UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA:

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl por el método de difusión en agar.

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

AUTORA:

Jéssica Vanessa Castro Córdova

DIRECTOR:

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana

LOJA
MARZO-2012

TÍTULO

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl por el método de difusión en agar.

AUTORÍA

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

Jéssica Vanessa Castro Córdova

CERTIFICACIÓN

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECTOR DE TESIS:

Certifico:

Que el trabajo de Investigación titulado **"Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl por el método de difusión en agar"** realizado por la Srta. Jéssica Vanessa Castro Córdova ha sido elaborado, orientado y rectificado bajo mi dirección, cumpliendo con los requisitos académicos y reglamentarios para su aprobación; por lo tanto, faculto a la autora para su presentación, disertación y defensa.

Loja, Marzo 2012

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana
DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana y a la Carrera de Laboratorio Clínico, por haberme permitido cursar por años magníficos y por brindarme una formación con calidad humana y profesional.

Al Dr. Luis Morocho por su constante ayuda, asesoría, dedicación y enseñanza que fue importante para el desarrollo y culminación de mi tesis, de igual manera a la Dra. Claudia Cruz por transmitir sus conocimientos, orientación y apoyo. A la Lic. Karla Montalvo por compartir sus ideas, experiencias y aporte incondicional para la realización del presente estudio.

Al Centro de Estudios y Desarrollo de la Amazonía (CEDAMAZ), por su apoyo financiero para que se lleve a cabo la presente investigación.

Al Centro de Diagnóstico Médico del Área de la Salud Humana por las facilidades otorgadas y colaboración para la ejecución del trabajo investigativo.

A los docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico por compartir desinteresadamente sus amplios conocimientos y experiencias.

Agradezco a todas las personas que de diferente manera hicieron posible la realización de este trabajo y han contribuido a que culmine satisfactoriamente mi carrera profesional.

GRACIAS A TODOS!!!!

DEDICATORIA

Con mucho amor, afecto y esfuerzo dedico mi tesis:

A Dios por brindarme la oportunidad de vivir, por otorgarme la fuerza, voluntad, sabiduría necesaria para continuar cada peldaño de mi formación profesional.

Con profundo cariño principalmente a mis padres Artemio y Gina. Por su apoyo incondicional para lograr mis metas y objetivos propuestos. Gracias mamita por ofrecerme siempre consejos, motivación, fuerza para ser perseverante, por tu compañía y amor en los momentos difíciles, te agradezco de todo corazón.

A mis hermanos José, Mikaela y especialmente a Camilo por estar siempre presente con sus recomendaciones y aliento para seguir adelante, los quiero mucho.

A mi Familia gracias por sus consejos y palabras de apoyo; de manera muy especial a mi abuelita Dolores y mi tía Vanessa que me acompañaron, dieron la impulso y orientación necesaria en lo que fuera necesario.

A mis compañeras y amigas del proyecto Angélica, Daniela, Lupe y Andrea gracias por su amistad, confianza, comprensión, tolerancia y experiencias compartidas ya que con su contribución este trabajo se realizó con éxito.

