener el diente y es inevitable la pérdida de la pieza (Papapanou, 2015).

La evaluación clínica de la enfermedad periodontal incluye el examen de la inflamación de los tejidos periodontales mediante índices que valoran el color, la textura y el sangrado al sondaje, el registro de la profundidad de sondeo de las bolsas, el nivel clínico de inserción de cada una de ellas y la valoración radiográfica del hueso alveolar mediante un análisis cualitativo y cuantitativo del hueso interproximal (Lindhe & Lang, *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*, 2005).

Para los nuevos diagnósticos cabe tomar en cuenta la nueva clasificación de enfermedad periodontal que ha surgido en base a estudios de la población, investigaciones de ciencias básicas y la evidencia de estudios prospectivos, donde es clasificada de acuerdo a la necrosis de mucosas, a las manifestaciones periodontales en enfermedades sistémicas y a la periodontitis en sí, según la etapa, extensión y distribución y al grado de progresión (Caton, et al., 2018).

1.2.1. Epidemiología

Los principales indicadores de riesgo de enfermedad periodontal son la edad, el género, el nivel de escolaridad, el nivel socioeconómico, el acceso a la salud y el tabaquismo convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel global por sus altas prevalencias donde el abordaje debería enfocarse hacia el fortalecimiento del nivel primario de salud, trabajo interdisciplinario e intersectorial, promoviendo estilos de vida saludables, hábitos de higiene oral, consejería anti tabáquica y dietética, y detección precoz de la enfermedad (Carvajal, 2016).

Por lo que se presentan estudios epidemiológicos en latino américa donde con resultados del 62.4% de la población presenta enfermedad periodontal, siendo la gingivitis

la más representativa con un 48.1%, convirtiendo las periodontopatías inflamatorias crónicas como el segundo problema de salud bucal más prevalente (Perez, et al., 2011). Así mismo la enfermedad periodontal es una de las enfermedades más comunes y de mayor prevalencia en el Ecuador relacionada con una mala higiene y un nivel regular de conocimiento de salud bucal, señalando otros factores de riesgo como trauma oclusal y ortodoncia, asociados a Periodontitis y Gingivitis (Martinez, LLerena, & Peñaherrera, 2017).

Un estudio sobre la prevalencia de la enfermedad periodontal en pacientes con y sin diabetes Mellitus tipo 2 en México presenta un 48.5% en aquellos que presentan la patología y un 40.0 en aquellos que no la presentan, concluyendo que la prevalencia y la severidad es mayor en el paciente diabético (Hernández, Sánchez, Zegbe, & Castañeda, 2015).

1.2.2. Etiología

La etiología es multifactorial donde factores tan inespecíficos como la raza, el sexo o la edad avanzada, así como el tabaco o la diabetes, están relacionados con el desarrollo de bacterias, entre ellas *P. gingivalis*, *P.intermedia* o *F.nucleatum* (Costa, Sá, & Almeida, 2001). La principal causa de la enfermedad periodontal es la infección bacteriana pero otros factores locales y sistémicos predisponen a la acumulación de placa, considerándolos factores etiológicos secundarios; establece que entre 6 a 12 especies bacterianas pueden ser responsables de la mayoría de los casos de periodontitis destructiva (Eley, Soory, & Manson, 2012).

Los colonizadores iniciales de las superficies dentales son *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *A. actinomycetemcomitans*, *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*, mientras que los

microorganismos que están relacionados directamente con las afecciones periodontales son *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Campylobacter*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum*, además se localiza una microbiota subgingival, constituido por bacterias anaeróbicas gramnegativas como la *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (Papapanou, 2015).

Bazzano, Parodi, Tabares, y Sembaj, (2012), evaluaron la composición microbiológica de las bolsas periodontales correspondientes a una periodontitis crónica donde se identificaron por cadena de la polimerasa (PCR) los siguientes patógenos de la enfermedad, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) y *Prevotella intermedia* (Pi), donde Pg se muestra con mayor prevalencia.

Por otro lado, cabe señalar que toda la placa bacteriana puede contribuir al potencial patógeno de la flora subgingival en mayor o menor grado, por su capacidad de colonizar y eludir las defensas del huésped y provocar inflamación y daño en el tejido; cualquier composición de la placa en cantidad suficiente en el surco gingival causa gingivitis pero solo en algunos casos provoca periodontitis (Eley, Soory, & Manson, 2012).

Los factores locales predisponentes a provocar enfermedad periodontal son las restauraciones defectuosas, lesiones de caries, impactación de comida, prótesis parciales mal diseñadas, aparatología ortodóntica, dientes mal alineados, falta de sellado labial o respiración oral, surcos congénitos en esmalte cervical o superficie de raíz y finamente el tabaco que puede tener efectos locales y sistémicos. Por otra parte, las enfermedades sistémicas que se encuentran asociadas con la enfermedad periodontal son la diabetes, la cardiopatía coronaria y úlceras gástricas (Eley, Soory, & Manson, 2012).

1.2.3. Tratamiento

El tratamiento periodontal tiene como objetivos, eliminar la enfermedad, restaurar la funcionalidad y obtener una estética satisfactoria, donde el tratamiento será determinado por la situación diagnóstica, la edad, la salud general, las actitudes y aspiraciones del paciente (Eley, Soory, & Manson, 2012). Para el tratamiento de las enfermedades periodontales se sugieren dos tipos de terapia; la terapia quirúrgica la cual se da con procedimientos correctores, reconstructores y regeneradores de las deformidades mucogingivales y la terapia no quirúrgica la que consiste principalmente en la remoción de placa, el control de placa, el detartraje supra y subgingival, el alisado radicular y la terapia coadyuvante con agentes químicos. Donde ambos tratamientos son efectivos en las diferentes formas de la enfermedad periodontal (Yánac, Girano, & Chipana, 2016).

El raspado y alisado radicular mejora significativamente los parámetros clínicos (Placa Bacteriana, Hemorragia, Supuración, Profundidad al Sondaje y Nivel de Inserción Clínica) y reduce la prevalencia de los patógenos periodontales, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* en bolsas periodontales profundas (Bazzano, Parodi, Tabares, & Sembaj, 2012). Pero la utilización de antibióticos por vía sistémica posibilita tratar múltiples bolsas y alcanzar lugares reservorio de bacterias, siendo utilizado en casos específicos como complemento al tratamiento periodontal no Quirúrgico (Costa, Sá, & Almeida, 2001). Dado que es imposible eliminar todas las bacterias de la bolsa periodontal mediante raspado y alisado radicular, el uso de antibióticos como auxiliares a estos procedimientos podría favorecer sus efectos.

Algún de los medicamentos que pueden complementar al tratamiento no quirúrgico son los enjuagues bucales con base de clorhexidina, geles, tabletas o capsulas antibióticas (National Institute of Dental and Craniofacial Research , 2013). Hoy en día existen un considerable número de fármacos utilizados de manera sistémica y local para eliminar

bacterias patógenas para el periodonto, entre las de mayor recurrencia esta la tetraciclina, Metronidazol, Amoxicilina + Acido clavulánico y Clindamicina (Costa, Sá, & Almeida, 2001). Ante ello se debe tener en cuenta algunos criterios para el uso de antibiótico que justifiquen la naturaleza de la flora bacteriana, no provocar efectos secundarios, ni hipersensibilidad, ni resistencia bacteriana, así como debe demostrarse que el antibiótico es superior para el control de la enfermedad (Eley, Soory, & Manson, 2012).

CAPÍTULO II

2. *Porphyromonas gingivalis*

La etiología de las enfermedades periodontales tiene ciertas características que influyen en la patogenicidad y virulencia. La enfermedad periodontal resulta de infecciones mixtas en las que los microorganismos se desarrollan y actúan de manera sinérgica y favorecidos por factores de susceptibilidad del huésped y son responsables del inicio y avance de la enfermedad (Lamont, Richard. J., Lewis, Janina P. y Potempa, J, 2015).

Además, la composición de estos consorcios de microorganismos patógenos puede variar de un individuo a otro e incluso de un sitio a otro de la misma boca. Para complicar aún más la situación, diferentes microorganismos o grupos de microorganismos pueden asumir mayor o menor importancia en diferentes etapas de la enfermedad, y muchos de estos patógenos –si no todos– también pueden encontrarse en individuos sanos. No obstante, ciertos grupos de patógenos que se encuentran en consenso tienen que ser identificados, (...). En general, un patógeno periodontal exitoso es el que ha evolucionado hasta ser capaz de situarse en la zona subgingival y permanecer ahí, superar las defensas del huésped y causar daño a los tejidos periodontales (Lamont, Richard. J., Lewis, Janina P. y Potempa, J, 2015, p. 259).

2.1. Definición

La *Porphyromonas gingivalis* es un bacilo gram negativo anaerobio, asacarolítico, predominante en la periodontitis e implicada como un factor accesorio en ciertos problemas sistémicos como la enfermedad cardíaca aterosclerótica o neumonía por aspiración (Díaz C. A., 2010). Son las bacterias con mayor presencia en el biofilm dental subgingival, estando relacionadas a las patologías periodontales como gingivitis y

periodontitis crónica además que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño (Ramos, 2011).

2.2.Taxonomía

Pertenece al género de los Bacteroides, con características anaerobias estrictas, gram negativo, no esporulado y de forma bacilar, con base a biológica molecular, con el ADN-ADN hibridación y estudio de sus características bioquímicas se pudo identificar un grupo homogéneo de especies a partir de Bacteroides, en sus inicios formado por 3 especies *P. gingivalis*, *P. asaccharolyticus*, *P. endodontales*. Estas especies no son fermentadoras y utilizan como sustrato el nitrógeno para obtener su energía a partir de tripticasa y peptona (Ramos, 2011).

2.3.Morfología y estructura

Es un bacilo corto o cocobacilo que mide de 0,5 – 0,8 um x 1-3,5 um, anaerobio estricto, gram negativo siendo considerado un comensal de la cavidad oral. Su pared presenta una membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. A nivel superficial presenta vesículas que contienen enzimas que juegan el rol de virulencia, así como enzimas con la capacidad de degradar compuestos proteicos (Ramos, 2011). Cuando existe crecimiento en agar sangre se observa al principio de color amarillo o crema y después de 4 días a 8 días colonias de color negro que va desde el borde hasta el centro debido a la capacidad de captar hierro y hemoglobina del medio de cultivo (Moreno & Contreras, 2013).

2.4.Factores de virulencia

2.4.1. Endotoxina

Presenta en la membrana externa compuesta por una parte por el lípido A que interrumpe la homeostasis inmunología del huésped, ocasiona inflamación gingival,

asociada a la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar por la activación de osteoclastos y causa liberación de prostaglandinas, incremento de IL18 y IL1B (Ramos, 2011). Las colonias de *P. Gingivalis* después de invadir la célula epitelial pueden inhibir la producción de IL-8 haciendo que no migre el neutrófilo al surco gingival con el fin de eliminar el patógeno intracelular como extracelular, este mecanismo conocido como parálisis local de quimoquinas (Moreno & Contreras, 2013).

2.4.2. Cápsula

Está compuesto por polisacáridos siendo un gen codificante de epimerasa *epsC* esencial para su síntesis, existiendo 6 serotipos capsulares de K1- K6. Este gen es importante para la evasión del sistema inmunológico, elude la fagocitosis, opsonización y accionar del complemento (Ramos, 2011). Según Moreno y Contreras (2013) “Las cepas de *P. gingivalis* encapsuladas son más virulentas que las no encapsuladas. Las cepas no encapsuladas fueron menos invasivas y generaron abscesos localizados, mientras que las cepas encapsuladas resultaron más invasivas y generaron infecciones más severas” (p. 22).

2.4.3. Vesículas de membrana externa

Son sacos cerrados a nivel externo de la bacteria con enzimas como fosfolipasa C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas, lipopolisacáridos que al ser liberadas producen daño de las células periodontales y neutrófilos (Ramos, 2011). Para ayudar a la invasión bacteriana una variedad de enzimas producidas ayudan a proveer nutrientes a la bacteria y otras son para destruir las moléculas de defensa protegiéndose de la fagocitosis (Moreno & Contreras, 2013).

2.4.4. Hemaglutininas

Ubicadas en la membrana externa que inducen a la aglutinación de eritrocitos debido que la bacteria requiere hemo para utilizarlo en su crecimiento dentro del huésped

(Moreno & Contreras, 2013). Proteínas codificadas por el gen *hag* y estas pueden ser 5 de A-E ayudan promoviendo la colonización por mediación de la unión bacteriana a receptores oligosacáridos en células humanas (Ramos, 2011). Durante la enfermedad *P. gingivalis* libre vesículas que contienen lipopolisacáridos las que invaden los tejidos periodontales y activan la proliferación de citoquinas en macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales siendo reconocidas por las células presentadoras de antígenos desencadenando la respuesta inmune específica en el hospedero (Díaz, Yáñez, Melgar, Álvarez, & Rojas, 2012).

2.4.5. Proteasas de tripsina

Las colonias de *P. gingivalis* son asacarolíticas por no depender de azúcar para degradar proteínas del huésped para obtener energía debido a ello una proteasa semejante a la tripsina desdobla grandes proteínas en pequeños péptidos que promueven mecanismos de crecimiento y multiplicación dentro del huésped, las bacterias que tienen proteasas semejantes a tripsina son *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia* (Moreno & Contreras, 2013).

2.4.6. Hemolisina

En las colonias de *P. gingivalis* para que se encuentren en condiciones necesarias de crecimiento requiere moléculas de hemina para su crecimiento y tiene gran habilidad para partir de proteínas grandes. Moreno y Contreras (2013) afirman:

La Hemolisina es una proteína que capta el hierro y es capaz de generar lisis de glóbulos rojos en el laboratorio, in vivo genera lisis de estas células en los confines de la bolsa periodontal, se encontraron 2 tipos de hemolisinas 48 kDa y 18 kDa. Las vesículas de membrana externa inactivan completamente la actividad bactericida

del suero humano, esta inhibición también fue observada en el lipolisacarido, por lo tanto se cree que es una función compartida (p.25).

