

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA LABORATORIO CLÍNICO



Tesis de grado previa la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico

TEMA:

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Iresine herbstii* por el método de difusión en agar

AUTORA:

- Ivanna Solmayra Ágrede Orellana.

DIRECTORA:

- Dra. Claudia Cruz Erazo

LOJA

FEBRERO – 2011

TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE *IRESINE HERBSTII* POR EL
MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.**

AUTORIA

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

Ivanna Solmayra Agreda Orellana

CERTIFICACION DEL DOCENTE

Dra.

Claudia Cruz Erazo
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA

Que la presente tesis titulada "**Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Iresine herbstii***" por el método de difusión en agar" elaborada por la Srta Ivanna Solmayra Agreda Orellana ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección, cumpliendo los requerimientos académicos reglamentarios para su aprobación por lo tanto faculto al autor para su presentación, disertación y defensa

Loja, Febrero del 2011

Att:



Dra. Claudia Cruz Erazo
DIRECTORA DE TESIS

AGRADECIMIENTO

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, al Área de la Salud Humana y a la Carrera de Laboratorio Clínico, por abrirme las puertas y contribuir al cumplimiento de uno de mis objetivos profesionales.

Al CEDAMAZ, por confiar en mi persona, para la elaboración de tan importante proyecto.

*A la **Dra. Claudia Cruz Erazo** por su grandiosa asesoría, colaboración, paciencia y sobre todo motivación diaria en la dirección de la tesis de grado, que Dios la bendiga Doctora.*

*Al **Dr. Luis Morocho**, por su asesoría y apoyo incondicional, en todo el desarrollo del proyecto.*

Al Centro de Diagnostico del Área de la Salud Humana, por permitirme desarrollar mi tema de tesis y colaborar con todo lo necesario para su culminación

A mis compañeras del proyecto de Fitoterapia, y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron para el desarrollo del presente proyecto.

Gracias a todos

DEDICATORIA

Con gran amor y cariño dedico este trabajo:

A Dios, mi Creador, por darme la fortaleza y sabiduría diaria y ayudar así a cumplir uno de mis tan anhelados sueños.

Con mucho respeto a mis padres Norma y Gonzalo, y a mis dos hermanos Welinton y Néstor por brindarme siempre su cariño, fortaleza y el apoyo incondicional en todo momento en cada una de las metas que me he propuesto.

A mis abuelitos Polibio y Zoila, quienes son un ejemplo vivo a seguir, y me ayudaron en los momentos más importantes de mi vida.

A todos ellos va dedicado el presente trabajo, ya que han sido mi mejor apoyo y mi pilar fundamental en todo instante enseñándome que con perseverancia y fé todo es posible en esta vida.

Para ustedes todos los frutos de esta experiencia.

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Nacional de Loja, en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana, con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana, mediante el método difusión en agar del extracto etanólico al 70% de *Iresine herbstii*, planta de uso medicinal que es usada por grupos de personas conocedores de la medicina tradicional llamados sanadores de la provincia de Zamora Chinchipe para el tratamiento de infecciones respiratorias agudas, las mismas que constituyen la primera causa de morbilidad y la tercera de mortalidad en el Ecuador, es por esto que el presente estudio se considera como una alternativa para el tratamiento de estas enfermedades preservando y garantizando así la salud en aquellas comunidades que se encuentran geográficamente distantes y que consecuentemente carecen de sistema oficial de salud. El estudio se realizó preparando diluciones etanólicas 1/100, 1/1000, 1/10000, del extracto concentrado de la planta *Iresine herbstii* con una concentración al 70% alcohol agua. Con estas diluciones se realizó la actividad antimicrobiana por el método Kirby Bauer modificado frente a cinco cepas puras de microorganismos del ATCC *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27873) y un hongo *Candida albicans* (ATCC 60193); las diluciones de los extractos concentrados de la planta estudiada no inhibieron el crecimiento microbiano, por lo tanto la planta no presenta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos antes mencionados, mediante el método y en las condiciones aplicadas en el presente estudio.

Palabras claves: *actividad antimicrobiana, plantas medicinales, infecciones, Iresine Herbstii, cepas ATCC.*

SUMMARY

This research was conducted at the National University of Loja, at Diagnostic Center of Human Health Area, in order to evaluate the antimicrobial activity, using agar diffusion method of the ethanolic's extract 70% of *Iresine herbstii* plant that is used by groups of people who know the medicine traditional called healers from Zamora Chinchipe's province to respiratory infections treatment, the same that is the first cause of morbidity and third of mortality of Ecuador, that is why this study is considered as an alternative for the treatment of these diseases and ensuring preserving health in those communities that are geographically distant and consequently no formal health system. The study was carry out by preparing ethanolic dilutions 1 / 100, 1 / 1000, 1 / 10000, of the concentrate extract from the plant *Iresine herbstii* with a concentration of 70% alcohol water. With these dilutions antimicrobial activity performed by Kirby Bauer method modified compared to five pure strains of microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27873) and a fungus *Candida albicans* (ATCC 60,193), the dilutions of the concentrated extracts plant studied did not inhibit microbial growth of the microorganisms above mentioned using the method and conditions applied this study.

Keywords: *antimicrobial activity, medicinal plants, Iresine herbstii, infections, ATCC strains*

ÍNDICE

Contenido	Pág.
TÍTULO.....	I
AUTORÍA.....	II
CERTIFICADO DEL DOCENTE DIRECTOR.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIAS.....	V
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
1. PLANTAS MEDICINALES.....	15
1.1. Importancia y uso.....	15
1.2. Plantas con acción Antimicrobiana.....	17
1.3. Descripción de la planta de estudio <i>Iresine herbstii</i>	19
1.3.1. Taxonomía.....	19
1.3.2. Descripción física.....	20
1.3.3. Composición fitoquímica.....	20
1.4. Metabolitos secundarios de las plantas medicinales.....	20
2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES.....	22
2.1. Bacterias.....	22
2.1.1. Estructura.....	22
2.1.1.1. Estructura de superficie y de cubierta.....	22
2.1.1.2. Estructuras internas.....	24
2.1.2. Reproducción.....	24
2.1.3. Nutrición.....	24
2.1.4. Crecimiento bacteriano.....	25
2.1.5. Bacterias liofilizadas de la ATCC.....	26

2.1.6. <i>Escherichia coli</i>	26
2.1.6.1. Morfología.....	26
2.1.6.2. Características.....	26
2.1.6.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	27
2.1.7. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
2.1.7.1. Morfología.....	28
2.1.7.2. Características.....	28
2.1.7.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	28
2.1.8. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	29
2.1.8.1. Morfología.....	29
2.1.8.2. Características.....	29
2.1.8.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	30
2.1.9. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
2.1.9.1. Morfología.....	31
2.1.9.2. Características.....	31
2.1.9.3. Pruebas diagnósticas.....	31
2.2. Hongos	33
2.2.1. Características.....	33
2.2.2. <i>Candida albicans</i>	33
2.2.2.1. Morfología.....	33
2.2.2.2. Característica.....	34
2.2.2.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	34
2.3. Medios de Cultivo	36
2.3.1. Tipos de medios de cultivo.....	36
2.4. Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana	37
2.4.1. Métodos de susceptibilidad antimicrobiana.....	38
2.4.1.1. Métodos de antibiograma basados en difusión.....	38
2.4.1.1.1. Antibiótico.....	38
2.4.1.1.1.1. Clasificación de los antibióticos.....	39
2.4.1.1.1.2. Mecanismos de acción de los antibacterianos.....	39
2.4.1.1.2. Antifúngicos.....	39

2.4.1.1.2.1.	Clasificación de los antifúngicos.....	40
2.4.1.1.2.2.	Mecanismos de acción de los antifúngicos.....	40
2.4.1.1.3.	El Antibiograma.....	40
2.4.1.1.3.1.	Técnica de Kirby Bauer.....	40
2.4.1.1.3.2.	Forma de aplicación.....	41
2.4.1.1.3.3.	Comportamiento de Inhibición.....	42
2.4.1.1.3.4.	Inoculo.....	42
2.4.1.2.	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	43
2.4.1.3.	Concentración mínima bactericida (CMB)	43
2.5.	CONTROL DE CALIDAD EN LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.....	44
2.5.1.	Control de calidad de los medios de cultivo.....	44
2.5.2.	Control de calidad de los reactivos.....	45
2.5.3.	Control de calidad de reactivos de tinción.....	45
2.5.4.	Control de calidad de los discos de sensibilidad.....	46
III.	METODOLOGÍA.....	48
IV.	RESULTADOS.....	53
V.	DISCUSIÓN.....	59
VI.	CONCLUSIONES.....	62
VII.	RECOMENDACIONES.....	64
	BIBLIOGRAFÍA.....	66
	ANEXOS.....	69

I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el hombre ha venido utilizado distintos tipos de plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o empíricamente en preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos, entre otras.(26)

En la actualidad a nivel internacional se ha notado un incrementando por estudios relacionados en busca de conocer la actividad antimicrobiana en plantas de uso medicinal, lo cual se debe a los resultados favorables obtenidos en las investigaciones realizadas, no así en nuestro país en el que este tipo de estudios es poco frecuente y es ahí donde radica la necesidad de realizar estudios de plantas medicinales, y de esta manera contribuir a la investigación.

Por ello constituye una gran ventaja la posibilidad de tener a nuestra disposición toda una amplia variedad de plantas medicinales útiles y necesarias para nuestro organismo, (25) así a las plantas se las ha venido empleando en varias infecciones que aquejan a las personas como son las producidas por bacterias y hongos, causando patologías de diferente tipo.

Por lo antes mencionado se plantea el estudio bajo el tema de “*Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de Iresine herbstii, mediante el método de difusión en agar*”, el mismo que contribuirá a comprobar científicamente los saberes populares de personas llamadas sanadores, que utilizan dicha planta como una alternativa para sanar infecciones de tipo respiratorio, teniendo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de *Iresine herbstii*.

Con este estudio se comprobó que el extracto etanólico al 70% de la planta *Iresine Herbistii*, no presenta actividad antibacteriana ni antifúngica frente a las bacterias

Staphylococcus aureus (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27873) y el hongo *Candida albicans* (ATCC 60193), mediante el método empleado, lo cual no significa que la planta no presente actividad antimicrobiana por cualquier otro método a diferente concentración que la usada en el presente estudio, debido a la posible presencia de metabolitos secundarios en bajas concentraciones con actividad antimicrobiana.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. PLANTAS MEDICINALES

1.1. Importancia y uso

A lo largo del desarrollo de las culturas humanas, la relación entre el hombre y su medio vegetal ha sido íntima y vital. En realidad, el hombre ha vivido con las plantas dependiendo de ellas. Por lo tanto, es comprensible que a través de la prehistoria y gran parte de la historia, botánica y medicina, por razones prácticas, han sido campos idénticos de conocimientos. (1)

Estos conocimientos adquiridos por las personas acerca de plantas medicinales han sido transmitidos en su mayoría en forma verbal de una generación a otra y los encargados de realizar esta práctica son individuos que han dedicado su vida al conocimiento profundo de la vida, del mundo de lo espiritual y que han enriquecido a través de sus experiencias.

Aunque mucha gente decide no utilizar los medicamentos “químicos”, y utilizan directamente las plantas curativas, muchas otras personas no llegan a esto, pero en los últimos años se han visto marcados en búsqueda de una vida sana, natural, con mejor calidad de vida, y para esto se vuelve “a las fuentes”, a la naturaleza.

Las plantas medicinales, juegan un papel importante en el cuidado de la salud de las personas en el mundo, especialmente en países en desarrollo.(2) Destacando que algunas plantas son más efectivas utilizadas en una forma que de otra, o según el modo en que se tomen o se apliquen se utilizan para diferentes dolencias. En función del remedio que convenga utilizar, se usará una u otra parte de la planta, debiendo ser recolectada para ello en el momento preciso.

El tratamiento con plantas medicinales ha resultado ser más útil que la medicina moderna para el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas, con menos efecto secundario y más económico de ahí el porqué de su uso.(2)

Según algunos autores las plantas útiles del Ecuador se las utilizan en el tratamiento de algunas patologías como:(3)

- Infecciones
- Heridas
- Desórdenes del sistema digestivo
- Contravenenos
- Desórdenes de la piel/tejidos subcutáneos
- Desórdenes del sistema respiratorio
- Desórdenes del sistema urogenital
- Desórdenes del sistema esquelético-muscular
- Desórdenes del sistema nervioso
- Desórdenes del sistema endócrino
- Desórdenes del sistema circulatorio

Existen diferentes formas de usar a las plantas medicinales entre las que se destacan las siguientes:(4)

Planta fresca: Se puede extraer su zumo o jugo o comer en ensaladas.

Planta en polvo: Se obtiene triturando la planta seca.

Extracto: Se trata del producto que se obtiene como resultado de la evaporación de una maceración en agua o en una solución alcohólica. Se utiliza diluido, a razón de una cucharada de extracto por cada 200 ml de agua.

Jugo: Se obtiene exprimiendo la planta fresca.