JÉSSICA CASTRO CÓRDOVA

RESUMEN

El uso terapéutico de elementos naturales permite y sustenta el desarrollo de la vida sobre la tierra; los agentes terapéuticos naturistas forman parte del entorno natural, y se emplean para preservar, fomentar y recuperar la salud. El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico Médico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja y en el cual se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico obtenido a partir de hojas y flores de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng (Hierba del toro) y de hojas de *Calatola costaricensis* Standl (Piu) por el método de difusión en agar. Estas especies vegetales son utilizadas por sanadores de la Provincia de Zamora Chinchipe para tratar enfermedades de tipo infeccioso como la enfermedad diarreica e infección respiratoria aguda. Según estudios bibliográficos no se reportan trabajos investigativos de actividad antimicrobiana sobre estas plantas, por ello surge la necesidad de plantear esta investigación. Para realizar el estudio se utilizó extracto seco liofilizado, en diluciones etanólicas al 70 % v/v: 1/100, 1/1000, 1/10.000, frente a cinco cepas estandarizadas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); y *Candida albicans* (ATCC 26790), mediante el método de Kirby-Bauer modificado; el cual consiste en usar un disco de papel filtro impregnado con el extracto a determinar, colocado sobre un medio de cultivo inoculado con los microorganismos de referencia para posteriormente ser incubado y medido el diámetro del halo de inhibición alrededor del mismo. Con la metodología empleada *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng (Hierba del toro) y *Calatola costaricensis* Standl (Piu) no presentaron actividad antibacteriana ni antifúngica frente a los microorganismos antes mencionados. Los resultados obtenidos fueron difundidos a los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico del VII módulo de Microbiología.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, Actividad antifúngica, extracto, *Cuphea racemosa*, *Calatola costaricensis*, difusión en agar.

SUMMARY

The therapeutic use of natural elements allows and supports the development of life on the earth; the naturists therapeutic agents are part of the natural environment, and are used to preserve, promote and recovery of health.This research work, was develop at Microbiology Laboratory of the Center for Medical Diagnosis of the Area of Human Health from the National University of Loja and it was evaluate the antibacterial and antifungal activity of the ethanolic extract obtained from leaves and flowers of *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng (Hierba del toro) and leaves of *Calatola costaricensis* Standl (Piu) by the agar diffusion method. These vegetable species are frequently used by traditional healers in the province of Zamora Chinchipe to treat infectious diseases as diarrhea disease and acute respiratory infection. According to the bibliographic study don't are reported investigative works on these plants, therefore there is a need to realize this investigation. For this study we used dry extract lyophilisate, at dilutions ethanolic 70% v/v: 1/100, 1/1000, 1/10000, compared to five standardized strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); and *Candida albicans* (ATCC 26790). Using the Kirby-Bauer method modified, which consists in use a filter paper disc impregnated with the extract to determine, located on a cultivation medium inoculated with the microorganisms reference to be incubated later and measured the diameter of inhibition around itself. With the methodology employed *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng (Hierba del toro) and *Calatola costaricensis* Standl (Piu) didn't show antimicrobial activity front the used microorganisms aforementioned. The obtained results were diffused to the students of clinical laboratory in the VII module of Microbiology.

Keywords: antibacterial activity, antifungal activity, extract, *Cuphea racemosa, Calatola costaricensis*, agar diffusion.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Págs.

TÍTULO…….....I
AUTORÍA…….....II
CERTIFICACIÓN…….....III
AGRADECIMIENTO……....IV
DEDICATORIA…….....V
RESUMEN…….....VI
SUMMARY……..….VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....VIII

I. INTRODUCCIÓN…….....1
II. REVISIÓN DE LITERATURA....……..…….....4
III. MATERIALES Y MÉTODOS…….....40
IV. RESULTADOS……..……46
V. DISCUSIÓN…….…….....48
VI. CONCLUSIONES…….…….....51
VII. RECOMENDACIONES……53
VIII. BIBLIOGRAFÍA…….....55
ANEXOS

I
INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas con fines curativos se ha dado desde los albores de la historia, este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia del día a día[1]. Desde que el hombre existe, las plantas han sido parte integral de su vida. En todo el mundo se descubren pruebas de su uso y de tradiciones basadas en ellas, su valor más evidente responde a su empleo como fuente de algunas drogas utilizadas en los medicamentos modernos[2]. Con certeza, las virtudes medicinales de las plantas solo pueden explicarse hoy por la existencia en ellas de determinados componentes quimicos, conocidos como principios activos, estos varían desde el punto de vista de su naturaleza química, y en qué órgano vegetal radica su existencia[3].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), se calcula que las dos terceras partes de la población mundial, 4.000 millones de personas, recurren al uso de plantas medicinales para tratar sus enfermedades[4]. Es así que, al menos, 7.000 compuestos de la farmacopea occidental se derivan de plantas y 35.000 especies de plantas del mundo tienen valor medicinal, la gran mayoría originarias de países en vías de desarrollo[2].