2.4.7. Fimbria.

Según Díaz, Yáñez, Melgar, Álvarez, y Rojas (2012) "La fimbria es una estructura filamentosa localizada en la superficie de *P. gingivalis* que le permite al microorganismo invadir los tejidos periodontales y colonizar la cavidad oral" (p.41).

Presentes en forma peritrica de 0.3 a 3.0 um de largo y de 5nm de ancho compuestos por monómeros de fimbrilina, codificados por el gen *fimA*. Le dan la capacidad de unirse a diferentes sustratos, moléculas y células como epiteliales, fibrinógeno, fibronectina y lactoferrina (Ramos, 2011).

2.4.8. Proteinasa cisteinproteasas

Le otorgan nutrición para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño colateral a huésped degenerado el colágeno de diferentes tipos. Estas proteínas son llamadas *gingipaínas* produciendo el 85% de la actividad proteolítica generada por *P. gingivalis* y el 100% de la actividad tipo tripsina (Ramos, 2011). Las *gingipaínas* son un grupo de proteasas pertenecientes al grupo *trypsin-like cystein proteinases*, que contienen dominios de separación catalítica y de adhesión hemaglutinínico (Díaz, Yáñez, Melgar, Álvarez, & Rojas, 2012). La actividad de estas es la degradación de fibronectina, fibrinógeno y de las uniones de las células epiteliales, activación del sistema de coagulación y sistema calicreina quinina (Ramos, 2011).

2.5.Fisiopatología

Al ingresar un microorganismo potencial patógeno periodontal por primera vez en la cavidad oral el reto es llegar al surco gingival, en algunos casos pueden movilizarse directo hacia la zona subgingival por sustancia quimioatrayentes, en cambio los

microorganismos no móviles están a merced o bajo los beneficios de los amortiguadores del flujo salival o con mayor probabilidad se localizan en zonas remotas o alejadas a la zona subgingival (Lamont et al., 2015).

P. gingivalis es considerado como un colonizador secundario, comensal del surco gingival, que llega por contagio o transmisión por individuos infectados, por medio de la saliva. Su capacidad de adherirse por sus fimbrias peritricas tipo Ib, así como vesículas de membrana Hemaglutininas, capsula le permiten dar el paso de la colonización del surco, en un periodo de 20 minutos, pudiendo replicarse dentro de ellas y diseminarse a las células de alrededor (Ramos, 2011).

Las cepas de *P. gingivalis* son capaces de invadir las células epiteliales de bolsas periodontales humanas o de surcos esta invasión de las células periodontales es una propiedad común a una amplia gama de patógenos mucosos por lo que existen mecanismos de adhesión y el ingreso posterior difiere entre las diferentes especies pero la ventaja la obtienen a la capacidad de protegerse de los mecanismos de defensa del huésped (Lindhe & Karring, Periodontologia clinica e implantologia odontologica, 2008).

CAPÍTULO III

3. Tratamiento farmacológico

3.1. Antecedentes

Antes del siglo XX muchas personas morían no por la vejez sino entre los 30 y 50 años e incluso en la infancia y la mayoría de una enfermedad infecciosa para lo cual no había tratamiento o cura. La Quimioterapia inicio en 1910 con Paul Ehrlich con la introducción de la asfenamina utilizado para el tratamiento de la sífilis y luego para tratar la tripanosomosis africana; uno de los primeros fármacos la optoquina se usó para infecciones de *Streptococcus pneumoniae* , posteriormente Alexander Fleming, realizo investigación en bacteriología haciendo estudios de *Staphylococcus aureus* dentro del cultivo que se había realizado observo un moho que inhibió la proliferación de las bacterias y se identificó como *Penicillium notatum*. Howard Florey después de 10 años de Fleming purificó la penicilina y creo un método para su producción en grandes cantidades, la penicilina resulto ser vital para militares durante el resto de la Segunda Guerra Mundial dado que se podían evitar de manera eficaz las infecciones en heridas de los militares o después de una cirugía (Leblanic, 2015).

Debido al acceso de la infección en la enfermedad periodontal nos permite escoger la forma de administrar antibióticos no solo la vía sistémica sino también la aplicación local, cada uno de los métodos tiene ventajas y desventajas específicas en la vía sistémica posibilita tratar múltiples bolsas simultáneamente y también alcanzar otros lugares de la cavidad bucal que pueden funcionar como reservorios de bacterias, esta característica favorable tiene también desventajas como reacciones adversas más frecuentes y un mayor riesgo de causar resistencias bacterianas lo que se traduce por limitaciones a nivel de dosis y terapéutica a utilizar (Costa, SÁ, Almeida, & Bascones, 2012).

3.2. Definiciones

“Antimicrobiano: molécula natural (...), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos” (Seija & Vignoli, 2008, p.631).

Sustancia quimioterápica es un término general para un agente químico que brinda un beneficio terapéutico clínico. Este concepto no especifica de qué manera la sustancia ayuda a lograr una mejoría clínica. Los beneficios pueden derivar de acciones antimicrobianas o del aumento de la resistencia del huésped (Jolkovsky & Ciancio, 1997-1998, p. 715).

Los antibióticos betalactámicos pueden ser de origen natural o semisintético que se caracterizan por ser la familia más utilizada y numerosa de antimicrobianos caracterizándose por poseer un anillo betalactámico inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana (Seija & Vignoli, 2008). La amoxicilina es una penicilina semisintética con un espectro extendido que incluyen diferentes bacterias como grampositivas y gramnegativas, es de utilidad para el tratamiento con pacientes con periodontitis agresiva tanto en su forma localizada y generalizada (Jolkovsky & Ciancio, 1997-1998).

3.3. Amoxicilina + ácido Clavulánico

Las combinaciones de amoxicilina con ácido clavulánico es sensible para las enzimas de penicilinasas producidas por las bacterias, esta combinación es útil para el tratamiento de periodontitis refractaria o agresiva localizada además que este fármaco detiene la pérdida de hueso alveolar en personas con enfermedad periodontal en la terapia con otros antibióticos, incluidos a tetraciclina, metronidazol y clindamicina (Jolkovsky & Ciancio, 1997-1998).

3.3.1. Datos Farmacéuticos

3.3.1.1. Composición cualitativa y cuantitativa

La presentación de la amoxicilina con ácido clavulánico tenemos en sólido oral (500mg + 125mg), sólido oral polvo (125mg +31.25mg)/5ml, sólido oral polvo (250mg +62.5mg)/5ml y sólido parenteral (1000 mg +200mg) (Ministerio de Salud Pública del Ecuador , 2014).

En la presentación de 500mg/125mg contiene 574,00 mg de amoxicilina equivalente a 500 mg y 148,9 mg de clavulanato potásico equivalente a 125mg de ácido clavulánico junto a otros componentes como: estearato de magnesio, talco, povidona, celulosa microcristalina y croscarmelosa sódica. El período de validez del fármaco después de su elaboración es no mayor a los 3 años conservando en temperaturas menor a 25°C, luego de su periodo de vigencia no existe condiciones especiales para la eliminación tan solo seguir la normativa de acuerdo al establecimiento donde haya estado almacenado (AMPS, 2017).

3.3.2. Datos clínicos

3.3.2.1. Indicaciones terapéuticas

Está indicado para el tratamiento de infecciones en adultos y niños de sinusitis bacteriana aguda, otitis media aguda, exacerbación aguda de bronquitis crónica, neumonía adquirida en la comunidad, cistitis, pielonefritis, infecciones de la piel y tejidos blandos como celulitis, mordedura de animales, abscesos dentales severos con celulitis diseminada, infecciones de huesos y articulaciones como osteomielitis, infecciones respiratorias altas y bajas, infecciones del tracto urinario, aborto séptico, sepsis puerperal y sepsis intraabdominal (AMPS, 2017 y Ministerio de Salud Pública del Ecuador , 2014).

3.3.2.2.Posología

Se expresa en función de Amoxicilina y se administra dosis orales luego de una comida o con leche, para administrar se debe tener en cuenta los patógenos esperados y la posible sensibilidad a agentes antibacterianos, la gravedad y el sitio de la infección, la edad, peso y función renal del paciente; en niños ≤ 2 -5 años 90mg/kg/día con 6.4 mg /kg/día de ácido clavulánico, vía oral divididos entre 8 horas, 7 – 10 días; >3 meses y < 40 Kg: 25-50 mg/kg/día dividido en 2 dosis ó 20 – 40mg kg/día/día dividido c/8horas; >40 kg: 500 – 875g vía oral cada 8 horas (Ministerio de Salud Publica del Ecuador , 2014).

3.3.2.2.1. Neumonía adquirida en la comunidad

Adultos la dosis es 1.2g intravenosa cada 8 horas por 7- 10 días con posibilidad de vía oral cuando esté disponible 1 a 2 g vía oral cada 12 horas hasta complementar 7 a 10 días, en niños ≥ 3 meses y < 40 kg: 90mg/kg/día vía oral cada 8 horas por 5 – 10 días, >40 kg: 2000 mg vía oral cada 8 horas por 7 a 10 días (Ministerio de Salud Publica del Ecuador , 2014).

3.3.2.2.2. Sinusitis

Adultos: 500 mg/125mg vía oral cada 8 horas o 875 mg/125mg vía oral cada 12 horas por 5 a 7 días, en sinusitis leve- moderada adultos: 500mg vía oral cada 12 horas o 250 mg cada 8 horas y en niños de 3 meses y <40 kg: 25mg – 45 mg/kg/día vía oral cada 12 horas por 10 a 14 días (Ministerio de Salud Publica del Ecuador , 2014).

3.3.3. Contraindicaciones

Es contraindicado en hipersensibilidad a los principios activos, las penicilinas, o a alguno de los excipientes, antecedentes de reacciones de hipersensibilidad inmediata grave a otros agentes betalactámicos y pacientes con antecedentes de ictericia o insuficiencia

hepática, uso concomitante con hemodiálisis (AMPS, 2017 y Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2014).

3.3.4. Precauciones

Alergias a múltiples alérgenos, pueden ocasionar reacciones anafilácticas severas que pueden llegar a ser fatales; no se recomienda su uso concomitante con probenecid; en colitis pseudomembranosa por *Clostridium difficile*; en adultos mayores con insuficiencia renal por el incremento de riesgo de toxicidad; en insuficiencia hepática reportándose hepatitis, colestasis, ictericia; en mononucleosis infecciosa incrementa el riesgo de rash eritematoso; fenilcetonuria; epilepsia; personas con falla renal debe recibir dosis ajustadas a su condición (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2014).

3.3.5. Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción

Los anticoagulantes orales y las penicilinas se han usado ampliamente en la práctica clínica sin embargo los pacientes con tratamiento con warfarina o acenocumarol a los que se prescribe amoxicilina es necesaria la coadministración se deben controlar cuidadosamente los tiempo de protrombina o de ser necesario ajustar la dosis de los anticoagulantes orales; con metatrexato pueden reducir la excreción de este fármaco causando toxicidad; con el probenecid no se recomienda su uso concomitante pues disminuye la secreción tubular renal de amoxicilina además de aumentar y prolongar los niveles plasmáticos de amoxicilina aunque no de los de ácido clavulánico (AMPS, 2017).

3.3.5.1. Embarazo y lactancia

Los estudios en animales no han demostrado los efectos perjudiciales directos o indirectos con respecto al embarazo durante el desarrollo embrionario, fetal parto o desarrollo postnatal, además no indican un mayor riesgo de malformaciones congénitas es por esto que se lo ha colocado en la categoría B; en la lactancia no se excreta en la leche materna

por lo tanto podrían producirse diarrea e infección fúngica de las mucosas en el lactante y la lactancia debería ser interrumpida, no se ha realizado estudios para los efectos sobre la capacidad de conducir y utilizar maquinas sin embargo pueden producirse efectos adversos como alergias, mareos convulsiones, etc (AMPS, 2017).

3.3.6. Efectos adversos

Frecuentes: dermatitis de contacto, diarrea especialmente en administración oral, nausea, vomito, infecciones micóticas, vaginitis; poco frecuente: anafilaxia, distensión abdominal, coloración oscura de la lengua, candidiasis, dolor torácico, disuria, angioedema, síndrome de Stevens Jhonson, necrosis epidérmica toxica. Dermatitis exfoliativa, eritema multiforme, reacciones similares a la enfermedad del suero, asma, epistaxis, cefalea, flatulencia, glositis, colestasis, hepatotoxicidad, hepatitis; Raros: colitis pseudomembranosa, neutropenia, leucopenia, anemia hemolítica, trombocitopenia o disfunción plaquetaria, convulsiones, alucinaciones; Muy raros: agranulocitosis, anemia hemolítica, angioedema, anafilaxia, vasculitis, reacciones similares a la enfermedad del suero, coloración oscura de la lengua, colitis causada por antibióticos (Ministerio de Salud Publica del Ecuador , 2014).

3.3.7. Propiedades Farmacológicas

3.3.7.1. Propiedades Farmacodinámicas

3.3.7.1.1. Mecanismo de acción

La amoxicilina inhibe una o más enzimas en la ruta biosintética del peptidoglicano bacteriano produciendo un debilitamiento de la pared celular, que luego va seguido de la lisis celular y la muerte, la amoxicilina es sensible a la degradación por las beta-lactamasas producida por las bacterias por lo que junto al ácido clavulánico inactiva algunas de las enzimas betalactamasas y previene la inactivación de amoxicilina por lo

mismo el ácido clavulánico no ejerce un efecto antibacteriano útil en la práctica clínica, los dos mecanismos de resistencia son: la inactivación por las betalactamasas que son inhibidas por el ácido clavulánico, alteración de las proteínas que se unen a la penicilina que reducen la afinidad del agente bacteriano (AMPS, 2017).