Maceración: Se prepara dejando reposar la planta, durante unas horas en agua fría o fresca. Se utiliza para extraer de las plantas los principios que son inestables frente al calor.

Tintura: Se obtiene dejando durante unos días la planta, fresca o seca, en maceración con alcohol destilado (aguardiente).

Emplastos y Cataplasmas: Consisten en la aplicación de hierbas frescas, cocidas, secas o en polvo, que se aplican directamente sobre el área afectada por una dolencia.

Aceites: Las propiedades curativas de ciertas plantas, que son solubles en grasas en ocasiones se adquieren a través de su maceración en aceite.

Inhalaciones y baños de vapor: Para esto se debe preparar una infusión y, en el primer caso, inhalar su vapor y en el segundo, dejar que el vapor entre en contacto con la parte del cuerpo a tratar.

Compresas: Son paños empapados del líquido extraído de la preparación de la planta con agua, en infusiones, cocciones o tinturas diluidas, que se aplican por vía externa directamente sobre la zona a tratar.

Baños: Para realizar esta aplicación se agrega al agua del baño una infusión o decocción.

1.2. Plantas con acción antimicrobiana

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Ellas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antibacteriana y antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc.(5)

La palabra antibiótico fue inventada por el biólogo Vuilleim en 1889. Definía con él el poder que tienen ciertas sustancias de detener el crecimiento de los microorganismos, como bacterias, hongos y otros y de destruirlos.

En la medicina estos productos antibióticos han tomado un papel preponderante desde 1939, pero es interesante saber que ya en la antigüedad y en la Edad Media algunas personas empleaban empíricamente estos productos. En efecto se cuenta que en el Imperio Romano se curaban las infecciones por medio de un ungüento que fabricaban extrayendo las materias eficaces de los mohos.

De las 520 nuevas drogas aprobadas entre 1983 y 1984, el 39% fueron productos naturales o derivados de productos naturales, y el 60 a 80% de drogas antibacterianas y de anticancerígenos son derivados de productos naturales.(6)

Las plantas tienen una casi ilimitada habilidad de sintetizar sustancias aromáticas, gran cantidad de ellas son fenoles o sus derivados de oxígenos sustituidos.

Muchos son metabolitos secundarios de los cuales por lo menos 12.000 han sido aislados, un número estimado menor en un 10% del total. En numerosos casos estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la predación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, tales como los terpenoides, dan a las plantas sus olores; otros (quinonas y taninos) son responsables del pigmento de las plantas. Muchos componentes son asimismo responsables del sabor de las plantas, y algunas de las hierbas y especies usados por los humanos para sazonar los alimentos producen compuestos medicinales útiles.(6)

Así mismo la actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular contra diversos hongos, los cuales causan infecciones frecuentes en humanos, ha sido motivo de estudio (Quiroga et al., 2001; Navarro García et al., 2003); Debido a los efectos adversos de algunas de las drogas antifúngicas utilizadas actualmente a que son poco efectivas e inducen frecuentemente resistencia (Escalante et al.,2002; Zhang et al., 2005), a los elevados costos de los tratamientos antimicóticos (Ibelise de González et al., 1998), numerosos investigadores han encaminado sus trabajos hacia la búsqueda y aplicación de

nuevos compuestos biológicamente activos que exhiban efectos secundarios mínimos (Fenner et al.; 2005; Bisignano et al., 2000; Jones et al.,2000; Ali Shtayehant Abu Ghdeib, 1999; Kandil et al., 1994).

1.3. Descripción de la planta de estudio

Iresine Herbstii



FOTOGRAFIA N° 1. *Iresine Herbstii*

FUENTE: Proyecto de Fitoterapia

1.3.1. Taxonomía:

Clase: Magnoliopsida
Subclase: Caryophyllidae
Super orden: Caryophyllanae
Orden: Caryophyllales
Suborden: Chenopodiineae
Familia: Amaranthaceae
Subfamilia: Gomphrenoideae
Género: *Iresine*
Especie: *Herbstii*

1.3.2. Descripción física:

Planta perenne, ampliamente cultivada, que puede llegar a medir 1- 2 m de altura. El tallo es grueso, ramificado, derecho se encuentra teñido de color rojo. El pecíolo es de 2-3 cm de longitud, casi glabroso. Brácteas y bractéolas persistentes, blanco verdoso o blanco amarillento, las hojas son opuestas o alternas, pecioladas, amplia y redondeada en la base y estrechándose hacia el final, de 1-1.5 mm, glabras. Flores pequeñas, unisexuales, contienen un óvulo, un estilo, cuyos pétalos son de color blanco verdoso o blanco amarillento, oblongo de 1 mm. Crecen en suelo orgánico y drenado.(7)

1.3.3. Composición fitoquímica*

La planta presenta los siguientes metabolitos secundarios:

Triterpenos +++

Flavonoides +

Lactonas +

Saponinas +

Fenoles +

Azúcares reductores +

1.4. Metabolitos secundarios de las plantas medicinales

El valor curativo de la planta se debe a la presencia en su tejido de una sustancia química “principio activo” que produce una alteración o modificación en el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. Mucho de los principios activos son sumamente complejos y ocasionalmente, aun se desconoce su naturaleza química; otros han sido aislados, purificados e, incluso, sintetizados.

*Resultado de los análisis del Screening fitoquímico obtenido en el Laboratorio de fitoquímica de la UNL

Dentro de los metabolitos encontrados en la planta de estudio tenemos:

- 1. Terpenoides.-** Se denomina así a los hidrocarburos, saturados o insaturados, constituidos formalmente por unidades sucesivas de isopropeno, constituyen el grupo más importante de los aceites vegetales, de hecho son los responsables de los aromas y sabores específicos de las plantas(8)
- 2. Flavonoides.-** son pigmentos naturales que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.,(9)
- 3. Lactonas.-** Estos compuestos se obtienen a partir de hojas y flores de plantas, y algunos ensayos demuestran que los extractos de estas plantas purificadas poseen propiedades antiinflamatorias (García-Piñeres et al. 2001, Humar et al. 2003).
- 4. Saponinas.-** Pueden tener efectos perjudiciales, actuando como antinutrientes, o incluso directamente como tóxicos. En el tubo digestivo prácticamente no se absorben, por lo que su efecto se produciría solamente a nivel local, al alterar las membranas, y posiblemente al aumentar su permeabilidad. Algunas saponinas pueden tener efectos beneficiosos, al tener actividad antiviral o antiinflamatoria. (9)
- 5. Fenoles.-** compuestos los cuales suelen encontrarse en forma de glicósidos. El ácido cafeico y el cinámico son representantes de la acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica.(6)

2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES

Mecanismo por el cual un agente antimicrobiano (antibiótico, antifúngico) elimina o inhibe a un microorganismo infectante, esto va a depender de varios factores como que el agente antimicrobiano se encuentre activo y en suficiente concentración.(10)

No existe una reglamentación de la metodología para la evaluación de la actividad antimicrobiana en plantas de uso medicinales como se establece para antibióticos pero la mayoría se encuentran basados en los métodos para evaluar la resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos, los mismos que se diferencian en el remplazo del antimicrobiano por el extracto de la planta.(11)

2.1. Bacterias

Son microorganismos procariontes que presentan un tamaño que oscila entre 2 y 10µm, se caracterizan porque poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano pueden tener formas como bastón, estrella, espiral, comas etc., También se encuentran agrupadas, normalmente en cadenas más o menos ramificadas. Cada célula contiene las bases genéticas para la reproducción en su genoma.(12)

2.1.1. Estructura

2.1.1.1. Estructura de superficie y de cubierta.

La **cápsula** se trata de un polímero extracelular que rodea a la célula, contribuyendo así a la invasividad de las bacterias patógenas, la misma que las cubre de la fagocitosis.

Los **cilios** o **flagelos**, están constituidos de flagelina, confieren antigenicidad a la bacteria, estos pueden estar implantados en uno extremo (monótrico), en múltiples desde una misma zona (lofótrico), o pueden tener un solo flagelo en

cada uno de los dos extremos opuestos (anfítricas) otros pueden presentar en todo su entorno (perítrico).

La **pared** es rígida, dúctil y elástica característica que se le atribuye a la naturaleza química del compuesto peptidoglucano.

La diferencia de composición bioquímica de las paredes de dos grupos de bacterias es responsable de su diferente comportamiento frente a coloración Gram. Se distinguen las bacterias **grampositivas** y las **gramnegativas**.

El **peptidoglucano** es una macromolécula única, con enlaces altamente entrecruzados, que concede rigidez a la envoltura. Consiste de: un esqueleto de glicano (polisacárido) que está compuesto de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosalina, cadenas laterales de péptidos conteniendo D- y L- aminoácidos y algunas veces ácido diaminopimélico. Las cadenas laterales están unidas de manera entrecruzada por puentes peptídicos. La estructura de estos puentes peptídicos varía entre las especies bacterianas. (13)

Envoltura de las bacterias Gram Positivas

Envoltura gruesa en los cuales se encuentran los ácidos teicóicos unidos covalentemente a la gruesa capa de peptidoglucano. Los ácidos teicóicos son importantes antígenos de superficie en las gram positivas, pueden también dirigir a las enzimas autolíticas hacia los sitios de digestión del peptidoglucano (autolisis). Algunas veces también están presentes polisacáridos neutros (manosa, arabinosa, galactosa).

Envoltura de las bacterias Gram Negativas

Esta unida covalentemente a la delgada capa de peptidoglucano que poseen, la lipoproteína se une a la membrana externa con la pared celular. Como otras membranas, la membrana externa contiene fosfolípidos y proteínas, pero a diferencia de las otras membranas, ésta contiene moléculas adicionales como el

lipopolisacárido (LPS). El lipopolisacárido es importante para la pared celular ya que le ayuda a proveer una barrera de permeabilidad ante sustancias hidrofóbicas. Las porinas en la membrana externa forman los canales que permitirán el paso a los pequeños nutrientes hidrofílicos (tales como los azúcares) a través de la membrana externa. (13)

La **membrana citoplasmática**, situada debajo de la pared, tiene permeabilidad selectiva frente a las sustancias que entran y salen de la bacteria, posee un papel fundamental en la división del núcleo bacteriano.

2.1.1.2. Estructuras internas

El **núcleo** lleva el material genético de la bacteria; está formado por un único filamento de ácido desoxirribonucleico (ADN) apelonado

Los **ribosomas** son elementos granulosos.

2.1.2. Reproducción

Generalmente la reproducción se realiza por **bipartición**, tras la duplicación del ADN, que está dirigida por la ADN-polimerasa que se encuentra en los mesosomas, la pared bacteriana crece hasta formar un tabique transversal separador de las dos nuevas bacterias.

Pero además, las bacterias poseen unos mecanismos de **reproducción sexual o parasexual**, mediante los cuales se intercambian fragmentos de ADN, los cuales son: *transformación, conjugación, transducción*.(13)

2.1.3. Nutrición

El éxito evolutivo de las bacterias se debe en parte a su **versatilidad metabólica**.

Según la **fuerza de carbono** que utilizan, los seres vivos se dividen en **autótrofos**, cuya principal fuente de carbono es el CO₂, y **heterótrofos** cuando su fuente de carbono es materia orgánica.

Por otra parte según la **fuerza de energía**, los seres vivos pueden ser **fotótrofos**, cuya principal fuente de energía es la luz, y los organismos **quimiotrofos**, cuya fuente de energía es un compuesto químico que se oxida.

2.1.4. Crecimiento bacteriano.

- A. Fase de Rezago.-** periodo durante el cual las células depauperadas de metabolitos y enzimas, como resultado de las condiciones desfavorables existentes al final del cultivo previo, se adaptan a su nuevo ambiente. Se forman enzimas y metabolitos intermedios que se acumulan hasta alcanzar concentraciones que permitan el reinicio del crecimiento.(13)
- B. Fase exponencial.-** durante esta fase las células se encuentran en crecimiento sostenido. Se sintetiza un nuevo material celular a una tasa constante, pero este es en sí catalítico y la masa aumenta de manera exponencial, esto sucede hasta que o bien se agotan uno o más nutrientes o se acumulen metabolitos tóxicos e inhiban el crecimiento bacteriano.
- C. Fase estacionaria máxima.-** el crecimiento cesa por completo, sin embargo puede presentarse un recambio celular: existe una pérdida lenta de células por muerte, lo cual se compensa por la formación de nuevas células a través del crecimiento y de la división
- D. Fase de declinación.-** la tasa de mortalidad aumenta de manera drástica hasta alcanzar un valor sostenido y este puede durar por meses e inclusive años nutriéndose de los alimentos de las células que mueren y se lisan.

2.1.5. Bacterias liofilizadas de la American Type Culture Collection ATCC

Se trata de un material biológico de referencia certificado, los mismos que se encuentran definidos por lo menos a nivel de género y especie, depositados y mantenidos en una Colección de Cultivos.

La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.(14)

2.1.6. *Escherichia coli*

2.1.6.1. Morfología

Son bacilos gramnegativos cortos no esporulados de tamaño intermedio (0,3 x 1 a 6µm), que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, móviles con flagelos peritricos, anaerobio facultativo.