En América Latina, donde gran parte de la población no tiene acceso a un programa de salud primario y medicinas sintéticas, el uso y comercio de las plantas medicinales se ha mantenido e incluso incrementado por razones económicas, sociales y culturales[4]. El Ecuador cuenta con innumerables plantas medicinales que nuestros pueblos nativos utilizan para tratar sus dolencias, debido a que es un medio eficaz y económico al alcance de todos[5].

Es importante indicar que la zona de estudio es la provincia de Zamora Chinchipe, cuya población rural del sector presenta un deterioro de la calidad de salud, esto se debe por falta de recursos económicos, socio-culturales y la deficiente infraestructura sanitaria[6]. Es por ello que despierta la necesidad de recurrir al conocimiento ancestral basado en plantas medicinales para tratar sus enfermedades como un recurso sustentable y accesible.

En el 2007 la primera causa de morbilidad en Ecuador fueron las enfermedades respiratorias agudas habiendo reportado 69% del total de consultas. En la provincia de Zamora Chinchipe, en el mismo año; se presentaron 93.1% de consultas con diagnóstico de procesos infecciosos, las cuales registraron, en primer lugar, a las infecciones respiratorias agudas con 59.1%, luego la enfermedad diarreica aguda con 25%, seguidas de enfermedades venéreas con 9%[7].

A nivel internacional se da una gran tendencia al desarrollo de estudios de actividad antimicrobiana de plantas medicinales, presentando resultados favorables. En nuestro país existen pocos estudios de este tipo, lo que limita su uso como complemento a la medicina occidental, siendo necesario fortalecer la investigación, promoción y recuperación de la medicina ancestral basada en plantas.

El presente estudio determinó la actividad antimicrobiana de diluciones etanólicas al 70% v/v: 1/100, 1/1000, 1/10.000, del extracto liofilizado de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng (Hierba del toro) y *Calatola costaricensis* Standl (Piu), empleando el método de difusión en agar de Kirby Bauer modificado; que radica en usar un disco de papel filtro impregnado con el extracto a determinar, colocado sobre un medio de cultivo inoculado con los cepas ATCC, para luego ser incubado y medido el diámetro del halo de inhibición alrededor del mismo. El ensayo reveló que las plantas no presentan actividad antibacteriana ni antifungica frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)*; Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomona aeruginosa (ATCC 27853); Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); y *Candida albicans* (ATCC 26790), mediante el método y diluciones aplicadas en el estudio. Los resultados obtenidos fueron difundidos a los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico del VII módulo correspondiente a Microbiología.

II
REVISIÓN DE LITERATURA

PLANTAS MEDICINALES

Historia

La medicina natural basada en plantas medicinales parte de dos principios. El primero es que las enfermedades, aunque sean locales, afectan a la totalidad del ser humano y, por lo tanto, el tratamiento debe ser global y abarcar aspectos como la alimentación, el ejercicio, los hábitos de vida, etc[(8)].

El segundo principio se basa en el tratamiento inoculo, es decir, el uso de remedios y sustancias naturales que usadas con criterio no afectan al organismo ni tengan efectos colaterales. Por otro lado, al usar sustancias naturales, se alienta al organismo a luchar por sí mismo contra la enfermedad.

La medicina moderna se caracteriza por la utilización de una tecnología cada vez más compleja y por el uso de drogas sintéticas de producción industrial. Esto ha representado, indiscutiblemente, avances muy importantes en la detección y el tratamiento de numerosas enfermedades y dolencias. Pero, junto con los adelantos, se han originado también diversos problemas. Por ejemplo, el costo de las prestaciones, que se vuelve cada vez más inaccesible para amplios sectores sociales; además, la mayoría de los medicamentos industrializados tiene efectos colaterales nocivos, especialmente si su uso es prolongado[(8)].