3.3.7.2. Propiedades Farmacocinéticas

3.3.7.2.1. Absorción

La amoxicilina y el ácido clavulánico se disocian completamente en solución acuosa a pH fisiológico. Ambos componentes se absorben bien y rápidamente tras la administración por vía oral. La absorción es óptima cuando el medicamento se toma al principio de las comidas. Tras la administración oral, la amoxicilina y el ácido clavulánico alcanzan una biodisponibilidad aproximada del 70%. Los perfiles plasmáticos de ambos componentes son similares y el tiempo para alcanzar la concentración máxima en cada caso es de aproximadamente 1 hora (AMPS, 2017).

3.3.7.2.2. Eliminación

La vía principal de eliminación de amoxicilina es la vía renal, mientras que el ácido clavulánico se elimina por mecanismos tanto renales como no renales. Amoxicilina/ácido clavulánico tiene una semivida de eliminación de aproximadamente una hora y una media en sujetos sanos y aproximadamente el 60 - 70% de la amoxicilina y de un 40 a un 65% del ácido clavulánico se excretan inalterados por la orina durante las primeras seis horas tras la administración de amoxicilina/ácido clavulánico 250 mg/125 mg ó 500 mg/125 mg comprimidos, en el caso del ácido clavulánico, la mayor parte del fármaco se excreta en las 2 primeras horas tras la administración (AMPS, 2017).

CAPITULO IV

4. Propóleo en periodoncia

El propóleo es uno de los productos de la colmena con cualidades terapéuticas conocidas desde muchos años es una sustancia parecida a una resina pegajosa que las abejas obtienen de las resinas de la corteza de ciertos árboles y junto con la saliva y cera de abejas, dentro de la colmena es usada como sellador de cualquier tipo de espacio o rotura con el fin de proteger la colonia de abejas invasoras, es un gran antiséptico para prevenir infecciones en lugares donde se crían las larvas o donde se guarda la miel es por ello que lo colocan en zonas donde esté libre de gérmenes (Felitti, 2014).

4.1.Composición

Existe dos versiones sobre la procedencia del propóleo una es que las abejas recolectan con sus mandíbulas y toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas como sauce, abedul, pino y algunas plantas herbáceas, al llegar a la colmena las obreras descargan el propóleo; la otra teoría manifiesta que se trata de un producto resultante de la digestión del polen y que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el intestino medio finalmente esta composición es sumamente compleja cada región presenta diferentes condiciones de flora diversa, fenómenos locales, influenciados por la temperatura, las precipitaciones, tipo de suelo, humedad relativa y brillo solar; entre las principales componentes tenemos: resinas y bálsamos aromáticos (50-55%), cera (7.5 – 3.5 %), polen (4-5%), sustancias orgánicas y minerales (5%) (Villar & Celi, 2004).

4.2.Características Organolépticas

Aspecto: Durante la recolección puede ser de forma de esfera, granos , briquetas;
Estructura: Espesa no homogénea, presencia de impurezas mecánicas y de cera el cual depende del método de cosecha, pero no debe ser excesivo; Color: Verde oscuro, amarillo,

amarillo-verdoso, pardo, pardo rojizo, pardo oscuro hasta negro; Consistencia: A temperatura superiores a 30°C es blando y menores de 15°C duro y quebradizo; Olor: Resinoso, aromático denota la presencia de aceites esenciales y miel del producto, pero existen propóleos sin olor; Sabor: Es generalmente amargo, picante e insípido en raras ocasiones (Collahuacho, 2010).

4.3. Propiedades del propóleo

La principal propiedad es la antibacteriana ya que es importante sobre gram positivo como gram negativo, los principales responsables son los flavonoides como la galangina y pinocembrina en particular con *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Streptococcus mutans*; Por su acción antimicótica se han obtenido excelentes resultados en micosis cutáneas, bucales e incluso genitales causadas por *Cándida albicans*; el propóleo inactiva los virus de herpes simple tipo 1 y 2, los flavonoides como apigenina, acacetina y pectolinarigenina que principalmente están presentes en la yemas del álamo y del abedul están relacionadas con esta actividad; la propiedad antiinflamatoria y analgésica se da por la presencia de flavonoides como la galangina capaz de inhibir la ciclooxigenasa y la actividad lipo oxigenasa, del mismo modo el éster fenil ácido cafeico muestra actividad antiinflamatoria inhibiendo la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular lo que conduce a la suspensión de la COX-1 y COX-2; finalmente la propiedad cicatrizante favorece la cicatrización estimulando la regeneración epitelial y microcirculación por ello se utiliza junto con la miel en forma de apósitos o vendajes en el tratamiento de heridas y lesiones ulcerosas de diferente etiología (Villar & Celi, 2004).

4.4. Mecanismo de Acción

La actividad antimicrobiana es mayor contra las bacterias gram positivas que las gram negativas debido a la capacidad de los flavonoides como también del fenil éster del

ácido cafeico cuyo mecanismo se basa en la inhibición de la ARN polimerasa bacteriana, además en degradar la membrana citoplasmática de las bacterias lo que conduce a una pérdida de iones de potasio provocando lisis celular en cambio la quercetina aumenta la permeabilidad de la membrana y disipa su potencial haciendo que las bacterias pierdan su motilidad, transporte de membrana y síntesis de ATP convirtiéndolas vulnerables al ataque inmunológico y potenciando a los antibióticos (Collahuacho, 2010).

A nivel periodontal el propóleo ha demostrado propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas anestésicas y cicatrizantes en casos de gingivitis crónicas y úlceras bucales recurrentes y para mejorar el tratamiento periodontal actuando a nivel de la placa supragingival ayudando a la recuperación de los tejidos y estimulando la respuesta inmune local, además a nivel antiinflamatorio inhibe la síntesis de prostaglandinas y ayuda al sistema inmune promoviendo la fagocitosis y a la respuesta inmune (Felitti, 2014).

CAPÍTULO V

5. Medios de cultivo

El cultivo en medios no selectivos de amplio espectro como el agar sangre permite el desarrollo de muchas especies orales, una muestra oral suele producir una impresionante gama de morfologías coloniales y puede ser difícil separar especies individuales de la mezcla y es posible que las bacterias ni siquiera se vean en cambio los medios selectivos con ingredientes que inhiben la proliferación de todas salvo de unas pocas especies pueden ser muy útiles para aislar especies individuales (Leys, Griffen, Beall, & Maiden, 2015).

“Un medio de cultivo es una solución en la que están presentes todas las sustancias necesarias para el crecimiento de un(os) determinado(s) microorganismo(s)” (Farmacéuticas, 2018).

5.1. Clasificación de Medios de Cultivo

De acuerdo a su composición pueden ser complejos o indefinidos su composición química exacta se desconoce, ya que son el producto de realizar infusiones y extractos de materiales naturales complejos; sintéticos o definidos se obtienen disolviendo en agua destilada cantidades concretas de distintas sustancias químicas puras, orgánicas y/o inorgánicas; de acuerdo a su consistencia son sólidos derivan de los líquidos simplemente añadiendo a la solución nutritiva un coloide en estado de gel que solidifica a esta solución; semisólidos si se agrega una cantidad de coloide en estado de gel menor que la adicionada a los medios sólidos; líquidos sin gelificante y finalmente otras clasificaciones permite diferenciarlos en selectivos aquellos que permiten seleccionar un tipo (o unos pocos tipos) de microorganismos y diferenciales aquellos que permiten distinguir a simple vista dos o más tipos de bacterias en función de su distinto comportamiento respecto de algún nutriente del medio (Farmacéuticas, 2018).

5.2.Siembra y transferencia de microorganismos

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra en un medio adecuado con el fin de iniciar un cultivo microbiano es necesario mantener la habitación sin corrientes de aire y estar al lado de la llama de un mechero o bajo campana o flujo laminar previa esterilización con luz UV; para realizar la siembra puede realizar en medio líquido, solido o semisólido utilizando ansa, hilo o bien hisopo o pipeta estéril que se deberá esterilizar en la llama hasta alcanzar al rojo vivo para después dejar enfriar y comenzar a transferir los microorganismos, se recomienda para un medio líquido a medio liquido utilizar una pipeta Pasteur ansa o hilo, para medio líquido a solido utilizar pipeta Pasteur ansa, hilo e hisopo; para medio solido ha solido utilizar ansa o hilo y de solido a medio liquido ansa o hilo, luego de sembrado se deberá incubar a temperatura adecuada para el crecimiento (Fernández, 2014). Tipo de siembra se realiza por agotamiento de ansa: Se flamea el ansa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se realizan estrías en dos placas en forma consecutiva sin recargar el ansa (Farmacéuticas, 2018).

5.3.Métodos para incubar en anaerobiosis

Puede recurrirse al uso de tubos con pirogalol o velas, pero más frecuentemente suelen usarse jarras anaerobias de las cuales existen varios tipos generalmente todas ellas se basan en el mismo principio que es extraer el oxígeno o, mejor dicho, consumirlo, el material de la jarra suele ser plástico, vidrio o metal con una tapa que asegura el cierre hermético en algunos casos se puede usar los sobres generadores de ambiente anaerobio que son a base aluminio y contienen dos tabletas de ácido cítrico, bicarbonato de sodio y borohidruro de sodio (Fernández, 2014).

5.4.Tinción de gram

“Es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas” (Jácome, et al, 2014, p.12) .

Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales (Jácome, y otros, 2014) .

5.5.Sensibilidad antimicrobiana

Es posible realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos en bacterias cultivadas una de las pruebas más usadas es la prueba de disco difusión donde discos impregnados con antibiótico se aplican a una caja petri que ha sido inoculada con bacteria y se incuba la placa, la zona de inhibición del desarrollo alrededor del disco es proporcional a la susceptibilidad de la bacteria al antimicrobiano (Leys, Griffen, Beall, & Maiden, 2015).

5.6.Método de Kirby Bauer

En este método se emplean discos de papel absorbente, impregnados con una concentración de antimicrobiano, mismo que se colocan en la superficie de una placa de agar de Muller-Hinton de 4mm de espesor la que se inoculó una suspensión de la cepa por probar, con una turbiedad equivalente al tubo de 0,5 de nefelómetro de McFarland; cuando el disco se humedece, el antimicrobiano difunde radialmente hacia fuera y crea un

gradiente de concentración por disco, así el antimicrobiano está en alta concentración cerca del disco y va disminuyendo a medida que se aleja del disco. El diámetro del anillo de inhibición dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo por probar, así como también de la solubilidad de la droga y de la tasa de difusión a través del agar. Por eso es importante controlar muy bien el medio de cultivo, su espesor, el tiempo de incubación y la concentración de bacterias inoculadas, entre otros factores (Rodríguez, Gamboa, Hernández, & García, 2016).

5. METODOLOGÍA

El presente estudio es de tipo: analítico, experimental y comparativo realizado en el cantón Loja de la Provincia de que se encuentra al sur del Ecuador, y las instalaciones del centro de análisis químico de la Universidad Nacional de Loja.

La población la constituyen las bacterias periodontopatógenas determinando la muestra conformada por 10 unidades muestrales en dos grupos de medicamentos establecidos en 10 cajas petri de cultivos bacterianos de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33227 sometidas a igual de condiciones.

Grupo experimental (Ge) *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33227

1 Imepenem (control positivo)

2 Amoxicilina más ácido clavulánico (prueba)

3 Extracto de propóleo al 50% (prueba)

4a disco en blanco (control negativo)

4b etanol (control negativo)

G1 (1- 2 – 4a)

G2 (1- 3- 4b)

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión es la tintura de propóleo al 50% de la ciudad de Loja, los discos para sensibilidad de Amoxicilina más ácido clavulánico y el disco para sensibilidad de Imepenem; por lo contrario los criterios de exclusión son los halos de inhibición traslapados e incompletos, las cajas petri contaminadas y en mal estado y la tintura de propóleo con diferente concentración.

Procedimientos

Fase 1: Preparación de sustancias de trabajo

Tintura de Propóleo al 50% de la ciudad de Loja

Se realizó bajo la asesoría técnica del centro apícola API – LOJA ubicado al norte de la ciudad en la planta de procesamiento de productos derivados de las abejas en el barrio la Banda, el extracto de propóleo obtenido se encuentra en una temperatura promedio de 18°C y a 2.060 msnm (Anexo 2).

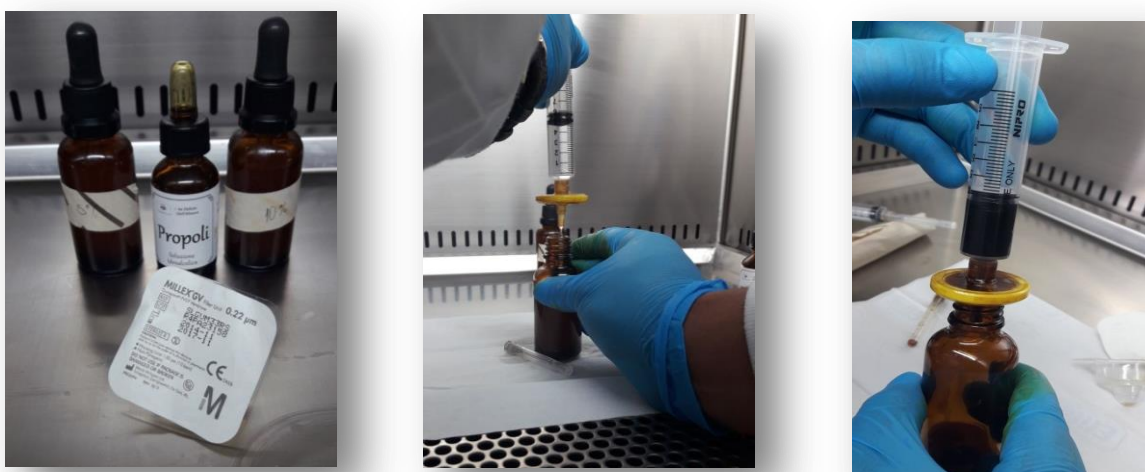


Fig. 1 Preparación y esterilización de tintura de propóleo al 50%
Fuente: Maza, 2018

Preparación de solución Vitamina K

Se prepara una solución madre de 10 ml de Vitamina K como parte del enriquecimiento para el medio de cultivo agar sangre necesario para el crecimiento de la cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33227 (Anexo 3).