2.1.6.2. Características

- *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped simbiosis.
- Puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal.
- Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarreas se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC). (13)
- Se distinguen tres tipos de antígenos: Ag O o antígeno somático constituido por el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, H ó antígeno flagelar y K ó antígeno capsular.

2.1.6.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio

A. Muestras

Orina, sangre, pus, líquido cefalorraquídeo, esputo, u otro material, según el proceso patológico

B. Examen microscópico

Se puede examinar los fluidos antes mencionados teñidos con Gram, en busca de bacilos cortos gram negativos.

C. Cultivo

Las muestras se siembran sobre medios de cultivos selectivos diferenciales para bacilos gram negativos como el agar EMB o Mac Conkey, durante 24 horas a 37°C, en los cuales transcurrido este tiempo se pueden observar la formación de colonias lisas, circulares convexas, con bordes bien diferenciado, no viscosas, aplanadas y de color rosa intensa debido a la fermentación de la lactosa. (13)

D. Pruebas Bioquímicas

E. coli se caracteriza por:

- Fermentar la lactosa y glucosa.
- Producción de ácido y gas.
- Reacción positiva de rojo de metilo.
- Son incapaces de crecer en medio con citrato
- Son ureasa negativos,
- Fenilalanina negativos,
- Son indol positivos y
- Decarboxilan la lisina.

E. Serología

El análisis serológico es muy útil para determinar la significación clínica de una cepa. La identificación serológica de estos microorganismos se lleva a cabo

mediante técnicas de aglutinación en portaobjetos, con sueros polivalentes o específicos para antígeno O somático. Sin embargo, la utilidad de este procedimiento está limitada por las reacciones cruzadas con enterobacterias antigénicamente relacionadas y con microorganismos de otras familias bacterianas (13)

2.1.7. *Klebsiella pneumoniae*

2.1.7.1. Morfología

Son bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, además se caracterizan por poseer cápsulas de aspecto mucoide, no móviles, productoras de la enzima lisina descarboxilasa.

2.1.7.2. Características

- Patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias.
- Probablemente tiene dos hábitats comunes: el medio ambiente, en el cual se halla en aguas superficiales y residuales, en el suelo y sobre las plantas; y las superficies mucosas de mamíferos. En humanos portadores *K. pneumoniae* se encuentra en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal.
- Los principales factores de virulencia son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas, los sideróforos y el lipopolisacárido.

2.1.7.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio

K. pneumoniae se caracteriza por:

- Es positiva para el Citrato,
- Fermentan glucosa y lactosa,

- Positivas en Ureasa, y
- Fenilalanina negativa
- Oxidasa negativos

Crece a 37°C en medios específicos para bacterias gram negativas como: agar Mac Conkey.

2.1.8. *Pseudomona aeruginosa*

2.1.8.1. Morfología

Bacilo gram negativo aerobio, dotado de motilidad (flagelo polar monótrico), mide casi 0.6 x 2 um. Se lo encuentra como bacteria única o en pares y ocasionalmente en cadenas cortas. Forma una cápsula de polisacáridos (conocida también como exopolisacárido mucoide, cubierta de alginato o glucocálix).

2.1.8.2. Características

- Se encuentran en el ambiente hospitalario, en los equipos de diálisis, e incluso las soluciones desinfectantes.
- Son capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno, y crecen incluso en agua destilada al degradar los restos de los nutrientes.
- En ocasiones produce un olor dulzón semejante a jugo de maíz o de uva, algunas cepas causan hemólisis. (13)
- Forma colonias redondas lisas de color verde fluorescente.
- Tiene muchos factores de virulencia, entre los que se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas.

2.1.8.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio

A. Muestras

Muestras de lesiones cutáneas, pus, orina, sangre, líquido cefalorraquídeo, esputo, y otros materiales, según el tipo de infección.

B. Examen microscópico

Se pueden observar bacilos gram negativos, en la tinción de gram no existen características morfológicas específicas para diferenciar esta pseudomona de los bacilos entéricos y de otros bacilos de muestras.

C. Cultivo

- Crece muy bien a 37°- 42°C pero su crecimiento a 42°C la ayuda a diferenciar de otras pseudomonas.
- Las muestras se colocan sobre medios diferenciales como Cetrimide observándose un muy buen crecimiento
- Produce un pigmento azulado no fluorescente, piocianina o fluorescente pioverdina, que le da color verde al medio, o piorrubina que le confiere el color rojo oscuro y el pigmento piomelanina que le da un color negro.
- El cultivo es muy importante para el diagnóstico bacteriano debido a los pigmentos que forman.

D. Pruebas Bioquímicas

P. aeruginosa se caracterizan por:

- Oxidasa positiva
- No fermentar lactosa por lo tanto es muy fácil su identificación.
- Movilidad Positiva
- Lisina Negativa

2.1.9. *Staphylococcus aureus*

2.1.9.1. Morfología

Son células esféricas de casi 1mm de diámetro dispuestas en grupos irregulares. Están desprovistos de motilidad, no forman esporas, bajo la influencia de fármacos sufren lisis celular, son aerobios y anaerobios facultativos.(13)

2.1.9.2. Características

- Resisten hasta 50°C por 30 minutos y a concentraciones de sal hasta 7.5% NaCl
- Presenta varias enzimas como: la coagulasa, catalasa, hialuronidasa, fibrinolisisina, lipasa, nucleasa, penicilasa.
- Su biota normal es nasofaringe, región perineal y piel; puede colonizar diversas superficies epiteliales y mucosas.
- Puede diseminarse de la cepa endógena a sitios estériles y transmitirse a partir de una lesión cutánea infectada de un profesional de la salud al paciente.
- En la estructura de la pared celular, estas bacterias contienen polisacáridos y proteínas antigénicas.

2.1.9.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio

A. Muestras

Frotis superficiales, pues, sangre, material aspirador de la tráquea, líquido cefalorraquídeo para cultivo, según la localización de la lesión.

B. Examen microscópico

En los frotis teñidos con Gram de pus o esputo, se observan los estafilococos típicos. No es posible distinguir los microorganismos saprofitos de los patógenos en los frotis.

C. Cultivo

Producen colonias con las características antes indicadas a las 18 horas, pero no pueden presentar hemolisis o pigmentos sino hasta después de 24 horas o más.

D. Pruebas bioquímicas

S. aureus se caracteriza por:

- Fermentar el manitol,
- Sintetizar un pigmento amarillo dorado, no difusible, que colorea las colonias
- Coagulasa positiva
- Catalasa positivo

Prueba de la Coagulasa.

El plasma citratado, de conejo, diluido 1:5, se mezcla con un volumen igual de caldo de cultivo, o colonias en crecimiento, sobre agar y se incuba a 37°C. Se debe formar un coagulo de 1 a 4 horas.

Prueba de la Catalasa

Se coloca una porción de solución de Peróxido de hidrogeno sobre una laminilla portaobjetos y se coloca una pequeña cantidad de bacterias en crecimiento, la presencia de burbujas indica la prueba positiva.

E. Serología

Estas pruebas tienen poco valor práctico.

2.2. Hongos

Conjunto de seres vivos que incluyen desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macroscópicos.

Los hongos unicelulares son microscópicos, poseen forma redondeada y se denominan *levaduras*, la mayoría de hongos, sin embargo son pluricelulares, están formados por células cilíndricas que se disponen linealmente para constituir largos filamentos a los que se denominan *hifas*, estas al crecer llegan a formar micelios visibles como los mohos y las setas.(15)

2.2.1. Características

- Son heterótrofos por lo que tienen que alimentarse de materia orgánica preformada que utilizan como fuente de energía y de carbono.
- Tienen pared celular formada por polisacáridos, polipéptidos y quitina; esta pared esta rígida, por lo que no puede fagocitar alimentos sino que absorben nutrimentos simples y solubles que obtienen al desintegrar polímeros mediante enzimas extracelulares llamadas polimerasas
- Algunos suelen presentar *dimorfismo*
- Las levaduras se reproducen por simple gemación, mientras que las hifas se forman a partir de una espora por emisión del tubo germinativo y puede ser sexual (telemorfa) o asexual (anamorfa).
- Son aerobios obligados o facultativos.

2.2.2. *Cándida albicans*

2.2.2.1. Morfología

Células levaduriformes ovaladas (3 a 5 μ m), dimórficas que forman tubos germinales y clamidoconidias terminales de pared gruesa.

La membrana está constituida por una doble capa de diversos fosfolípidos entre los que destacan la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, contiene también esteroides (sobre todo ergosterol y zosterol).

Presenta la pared celular la cual le proporciona rigidez y fuerza, y protege a la membrana celular de un shock osmótico, está compuesta en un 80 al 90% de hidratos de carbono y aproximadamente un 10% de proteínas y glicoproteínas.

En la fase levaduriforme de *Cándida albicans* se pueden distinguir tres capas en su pared, una capa externa constituida en un 80% por manoproteínas, una capa media de β (1,6) glucanos, y una capa interna con β (1,3) glucanos, manosa y quitina. La pared celular tiene importancia médica por constituir un potente antígeno.(13)

2.2.2.2. Características

- Se encuentran frecuentemente como miembros de la flora normal de la boca, garganta, intestino grueso, vagina y piel o también se encuentran como contaminantes en otros exudados u otras muestras tomadas de estas áreas.
- No sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad
- Se caracteriza su estructura antigénica por poseer adhesinas, proteinasas y fosfolipasas, tigmotropismo

2.2.2.3. Pruebas diagnósticas de laboratorio

A. Muestras

Las muestras incluyen frotis y raspados de lesiones superficiales, sangre líquidos ceforraquídeo, biopsia de tejido, orina, exudados y materiales retirado del catéter intravenoso.

B. Examen microscópico

Se puede examinar los fluidos antes mencionados teñidos con Gram, en busca de pseudohifas y células en gemación. La piel o el raspado de las uñas se examinan en una gota de hidróxido de potasio al 20%.

C. Cultivo

Se cultivan a una temperatura de 37°C durante 24 a 48 horas en medios específicos para hongos como el sabouraud,

Presentan colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura

Se la puede identificar por la formación del tubo germinal, o por el auxonograma (fermentación de carbohidratos).

Pruebas del tubo germinal.- consiste en incubar suero sanguíneo y colonias de levadura a 37°C por 2-4 horas, produciendo las levaduras de *C. albicans*, cortos filamentos hifales laterales, llamados tubos germinales, los mismo que se observan al microscopio en placas portaobjetos. (16)

Auxonograma.- pequeñas cantidades de hidratos de carbono secos se colocan sobre superficies de un medio de cultivo sembrado con *C. albicans*, el crecimiento es visiblemente mayor alrededor del punto donde se colocó un compuesto asimilado, cuando esta área se compara con el crecimiento del fondo, la falta de mayor crecimiento denota falta de las enzimas necesarias para la utilización de los hidratos de carbono de prueba.

D. Serología

Las pruebas disponibles tienen especificidad y sensibilidad limitada. Los anticuerpos séricos y la inmunidad mediada por células son demostrables en la

mayoría de las personas, como resultado de la exposición durante toda la vida a especies *C. albicans*.

2.3. Medios de Cultivo

Son mezclas de sustancias que proporcionan en forma asimilable todos los elementos necesarios para su crecimiento y multiplicación, demostrando las reacciones metabólicas y fisiológicas de las bacterias.(16)

El crecimiento bacteriano en un medio de cultivo, depende de una serie de factores, dentro de los más destacables tenemos:

- a) **La composición.-** los medios de cultivo deben incluir los elementos indispensables para la vida bacteriana, como: nitrógeno, carbono, fosforo, azufre, aminoácidos, vitaminas, entre otros
- b) **El pH.-** la mayoría crecen a un pH neutral (6,8-7,6).
- c) **La presión osmótica.-** los medios se preparan en condiciones de isotonía.
- d) **La hidratación.-** la presencia de agua es indispensable para el crecimiento.
- e) **La temperatura.-** temperatura correcta en el caso de los microorganismos de interés clínico es de 35° - 37°C
- f) **La atmosfera.-** algunas bacterias aerobias y facultativas, necesitan para su crecimiento de la presencia de ciertos ambientes gaseosos.

2.3.1. Tipos de medios de cultivo

Debido a la falta de un medio universal el mismo que permita crecer todo tipo de bacterias, la elección del medio de cultivo se lo realizara dependiendo de las necesidades bacterianas. (17)

Según el fin al que estén destinados, los medios de cultivo se clasifican en: ⁽¹⁶⁾

1. **Medios selectivos.**- se utilizan para inhibir por completo el crecimiento de bacterias distintas de las que se quiere aislar y que están presentes en la muestra.
2. **Medios de enriquecimiento.**- favorecen el crecimiento de algún tipo de bacterias, que se encuentran en forma minoritaria, en una mezcla de varios grupos bacterianos.
3. **Medios de diferenciación.**- se utilizan para poner en manifiesto a las bacterias que dan positiva alguna propiedad bioquímica y que están presentes en una mezcla.
4. **Medios de identificación.**- se usan para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un determinado sustrato.
5. **Medios de multiplicación.**- son aquellos que poseen una composición determinada y óptima para el grupo de bacterias a las que va destinado, y que permitirá un máximo de aumento celular bacteriano en un mínimo de tiempo.
6. **Medios de conservación.**- son aquellos cuya composición favorece al mantenimiento de los microorganismos siempre que se los incuba a 2°C - 4°C.