Posiblemente por estas razones la OMS definió en 1978, en su 31ª. Asamblea general, el lanzamiento de un programa mundial para evaluar y utilizar los elementos y los métodos de la medicina popular. Esto significa, por un lado, el uso terapéutico de plantas y alimentos; por el otro, la revalorización de métodos y técnicas no agresivas para el cuerpo, en muchos casos de tradición milenaria. Es importante aclarar que esto no significa un rechazo a la medicina o la ciencia, ni el respaldo al curanderismo o la automedicación; por el contrario, es parte de una corriente mundial cada vez más fuerte, que busca el aprovechamiento integral de todo el potencial curativo de la naturaleza, como alternativa o complemento del criterio tecnológico predominante[(8)].

Definición de plantas medicinales

Son aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial es servir como medicamento que alivie la enfermedad[(1)].

La parte utilizada o droga vegetal

Se conoce así a la parte o partes concretas de la planta que le confieren su utilidad terapéutica. Así, cuando definimos una planta como medicinal debemos mencionar obligatoriamente la parte de esta planta que sustenta la actividad curativa. Por ejemplo, en el caso de la manzanilla (*Matricaria recutita L.*) la parte utilizada o droga vegetal de esta planta son las flores, pero no las hojas ni el tallo; por tanto, sin en una infusión de manzanilla no hay flores, no habrá actividad terapéutica[(9)].

Importancia

El beneficio de las plantas, desde el punto de vista terapéutico, sea dar ciertas, mezclas biológicas de distintos elementos terapéuticos, nutricionales y otros desconocidos que logran, después de un tiempo, equilibrar las alteraciones propias de la enfermedad[(10)]. Las plantas medicinales sin embargo se caracterizan por aportar al organismo múltiples principios activos que al tratarse de moléculas orgánicas se absorben en general más fácilmente y su efecto depende de la acción conjunta de variadas sustancias que se potencian y equilibran mutuamente pudiendo beneficiar a diferentes órganos o funciones del organismo. Si bien su acción es más lenta, seguramente será más persistente en el tiempo; no es frecuente la aparición de efectos de rebote, o de resistencias, o provocar adicciones o efectos tóxicos. Tengamos en cuenta sin embargo, que aunque no con la frecuencia de los medicamentos químicos, las plantas medicinales también tienen sus limitaciones y efectos secundarios[(9)].

Efectos secundarios

Con respecto a la seguridad en el uso de las plantas, muchas drogas de origen vegetal provienen de la medicina tradicional y han sido utilizadas durante cientos de años, lo cual proporciona cierta garantía de su inocuidad, principalmente en lo que a toxicidad aguda se refiere. A pesar de todo, si bien sabemos que los productos fitoterápicos suelen tener márgenes terapéuticos amplios y menos efectos secundarios, las drogas vegetales y sus derivados, no están exentas de posibles, y a veces incluso graves efectos secundarios, interacciones o incompatibilidades y contraindicaciones[(9)].

Métodos para usar las plantas medicinales

La forma más común de preparar y administrar las plantas medicinales por los sanadores de la región se refieren a las siguientes:

- **Infusiones o tisanas:** es la forma más popular de uso de las plantas medicinales. Procedimiento ideal para obtener de forma casera los principios activos de las partes delicadas de las plantas: hojas, flores, sumidades y tallos tiernos. Se realiza vertiendo agua hirviendo sobre una proporción de planta adecuada. Dejar reposar tapada entre 5 y 10 minutos para finalmente colar y tomarla[(9)].
- **Decocción:** se utiliza principalmente para preparar medicamentos a partir de partes duras de la planta (tallos, cortezas, semillas, raíces, rizomas). Generalmente se prepara en proporción de una parte de droga vegetal por 20 partes de agua, antes de iniciarse la ebullición se debe colocar la parte de la planta y mantenerla en cocción durante 1 a 15 minutos siempre tapada y con posterior reposo[(11)].
- **Tintura:** la tintura se obtiene por inmersión prolongada de una planta fresca o seca en alcohol diluido. Las proporciones son generalmente de una parte de plantas pulverizadas o trituradas por cinco partes de alcohol al 70%. Se deja macerar en un recipiente bien cerrado de 2 a 6 días, según los casos, y luego se filtra el líquido[(12)].
- **Maceración:** consiste en colocar la planta en la proporción adecuada en el disolvente elegido: agua, aceite, alcohol, o aguardiente; en un recipiente opaco, manteniendo en reposo durante 12 a 24 horas, por