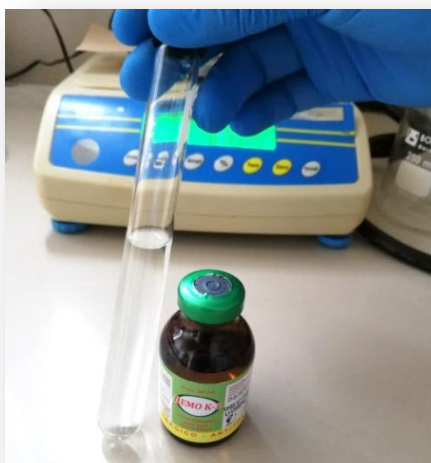


Fig. 2 Preparación de Vitamina K
Fuente: Maza, 2018

Preparación de solución Hemina

Como parte de las soluciones enriquecedoras para el crecimiento de la cepa bacteriana *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33227 se prepara una solución madre de 50 ml de hemina que es perteneciente al grupo farmacológico hemo resultando una variante de la hemoglobina incapaz de captar oxígeno (Anexo 4).



Fig. 3 Preparación de Hemina
Fuente: Maza, 2018

Viabilización de la cepa bacteriana

Según las indicaciones del fabricante y la hoja de seguridad se obtuvo la muestra de la cepa estandarizada por American Type Culture Collection *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33227 facilitados por la casa comercial MEDIBAC (Anexo 5).

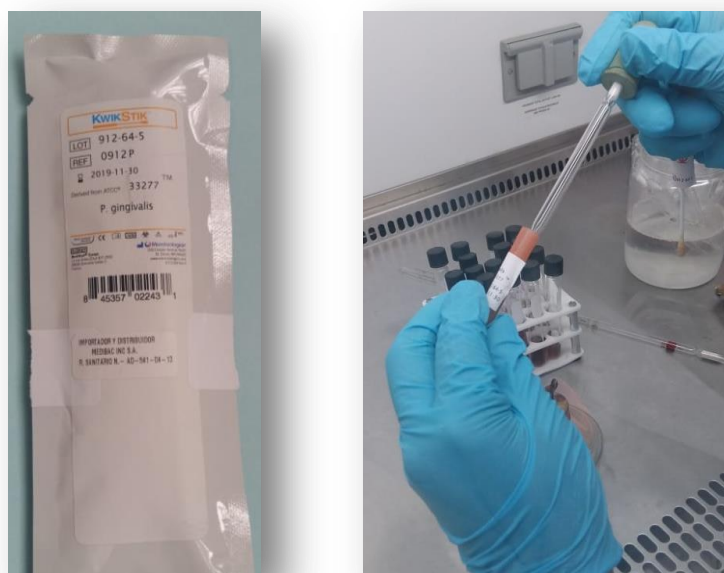


Fig. 4 Viabilización de cepa ATCC 33227
Fuente: Maza, 2018

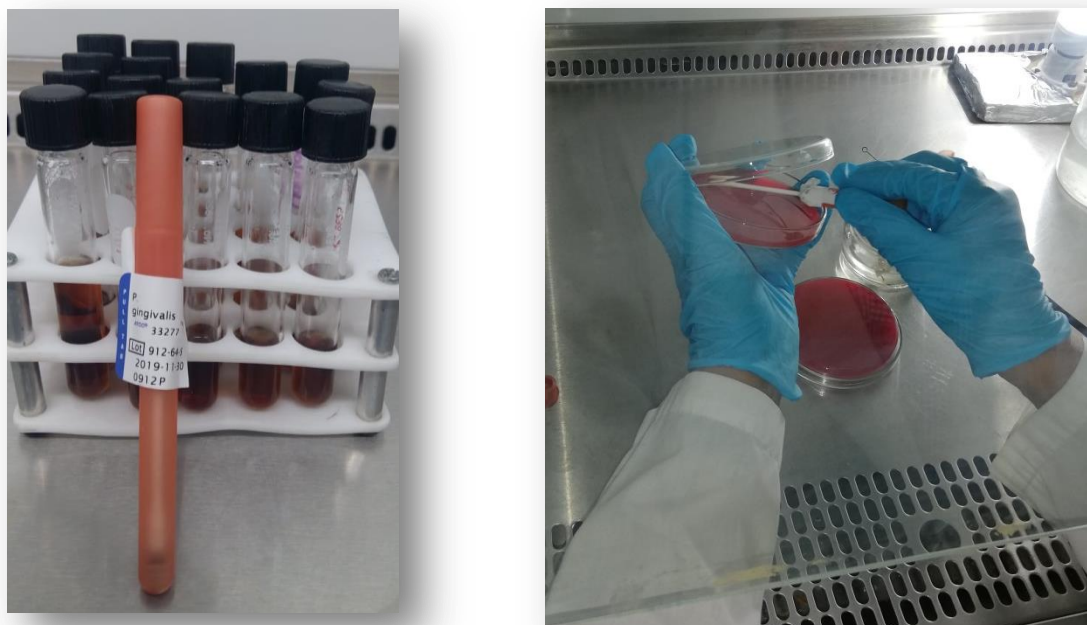


Fig. 5 Siembra en Agar Sangre con Vitamina K y Hemina
Fuente: Maza, 2018

Medio de cultivo Agar Sangre enriquecido con Vitamina k y hemina

La preparación de 100ml de cultivo agar sangre se parte del agar base y agregando la cantidad equivalente al 5% de sangre humana tipo ORH + siguiendo las concentraciones del fabricante a este medio se le agregó las soluciones enriquecedoras de 50ul de vitamina k y 50ul de hemina, se dejó gelificar y almacenar en refrigeración (Anexo 6).

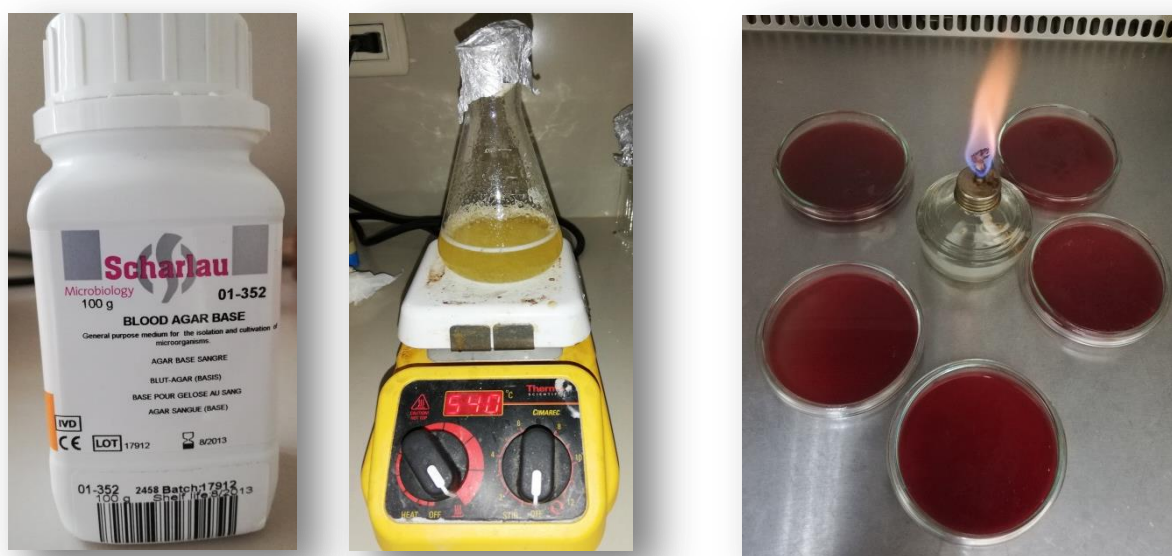


Fig. 6 Preparación de Agar Sangre
Fuente: Maza, 2018

Medio de cultivo Muller Hinton

Se prepara los medios de cultivo agar Muller Hinton que ha sido recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) como medio universal para las pruebas de sensibilidad, medio no selectivo y no diferencial con un pH de 7.1 a esto se le agregó las soluciones enriquecedoras de Vitamina K y Hemina por lo indispensable que son para el crecimiento de la cepa bacteriana, se almacenó en refrigeración para su uso posterior (Anexo 7).

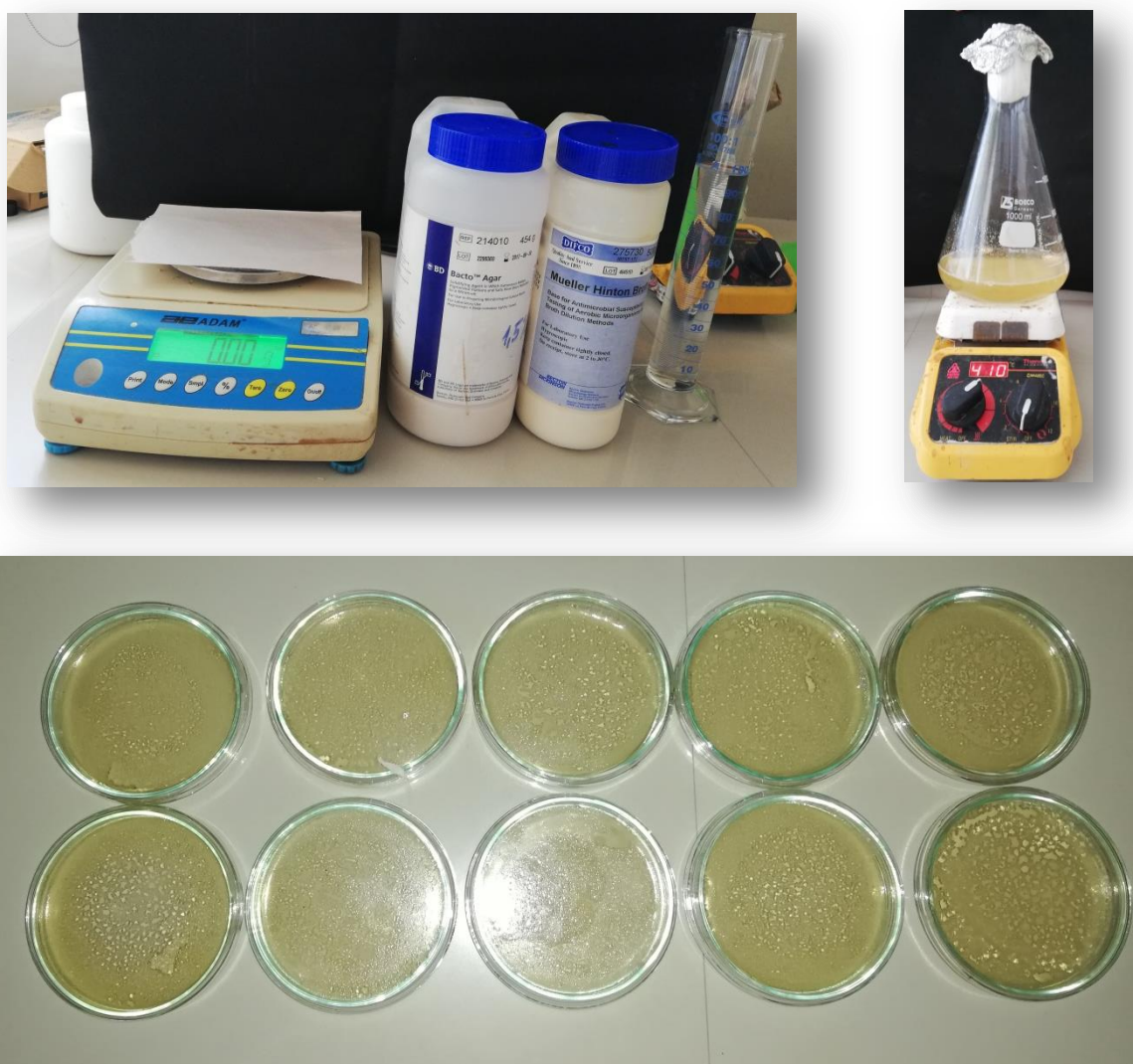


Fig. 7 Preparación de Agar Muller Hinton y distribución en cajas Petri
Fuente: Maza, 2018

Fase 2

Siembra de la muestra

Procedimiento de introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura de 37°C en anaerobiosis entre 3 a 7 días que es el adecuado para el crecimiento bacteriano. El método más usual para la siembra es la técnica de estría en la cual podemos obtener colonias aisladas en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies (Anexo 8).



Fig. 8 A. Siembra de cepa bacteriana luego de realizar la viabilización B. Crecimiento de colonias bacterianas a las 96 horas de incubación
Fuente: Maza, 2018

Tinción de Gram

Procedimiento Microbiológico para la observación microscópica utilizando soluciones o tinciones que serán para identificar de acuerdo a la permeabilidad de la membrana bacteriana los microorganismos gram positivos o negativos la cual se toma una colonia sobre un portaobjetos y fijada al mechero (Anexo 9).