2.4. Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

La prueba de sensibilidad antimicrobiana es una de las tantas armas con las que contamos en el laboratorio para ayudar a controlar los procesos infecciosos que se desarrolla en los pacientes a causa de bacterias u hongos.

Pero para poder desarrollar todo el potencial con que se cuenta hay que cumplir con un requisito fundamental: es necesario lograr el aislamiento del agente productor del cuadro clínico mediante los cultivos correspondientes. ⁽¹⁷⁾

2.4.1. Métodos de susceptibilidad antimicrobiana

Para efectuar las pruebas de sensibilidad, se cuenta con los siguientes métodos

- a. Difusión en agar (Técnica de Bauer & Kirby)
- b. Dilución en agar
- c. Epsilon test (E test)

Los métodos de dilución se pueden realizar en tubos, micro placas y en agar, determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las concentraciones bactericidas mínimas (CMB): (16)

En cambio, los métodos de difusión se emplean básicamente para realizar la prueba de disco - difusión o de Kirby-Bauer.

Recientemente se han desarrollado y puesto en práctica el EpsilonTest, a través del cual podemos determinar la CMI de manera más rápida, ya que es un método de difusión utilizando la misma metodología del Kirby-Bauer, pero en lugar de discos se utilizan tiras de celulosa impregnadas con diferentes gradientes de concentración del antibiótico que se está probando.

2.4.1.1. Métodos de antibiograma basados en difusión

Debido a la metodología empleada en el presente estudio, se profundizará el método de difusión en agar, teniendo en cuenta aspectos como:

2.4.1.1.1. Antibiótico

Los antibióticos son sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas que se producen por algunos microorganismos, el mismo que inhiben el crecimiento o matan a las bacterias. (18)

2.4.1.1.1.1. Clasificación de los antibióticos: (19)

De acuerdo a su forma de acción se clasifican en dos grandes grupos:

Bactericidas

Beta-lactámicos

Glicopéptidos

Aminoglucósidos

Quinolonas

Polimixinas

Bacteriostáticos

Sulfamidas

Cloramfenicol

Macrólidos

Tetraciclinas

Clindamicina, Lincomicina

Bactericida.-producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso.

Bacteriostático.- inhiben el crecimiento bacteriano aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, una vez suspendido el antibiótico, puede recuperarse y volver a multiplicarse.

2.4.1.1.1.2. Mecanismos de acción de los antibacterianos

Los antimicrobianos actúan de varias formas como:

- Toxicidad selectiva
- Inhibición de síntesis de la pared celular.
- Inhibición de la función de la membrana celular,
- Inhibición de síntesis de proteínas
- Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos.(13)

2.4.1.1.2. Antifúngicos

Son sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

2.4.1.1.2.1. Clasificación de los antifúngicos

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción.

La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: (20)

1. Polienos
2. Azoles
3. Alilaminas.
4. Lipopéptidos

2.4.1.1.2.2. Mecanismos de acción de los antifúngicos

Los hongos poseen distintos mecanismos de acción entre estos tenemos:(20)

- Acción sobre la membrana celular del hongo (Polieno, Azoles, Alilaminas)
- Sobre la pared celular del hongo (Lipopéptidos.)
- Sobre el núcleo de la célula fúngica (Antimetabolitos).

2.4.1.1.3. El Antibiograma

Es una técnica perfectamente estandarizada que permite el estudio de la sensibilidad del microorganismo "in vitro" productor de la infección a los antimicrobianos.(16)

2.4.1.1.3.1. Técnica De Kirby Bauer

El método Kirby-Bauer se lo emplea para determinar la susceptibilidad de un agente microbiano frente a un antimicrobiano o quimioterápico.

El método relaciona mediante curvas de regresión, el diámetro del halo de inhibición de crecimiento, con la CMI, en este método, el antibacteriano o fármaco se difunde en la superficie del medio de cultivo en agar alrededor del disco que contiene el antibacteriano. La difusión se hace en forma radial, siendo más intensa en contorno del disco y disminuyendo hacia la periferia del medio (16).

2.4.1.1.3.2. Forma de aplicación:

Sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas en forma pareja para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. La elección de los antimicrobianos a probar depende del germen y del foco de infección.

El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar en forma radial. Se incuba la placa por 18/24 horas a 37°C, luego se miden con una regla y en milímetros los halos de inhibición de desarrollo y se interpretan de acuerdo a tablas confeccionadas previamente. Los resultados se expresan como: Sensible (S), Intermedio o moderadamente sensible (I) y Resistente (R).

Un microorganismo se considera **sensible** a un determinado antibiótico cuando este puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria (CMI), en el lugar de la infección (16)

Un microorganismo se considera **resistente** a un antibiótico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección (líquidos, tejidos, sueros) no es suficiente para afectarle, y que por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis. (16)

Entre estas dos categorías se establece la de germen de **sensibilidad intermedia** que es la que se refiere al microorganismo que no es afectado por dosis normales de antibiótico dadas a intervalos adecuados, pero que si la dosis se eleva sin que existan efectos tóxicos, o si se produce una acumulación en el lugar de la infección se puede llegar a erradicar. (16)

2.4.1.1.3.3. Comportamiento de Inhibición

El tamaño del halo de inhibición de desarrollo se debe a las siguientes posibilidades:

1. La concentración de la droga
2. Sensibilidad bacteriana
3. Coeficiente de difusión de la droga en el agar
4. Tiempo y Temperatura de incubación
5. pH y composición del medio.
6. Profundidad del medio en las placas: se emplean placas de 9 cm. de diámetro, y se agrega siempre el mismo volumen de medio de cultivo: 20 ml. por placa, de tal modo que la placa tenga un grosor de 4mm.(16)
7. Tamaño del inóculo.

2.4.1.1.3.4. Inóculo

Se trata de microorganismo dispuestos en una solución isotónica, los mismos que los mantienen viables, este se prepara sembrando 4 a 5 colonias en la solución salina estéril al 0.9%, ajustando visualmente hasta una turbidez igual al estándar 0,5 de McFarland (lo que equivale aproximadamente a 1×10^8 CFU/ml)(22), O también se realiza una medición de la absorbancia en un espectrofotómetro a 625 nm, la misma que debería estar entre 0,08 - 0,10 para el estándar 0,5 de Mc Farland.(21)

2.4.1.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se trata de un método de dilución en caldo, en el que se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo comúnmente usado para estas pruebas es el de caldo de tioglicolato.

CIM.- es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba⁽²²⁾

Los agentes antimicrobianos se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.

Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento, luego de la incubación adecuada (usualmente de un día para el otro) se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).⁽¹⁶⁾

2.4.1.3. Concentración mínima bactericida (CMB)

Sirve para determinar la menor concentración de un antimicrobiano que es capaz de matar una cepa bacteriana, con el fin de compararla con la que alcanza en una determinada localización. Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria, hongo y antimicrobiano se enfrentan en un caldo.

La forma de averiguar la CMB consiste en sembrar un asa del contenido de los tubos anterior (con menos antimicrobiano), igual al de la CMI y posterior (con más

antimicrobiano), sobre medios de cultivo selectivos. Lo que se pretende es comprobar en los tubos sin crecimiento qué concentración de antimicrobianos ha matado, no sólo inhibido, el aislado bacteriano estudiado.(23)

2.5. Control de calidad en los análisis microbiológicos

El control de calidad (CC) incluye la selección correcta de los reactivos, la preparación de los medios de acuerdo con las formulaciones aprobadas o con las instrucciones específicas del fabricante y el uso de las cepas de referencia bien caracterizadas para controlar el medio preparado. (24)

2.5.1. Control de calidad de los medios de cultivo

Cada lote de medio preparado, partiendo de los ingredientes individuales, o cada número de lote diferente de medio deshidratado de un fabricante debe ser probado para la esterilidad, la habilidad para soportar el crecimiento de organismos específicos y la habilidad para producir reacciones bioquímicas de manera apropiada. (24)

2.5.1.1. Esterilidad

- Incube toda la noche a 35°–37°C un tubo o una placa por cada lote de medio esterilizado por autoclave y examínelo para ver si hay contaminantes.

2.5.1.2. Habilidad de soportar el crecimiento de organismos específicos

- Use al menos una cepa para probar la capacidad de un medio selectivo de soportar el crecimiento del patógeno específico. La documentación debe basarse en si esta cepa produce las reacciones bioquímicas apropiadas y el color en el medio de prueba

2.5.1.3. Habilidad de producir reacciones bioquímicas apropiadas

- **Para medios selectivos:** Use al menos un microorganismo que crezca y uno que no crezca en el medio selectivo para la prueba de habilidad del medio, para diferenciar el microorganismo específico de sus competidores. Si el medio es a la vez selectivo y diferencial, puede ser útil incluir dos organismos que crezcan en el medio y que producirán diferentes reacciones (por ejemplo, para el agar Mac Conkey: un microorganismo no fermentador de la lactosa como *S. flexneri*; un microorganismo fermentador de la lactosa como *E. coli* y *S. aureus*, que no debe crecer). (24)
- **Para medios bioquímicos:** Use al menos un microorganismo que produzca una reacción positiva y uno que produzca una reacción negativa

2.5.2. Control de calidad de los reactivos

Por ello, se recomienda correr controles diarios con los microorganismos puros y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.

REACTIVO	MICROORGANISMO	REACCION ESPERADA
Coagulasa	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coágulo - Coagulasa positiva
Oxidasa	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Negro - Oxidasa positiva

2.5.3. Control de calidad de los reactivos de tinción :

Basta con un control cada semana para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso.

Se recomienda tener especial cuidado con la mezcla de alcohol-acetona para decolorar la placa. Es posiblemente éste reactivo el que produce mayores problemas ya sea por decoloración excesiva o por débil decoloración de los microorganismos. Es también la etapa de la tinción de Gram en la que el tiempo de exposición es más determinante.

Para facilitar el control de los reactivos de tinción, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario, utilizando cepas frescas, tomando en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.

Algunos ejemplos son:

TINCIÓN	MICROORGANISMO	REACCIÓN ESPERADA
Gram	Estafilococo sp.	Morado. Gram-Positivo.
Gram	E. coli	Rosado. Gram-Negativo.

2.5.4. Control de calidad de los discos de sensibilidad:

1. Los discos deben ser almacenados a un temperatura entre -20 y $+8^{\circ}\text{C}$.
2. Para su uso, esperar a que los viales alcancen la temperatura ambiente por 1 a 2 horas.
3. Siempre utilice primero los viales con fecha de caducidad más próxima.
4. Siempre que un vial ha sido extraído del paquete, éste debe guardarse en un desecador que cierre perfectamente.
5. Los discos son colocados en el medio a una distancia de más de 24 mm del centro de uno al centro del otro. En todo caso no colocar más de 5 discos sobre la placa de 100mm.
6. Para verificar el estado de los discos de sensibilidad, utilice cepas control ATCC. Estas cepas se corren como una muestra más y se correlaciona el tamaño de los halos de inhibición con las medidas expresadas en los Manuales. (24)

III. METODOLOGÍA

Tipo de estudio: La presente investigación se enmarca en las características de un estudio experimental.

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

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

Universo:

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

Muestra:

“Iresine herbstii Hook”

Criterios de inclusión:

- Plantas nativas de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Plantas más comunes usadas tradicionalmente para tratar procesos infecciosos por los sanadores de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Plantas medicinales que no cuenten con estudios previos realizados.

Criterios de exclusión:

- Plantas que se encuentren en peligro de extinción.

Para la presente investigación se realizarán los siguientes procedimientos:

Pruebas Piloto

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

- Comprobación del papel filtro para la elaboración de los disco de sensibilidad, usando papel filtro común, papel filtro de 0.6 mm de espesor y papel whatman N°1 de 6 mm de diámetro, mediante el uso de diluciones de 30 mg y 60 mg del antibiótico amikacina, cuya impregnación se la realizo siguiendo el protocolo número 20,
- Se realizaron diluciones del extracto en varias concentraciones descartando la dilución 1/100.000 debido a que se encontraba demasiado diluida.
- Se realizaron pruebas en cada uno de los medios de cultivo descritos en los protocolos: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13.
- Se comprobó el método, empleando extractos de plantas con actividad antimicrobiana conocida como la canela, clavo de olor y ruda, obteniendo resultados positivos, siguiendo el protocolo 21 y 22.
- Se elaboró ensayos validando la metodología de la concentración mínima inhibitoria, y la concentración mínima bactericida de acuerdo al protocolo 23 y 24.

Validados y estandarizados los procedimientos pre-analíticos que conlleva el estudio “Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Iresine herbstii* por el método de difusión en agar”, se procedió a la ejecución de los mismos.