término medio, hasta dos a tres semanas. Muchas veces conviene que la planta esté triturada para facilitar la extracción de principios activos[9].

- **Jugo fresco:** se obtiene a partir de plantas frescas trituradas y prensadas[12].

Actividad antimicrobiana de plantas medicinales

Las propiedades antimicrobianas de sustancias y aceites esenciales que las plantas contienen como productos de su metabolismo secundario han sido reconocidas empíricamente durante siglos, pero sólo recientemente fueron confirmadas científicamente[13].

Actualmente los microorganismos que causan perjuicios a la salud humana se están mostrando resistentes a la mayoría de los antimicrobianos conocidos, lo que ha incentivado aún más la búsqueda por antibióticos de origen natural; por lo cual, extractos y aceites esenciales de plantas se han mostrado eficaces en el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias. La actividad antimicrobiana de algunas plantas medicinales es revelada mediante extractos, fracciones y compuestos aislados que presentan la capacidad de controlar el crecimiento de una o más especies de microorganismos, indicando buen potencial de aplicación como antimicrobiano[13].

Metabolitos secundarios

Son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. Además, se conocen moléculas activas generadas por diversas especies vegetales, necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con roles muy importantes en el reino vegetal[14].

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas

funciones. Se denominan metabolitos primarios. Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios[(15)].

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies[(15)].

Grupos químicos con acción antimicrobiana aislados de plantas

Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que solo el 10% de los metabolitos secundarios posee cierta actividad frente a los microorganismos. No se conoce cuál es la razón, se cree que podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano. Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados[(16)].

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

1. **Terpenoides**

   Es un grupo importante de componentes vegetales que tienen un origen biosintético común. Todos, aunque con estructuras químicas muy distintas, proceden de la condensación, en número variable, de unidades isoprénicas. Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos constituyentes de los aceites

esenciales, derivados de monoterpenos correspondientes a los iridoides, lactonas sesquiterpénicas que forman parte de los principios amargos, algunos diterpenos que poseen actividades antimicrobianas de aplicación a la terapéutica y por último, triterpenos y esteroides entre los que se encuentran las saponinas y los heterósidos cardiotónicos[17].

2. Compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y sus derivados.

Polifenoles

Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes son:[18].

- **Ácidos fenólicos.-** sus acciones farmacológicas y aplicaciones son diversas, como antioxidantes, analgésicos, coleréticos etc. El eugenol por ejemplo es un antimicrobiano y anestésico local empleado en odontología. Entre los fenoles en estado libre, se encuentran constituyentes importantes de las esencias, como el timol y su isómero el carvacrol (esencias de tomillo)[18].
- **Cumarinas.-** se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales. Están presentes en las margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitronbóticas y vasodilatadoras. Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral[16].
- **Flavonoides.**- son los pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo-pirona o fenilcromona. Se dan mucho en el reino vegetal, normalmente en forma de heterósidos. Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Existen 6 clases principales, las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavanoles, las antocianidinas, y los taninos condensados, y otras dos más, las xantonas y las auronas Diversos

estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte efectos antiinflamatorios y antivirales[18].