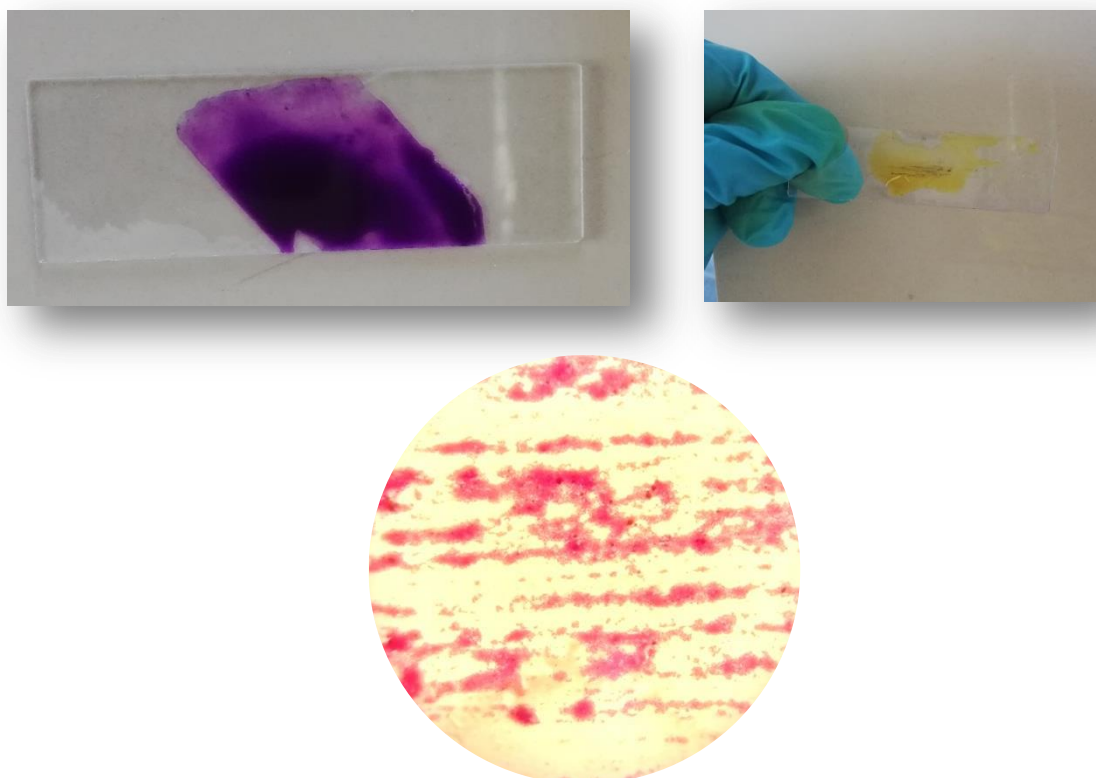


Fig. 9 A. Desarrollo de Tinción de Gram B. Observación microscópica de bacteria Gram Negativa (*Porphyromonas Gingivalis*)
Fuente: Maza, 2018

Estándar de turbidez

Para preparar este estándar añadir solución salina aproximadamente 4 ml junto con una o dos colonias de la bacteria, mezclar perfectamente y distribuir en tubos tapa rosca 13 x 100 sellar herméticamente y almacenarlos en un lugar oscuro a temperatura ambiente, para hacer la comparación con el cultivo, se debe agitar el estándar preferiblemente con un agitador tipo vortex (Anexo 10)



Fig. 10 Estándar de turbidez McFarland
Fuente: Maza, 2018

Preparación de discos de sensibilidad

Se tratan de pequeños discos en blanco los cuales contienen una cantidad específica del antimicrobiano (con posibles principios activos antimicrobianos), a los discos se lo empapó con la solución de tintura de propóleo al 50% con 20ul de la solución, aproximadamente 10mcg de propóleo por disco para la prueba y para el control negativo se le impregnó con 20ul de alcohol etílico al 70%, esto se lo dejó reposar por 1 hora y luego colocarlo en las cajas petri con el agar Muller Hinton (Anexo 11).



Fig. 11 A. Material utilizado para impregnación de discos B. Impregnación de 20ul de etanol al 70%(control negativo) C. Impregnación de 20ul de Propóleo al 50% (control positivo)
Fuente: Maza, 2018

Sensibilidad antimicrobiana: Método Kirby Bauer

Su utilización está limitada a bacterias aerobias y anaerobias, 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 72 horas debido al crecimiento lento de la cepa (Anexo 12).

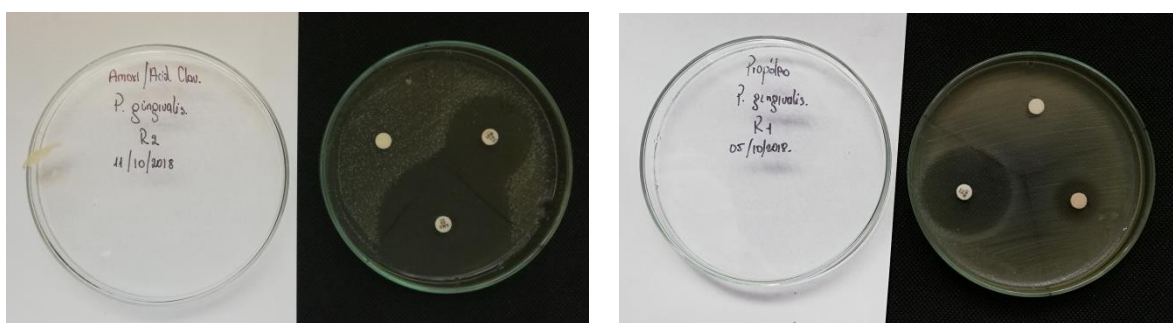


Fig. 12 A. Halo inhibitorio de Amoxicilina - Ácido clavulánico B. Halo inhibitorio de Propóleo
Fuente: Maza, 2018

6. RESULTADOS

Análisis de los resultados

El alcohol al 70% (control negativo) no produjo crecimiento del halo inhibitorio con respecto del crecimiento obtenido con el betalactámico (control positivo).

La comparación del efecto de la tintura de propóleo y de la amoxicilina + ácido clavulánico toma como valor de línea de base el crecimiento obtenido en el control positivo con el disco de 10 ug de imipenem. La sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos periodontopatógenos estará determinada por el crecimiento del halo inhibitorio en una relación inversamente proporcional.

Tintura de Propóleo vs Imipenem

La tabla 1 muestra que el diámetro inhibitorio producido por la acción del imipenem fue de 34.2 ± 0.8 mm en tanto que el halo del propóleo tuvo un promedio de 15.0 ± 1.2 mm. La diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) establece mejor sensibilidad antimicrobiana a la acción del betalactámico.

Tabla 1. Comparación entre el halo inhibitorio del propóleo vs imipenem.

	Imipenem	Propóleo	valor P
	n = 5	n = 5	
Diámetro del halo inhibitorio	34.2 ± 0.8	15.0 ± 1.2	< 0.001

Amoxicilina + ácido clavulánico vs Tintura de Propóleo

Frente al halo inhibitorio producido por acción de la amoxicilina + ácido clavulánico, que fue de 52.8 ± 1.6 mm, el halo inhibitorio del propóleo fue significativamente menor, con un promedio de 15.0 ± 1.2 mm ($P < 0.001$).

Esta gran diferencia establece que la sensibilidad antimicrobiana a la acción del propóleo es inferior a la sensibilidad al betalactámico.

Tabla 2. Comparación Amoxicilina + ácido clavulánico vs Tintura de Propóleo

	Amoxicilina/ácido Clavulánico n = 5	Tintura de Propóleo n = 5	valor P
Diámetro del halo inhibitorio	52.8 ± 1.6	15.0 ± 1.2	< 0.001

Amoxicilina + ácido clavulánico vs Imipenem

En la tabla 3 se compara los dos antibióticos: amoxicilina + ácido clavulánico vs imipenem. El diámetro inhibitorio de la amoxicilina + ácido clavulánico, de 52.8 ± 1.6 mm fue significativamente superior al halo del imipenem que fue de 34.2 ± 0.8 mm (P < 0.001).

Tabla 3. Comparación amoxicilina + ácido clavulánico vs Imepenem

	Amoxicilina/ácido Clavulánico n = 5	Imipenem n = 5	Valor P
Diámetro del halo inhibitorio	52.8 ± 1.6	34.2 ± 0.8	< 0.001

Comparaciones múltiples con ANOVA y corrección de Tukey

El análisis de comparaciones múltiples entre los compuestos de acción antimicrobiana, que incluye el estudio, permite ver que los gérmenes periodontopatógenos son más sensibles a la acción de la amoxicilina + ácido clavulánico.

En efecto, la tabla 4 muestra que el promedio del halo inhibitorio de la amoxicilina + ácido clavulánico es superior a los promedios del halo de los otros compuestos. En la descripción de las diferencias de crecimiento de los halos inhibitorios, en la tabla 5, vemos que la más alta ocurre entre amoxicilina + ácido clavulánico con respecto del propóleo [37.8 (IC95% 35.6 – 39.9)] y la más baja con respecto del imipenem [18.6 (IC95% 16.4 – 20.7)]. En todos los casos, la diferencia de medias fue significativa al nivel de alfa de 0.05.

Se utilizó la corrección de Tukey para enfatizar la comparación entre cada par de resultados.

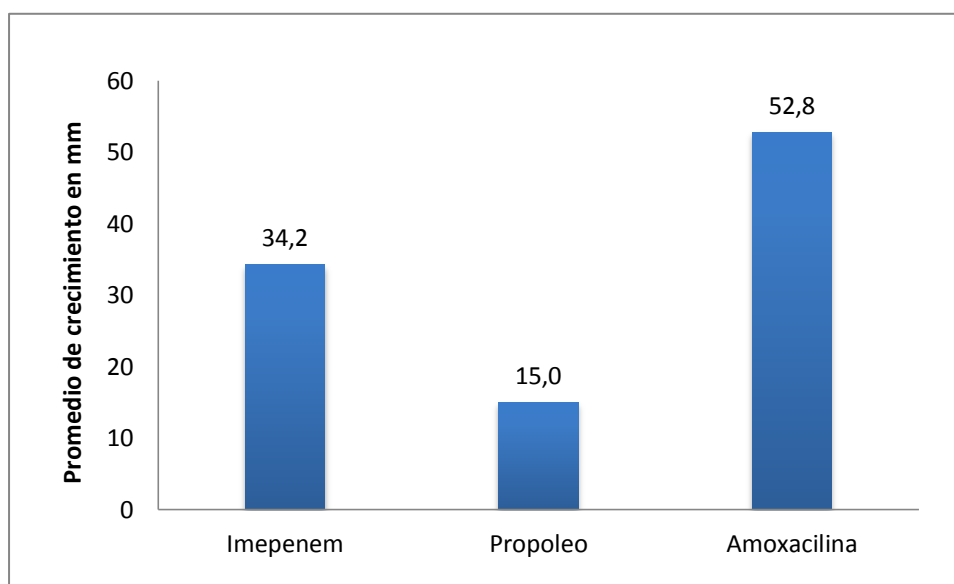
Tabla 4. Comparación entre los 3 grupos (ANOVA de un factor)

Halo inhibitorio (mm)	Amoxicilina + ácido clavulánico n = 5	Imipenem n = 5	Tintura de Propóleo n = 5
Promedio	52,8	34,2	15,0
Error estándar (EE)	0,7	0,4	0,5
IC 95% límite superior (EE)	51,4	33,5	13,9
IC95% límite inferior (EE)	54,2	34,9	16,1

Tabla 5. Comparaciones múltiples con la corrección de Tukey

(I) Halo de crecimiento	(J) Halo de crecimiento	Diferencia de crecimiento (I-J)	Error típico	Valor P	IC 95%	
amoxicilina + ácido clavulánico	Imipenem	18,6*	0,808	< 0,001	16,4	20,7
	Propóleo	37,8*	0,808	< 0,001	35,6	39,9
Imipenem	Propóleo	19,2*	0,808	< 0,001	17,0	21,3
	Amoxicilina	-18,6*	0,808	< 0,001	-20,7	-16,4
Propóleo	Imipenem	-19,2*	0,808	< 0,001	-21,3	-17,0
	Amoxicilina	-37,8*	0,808	< 0,001	-39,9	-35,6

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

**Gráfico 1. Diferencia de crecimiento de los tres compuestos**

7. DISCUSIÓN

En esta investigación con el propósito de determinar la sensibilidad de un organismo periodontopatógeno como la *Porphyromonas gingivalis* frente a la amoxicilina/ácido clavulánico y la tintura de propóleo como método alternativo en la terapéutica de las enfermedades periodontales basado en el método Kirby Bauer (disco difusión).

Seija & Vignoli, (2008) señala que el método de Kirby Bauer es un método cualitativo que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y utiliza una técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa estudio, este método recomendado por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para determinar la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, este método consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Muller Hinton previamente inoculada con el microorganismo discos de papel impregnados de antibióticos; por otra parte Sanchez, Sanchez, & Garcia, (2014) mencionan que el método de difusión con discos no está aprobado por el CLSI que en su momento considerado pero luego abandonado por la falta de correlación con la dilución en agar, actualmente se investiga en especies de crecimiento rápido.

En la investigación se realizó un antibiograma para la *Porphyromonas gingivalis* lo que se respalda en Picazo, (2011) que menciona que el antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad especialmente cuando puede presentar resistencias el antibiograma también son útiles para estudios epidemiológicos, este método es fácil rápido y barato aplicable a una amplia variedad de bacterias como las *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter*, etc.

De acuerdo al estudio de Medina, Vasquez, Lazo, & Lara, (2016) donde analizaron la susceptibilidad para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* frente a moxifloxacina y amoxicilina/ácido clavulánico en el que ambos periodontopatógenos fueron muy sensibles, en el caso de *Porphyromonas gingivales* el 87,5% de las muestras presentaron sensibilidad que favorece a los resultados de esta investigación donde para el mismo antibiótico se presentó sensibilidad del 100% con un halo inhibitorio de 52,8mm; de igual manera en el estudio de Vega, Fernández, Morales, Calle, & Perez, (2014) donde las cepas de *Porphyromonas gingivalis* fueron sensibles a la mayoría de los antibacterianos, con frecuencias de sensibilidad entre 53.3 a 100% los antibióticos con mayor sensibilidad mayor al 80% fueron imipenem, amoxicilina/ácido clavulánico, clindamicina, metronidazol, ceftriaxona, doxicilina y cloranfenicol mientras que índices de resistencia se observaron frente a sulfatrimetropin y gentamicina.

De acuerdo a la tintura de propóleo en el estudio de Santos, et al. (2003) analizó la optimización de propóleos donde la mayor actividad antimicrobiana es mejor con extractos que se obtienen con etanol al 50% a 90% sugiriendo que el alcohol al 70% es el ideal para la obtención de tinturas de propóleo lo que favorece a la tintura de propóleo utilizada en esta investigación que se preparó con etanol al 70% para las pruebas posteriores.