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

La planta *Iresine herbstii* fue recolectada el día 12 de junio del 2010 en el cantón Yantzaza parroquia los Encuentros comunidad el Padmi en la estación de la UNL, siguiendo el procedimiento del protocolo número 1.

Previa obtención del extracto se procedió a concentrarlos siguiendo los protocolos 2 y 3.

Del extracto concentrado en rotavapor se tomó un gramo y se diluyó con 100 ml de una mezcla de etanol (70% v/v) agua obteniéndose así la dilución 1/100 a partir de la cual se prepararon las dos diluciones siguientes 1:1.000, 1:10.000.

Cada una de las diluciones se impregnó en los discos siguiendo el protocolo 20.

Fase2: Preparación de los cultivos microbianos

Se utilizaron 5 cepas microbianas que se considera como una batería mínima para ensayos de susceptibilidad, de referencia internacional, depositadas en el *American Type Culture Collection* (ATCC)

La viabilización y las pruebas bioquímicas correspondientes a cada microorganismo se realizaron siguiendo los protocolos 15, 16, 17, 18, 19.

Fase 3: Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método cualitativo de Kirby-Bauer modificado siguiendo los protocolos 21- 22.

Fase 4: Cumplimiento del tercer objetivo.

En cumplimiento al tercer objetivo el mismo que trata acerca de la difusión de resultados de la **Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*”** por el método de difusión en agar, se procedió a lo siguiente:

1. Solicitud al Dr. Amable Bermeo, Director del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, solicitando autorización para realizar la difusión de resultados y a la vez se digne en facilitar el aula Magna para el evento. Anexo 3
2. La difusión de los resultados se los realizó en día miércoles 09 de febrero del 2011 a las 18:00, con la presencia de los Estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.
3. Para la constancia de la misma se procedió al registro de los asistentes, la misma que se adjunta en el anexos 4.

IV. RESULTADOS

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Escherichia coli*

Tabla N°1.

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		Control Positivo Ciprofloxacina	Control Negativo Etanol al 70%
1/100	Negativo	37 mm (sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	37 mm (sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	36 mm (sensible)	Negativo

Fuente.-Registro del Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana

Autora.- Ivanna Solmayra Agreda Orellana.

Interpretación.- En las diluciones 1/100, 1/1000, y 1/10.000, se presentó crecimiento bacteriano alrededor del disco, lo que indica una clara resistencia de la bacteria *E. coli* frente al extracto etanólico de “*Iresine herbstii*”, en tanto que en el control positivo empleado no mostró crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo, que si obtuvo crecimiento bacteriano.

Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Escherichia coli*

No se realizó la CMI y CMB, a causa de los resultados negativos obtenidos en la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *E. coli*

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla N°2.

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		Control Positivo Ampicilina más Sulbactam	Control Negativo Etanol al 70%
1/100	Negativo	41 mm (sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	42 mm (sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	41 mm (sensible)	Negativo

Fuente.-Registro del Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana
Autora.- Ivanna Solmayra Agreda Orellana.

Interpretación.- En las diluciones 1/100, 1/1000, y 1/10.000, se presentó crecimiento bacteriano alrededor del disco, lo que indica una clara resistencia de la bacteria *S. aureus* frente al extracto etanólico de “*Iresine herbstii*”, en tanto que en el control positivo empleado no mostró crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo, que si obtuvo crecimiento bacteriano.

Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Staphylococcus aureus*

No se realizó la CMI y CMB, a causa de los resultados negativos obtenidos en la Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *S.aureus*

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Pseudomona aeruginosa*

Tabla N°3.

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		Control Positivo Gentamicina	Control Negativo Etanol al 70%
1/100	Negativo	18 mm (sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	16 mm (sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	17 mm (sensible)	Negativo

Fuente.-Registro del Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana
Autora.- Ivanna Solmayra Agreda Orellana.

Interpretación.-En las diluciones 1/100, 1/1000, y 1/10.000, se presentó crecimiento bacteriano alrededor del disco, lo que indica una clara resistencia de la bacteria *P. aeruginosa* frente al extracto etanólico de “*Iresine herbstii*”, en tanto que en el control positivo empleado no mostró crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo, que si obtuvo crecimiento bacteriano.

Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Pseudomona aeruginosa*

No se realizó la CMI y CMB, a causa de los resultados negativos obtenidos en la Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *P. aeruginosa*

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Klebsiella pneumoniae*

Tabla N°4.

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		Control Positivo Amoxicilina más Ac. clavulánico	Control Negativo Etanol al 70%
1/100	Negativo	18 mm (sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	17 mm (sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	18 mm (sensible)	Negativo

Fuente.-Registro del Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana
Autora.- Ivanna Solmayra Agreda Orellana.

Interpretación.-En las diluciones 1/100, 1/1000, y 1/10.000, se presentó crecimiento bacteriano alrededor del disco, lo que indica una clara resistencia de la bacteria *K. pneumoniae* frente al extracto etanólico de “*Iresine herbstii*”, en tanto que en el control positivo empleado no mostró crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo, que si obtuvo crecimiento bacteriano.

Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Klebsiella pneumoniae*

No se realizó la CMI y CMB, a causa de los resultados negativos obtenidos en la Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *K. pneumoniae*

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Candida albicans*

Tabla N°5

DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES	
		Control Positivo Fluconazol	Control Negativo Etanol al 70%
1/100	Negativo	20 mm (sensible)	Negativo
1/1000	Negativo	20 mm (sensible)	Negativo
1/10.000	Negativo	18 mm (sensible)	Negativo

Fuente.-Registro del Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana
Autora.- Ivanna Solmayra Agreda Orellana.

Interpretación.-En las diluciones 1/100, 1/1000, y 1/10.000, se presentó crecimiento bacteriano alrededor del disco, lo que indica una clara resistencia de la bacteria *C. albicans* frente al extracto etanólico de “*Iresine herbstii*”, en tanto que en el control positivo empleado no se mostró crecimiento bacteriano alrededor del disco, a diferencia del control negativo, que si obtuvo crecimiento bacteriano.

Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *Candida albicans*

No se realizó la CMI y CMB, a causa de los resultados negativos obtenidos en la Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de “*Iresine herbstii*” frente a *C.albicans*

V. DISCUSIÓN

Mediante los ensayos realizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico de la planta *Iresine herbstii* por el método de Kirby Bauer modificado frente a cinco cepas puras de microorganismos del ATCC *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27873) y un hongo *Candida albicans* (ATCC 60193), no se mostró actividad antimicrobiana contra ninguno de los microorganismos empleados en la concentraciones 1/100, 1/1000, 1/10.000, mientras que los controles positivos usados inhibieron el crecimiento bacteriano, no así los controles negativos en los cuales no se evidencio el halo de inhibición.

Según lo reportado por Pereira *et al* 2007 donde se evaluó la Actividad antimicrobiana del Extracto de etanol al 70% de *Alternanthera brasiliana* (planta que pertenece a la misma familia de la planta en estudio), por el método de dilución en caldo usando bacterias y hongos, exhibió moderada acción antimicrobiana particularmente contra en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Prototheca zopfii*, mientras que la bacteria *Escherichia coli* y las levaduras *Candida albicans* y *C. glabrata* no fueron inhibidas por ninguno de los extractos probados, constituyendo un dato que apoya los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Finalmente el estudio realizado por Pereira *et al* 2007, confirmó la ausencia de actividad antimicrobiana del extracto etanólico al 70% frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*, no así en las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, en los cuales la actividad antimicrobiana varía, resultados que se le puede atribuir al distinto método empleado en la actividad antimicrobiana y a la variación en las concentraciones de los extractos usados.

Al realizar el análisis fitoquímico de la planta mediante el screening fitoquímico realizado en el laboratorio de fitoquímica de la UNL, se encontraron metabolitos secundarios que de acuerdo a lo descrito por Davicino *et al* 2007, presentan actividad antimicrobiana los fenoles y flavonoides de los encontrados en la planta

de estudio, destacando que las concentraciones de dichos metabolitos fueron demasiado bajas, lo que nos lleva a pensar que ha diferentes concentraciones de las usadas en el estudio o mediante otros métodos de extracción, la planta podría presentar actividad antimicrobiana.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico al 70% de la planta *Iresine herbstii* no presentó actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar en las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000
- El extracto etanólico al 70% de la planta *Iresine herbstii* no presentó actividad antifúngica mediante el método de difusión en agar en las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000
- La planta *Iresine herbstii* presenta metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana pero en concentraciones muy bajas con el método de extracción empleado, lo cual no significa que a diferentes concentraciones de las usadas en el presente estudio o mediante otra metodología no presente actividad antimicrobiana.
- Se validó la metodología para la evaluación antimicrobiana adaptada a plantas de uso medicinal mediante la elaboración de protocolos, los mismos que se depositaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- Se difundieron los resultados de la investigación mediante la coordinación de la carrera de Laboratorio Clínico, organizando un evento en el aula Magna del Área de la Salud Humana para la exposición de resultados contando con la participación de los estudiantes que se encontraron cursando el módulo relacionado con microbiología y docentes de la carrera.

VII. RECOMENDACIONES

- Seguir incentivando a los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico, a que continúen con estudios relacionados a la actividad antimicrobiana en plantas de uso medicinal de esta manera se estará contribuyendo a la investigación experimental.
- Emplear diferentes metodologías para evaluar la actividad antimicrobiana de la planta *Iresine herbstii*, debido a la presencia de metabolitos secundarios con acción antimicrobiana que contiene.
- Emplear un método adecuado para la conservación de las cepas microbianas ATCC, por su difícil acceso y coste económico, mismas que servirán para los siguientes proyectos del mismo tipo.
- Utilizar un mayor número de plantas de uso medicinal para posteriores estudios de la actividad antimicrobiana contribuyendo así a la investigación y a la mejora de la salud de personas que usan la fitoterapia.
- Que las Autoridades de la Universidad Nacional de Loja intervengan para la creación de macroproyectos de investigación dentro de los cuales se incluyan a los Estudiantes Universitarios de la carrera de Laboratorio Clínico.

BIBLIOGRAFÍA

1. **LA ETNOBOTANICA" UNA EXPERIENCIA INTEGRADORA, DENTRO DEL ITINERARIO DE LAS NORIAS DE ABARAN.** Juan José Martínez Soler, Victoria Martines Abellan. s.l. : Kikirikí, 2000.
2. *Beneficios de la fitoterapia.* **Álvarez, Dra C. Teresita Zambrana.** 2, Habana : Ciencias Médicas, 2005, Vol. 10.
3. **Lucía de la Torre, Domenica Alarcón S., Lars Peter Kvist & Javier Salazar Lecaro.** *Usos medicinales de las plantas.* Quito : Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 2008.
4. *MANUAL DE HIERBAS MEDICINALES DE ACONCAGUA.* **Bahamones, Mercedes Pimentel.** Chile : Jardín medicinal Agualuna, 2009.
5. *Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina.* **Roberto Davicino¹, María Aída Mattar, Yolanda Angelina Casali, Silvia Graciela Correa, Elisa Margarita Pettenati y Blas Micalizzi.** 14, Argentina : Facultad de Ciencias biológicas, 2007, Vol. 2. 1727-9933.
6. *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS.* **Jorge Araujo Díaz, Ramsés Salas Asencios.** 6, Peru : Fondo Editorial de la Universidad Científica del Sur.
7. **Salinas, Esther Pliego de.***Jardín Botánico Acapulco.* Mexico : s.n., 2009.
8. **C, Mac Helda del Castillo.***Terpenoides o isoprenoides.* Chiclayo, Peru : s.n.
9. *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.* **S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras y M.^a J. Tuñón.** Leon-España : Nutricion Hospitalaria, 2002. 0212-1611.
10. **Lennette, Edwin H; Shadomy, H. Jean.***Manual de microbiología clínica.* 4. s.l. : Buenos Aires PANAMERICANA , ARGENTINA. pág. 1408.
11. **Shiva, Carlos Martin.** *Estudios de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y acidos organicos. Posible alternativa a los antibioticos promotores de crecimiento.* barcelona : s.n., 2007.

12. **Prats, Guillem.** *Microbiología Clínica*. Madrid : Panamericana, 2006. pág. 360.
13: 9788479039714.
13. **Geo F. Brooks, Janet S. Butel, PhD, Stephen A. Morse.** *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 18ª. s.l. : Manual Moderno, 2005.
9789707291362.
14. *LAS CEPAS ATCC Herramienta indispensable en el Control de Calidad Interno en Microbiología.* **ROMERO, MARIA ISABEL MONTOYA.** Colombia : s.n.
15. **Arenas, Roberto.** *Micología Médica Ilustrada*. Mexico : Mc. Graw Hill interamericana, 2008. 10.9701065670.
16. **Alvarez, Agustin.** *Manual de Tecnicas en Microbiología Clínica*.
17. **Herrera, Dr. Marco Luis.** *Pruebas de sensibilidad antimicrobiana*. Costa Rica : Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, 1999.
1017-8546.
18. **Jara, Fresia Quintana.** *Antibióticos*. Chile : s.n.
19. **Alvarez, Prof. Rodrigo.** *Los Antibióticos*. Montevideo : Monografias.com, 2000.
20. *Estructura y actividad de los antifúngicos.* **Valdés1, Bárbara Susana Gregorí.**
2, Cuba : s.n., 2005, Vol. 39. ISSN 0034-7515.
21. **Henry, John Bernard.** *Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio*. 9 a. s.l. : MASSON-SALVAT Medicina.
22. **Stephen J. Cavalieri ... [et al.]**. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Washington : s.n. 1-55581-347.
23. *MÉTODOS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.* **Jose A. García Rodríguez, Rafael Cantón, J. Elías García Sánchez, Luis Martínez Martínez, Carmen Rodríguez-Avial.** Español : s.n., 2001.