En el estudio de Agarwal, Vemanaradhya, & Mehta, (2012) que evaluaron la composición química y la eficacia antimicrobiana del propóleos en *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* su estudio dio que el propóleo tuvo una actividad antimicrobiana muy potente con zonas de inhibición del extracto de propóleos contra Pg, oscilaban entre 18 y 25mm y de Aa de 12 a 14mm, en cambio en la presente investigación se obtuvo un promedio de 15mm el halo de sensibilidad demostrando que el propóleo puede ser considerado como método alternativo para la

terapia periodontal; en el estudio de Santos, et al. (2002) favorecen a esta investigación ya que en la susceptibilidad de bacterias como *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella negrescens* (Pn) y *Porphyromonas gingivalis* frente a propóleos del cual encontraron actividad positiva antimicrobiana de este producto donde recalca que las bacterias Pi y Pn resistentes a clindamicina y tetraciclina se mostraron susceptibles al propóleo proponiéndolo como un producto preventivo de enfermedades periodontopatógenas.

Finalmente, en el crecimiento de la cepa bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* que se utilizó en la presente investigación para su viabilización se corrobora con el estudio de Suyo & Casalino (2011) que para la reconstitución se creó un ambiente anaerobio con caldo de Tioglicolato posteriormente el uso de un medio de cultivo como agar sangre de carnero desfibrinada, hemina y vitamina k a una temperatura de 37°C entre 5 a 7 días de incubación similares a este estudio, además que a su vez estos autores analizan la actividad antimicrobiana de propóleo de Oxapampa – Perú donde las concentraciones del propóleo fueron del 1%, 5% y 10% donde los halos inhibitorios fueron 12,8mm 20,2mm y 21,93 mm respectivamente, concluyen en este estudio que el propóleo al 10% es más efectivo para las periodontopatógenas.

8. CONCLUSIONES

El estudio refleja que la *Porphyromonas gingivalis* uno de los principales periodontopatógenos en la enfermedad periodontal requiere de soluciones enriquecedoras como vitamina k y hemina para crear el hábitat adecuado para su viabilización comprendiendo además que se requiere de un tiempo aproximado de incubación de 5 días mínimo a 37°C en condiciones anaerobias estrictas.

El antibiótico betalactámico combinado como la amoxicilina/ ácido clavulánico mediante el método de Kirby Bauer dio un halo de sensibilidad promedio de 52,8mm otorgándole mayor efectividad bactericida en las *Porphyromonas gingivalis*.

La tintura de propóleo al 50% preparada con una solución etanólica al 70% frente a la *Porphyromonas gingivalis* (Pg.) generó un halo inhibitorio medio de 15mm siendo efectivo para el crecimiento de este tipo de periodontopatógeno, considerándolo como método alternativo para el tratamiento en las enfermedades periodontales donde se haya determinado el crecimiento de Pg.

9. RECOMENDACIONES

En las investigaciones posteriores se recomienda realizar los estudios comparativos para los diferentes fármacos que habitualmente se utiliza en la enfermedad periodontal como antibiótico terapia frente a los periodontopatógenos más comunes en esta enfermedad, con la finalidad de disminuir las resistencias antimicrobianas y evitar aplicar una mala dosificación de los medicamentos.

En estudios posteriores es recomendable seguir probando con extractos, aceites, etc, de plantas y sustancias resinosas como método alternativo para la prevención de las enfermedades gingivales y periodontales de este modo dar la apertura para la medicina alternativa como nueva forma de vida en la terapéutica periodontal.

Las investigaciones posteriores es recomendable orientarla en los diferentes métodos para determinar sensibilidades antimicrobianas demostrando las concentraciones adecuadas y efectivas para combatir los periodontopatógenos, estos métodos pueden ser la CIM; CMB empleando test, macro o micro diluciones.

10. REFERENCIAS

- Agarwal, G., Vemanaradhya, G. G., & Mehta, D. (2012). Evaluación de la composición química y la eficacia del extracto de propóleo chino en *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : un estudio in vitro. *Contemporary Clinical Dentistry* , 256- 261.
- AMPS, A. E. (Diciembre de 2017). *Centro de informacion online de medicamentos de la AMPS* . Obtenido de https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/63211/FT_63211.html#10-fecha-de-la-revisi-n-del-texto
- Bazzano, G., Parodi, R., Tabares, S., & Sembaj, A. (2012). Evauación de la terapia mecánica periodontal en bolsas profundas: Respuesta clínica y bacteriológica. *Periodoncia Implantología*, 5(3), 123-128.
- Botero, J., Arce, R., Jaramillo, A., & Contreras, A. (2003). Diagnósticomicrobiológico: Su importancia en el tratamiento y pronóstico periodontal. *Facultad de Odontologia Universidad de Antioquia*, 14(2), 41-50.
- Camarena, A. H., Anaya, Y. B., Perez, M. d., & Mendoza, J. A. (2016). Bacterias asociadas a enfermedades Periodontales . *Oral* , 1374 - 1378 .
- Carranza, F., Newman, M., Takei, H., & Klokkevol, P. (1996). Periodontología Clínica . En F. Carranza, & G. Bernard, *Estructuras de soporte dentario*. McGraw - Hill.
- Carvajal, P. (Agosto de 2016). Epidemiología de las Enfermedades Periodontales en América Latina. *Revista clinica. Periodoncia, Implantologia y Rehabilitacion Oral*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.001>

Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, L., Jepsen, S., Kornmman, K., . . .

Tonetti, M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from. *Journal of Clinical Periodontology*. doi:DOI: 10.1111/jcpe.12935

Collahuacho, C. V. (2010). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis cronica . Lima , Peru .

Costa, C. F., SÁ, A. M., Almeida, R. F., & Bascones, A. (2012). Antibioterapia en Periodoncia. Situación actual I- Antibióticos Sistémicos. *Avances en Periodoncia*, 41.

Costa, F., Sá, M., & Almeida, F. (2001). Antibioterapia en Periodoncia. Situación actual I- Antibióticos Sistémicos. *Scielo*, 13(1), 39-47.

Díaz, C. A. (2010). Periodontitis, Porphyromonas gingivalis y su relación con la expresión de quorum sensing. *Revista Cubana de Estomatología*, 407.

Díaz, J., Yáñez, J., Melgar, S., Álvarez, R., & Rojas, L. C. (2012). Virulencia y variabilidad de Porphyromonas gingivalis y Aggregatibacter actinomycetemcomitans y su asociación a la periodontitis. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 41.

Eley, B., Soory, M., & Manson, J. (2012). *Periodoncia* (Sexta ed.). Barcelona, España: Elsevier.

Farmacéuticas, F. d. (2018). *TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGIA Y NUTRICION BACTERIANA*. Rosario - Argentina.

- Felitti, R. (2014). Propóleo en Odontología. Usos y aplicaciones . *Actas Odontológicas* , 31.
- Fernández, C. B. (2014). *Guia de Laboratorio de microbiologia*. Quito.
- Guilarte, C., & Perrone, M. (2013). Bacterias Periodontopatogenas: Bacilos anaerobios gram negativos como agentes etiologicos de la enfermedad periodontal. *Acta Venezolana*.
- Hernández, A., Sánchez, F., Zegbe, J., & Castañeda, J. (Agosto de 2015). Prevalencia, severidad y factores asociados a enfermedad periodontal en pacientes con y sin diabetes. *Revista electronica semestral en ciencias de la Salud*, 2, 1-13.
- Jácome, L. E., Durán, M. H., Castro, C. A., Peña, S. O., González, G. C., & Cendejas, R. F. (2014). Las Tinciones basicas en el Laboratorio de Microbiologia . *Investigacion en Discapacidad* , 12.
- Jolkovsky, L. D., & Ciancio, S. G. (1997-1998). Sustancias Quimioterápicas en el tratamiento de las enfermedades periodontales. En T. C. Newman, *Periodontología Clínica* (pág. 715). Mexico: Interamericana.
- Lamont, Richard. J., Lewis, Janina P. y Potempa, J. (2015). Factores de virulencia de bacterias periodontales. En R. J. Lamont, *Microbiologia e inmunologia oral* (pág. 259). Mexico D.F: El Manual Moderno.
- Leblanic, D. J. (2015). Antibióticos y tratamiento de enfermedades infecciosas. En R. J. Lamont, *Microbiologia e inmunologia oral* (págs. 387 - 388). Mexico D.F: El Manual Moderno .

- Leys, E. J., Griffen, A. L., Beall, C., & Maiden, M. F. (2015). Aislamiento, clasificación e identificación de microorganismos orales. En R. J. Lamont, *Microbiología e inmunología oral* (pág. 90). Mexico D.F.: El Manual Moderno.
- Lindhe, J., & Karring, L. (2008). Periodontología clínica e implantología odontológica. En Lindhe, *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Madrid: Panamericana.
- Lindhe, J., & Lang, N. (2005). *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Panamericana.
- Martinez, A., LLerena, M., & Peñaherrera, M. (2017). Prevalencia de enfermedad periodontal y factores de riesgo asociados. *Revista científica Dominio de las Ciencias*, 3(1), 99-108.
doi:<http://dx.doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.1.99-108>
- Medina, C. M., Vasquez, N. L., Lazo, C. E., & Lara, G. P. (2016). susceptibilidad antimicrobiana de dos periodontopatógenos a moxifloxacina y amoxicilina ácido clavulánico. *Scielo*.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador . (Octubre de 2014). *Registro Terapéutico de medicamentos esenciales*. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/10/Registro-Terapeutico-del-CNMB-9na-revision.pdf>
- Moreno, S., & Contreras, A. (2013). Factores de Virulencia de Porphyromonas Gingivalis. *Fundación Juan José Carraro*, 22.
- National Institute of Dental and Craniofacial Research . (agosto de 2013). *Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial*. Obtenido de

https://www.nidcr.nih.gov/sites/default/files/2018-01/enfermedad-encias-enfermedad-periodontal_3.pdf

- Papapanou, P. (2015). Enfermedades Periodontales: Conceptos generales. En R. Lamont, G. Hajishengallis, & H. Jenkinson, *Microbiología e Inmunología Oral* . El Manual Moderno.
- Perez, L., Armas, Armas, A., Fuentes, E., Rosell, F., & Urrutia, D. (2011). Prevalencia de enfermedad periodontal y factores de riesgo asociados. Policlínico Pedro Borrás, Pinar del Río. *Revista de Ciencias Medicas de Pinas del Rio*.
- Picazo, J. J. (2011). Metodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos . *Procedimientos en Microbiologia Clinica* .
- Ramos, D. N. (2011). Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *ODONTOLOGÍA SANMARQUINA*, 34.
- Rodriguez, B. N., Ureña, J. L., Alonso, M. S., Gonzalez, D. H., & Aguado, F. M. (2002). Microbiologia Periodontal y Periimplantaria. En J. L. Ureña, *Microbiologia Oral* (pág. 571). Madrid- España : McGraw- Hill Interamericana de España, S.A.U. .
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. (2016). *Bacteriologia General* . Editorial de la Universidad de Costo Rica.
- Sanchez, J. G., Sanchez, E. G., & Garcia, M. G. (2014). Enfermedades Infecciosas y microbiologia clinica . *Elsevier Doyma* , 23-29 .
- Santos, D., F, A., E., C., Lucio, Araujo, L., T., . . . L., R. (2003). Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia* .

- Santos, EM, B., Rodrigues PH, U. M., MA, C., M, F., & ES., M. (2002). Susceptibilidad de *Prevotella intermedia* / *Prevotella nigrescens* (y *Porphyromonas gingivalis*) a propóleos (cola de abeja) y otros agentes antimicrobianos. *Oral & Dental Bacteriology & Infection*, 9 - 15.
- Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos . *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA*, 631.
- Suyo, J. D., & Casalino, D. P. (2011). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propoleo de Oxapampa - Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* . *Revista Estomatologica Herediana* , 21.
- Vega, H., Fernández, V., Morales, S., Calle, S., & Perez, C. (2014). Determinacion de la susceptibilidad antibiotica in vitro de bacterias subgingivalis en la enfermedad periodontal moderada a severa . *Scielo* .
- Villar, J. A., & Celi, M. M. (2004). *Estandarizacion del propoleos de la provincia de Oxapampa, departamento del Pasco (Perú) como materia prima para su utilizacion industrial* . Lima .
- Yánac, L., Girano, J., & Chipana, J. (2016). Tratamiento quirúrgico vs. tratamiento no quirúrgico en la enfermedad periodontal. *Simiykita*, 106 - 113.

11.ANEXOS

ANEXO 1

1. TITULO: BIOSEGURIDAD

2. OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado sobre normas y procedimientos de bioseguridad.

3. ALCANCE: Aplicar las buenas prácticas de Laboratorio en cuanto a bioseguridad en el Laboratorio de la Unidad de Microbiología de Análisis Químico de la UNL.

4. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

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

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

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

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

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

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

Bioseguridad: Conjunto de medidas y normas preventivas, destinadas a mantener el control de factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos, logrando la prevención de impactos nocivos frente a riesgos propios de su actividad diaria, asegurando que el desarrollo o producto final de dichos procedimientos no atenten contra la seguridad de los trabajadores de la salud, pacientes, visitantes y el medio ambiente. Además de proveer al personal que labora en el laboratorio de microbiología la aplicación de técnicas y equipos necesarios para prevenir la exposición a agentes potencialmente infecciosos.

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

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

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

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

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
	<p align="center">Normas de Bioseguridad</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 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.

1	para el Laboratorio de microbiología	<ul style="list-style-type: none"> - 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.
		<ul style="list-style-type: none"> - 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.

2	<p style="text-align: center;">Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 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.
---	---	---

		<ul style="list-style-type: none"> - 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 Montaña. Año 2010.

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- ✓ Garcés A. Normas de seguridad en el laboratorio de microbiología. Abril 2008
- ✓ OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3era edición. Ginebra. 2005. Págs. 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.

ANEXO 2

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO POR MACERACIÓN.

OBJETIVOS: Fijar el procedimiento para la elaboración de un extracto etanólico de propóleo por el método de maceración.

ALCANCE: El presente procedimiento es aplicable al procedimiento de obtención de extracto etanólico en el Laboratorio del centro apícola API – LOJA.

RESPONSABILIDADES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Tesista: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aplicar el procedimiento.

Control: Director de laboratorio de API LOJA – Control de calidad API LOJA.

DEFINICIONES:

Propóleo.- El propóleo se ha utilizado tradicionalmente, por sus propiedades antisépticas y fungicidas, para tratar diversas infecciones. Con el auge de las medicinas alternativas su uso se ha extendido a enfermedades para las que no existe evidencia de efectividad

Etanol.- El etanol se mezcla fácilmente con el agua y muchos compuestos orgánicos, y genera un disolvente efectivo para usar en pinturas, lacas y barnices, como también en productos de cuidado personal y productos de limpieza para el hogar.

METOLOGÍA: La preparación del extracto etanólico de propóleo se realiza siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación.

PROCEDIMIENTO:

Recolección del propóleo.

Se realizará en las colmenas del CENTRO APÍCOLA "API – LOJA" del gerente propietario Tlgo. Manuel Chamba, ubicada al norte de la ciudad de Loja en el barrio la Banda cuya foresta proporcionan fuente principal de resina a partir de las cuales las abejas elaboran el Propóleo. Las abejas que residen en estas colmenas son del género *Apis Mellifera* Caucásica y la recolección será mediante la técnica de "Trampa de propóleo con malla plástica"

Traslado al laboratorio.

Colocados de manera conjunta en bolsas oscuras alejados de la luz, se transportará hacia el laboratorio apícola de API – LOJA.

Selección y/o eliminación de impurezas.

Obtenida la muestra se procederá a realizar la separación de algunos componentes macroscópicos que no forman parte de ella como polvo, restos de madera, de hojas, astillas de las colmenas o partes de abejas (trozos de alas, patas, aguijones, etc.); y otros, que puedan alterar su composición.

Congelado.

Se congelará la masa de propóleo a temperatura de -20 A -40 °C por 48 horas, hasta que el propóleo presente un estado de cristalización.

Trituración.

Una vez en estado de cristalización se triturará el propóleo con la ayuda de un mortero y un pistilo, hasta obtener los polvos del propóleo.

Pesado del Propóleo.

Se pesará en una balanza analítica la cantidad de 100gr de propóleo para obtener el extracto puro.

Maceración del propóleo

Se colocará en matraz de 1000 ml la cantidad de 100mg de propóleo y 100ml de alcohol posteriormente bien cubierto con papel aluminio en un lugar seco y fresco, alejado de la luz, durante un periodo de 21 días, agitándolos varias veces en el día. Una vez obtenido los extractos se someten a calentamiento por 30 minutos a una temperatura de 45 ° C para su concentración.

Filtrado.

Terminado el proceso de maceración, la solución etanólica sobrenadante se decanta cuidadosamente y se filtrará previamente a través de papel de filtración rápida. Se somete a temperatura de refrigeración durante 24 h y se procederá a la filtración final con papel de filtración rápida, obteniéndose.

Envasado.

Una vez obtenida la solución hidroalcohólica de propóleo al 50% se realiza el envasado en frascos de color ámbar para evitar que la luz solar altere el contenido.

ANEXO 3

**PREPARACION DE SOLUCION ENRIQUECEDORA DE CULTIVO DE
VITAMINA K**

OBJETIVOS: Fijar el procedimiento para la elaboración de una solución madre como medio enriquecedor de cultivo de vitamina k

ALCANCE: El presente procedimiento es aplicable al protocolo para la elaboración del medio de cultivo agar sangre en el laboratorio de análisis químico de la UNL.

RESPONSABILIDADES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Tesista: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aplicar el procedimiento.

Control: Director de laboratorio de análisis químico – UNL.

DEFINICIONES:

Vitamina k.- Se conoce como la vitamina de la coagulación, porque sin ella la sangre no coagularía. Algunos estudios sugieren que ayuda a mantener los huesos fuertes en los adultos mayores.

Solución Fisiológica.- Es una solución salina, es decir, contiene agua y sal (así de sencillo), a una concentración del 0,9%. Esto, hace que su concentración en sal sea igual a la de nuestra sangre, y por eso se dice que es isotónica, siendo a su vez lo que le otorga esa inocuidad.

METOLOGÍA: La preparación de la solución de vitamina k se realiza siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación.

PROCEDIMIENTO:

- Preparar el material necesario, la esterilización necesaria de los elementos que se utilizaran por el tiempo de 120/15min en autoclave.
- Esterilización de la cámara de bioseguridad mediante rayos UV
- Desinfectar el tapón del frasco que contiene la vitamina k mediante alcohol más yodo.
- Una vez esterilizado el material e instrumental se coloca dentro de la cámara de bioseguridad.
- Con una jeringa de 10 ml tomamos 9ml de solución fisiología y luego sacamos 1ml de vitamina k que se encuentra a la concentración de 5mg/ml
- Se vierte el contenido en un tubo de tapa rosca estéril esterilizar en autoclave y finalmente empacar para su almacenamiento.

Observaciones

- Para el presente estudio se toma la cantidad de 50ul de solución madre de vitamina k por cada 100ml.
- La vitamina k al ser fotosensible se debe almacenar en un recipiente ámbar o en su efecto envolver con papel aluminio a un temperatura entre 4 a 8 °C.

ANEXO 4

PREPARACION DE SOLUCION ENRIQUECEDORA DE CULTIVO DE

HEMINA

OBJETIVOS: Fijar el procedimiento para la elaboración de una solución madre como medio enriquecedor de cultivo de Hemina.

ALCANCE: El presente procedimiento es aplicable al protocolo para la elaboración del medio de cultivo agar sangre en el laboratorio de análisis químico de la UNL.

RESPONSABILIDADES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

Tesista: Diseñar, redactar, ejecutar, validar y aplicar el procedimiento.

Control: Director de laboratorio de análisis químico – UNL.

DEFINICIONES:

Hemina.- Es el nombre farmacológico para el grupo hemo. La hemina resulta de la unión de la Protoporfirina IX con el átomo de hierro en su forma férrica, resultando una variante de la Hemoglobina incapaz de captar oxígeno, por lo que es inútil para el transporte del mismo.

Agua destilada.- Es agua que ha sido sometida a un proceso de destilación que permitió limpiarla y purificarla. Esto hace, en teoría, que el agua destilada sea agua potable, ya que es una sustancia pura que solo contiene un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno (H₂O).

Destilar.- Es el acto de filtrar o de separar una sustancia volátil de otra fija a través de la aplicación de calor para luego enfriar su vapor y convertirla otra vez en un líquido.

METODOLOGÍA: La preparación de la solución de hemina se realiza siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación.

PROCEDIMIENTO:

- Preparar el material necesario, la esterilización necesaria de los elementos que se utilizaran por el tiempo de 120/15min en autoclave.
- Esterilización de la cámara de bioseguridad mediante rayos UV
- Desinfectar el tapón del frasco que contiene la vitamina k mediante alcohol más yodo.
- Una vez esterilizado el material e instrumental se coloca dentro de la cámara de bioseguridad.
- En una balanza digital se pesó 2 gramos de hemina
- Se toma en un matraz 100 ml de agua destilada y se agrega los 2gramos de hemina se diluye y se hierve hasta que no exista soluto.
- Se esteriliza en autoclave, posterior se realiza filtración en papel wattman tipo 1 dentro de un frasco estéril.
- Una vez filtrado se procede almacenar en refrigeración entre 4 a 8 °C.

Observaciones

- Para el presente estudio se toma la cantidad de 50ul de solución madre de hemina por cada 100ml.
- La hemina antes de agregar a cualquier medio de cultivo se lleva a centrifugación a 4000rpm por 20 min.

ANEXO 5

PROTOCOLO PARA ACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPA

PORPHYROMONAS GINGIVALIS ATCC 33227

Activación de cepa control

1. Abrir el vial por la mitad
2. Colocar de 0,5 a 1,0 ml de caldo tripticasa de soya preparado en el vial con una pipeta Pasteur y agitar
3. Llevar el vial a la incubadora 30 minutos
4. Luego de la incubación, proceder a sembrar por agotamiento en agar tripticasa de soya y dejar incubar 24 horas
5. A las 24 horas de incubación se procede hacer un pase en Agar sangre con hemina y vitamina K.

Conservación de cepa control

1. Esterilizar todo el material: tubos, alícuotas con 5 ul de glicerina, hisopos, caldo tripticasa de soya.
2. Colocar en un tubo estéril una cantidad de 8 ml de caldo tripticasa de soya
3. De las cepas crecidas en agar sangre se procede a coger colonias de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33227 y realizar la escala de McFarland con el caldo tripticasa de soya, dándonos una cantidad de 0.5 en la escala
4. Se coloca en las alícuotas con 500 ul de glicerina, 500 ul de la escala de McFarland, se cierran las alícuotas y se procede a rotular
5. Colocar las alícuotas en una gradilla y mantenerlas en refrigeración a una temperatura de 80 °C para su posterior utilización en el control de calidad de la investigación.

Fuente:

Medibac-incs s.a The ATCC Licensed derivative Emblem, the ATCC Licensed derivative word and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc.is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC cultures

ANEXO 6

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 8° C hasta antes de tres meses.

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

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

6. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones	<p>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.</p> <p>Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.</p>
2	Pesaje	<p>Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el</p>

		<p>volumen requerido.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
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	<p>Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico.</p> <p>Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.</p>
5	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 35°-37°C 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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

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

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12^a 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. 1^{ra} Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3^{ra} 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%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.

ANEXO 7

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 °C) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos).

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

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

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

6. DESARROLLO:

ITE M	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO

1	Lectura de las indicaciones.	<p>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.</p> <p>Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.</p>
2	Pesaje.	<p>Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	Disolución del polvo a través de una plancha de calor.	<p>Se coloca el matraz a calentar sobre una plancha de calor. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.</p>
4	Esterilización del	<p>Con algodón hidrófobo y gasa se hace un (tapón). Se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el</p>

	medio de cultivo.	algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.
5	Medición del pH.	Colocar 5ml de medio de cultivo en un tubo de ensayo, esperar que se solidifique, introducir una varilla, realizar un orificio y con la ayuda de la aguja del potenciómetro introducir en el orificio del agar y medir el pH; que oscile ente (7,2 ± 0.2 a 7,4), a temperatura ambiente (25°C).
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	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen

	medio de cultivo.	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado. La duración de este medio de cultivo es de 7 a 14 días.

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

Actualizado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica 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. 12^a 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. 1^{ra} Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3^{ra} 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%20de%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.

ANEXO 8

Siembra de muestra y conteo de colonias

1. Introducción

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento bacteriano. El método más usual para la siembra es la técnica de estría en la cual podemos obtener colonias aisladas en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies.

Una colonia bacteriana es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido; aunque varía de tamaño generalmente es visible a simple vista. Las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura y en algunos casos color característicos, que aunque puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, es constante bajo condiciones controladas y depende de la especie bacteriana que la forme.

Debido a que las características de las colonias ocurren en varios grados y combinaciones dependiendo de las bacterias y son a menudo muy uniformes, sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados. La morfología colonial es comparable a una estadística ya que se deriva de una célula individual pero es la característica de la masa celular. En una colonia pueden distinguirse varios aspectos como forma, elevación, borde, tamaño, color.

Para el conteo de colonias se usan varios métodos cuantitativos, en este caso utilizaremos el método de asa calibrada, el cual consiste contar el número de colonias

desarrolladas después de incubar las siembra a 37^a C durante 24 horas, el resultado se multiplica por 100 ya que el asa de platino contiene 0,01 ml de orina.

Cuando se obtienen dos recuentos sucesivos con más de 100 000 colonias por ml., la probabilidad de infección es de 80%, cifra que se eleva a 95% si el mismo resultado se logra en tres recuentos sucesivos.

Por lo general, las muestras contaminadas tienden a mostrar cuentas inferiores a 10 000 colonias/ml. Cuando el recuento revela valores intermedios, entre 10 000 y 100 000 colonias/ml, el examen debe repetirse. Conviene advertir que pueden pasar inadvertidas infecciones urinarias verdaderas, si no se toman en cuenta cuentas inferiores a 100 000 colonias por ml, ya que existen diversos factores que pueden explicar recuentos bajos en infecciones urinarias verdaderas, diuresis acentuada, obstrucción uretral, infecciones crónicas e infecciones por cocos grampositivos.

Objetivo

Definir los pasos necesarios que garantice el procedimiento para siembra de muestras de orina en medios de cultivo de forma que se logre el aislamiento de bacterias y así poder diferenciar el fenómeno de hemólisis en agar sangre e identificar las características de las colonias.

2. ALCANCE

Este procedimiento forma parte del macroproyecto “Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y Solca Loja” y garantizará el aislamiento e identificación de bacterias.

3. Responsables:

3.1. ESTUDIANTES: elaboración del procedimiento.

3.2. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.

3.3. COLABORADORES INSTITUCIONES PARTICIPANTES: aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

4. MATERIALES

Equipos

- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol con alcohol al 70%
- Incubadora

Instrumentos

- Asas de platino
- Hisopos estériles
- Soportes para las asas de platino

Insumos

- Cajas Petri con medio de cultivo elaborado
- Lápiz graso
- Guantes

Sustancias y reactivos

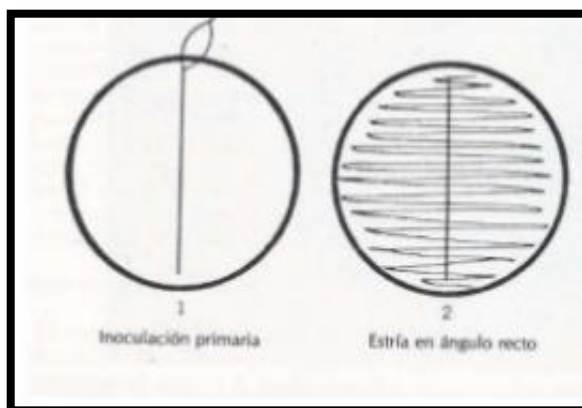
- Muestra a estudiar

5. Procedimiento

Para realizar un cultivo bacteriano es necesario:

1. Tomar el asa calibrada e introducirla al fuego para que se esterilice, dejar enfriar unos segundos y tomar la muestra que se va a estudiar,
2. La orina se mezcla bien, no se centrifuga.
3. Se usa asa calibrada de platino o de plástico (0.01 ml).
4. Se inocula la placa de agar MacConkey por estría primaria y secundaria.
5. Se incuba a 35°C, por 24 horas.
6. Se anotan las características de las colonias y el número de colonias diferentes.
7. Se cuantifican las colonias para obtener las UFC/ml. Se deben anotar todas estas características

Técnica de estría



Lectura de cultivo en UFC/ml

- Después de incubar las siembras a 37° durante 24 a 48 horas, se cuenta el número de colonias desarrolladas y el resultado se multiplica por 100, ya que el asa de platino contiene 0.01 ml. de orina.
- Los resultados del estudio cuantitativo se informan de la siguiente manera:
 - ❖ No hubo desarrollo microbiano.
 - ❖ Menos (<) de 10 000 colonias por ml.