24. *MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD. MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD* : s.n., 2008.

25. *Bases de la fitoterapia.* **FLORIL, PROF. DR. MED. FERNANDO PINTO.**

26. *Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de Baccharis nitida.* **Pavon, Ruiz et. s.l.** : Rev Fac Farma, jul.-dic 2001.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

I.	Certificación del Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico.....	2
II.	Petición de autorización para la difusión de los resultados.....	3
III.	Registro de asistentes a la difusión de resultados.....	4
IV.	Fotografía de los ensayos realizados.....	6
V.	Protocolos usados en cada uno de los procedimientos.....	9

Anexo 1: Certificación de la elaboración del proyecto de tesis en el Laboratorio Microbiológico del Centro de Diagnóstico de la UNL

Dra.

Claudia Cruz Erazo
COORDINADORA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DEL CENTRO DE DIAGNOSTICO DE LA UNL

CERTIFICA

Que la presente egresada Ivanna Solmayra Agreda Orellana de la carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana, de la Universidad Nacional de Loja, realizó los ensayos que conllevan su tesis con la finalidad de **“Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Iresine herbstii* por el método de difusión en agar”**.


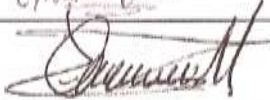

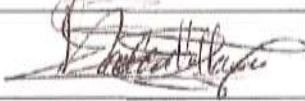


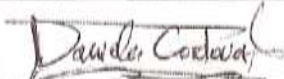



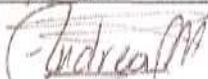




Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, por lo tanto autorizo el uso del presente para los fines pertinentes.

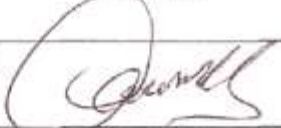



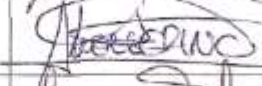
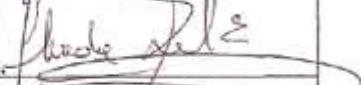
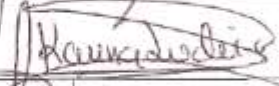



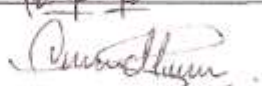
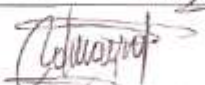
Att:



Dra. Claudia Cruz Erazo
COORDINADORA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DEL CENTRO DE DIAGNOSTICO DE LA UNL

**REGISTRO DE ASISTENCIA A LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS DE LA
"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE CINCO ESPECIES VEGETALES POR EL MÉTODO DE
DIFUSIÓN EN AGAR."**

Nº	NOMBRE Y APELLIDO	Nº Cedula	Docente	Estudiante	FIRMA
1	MARCO CELIZ	070 468 5007		X	
2	VALERIA MALDONADO	1718466194		X	
3	Jesico Castro	1723100705		X	
4	Nadia Villavicencio	190062086		X	
5	Lenny Galva	1400610161		X	
6	NIXON SARAGO	1900578467		X	
7	Daniela Cordova	1104919889		X	
8	Lucia Andrade	1102307360		X	
9	Martine Pergel	1103581326		X	
10	Melissa Lopezaga	1104680556		X	
11	Andrea Michay	1104388556		X	
12	DIANA LEÓN	1900586965		X	
13	Andrea Alpina	1104869282		X	
14	Andrea Alvarado	1104027264		X	
15	ENMA LUNA	1104723919		X	

Nº	NOMBRE Y APELLIDO	Nº Cedula	Docente	Estudiante	FIRMA
16	Claudio Cruz Enoro	1103006367	X		
17	Isith Cruz Yegua	110457611-9		X	
18	Marla Fernanda Montalvo S.	110377422-8		X	
19	Angel Cruz	110449061-8	X		
20	Katherine Buena	1104014590	X		
21	Gloria Rodriguez	1102055405	X		
22	Karina Ludeña	1103340387	X		
23	Elsa Ramirez S.	1102001193	X		
24	Luis Morocho	1102507959	X		
25	Kannya K. León B.	1103223994		X	
26	Diana del Rocío Montano L.	1104741895		X	
27	Ivanna Soluano Agreda O	1900549935		X	
28					
29					
30					
31					
32					

Anexo N° 4: Fotografías de los Procedimientos

Preparación de diluciones de trabajo de *Iresine herbstii*.



Fig. N° 4.1. Muestra la preparación de las diluciones realizadas

Preparación de medios de cultivo.



Fig. N° 4.2. Muestra la preparación de las de los medios de cultivo

Viabilización de bacterias



Fig. N° 4.3. Muestra la viabilización de las bacterias en los medios de cultivo adecuado

Bacterias viabilizadas.



Fig. Nº 4.4. Bacteria *Staphylococcus aureus* viabilizada



Fig. Nº 4.5. Bacteria *Klebsiella pneumoniae* viabilizada



Fig. Nº 4.6. Bacteria *Pseudomonas aureoginosa* viabilizada



Fig. Nº 4.7. Bacteria *Escherichia coli* viabilizada

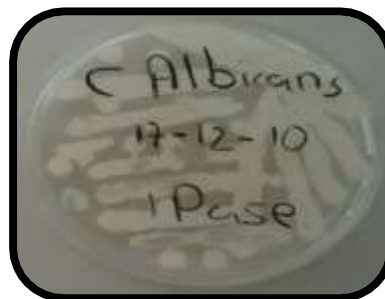


Fig. Nº 4.8. Hongo *Candida albicans* viabilizada

Actividad Antimicrobiana

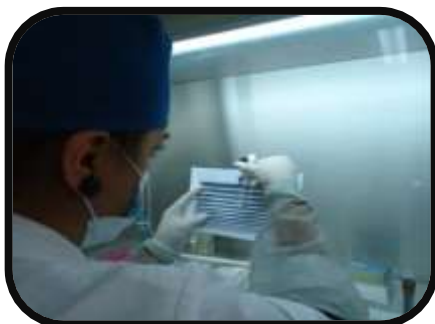


Fig. Nº 4.9. Preparación del inculo bacteriano



Fig. Nº 4.10. Impregnación de discos



Fig. N° 4.11 Inoculación en el medio de cultivo Mueller Hinton



Fig. N° 4.12 Colocación de los discos en los medios



Fig. N° 4.13 Medición de los halos

Difusión de resultados



Fig. N° 4.14 Exposición del estudio



Fig. N° 4.15 Integrantes del Proyecto de Fitoterapia

Anexo N°5: Protocolos de los ensayos realizados



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR- CD -
UNL-001

1. TITULO: Instructivo para la colecta de drogas

2. **OBJETIVOS:** Garantizar la colección de muestras de drogas para estudios fitoquímicos y de bioactividad.

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

4.- RESPONSABLES:

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

Verificación: Responsable del laboratorio de fitoquímica.

Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

5.- PROCEDIMIENTO:

Requisitos previos a la recolección

Personal Técnico:

- Botánico
- Guía
- Colector(es)

Instrumentos/equipos:

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

a) Recolección y transporte

1. Determinar de antemano las mejores condiciones para la colección de la parte de la planta (droga vegetal) a estudiar:
 - a) **Hojas:** Se colectan generalmente cuando la fotosíntesis es más activa, cuando están verdes, antes y durante la floración y antes de la maduración de los frutos.

- b) **Flores:** Antes o durante la época de polinización.
 - c) **Frutos:** Generalmente cuando ya están desarrollados o cuando están verdes o maduros.
 - d) **Semillas:** Cuando el fruto ya está maduro, antes de que expulse las semillas.
 - e) **Corteza:** Cuando empiezan los procesos vegetativos, cuando hay más circulación de savia.
 - f) **Raíces y rizomas:** Cuando finalizan los procesos vegetativos.
2. Las plantas a colectarse deben ser identificadas plenamente por el Botánico del equipo.
 3. Tomar fotografías del ejemplar representativo de la especie a colectar.
 4. Identificar/registrarse el sitio de colección.
 5. Colectar exclusivamente la parte elegida para el estudio, con criterios de conservación del medio.
 6. El material debe colectarse y transportarse en sacos de yute o saquillos plásticos o tela hasta el sitio de acopio temporal y luego en cajas de cartón.
 7. No colectar en fundas plásticas, para evitar el deterioro térmico de la droga vegetal.
 8. Al colectar raíces, rizomas o bulbos eliminar mecánicamente la mayor cantidad de tierra.
 9. En lo posible, luego de colectada la droga vegetal, iniciar el proceso de secado, especialmente hojas y flores, extendiéndolo sobre papel periódico limpio (en blanco).
 10. Luego de la jornada de colección y, de ser necesario, proceder al lavado del material (especialmente raíces)

b) Secado

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



1. **TITULO :** Obtención de extractos de plantas medicinales por maceración
2. **OBJETIVO:** Definir el procedimiento para la elaboración de extractos de plantas medicinales por el método de maceración.
3. **ALCANCE:** El presente procedimiento es aplicable al procedimiento de obtención de extractos de plantas medicinales en el laboratorio de Fitoquímica-UNL.

4. RESPONSABILIDADES:

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

Verificación: Responsable del laboratorio de fitoquímica.

Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

5.- PROCEDIMIENTO

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



1. **TITULO:** Operación de concentración en rotavapor
2. **OBJETIVO:** Garantizar el buen funcionamiento y uso de los rotavapores del laboratorio de Fitoquímica.
3. **ALCANCE:** El presente procedimiento es aplicable a rotavapores del laboratorio de Fitoquímica, con las siguientes características:

Marca: YAMATO

Modelo: RE200

Serie:

Capacidad máxima: 1000 ml

Capacidad mínima:

Ubicación: Laboratorio de Fitoquímica

Última Revisión de Mantenimiento:

Componentes del equipo: Rotavapor, baño María de agua, mangueras de ingreso/salida de agua al refrigerante y manguera de conexión de vacío.

4.- RESPONSABILIDADES:

Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas.

Verificación: Responsable del laboratorio de fitoquímica.

Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

5.- PROCEDIMIENTO

- a) Retirar la cubierta protectora del equipo y verificar que se encuentra en condiciones de operatividad según las instrucciones del fabricante. Es decir que se encuentren conectadas las mangueras de ingreso y salida de agua (refrigerante), la conexión al sistema de vacío, agua suficiente en el baño maría, lubricación de las uniones del balón concentrador y colector etc. Verificar que el equipo se encuentre perfectamente nivelado.
- b) Conectar el rotavapor y el baño maría a la fuente de poder (toma-corriente), verificando que el voltaje de la red sea de 110 V.
- c) Encender primeramente el baño maría, para lo cual presionar la tecla de poder ubicada al costado derecho del equipo. Al cabo de unos 10 minutos encender el rotavapor presionando el botón de encendido ubicado en la parte superior derecha del panel de mandos.

- d) Colocar el balón de concentración al conducto de vapor y coloque la pinza de fijación (clamp).
- e) Colocar el balón colector asegurándolo con la pinza de fijación (clamp).
- f) Verificar que la tapa del condensador se encuentre cerrada al ingreso de aire y líquido a concentrar (posición horizontal).
- g) Encender la bomba de vacío y extraer el aire del sistema.
- h) Introduzca la manguera de alimentación en el recipiente que contiene el líquido a concentrar. Con precaución haga rota la llave (tapa) del condensador (orificio de la tapa dirigido hacia abajo) de tal manera que empiece a subir el líquido (muestra) por la manguera de alimentación y pase al balón concentrador. Cuando el balón concentrador contenga aproximadamente $\frac{1}{2}$ de su capacidad suspender la alimentación rotando la tapa del condensador (orificio de la tapa en posición horizontal).

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

- i) Con la mano izquierda sostenga el motor del rotavapor mientras con la derecha afloje el tornillo de fijación al soporte (pedestal); con precaución descienda el rotavapor hasta que el balón concentrador quede sumergido en el baño maría hasta una profundidad aproximada de $\frac{1}{2}$ y de tal forma que no cause el derrame del agua del baño o roce con el borde del mismo.
- j) Iniciar la rotación del balón concentrador, para lo cual gire la perilla de velocidad en dirección de las manecillas del reloj hasta una velocidad aproximada de 120 rpm.
- k) Abra la llave de ingreso de agua (refrigerante), asegurándose que tenga un flujo adecuado.
- l) Para mantener una buena velocidad de evaporación, de vez en cuando active el sistema de vacío (bomba de vacío).
- m) Una vez alcanzada una buen grado de concentración del extracto, parar la rotación del balón, sacarlo del baño maría, mantener la refrigeración por unos 2-3 minutos más y cortar el suministro de refrigerante; apague el baño maría si no se va utilizar nuevamente el equipo.
- n) Retire el balón concentrador; para lo cual extraiga la pinza de sujeción y rote en sentido contrario a las manecillas del reloj el removedor del balón ubicado en el conducto de vapor.

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

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

- p) Retire el balón colector, extrayendo previamente la pinza de sujeción (clamp) y con la otra sostenga firmemente el balón, deposite el solvente destilado en un recipiente para el reciclado de solventes o reinicie el proceso de extracción, de acuerdo a la metodología aplicada para la obtención de extractos.
- q) Lave cuidadosamente el balón concentrador y colector con una porción nueva del solvente utilizado para la obtención del extracto; con la misma solución lave el condensador para lo cual retire la tapa y con la ayuda de una pipeta lave el serpentín y las paredes del condensador, colectando el líquido para posteriormente ser reciclado.
- r) Apague el baño maría y el rotavapor, desconéctelo de la red de alimentación eléctrica.



1.-TITULO: BIOSEGURIDAD

2.- **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado de las normas de bioseguridad en el laboratorio de Microbiología.

3.- **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el laboratorio de Microbiología del Área de Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- DEFINICIONES:

BIOSEGURIDAD: Conjunto de medidas y normas preventivas, destinadas a mantener el control de factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos, logrando la prevención de impactos nocivos frente a riesgos propios de su actividad diaria.

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

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

ANTISEPSIA: Procedimiento de aplicación de sustancias que no son quimoterápica, 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

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

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

6.- METODOLOGÍA: Normas de bioseguridad que van hacer aplicada en el laboratorio de Microbiología, con la finalidad de asegurar la salud de todos los miembros involucrados.

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<p align="center">Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio de Microbiología</p>	<p>Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos.</p> <p>El acceso al laboratorio estará limitado solo al personal autorizado.</p> <p>Nunca se pipeteará con la boca.</p> <p>En la zona de laboratorio no se permitirá comer, guardar alimentos, beber, fumar, ni usar cosméticos.</p> <p>Las superficies de trabajo se deben descontaminar antes y después de la jornada de trabajo y siempre que haya un derrame.</p> <p>Todo el personal se lavara las manos al ingresar al laboratorio y después de haber manipulado material y al salir del laboratorio.</p> <p>Quitarse los guantes para utilizar equipos o instrumentos no contaminados como teléfonos computadoras, material de escritorio.</p> <p>Utilizar una campana de bioseguridad. Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito.</p> <p>Tras quitarse los guantes, se realizará un lavado de manos. Las superficies de las mesas deben estar limpias y ordenadas.</p> <p>El personal debe llevar cabello recogido.</p> <p>Todos los desechos biológicos ya sean líquidos o sólidos deben ser descontaminados antes de eliminarlos.</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-AS-
UNL-005

- 1.-TITULO:** Procedimiento para la preparación del medio de cultivo agar sangre.
- 2.- OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Agar Sangre.
- 3.- ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.
- 4.- RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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.

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

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25 -30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

6.- METODOLOGÍA: La Preparación de Medios de Cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como las rehidratación, pesaje, esterilización.

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	Se lee el envase del polvo para la preparación de Agar Sangre (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual se debe suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	Pesaje.	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	Esterilización del medio de cultivo	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca papel aluminio sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico.

		Se escribe en el matraz el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Esterilizar en I autoclave a 121°C.
5	Colocación de la sangre humana desfibrinada.	Enfriar a 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5%. Homogenizar.
6	Distribución del medio de cultivo	Distribuir en placas de petri, hacerlo sobre un nivel recto.
7	Control de calidad de los medios de cultivo	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
8	Almacenamiento y conservación	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8° C, hasta que el medio sea utilizado.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-AMC-
UNL-006

1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo: agar Mac Conkey.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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.

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

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25-30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	<p>Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Mac Conkey (Casa Comercial HIMEDIA), según la cuál por cada 1 litro de preparación deben haber 49.53 g de polvo de preparación.</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>Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación.</p> <p>Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	<p>Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.</p>

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



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-ACM-
UNL-007

1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo: agar Chapman Manitol.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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.

AGAR CHAPMAN MANITOL: es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococo sal utilizar una alta concentración cloruro de sodio al 7.5% al Agar Rojo de Fenol y Manitol, que forman colonias y halos amarillos. En este medio las peptonas y el extracto de carne proporcionan la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El rojo de fenol actúa como indicador de pH. El agar es adicionado como agente solidificante.

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25-30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	<p>Se lee el envase del polvo de la preparación de Chapman Manitol (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada 1 litro de preparación debe haber 111 g de polvo de preparación.</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>Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación.</p> <p>Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	Esterilización del medio de cultivo	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz,

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



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-AC-
UNL-008

1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo: agar Cetrimide.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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.

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

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25-30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	<p>Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Cetrimide (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada 1 litro de agua destilada que contenga 10 ml de glicerol, deben haber 46.7 g de polvo de preparación.</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>Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación.</p> <p>Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	<p>Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.</p>

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



1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo: caldo Tripticasa de Soja.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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.

CALDO TRIPTONA SOYA: medio altamente nutritivo para el cultivo de una gran variedad de microorganismos exigentes y recomendado para los ensayos de esterilidad y para uso general de laboratorio.

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25-30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los laboratorios de microbiología.

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	<p>Se lee el envase del polvo de la preparación de Caldo Triptona de Soja (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada 1 litro de preparación deben haber 27.5 g de polvo de preparación.</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>Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación.</p> <p>Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	<p>Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.</p>
4	Esterilización del medio de cultivo	<p>Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto.</p> <p>Se coloca un papel aluminio sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el matraz el tipo de medio de cultivo que se ha preparado.</p>

		Se lleva a autoclave a 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	Distribución del medio de cultivo	Distribuir en tubos de ensayo estériles.
6	Control de calidad de los medios de cultivo	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	Almacenamiento y conservación	Almacenar y conservar, a una temperatura de 2 – 8°C, hasta que el medio sea utilizado.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-ATS-
UNL-
0010

1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo agar Trypticasa de soja.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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.

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25-30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final.

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	<p>Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Triptona de Soja (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada 1 litro de preparación debe haber 40 g de polvo de preparación.</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>Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación.</p> <p>Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	<p>Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.</p>
4	Esterilización del medio de cultivo	<p>Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel aluminio sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el matraz el tipo de medio de cultivo que se ha preparado.</p> <p>Se lleva a autoclave a 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.</p>
5	Distribución del medio de cultivo	<p>Distribuir en placas.</p>

6	Control de calidad de los medios de cultivo	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	Almacenamiento y conservación	Almacenar y conservar las placas, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8° C, hasta que el medio sea utilizado.



1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo: agar Dextrosa Sabouraud.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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

AGAR DEXTROSA SABOURAUD: medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras. El Agar de Dextrosa Sabouraud es una modificación a la fórmula original del Agar de Dextrosa desarrollado por Raymond Sabouraud. La alta concentración de dextrosa y la acidez del pH hacen a éste un medio selectivo para hongos. Con la adición de cicloheximida, estreptomycinina y penicilina, se obtiene un excelente medio para el aislamiento primario de dermatofitos. En este medio las peptonas proveen la fuente de

carbono y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos, la dextrosa actúa como fuente de energía y el agar es agregado como agente solidificante.

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25-30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Dextrosa Saboraud (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada 1 litro de preparación debe haber 65 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	Pesaje.	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.

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



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-ADS-
UNL-012

1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo: agar de infusión cerebro – corazón.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

AGAR: sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

CULTIVO: Es el proceso de crecimiento de microorganismos mediante la toma de microorganismos de un sitio de infección 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

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

CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO: en frasco cerrado se deben almacenar de 25-30° C, hasta 5 años. 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: proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones.	<p>Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar de Infusión Cerebro – Corazón (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada 1 litro de preparación debe haber 37 g de polvo de preparación.</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>Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación.</p> <p>Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación.</p> <p>Se lleva la preparación a aforo con agua destilada.</p> <p>Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.</p>
3	Disolución del polvo a través	<p>Se pone a calentar el matraz. Ya lista la preparación, se retira de la fuente de calor.</p>

	de una fuente de calor.	
4	Esterilización del medio de cultivo	Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel aluminio sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el matraz el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	Distribución del medio de cultivo	Distribuir en tubos.
6	Control de calidad de los medios de cultivo	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 24 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	Almacenamiento y conservación	Almacenar y conservar los tubos, de forma que se encuentren viradas, a una temperatura de 2 – 8° C, hasta que el medio sea utilizado.



1. **TITULO:** Procedimiento para la preparación del Agar Mueller Hinton (QUIMINET)
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para realizar la preparación del Agar Mueller-Hinton.
3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico de la UNL.
4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. DEFINICIONES:

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

Este medio también es conocido como Agar M-H, y entre su composición se encuentra:

- Caseína ácida hidrolizada 17,50g
- Infusión de carne de res o corazón 2,00g
- Almidón, soluble 1,50g
- 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).

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Mueller-Hinton, que indica que por cada litro de preparación debe haber 38g de polvo.
2	Pesaje	Se coloca una luna de reloj sobre la balanza y se tara. Se pesan 38.0gr de polvo, y se lo vierte en un matraz Erlenmeyer, durante este proceso también se limpia la luna de reloj con agua destilada. Luego se lleva a aforo con agua destilada para completar la preparación. Se mezcla la preparación con una varilla de agitación tratando de no dejar grumos
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor.	Calentar con agitación suave hasta su completa disolución. Una vez lista la preparación, se retira de la fuente de calor.
4	Esterilización del medio de cultivo	Con algodón se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca papel aluminio sobre la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso, dejar enfriar el medio a 45- 50 °C
5	Condiciones para su uso	Se debe examinar la esterilidad de una muestra representativa de cada partida de placas incubándolas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 24 horas. Se mide el pH del agar de Mueller-Hinton ($7,3 \pm 0,2$), a temperatura ambiente (25°C).

6	Distribución del medio de cultivo	Verter con ayuda de una pipeta serológica 20 ml del medio recién preparado en una placa de Petri de plástico de 9 cm de diámetro con fondo plano, colocadas sobre una superficie horizontal nivelada para obtener una profundidad uniforme de aproximadamente 4mm.
7	Control de calidad del medio de cultivo	<p>Comprobar si hay signos de deterioro como: contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, o agrietamiento en el medio de cultivo.</p> <p>El control de calidad debe ser llevado a cabo con al menos un organismo que demuestre la actuación esperada.</p> <p>No usar si el resultado del control del microorganismo es incorrecto.</p>
8	Conservación y caducidad del agar Mueller-Hinton.	<p>Todos los contenedores deben ser mantenidos cerrados herméticamente y almacenados en un lugar seco a 25°C o menos hasta la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del envase.</p> <p>La duración de medio de cultivo es de 7 a 14 días.</p>



1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del patrón No. 5 DE MAC FARLAND.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

PATRÓN MAC FARLAND: Es una escala de turbidez, cuya finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Es la más usada, y se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1% y de cloruro de bario al 1,175%, para obtener soluciones con densidades ópticas específicas. El estándar 0,5 de Mac Farland, proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

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

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO								
1	Preparación del material.	En una gradilla disponer de 1 tubos de ensayo grande, estéril y rotularlo.								
2	Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla No. 1.	<p>Añadir una solución al 1% de cloruro de bario anhidro y una solución fría al 1% (en volumen) de ácido sulfúrico químicamente puro, según el siguiente cuadro:</p> <p>Tabla No. 1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>TUBO No.</th> <th>Cl₂Ba (1%)</th> <th>SO₄H₂ (1%)</th> <th>U.F.C/ml</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>0,5</td> <td>99,5</td> <td>1,5x10⁸</td> </tr> </tbody> </table>	TUBO No.	Cl ₂ Ba (1%)	SO ₄ H ₂ (1%)	U.F.C/ml	5	0,5	99,5	1,5x10 ⁸
TUBO No.	Cl ₂ Ba (1%)	SO ₄ H ₂ (1%)	U.F.C/ml							
5	0,5	99,5	1,5x10 ⁸							
3	Calibración del Patrón No. 5 de Mc Farland por espectrofotometría	<p>Encender el turbidímetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar la suspensión en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.085 y 0.10.</p> <p>Es conveniente verificar mensualmente la turbidez de dicho Patrón.</p>								
4	Almacenamiento y Conservación.	Sellar los tubos y mantenerlos en refrigerador. Cuando el fino precipitado blanco de sulfato de bario se sacude, cada tubo posee una densidad diferente que corresponde aproximadamente a cada suspensión bacteriana.								



1.-TITULO: Procedimiento para la preparación del Inóculo.