- ❖ Entre 10 000 y 100 000 colonias por ml.
- ❖ Más de (>) 100 000 colonias por ml.

6. OBSERVACIONES

- 6.1. La siembra debe realizarse de la orina sin centrifugar con un asa calibrada, lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo microbiano.
 - 6.2. Marcar las cajas antes de empezar a trabajar
 - 6.3. No hablar durante la siembra
 - 6.4. Flamear el asa antes de realizar la serie de estrías y enfriar en una orilla.
 - 6.5. Las placas no se descartan si no hay crecimiento a las 24 horas, se vuelven a incubar hasta por 72 horas (observando cada 24 horas), si transcurrido el tiempo no hay crecimiento, si se descartan
7. **Elaboración:** María de los Ángeles Ucho.
 8. **Revisión y aprobación:** Dra. Sandra Feire Cuesta / Laboratorio Clínico de la UNL.

ANEXO 9

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

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

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

3. RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4. DEFINICIONES:

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

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

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

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

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

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

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

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

6. DESARROLLO:

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

Elaborado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Daniela Córdova, Angélica 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.

ANEXO 10

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

2 OBJETIVOS: Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del Patrón N°. 5 de Mac Farland.

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

3 RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

4 DEFINICIONES:

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

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

Patrón Mac Farland: es una escala de turbidez, cuya finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Es la más usada, y se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1% y de cloruro de bario al 1.175%,

para obtener soluciones con densidades ópticas especiales. El estándar 0.5 de Mac Farland, proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

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

6 DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO								
1	Preparación del material.	En una gradilla disponer de un tubo de ensayo de 10ml totalmente estéril, rotularlo.								
2	Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla N.- 1.	<p>Añadir una solución al 1% de Cloruro de Bario Anhidrido y una solución al 1% (en volumen) de Ácido Sulfúrico químicamente puro, según el siguiente tabla:</p> <p>Tabla N.- 1</p> <table border="1" data-bbox="810 1503 1382 1872"> <thead> <tr> <th data-bbox="810 1503 951 1738">Tubo N.</th> <th data-bbox="951 1503 1091 1738">Cl₂Ba (1%)</th> <th data-bbox="1091 1503 1232 1738">SO₄H₂ (1%)</th> <th data-bbox="1232 1503 1382 1738">U.F.C/ml</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="810 1738 951 1872">5</td> <td data-bbox="951 1738 1091 1872">0.5</td> <td data-bbox="1091 1738 1232 1872">99.5</td> <td data-bbox="1232 1738 1382 1872">1.5×10^8</td> </tr> </tbody> </table>	Tubo N.	Cl ₂ Ba (1%)	SO ₄ H ₂ (1%)	U.F.C/ml	5	0.5	99.5	1.5×10^8
Tubo N.	Cl ₂ Ba (1%)	SO ₄ H ₂ (1%)	U.F.C/ml							
5	0.5	99.5	1.5×10^8							
	Calibración del Patrón N. 5 de	Encender el espectrofotómetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar la suspensión en una								

3	Mc Farland por espectrofotometría.	cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.080 y 0.10. Es conveniente verificar mensualmente la turbidez de dicho Patrón.
4	Almacenamiento y conservación.	Sellar los tubos y mantenerlos en refrigeración. Cuando el fino precipitado blanco de Sulfato de Bario se sacude, cada tubo posee una densidad diferente que corresponde aproximadamente a cada suspensión bacteriana.

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

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

ANEXO 11

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 en blanco 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 disco en blanco 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 N° 3 de 6 mm de diámetro o mediante la casa comercial Medibac adquiriendo los discos en blanco.
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 en blanco o a su vez de papel filtro WHATMAN N° 3 de 6 mm de diámetro en una caja petri que va a contener la malla metálica estéril e impregnarlo con 10 ul de etanol al 70%, esperamos unos minutos y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de etanol al 70%.
5	Controles positivos.	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.

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

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Concepto de Dilución [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.pcb.ub.edu/centrepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo_patentesextractosplantas.pdf
- 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. Diagnóstico Clínico por el laboratorio. 8ª ed. Salvat; 2001. P. 487.

ANEXO 12

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.	<ul style="list-style-type: none"> - 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 inóculo (protocolo N° 12), se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo.

		<ul style="list-style-type: none"> - Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton (protocolo N° 10), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar. - 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	<p>Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo N° 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. <p>Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben</p>

		<p>colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm.</p> <p>Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.</p>
3	Incubación	<ul style="list-style-type: none"> - Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (las temperaturas de $>35^{\circ}\text{C}$ 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	<ul style="list-style-type: none"> - 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 inóculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluyente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares.

		<p>- Si se observan colonias aisladas, significa que el inóculo estaba diluido y la prueba debe repetirse.</p> <p>- Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.</p>
5	Interpretación de resultados	<p>- < 6mm Negativo (Resistente)</p> <p>- 6 – 9 mm Intermedio</p> <p>- > 9mm Positivo (Sensible).</p>

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

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

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. 3^{ra} 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.

Anexo 13

Objetivos

Objetivo General

Determinar la sensibilidad antimicrobiana de un microorganismo periodontópatogeno frente a un betalactámico y, la tintura de propóleo.

Objetivos específicos

Determinar la sensibilidad antimicrobiana de un microorganismo periodontópageno frente a un antibiótico betalactámico.

Determinar la sensibilidad antimicrobiana de un microorganismo periodontópatogeno frente a la tintura de propóleo.

Anexo 14

English Speak Up Center

Nosotros "English Speak Up Center"

CERTIFICAMOS que

La traducción del documento adjunto solicitada por el señor **VICENTE JAVIER MAZA JUMBO** con cédula de ciudadanía número **1104804818** cuyo tema de investigación se titula: **"SENSIBILIDAD DE UN MICROORGANISMO PERIODONTÓPATOGENO FRENTE A UN ANTIBIÓTICO BETALACTÁMICO Y A LA TINTURA DE PROPÓLEO. ESTUDIO IN VITRO"**, ha sido realizada por el Centro Particular de Enseñanza de Idiomas "English Speak Up Center".

Esta es una traducción textual del documento adjunto, y el traductor es competente para realizar traducciones.

Loja, 30 de Octubre de 2018


Mgs. Elizabeth Sánchez Burneo

DIRECTORA ACADÉMICA



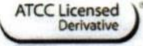



Anexo 15



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Porphyromonas gingivalis Catalog Number: 0912 Lot Number: 912-64** Reference Number: ATCC® 33277™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/11/30 Release Information: Quality Control Technologist: Kieshia L. Negen Release Date: 2018/2/8
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Small, circular, transparent colonies that become brown with age.	Medium: A/R SBAP
Microscopic Features: Gram negative rod, pleomorphic bacillary to coccoid forms.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div> </div>	

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Porphyromonas gingivalis
 Sample Description: 0912
 Sample ID: 912-64
 Sample Creation Date/Time: 2018-02-07T15:44:52.457 MB
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D4 (+++)(A)	912-64	Porphyromonas gingivalis	2.31

Comments:

N/A







Anexo 16



Universidad Nacional de Loja

Carrera de Odontología

Registro de Actividades

Tema: Sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y la tintura de propóleo. Estudio in vitro		Autor: Vicente Javier Maza Jumbo
Fecha	Actividad	Director Metodológico: Dr. Luis Morocho
Fecha	Actividad	Firma Tesista/Encargado de laboratorio.
31/Ago/2018	<ul style="list-style-type: none"> • Esterilización y preparación del material • Preparar caldo de tripticosa de soja. • Preparación de solución de vitamina K. • Preparación de hemina. 	 Maza
03/Sept/2018.	<ul style="list-style-type: none"> • Preparación de caldo de tripticosa. • Distribución en tubos tapa rosca y estéril. • Viabilización de ATCC 33277 <i>Tr. phylogenans</i> <i>genovales</i>. • Primer paso de ATCC 33277 en tubos. 	 Maza
04/Sept/2018.	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar y esterilizar agar tripticato • Distribución en tubos tapa rosca y placas. • Siembra en cajas petri • Calentar en ambiente autoclavio 	 Maza
05/Sept/2018	<ul style="list-style-type: none"> • Siembra en tubos de agar tripticato por pipetara. • Pase de ATCC en TSB + BHI • Pase en TSB. 	 Maza
06/Sept/2018		 Maza
07/Sept/2018		 Maza

Observaciones

-Material listo para viabilización de ATCC 33277.

-Inovar a 37°C durante 5-7 días.

-No hay crecimiento en tubos de caldo de tripticato a las 24 horas.

- No hay crecimiento en tubos de caldo de tripticato a las 48 horas.
- No hay crecimiento en cajas petri a las 24 horas

- No hay crecimiento en tubos a las 72 horas

- No hay crecimiento en cajas petri a las 48 h.

- Pruebas en uso de los tubos de leve crecimiento a los 4 días.

- Hay crecimiento aparente en cajas petri



Universidad Nacional de Loja

Carrera de Odontología

Registro de Actividades

Tema: Sensibilidad de un microorganismo periodontopatógeno frente a un antibiótico betalactámico y la tintura de propóleo. Estudio in vitro		Autor: Vicente Javier Maza Jumbo Director Metodológico: Dr. Luis Morocho	
Fecha	Actividad	Observaciones	Firma Tesista/Encargado de laboratorio.
10/Sept/2018.	<ul style="list-style-type: none"> Preparación de Tinción de Gram tomado de cajas a los 5 días. 	<ul style="list-style-type: none"> No hay presencia de microorganismos de acuerdo al gram en el microscopio Se preparó pasar en agar sangie. 	<i>[Firma]</i>
11/Sept/2018.	<ul style="list-style-type: none"> Preparación de agar sangie, aureobria en cajas petri. 		<i>[Firma]</i>
12/Sept/2018	<ul style="list-style-type: none"> Preparación de Agar Muller Hinton 	<ul style="list-style-type: none"> No hay crecimiento en agar sangie a las 24 horas. 	<i>[Firma]</i>
14/Sept/2018	<ul style="list-style-type: none"> Preparación de 100ml Agar Muller Hinton. 	<ul style="list-style-type: none"> Crecimiento de ATCC 33277 en agar sangie a las 72 horas 	<i>[Firma]</i>
17/Sept/2018.	<ul style="list-style-type: none"> Prueba Tinción de gram Cap 1-2 del agar sangie. Siembra en agar Muller Hinton en aureobria. 	<ul style="list-style-type: none"> Positivo (gram) negativo correspondiente a P. ATCC 33277. 	<i>[Firma]</i>
21/Sept/2018		<ul style="list-style-type: none"> Crecimiento de ATCC 33277 en Agar Muller Hinton. 	<i>[Firma]</i>



Universidad Nacional de Loja

Carrera de Odontología

Registro de Actividades

Tema: Sensibilidad de un microorganismo periodontópatógeno frente a un antibiótico betalactámico y la tintura de propóleo. Estudio in vitro		Autor: Vicente Javier Maza Jumbo Director Metodológico: Dr. Luis Morocho	
Fecha	Actividad	Observaciones	Firma Tesista/Encargado de laboratorio.
01/10/2018	Seal Pose de Pg ATCC 35277 a agar miller hinton - agar sangre.	<ul style="list-style-type: none"> Se prepara solución madre de Hawnin (2g/50ml) Preparar agar Muller Hinton 240ml. 	
02/10/2018	- Distribución en cajas de agar miller hinton	<ul style="list-style-type: none"> No se observa crecimiento en 24 horas en agar sangre - MH. 	
03/10/2018	• Esterilización para preparar solución McFaldaud.	<ul style="list-style-type: none"> Crecimiento leve a las 48 horas en agar sangre - MH 	
05/10/2018	• Preparación McFaldaud 0,5. • Inoculación de Ceba en agar MH. • Impresión de tintura de propóleo al 50% a 200/absc.	<ul style="list-style-type: none"> Se realizó de forma manual la solución McFaldaud. Se preparó los discos en la cámara 	
09/10/2018	• Medición de halos de inhibición • Contid positivo, negativo y prueba. de acuerdo a tintura de propóleo		
10/10/2018	• Esterilización del material para la prueba de Amoxicilina (Acid. Clavulánico)		



Universidad Nacional de Loja

Carrera de Odontología

Registro de Actividades

Tema: Sensibilidad de un microorganismo periodontopatogeno frente a un antibiótico betalactámico y la tintura de propóleo. Estudio in vitro		Autor: Vicente Javier Maza Jumbo	Director Metodológico: Dr. Luis Morocho
Fecha	Actividad	Observaciones	Firma Tesista/Encargado de laboratorio.
11/10/2018	<ul style="list-style-type: none"> • Tinción de gram. • Preparación de sol. Hc-Fralaud. • Inoculación en agar H1. • Selección de díscos Ct-C⁻-P. 	<p>Se deja el mismo tiempo de incubación igual que la tintura de propóleo.</p>	
15/10/2018	<ul style="list-style-type: none"> • Revisión de halos de sensibilidad para la prueba de clarificación (Ardo clausulico). 	<p>• Medicion con regla milimetrada despues de 4 dias.</p>	