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5.- DEFINICIONES:

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

CONTROL DE CALIDAD DEL INÓCULO: toma en cuenta varias consideraciones:

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Preparación del material.	Se utilizará una cepa joven de acuerdo al protocolo No. 2, disponer de 1 tubo de ensayo, un aplicador y una cubeta para espectrofotómetro, solución salina. Todo el material a utilizar debe encontrarse estéril

<p>2</p>	<p>Suspensión de la cepa en la solución salina.</p>	<p>Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina en un tubo estéril. Utilizando un aplicador (estéril), tomar de cuatro a cinco colonias de la cepa seleccionada, de forma suave y tocando solamente la punta del aplicador. Suspenderlas en la solución salina al 0,85%, para lograr una suspensión turbia. Mezclar bien y tapar el tubo.</p>
<p>3</p>	<p>Estandarización visual de la turbidez del inóculo.</p>	<p>Comparar la turbidez de la suspensión del microorganismo con el Patrón N^o. 5 de Mac Farland, para lo cual se debe colocar juntos la suspensión bacteriana y el tubo de Mac Farland, observándolos contra un fondo de rayas negras. Es muy importante agitar bien los tubos antes de realizar este paso.</p>
<p>4</p>	<p>Verificar la turbidez de la suspensión a través del turbidímetro.</p>	<p>Es conveniente además el uso de un instrumento como el turbidímetro para realizar el control de calidad. Encender el turbidímetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar el inóculo en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.085 y 0.10, adecuada para realizar el antibiograma. Si la suspensión bacteriana no presenta inicialmente la turbidez deseada, se la puede diluir o agregarle más microorganismos, según sea necesario.</p>



- 1.- **TITULO:** VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Staphylococcus aureus*
- 2.- **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de *Staphylococcus aureus*
- 3.- **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico del Centro de Diagnóstico de la UNL.

4.- **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- **DEFINICIONES:**

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

CRECIMIENTO MICROBIANO es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

FASE EXPONENCIAL.- parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

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

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

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<p align="center">Obtención de la <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	<p>Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en <i>American Type Culture Collection (ATCC)</i></p>
2	<p align="center">Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 Cultivo primario</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. 2. Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. 3. Saturar inmediatamente un hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Chapman manitol, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hisopo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento 4. Incubar inmediatamente el medio de Chapman manitol inoculado, a 37°C durante 24 horas Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas

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



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

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

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

4.- **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- **DEFINICIONES:**

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

CRECIMIENTO MICROBIANO es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

FASE EXPONENCIAL. parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

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

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

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Obtención de la <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en <i>American Type Culture Collection (ATCC)</i>
2	Recuperación de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Cultivo primario	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. 2. Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. 3. Saturar inmediatamente el hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Agar Mac Conkey, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hisopo un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento. 4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas

3	<p align="center">Obtención del cultivo secundario de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	<p>A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, específico para <i>Escherichia coli</i>. Incubar a 37°C durante 24 horas.</p> <p>Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.</p>
4	<p align="center">Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</p>	<p>El Control de Calidad de <i>Escherichia coli</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Al cultivo de trabajo obtenido se le realizan pruebas bioquímicas específicas observándose cada una de las siguientes características propias de la bacteria como lo son:</p> <p>Tinción de Gram: bacilos gram negativos, cortos.</p> <p>TSI: Fermentadoras de lactosa y glucosa, A/A</p> <p>Indol: Positivo,</p> <p>SIM: positiva,</p> <p>Citrato: negativo.</p> <p>Lisina: positiva.</p> <p>Fenilalanina: negativa.</p>



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

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- DEFINICIONES:

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

CRECIMIENTO MICROBIANO es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

FASE EXPONENCIAL.-parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

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

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

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<p align="center">Obtención de la <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883</p>	<p>Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en <i>American Type Culture Collection(ATCC)</i></p>
2	<p align="center">Recuperación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 Cultivo primario</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. 2. Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. 3. Saturar inmediatamente un hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de sangre, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. 4. Use el mismo hisopo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento 5. Incubar inmediatamente el medio de Mac conkey inoculado, a 37°C durante 24 horas Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas

3	<p align="center">Obtención del cultivo secundario de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883</p>	<p>A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, específico para <i>Klebsiella pneumoniae</i> Incubar a 37°C durante 24 horas.</p> <p>Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.</p>
4	<p align="center">Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</p>	<p>El Control de Calidad de <i>Klebsiella pneumoniae</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p> <p>Al cultivo de trabajo obtenido se le realizan pruebas bioquímicas específicas observándose cada una de las siguientes características propias de las bacterias como lo son:</p> <p>Tincion Gram: se observa la presencia de bacilos Gram negativos, pequeños, que están unidos en pares y en cadenas cortas</p> <p>TSI: No fermentan ni lactosa, oxidan glucosa. N/K</p> <p>SIM: positivo</p> <p>Lisina: negativa</p> <p>Oxidasa: positiva</p> <p>Catalasa: positiva</p> <p>Citrato: negativo</p>



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

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

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

4.- **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- **DEFINICIONES:**

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

CRECIMIENTO MICROBIANO es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

FASE EXPONENCIAL. parte del paso del crecimiento bacteriano en la cual las células se dividen regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo.

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

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

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<p align="center">Obtención de la <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853</p>	<p>Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en <i>American Type Culture Collection (ATCC)</i></p>
2	<p align="center">Recuperación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 Cultivo primario</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. 2. Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. 3. Saturar inmediatamente el hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Agar Cetrimide, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hisopo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento. 4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Cetrimide inoculado, a 37°- 42°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.

3	<p align="center">Obtención del cultivo secundario de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>	<p>A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Cetrimide, específico para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Incubar a 37°C durante 24 - 48 horas.</p> <p>Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.</p>
4	<p align="center">Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</p>	<p>El Control de Calidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Al cultivo de trabajo obtenido se le realizan pruebas bioquímicas específicas observándose cada una de las siguientes características propias de las bacterias como lo son:</p> <p>Tinción Gram: se observa la presencia de bacilos Gram negativos, pequeños delgados, que están unidos en pares y en cadenas cortas</p> <p>Cultivo: presenta olor mohoso, a su vez Producen la formación de pigmentos como son plocianina, piorrubina, piomelanina, pioverdina, los mismos que se pueden observar fácilmente en cultivos de 48 horas.</p> <p>TSI: No fermentan lactosa, oxidan glucosa. N/K</p> <p>SIM: positivo</p> <p>Lisina: negativa</p> <p>Oxidasa: positiva</p> <p>Catalasa: positiva</p>



1.-TITULO: VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Candida albicans*

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

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

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- DEFINICIONES:

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

CRECIMIENTO MICROBIANO es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo sino al demográfico de una población.

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

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Obtención de la <i>Candida albicans</i> ATCC 26790	Se obtiene esta cepa pura adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en <i>American Type Culture Collection(ATCC)</i>
2	Recuperación de <i>Candida albicans</i> ATCC 26790 Cultivo primario	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente. 2. Tomar el vial y colocar en el mismo 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, tapar y homogeneizar por 10 minutos. 3. Saturar inmediatamente un hisopo con material hidratado y transferir el material al medio de Sabouraud, girar el hisopo aplicando una leve presión, para inocular un área circular del medio de agar. Use el mismo hisopo a un lazo estéril para formar rayas o surcos repetidamente (10-20 veces), en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie el agar para aislamiento. 4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Sabouraud inoculado, a 37°C durante 24-48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas
3	Obtención del cultivo secundario de <i>Candida albicans</i> ATCC 26790	<p>A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de de Sabouraud, específico para <i>Candida albicans</i>. Incubar a 37°C durante 48 horas.</p> <p>Después de la incubación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.</p>
4	Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados	<p>El Control de Calidad de <i>Candida albicans</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización morfológica y pruebas específicas de la misma. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>Candida albicans</i>.</p> <p>KOH 20%: levaduras solas o en gemación</p> <p>Test de filamentación: positivo</p>



1.-TITULO: Preparación de Discos De Sensibilidad

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

3.- ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el laboratorio de Microbiología del Área de Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- DEFINICIONES:

EXTRACTO VEGETAL: es el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes como el alcohol.

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

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

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

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Obtención de los discos	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN N° 1 de 6 mm de diámetro
2	Esterilización de los discos	Esterilizar los discos colocándolos en una caja petri estéril en la cabina de flujo laminar mediante rayos ultravioleta (UV), por el lapso de dos horas.
3	Impregnación del extracto vegetal	Utilizar la caja petri, y colocar una malla metálica estéril en esta, a su vez colocar los discos estériles, impregnarlos con 10 ul, luego eliminar el solvente con la ayuda de una secadora y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de dilución, realizar el mismo procedimiento con cada una de la diluciones
4	Elaboración de controles negativos	Colocar un disco de papel filtro WHATMAN N° 1 de 6 mm de diámetro en una caja petri que va a contener la malla metálica estéril e impregnarlo con 10 ul de etanol al 70%, luego eliminar el solvente con la ayuda de una secadora y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de etanol al 70%.
5	Controles positivos	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-EAA-
UNL-021

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

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

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

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

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

6. METODOLOGÍA:

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

7. DESARROLLO

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Inoculación de las placas	<ul style="list-style-type: none">- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 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.- Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton, 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	Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada	<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.- Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm.

		<ul style="list-style-type: none"> - Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.
3	Incubación	<ul style="list-style-type: none"> - Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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 inoculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluyente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares. - Si se observan colonias aisladas, significa que el inoculo estaba diluido y la prueba debe repetirse. - Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros
5	Interpretación de los resultados	<ul style="list-style-type: none"> - $< 6\text{mm}$ Negativo (Resistente) - $6 - 9 \text{mm}$ Intermedio - $> 9\text{mm}$ Positivo (Sensible)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CEDAMAZ-ASH
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
PROYECTO PLANTAS MEDICINALES

PR-EAA-
UNL-022

1. **TITULO:** Procedimiento para evaluar la actividad antifúngica por el método de difusión en discos.
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales.
3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento.

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento.

Tesistas: Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

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

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

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

6. METODOLOGÍA:

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

7. DESARROLLO

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Inoculación de las placas	<ul style="list-style-type: none">- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 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.- Inocular la superficie seca de una placa de agar Sabouraud, 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	Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada	<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.- Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm.- Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.

3	Incubación	<ul style="list-style-type: none"> - Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35°C ± 2°C (las temperaturas de >35°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 48 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. - Si se observan colonias aisladas, significa que el inóculo estaba diluido y la prueba debe repetirse. - Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros
5	Interpretación de los resultados	<ul style="list-style-type: none"> - < 6mm Negativo (Resistente) - 6 – 9 mm Intermedio - > 9mm Positivo (Sensible)



1.-TITULO: Procedimiento para la realización de la concentración mínima inhibitoria en la evaluación antimicrobiana

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

3.- ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el laboratorio clínico del centro de diagnóstico de la UNL.

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- DEFINICIONES:

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

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

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

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

CMI: Un antibiótico se considera activo frente a una bacteria cuando inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa in vitro determinando la concentración inhibitoria

mínima (CIM), que es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo.

TECNICAS DE REALIZACIÓN para evaluar la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico in vitro se puede determinar mediante técnicas de diluciones en medio líquido, en medio sólidos o por técnicas de gradiente de difusión, como el Épsilon-test. Todos estos métodos requieren una rigurosa estandarización del medio de cultivo, del inóculo bacteriano, de la temperatura, la atmosfera, el tiempo de incubación y de los criterios de lectura.

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

7.- DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Dilución del inóculo	Se prepara el inóculo con las cepas en solución salina a una concentración similar al patrón 0.5 de la escala de MacFarland, al cual se diluye 1/200 obteniendo una concentración microbiana final de 10^5 - 10^6
2	Preparación de sub-diluciones	Se colocan 8 tubos con 3 ml del caldo tripticasa soja, en el primer tubo se adiciona 1 ml del extracto que presente inhibición en la actividad antimicrobiana, de este se extrae 1 ml y se realizan las diluciones sucesivas de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 hasta el tubo 6. En el tubo 7 se coloca un antibiótico conocido para el control positivo y en último tubo se adiciona 1ml de etanol al 70% que nos servirá como blanco.
3	Preparación de las muestras	En las diluciones anteriores se colocan en los 8 tubos 1ml del inóculo que presenta una concentración microbiana de 10^5 - 10^6 .UCF/ml
4	Incubación	Se incuba durante 24 horas a 37 °C.
5	Lectura de resultados	Se leen los resultados, en los que se considera como CMI la del tubo con mayor dilución del extracto que no presente aumento de turbidez respecto al tubo testigo utilizado como blanco.



1.-TITULO: Procedimiento para la realización de la concentración mínima bactericida en la evaluación antimicrobiana

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

3.- ALCANCE: Este procedimiento es aplicado en el laboratorio clínico del centro de diagnóstico de la UNL.

4.- RESPONSABLES:

Director del proyecto: Aprobar el procedimiento

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

Técnico de laboratorio: Ejecutar y evaluar el procedimiento

Tesistas: Aplicar el procedimiento

5.- DEFINICIONES:

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

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

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

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

CMB: la menor concentración de un antimicrobiano que reduce la población de un microorganismo a 0.1% o menos del número de células presentes en el inóculo original se

conoce como concentración mínima bactericida o letal para al menos el 99.9% del inóculo original.

Variables biológicas de las pruebas del CMB:

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

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

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

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

7.- DESARROLLO:

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