- **Lignanos.**- son muy abundantes en el reino vegetal. Por ejemplo, la podofilotoxina, se encuentra en el rizoma del podófilo (*Podophyllum peltatum*) y es la precursora de 2 sustancias (etopósido y tenipósido) empleadas en terapia antitumoral. También la silimarina, que es hepatoprotectora y se obtiene del cardo mariano (*Sylibum marianum*)[18].
- **Taninos.-** son sustancias de origen vegetal natural, no nitrogenadas de estructura prolifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Sus principales propiedades con su capacidad de poseer acciones antidiarreicas, astringentes, cicatrizantes y hemostáticas[18].
- **Quinonas.-** las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio[16].

3. Compuestos nitrogenados o alcaloides

Son aquellos metabolitos secundarios de las plantas sintetizados, generalmente, a partir de aminoácidos. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, cafeína y la estricnina. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo[16].

Plantas Medicinales en estudio

Cuphea racemosa (L.f.) Spreng

Fotografía: Dr. Luis Morocho

Nombre común: Hierba del toro

Información Taxonómica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Lythraceae

Género: Cuphea

Epíteto específico: racemosa

Nombre Científico: *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng.

Autor del nombre: (L. f.) Spreng[19].

Características generales de la especie

- **Descripción:** *Cuphea racemosa* es una hierba de casi 50 cm de altura, siendo un tanto maderos en la base, con pelos glandulares en tallos rojizos. Las hojas son opuestas, simples, obovadas, elípticas u

oblongas, de 6 cm de largo, con algunos pelos glandulares en la superficie inferior y bordes con pelos blancos, muy finos. Las flores se distribuyen en panículas terminales. El tubo floral presenta su joroba distintiva en la base y bandas rojizas oscuras. La corola es blanca con una banda rosada en cada pétalo contiene 6 pétalos. El fruto es una cápsula pequeña ovoide, de 4 mm de largo, conteniendo 4 semillas[20].

- **Distribución geográfica:** este género consiste en 260 especies. Esta especie es de origen sudamericano, distribución amplia, es una de las más variables y complejas de *Cuphea*. Nativa de Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina[21].
- **Hábitat:** se les encuentra creciendo en sitios abiertos como potreros, bordes de caminos, barrancas húmedas, orillas de arroyos, malezas de cultivos, lugares húmedos y sombreados. Es común por debajo de los 1900 metros[20-21].
- **Propiedades medicinales:** diurético, purgante y depurativo de la sangre (partes usadas: tallos y hojas)[22].
- **Utilización de la planta en la zona de estudio:** la utilizan para tratar la enfermedad diarreica aguda, para lo cual utilizan las hojas y flores, se hierve un puñado en un litro de agua por 5 minutos, de esta preparación se beben 250 ml, tres veces al día[23].

Los metabolitos presentes en *Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng fueron los siguientes:

Tabla Nº 1
Metabolitos de *Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng

Ensayo	Resultado
Triterpenos	++
Quinonas	-
Flavonoides	-
Lactonas	+
Saponinas	+
Fenoles	+
Aminoácidos	++

Leyenda: Reacción negativa (-); Reacción débil (+); Reacción media (++); Reacción intensa (+++)
Fuente: Laboratorio de fitoquímica-Universidad Nacional de Loja.
Autor: Dr. Luis Morocho.

Calatola costaricensis Standl

Fotografía: Dr. Luis Morocho

Nombre común: Piu

Información Taxonómica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Celastrales

Familia: Icacinaceae

Género: Calatola

Epíteto específico: costaricensis

Nombre Científico: *Calatola costaricensis Standl*[24].

Características generales de la especie

- **Descripción:** los frutos son drupas verdes abundantes en el árbol, al caer sin embargo, toman una coloración negro-azulada (al igual que las hojas al cortarse). Las semillas son fáciles de reconocer por su apariencia rugosa, estas se encuentran esporádicamente en el suelo, sin embargo en muchas ocasiones solo se encuentra presente la testa. La

plántula es fácil de reconocer por sus hojas simples alternas fuertemente dentadas con el tallo verde oscuro y engrosado[25].

- **Distribución geográfica:** especie nativa de México, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Nicaragua, Venezuela Panamá y Perú [26].
- **Hábitat:** es una especie muy abundante en vertientes y en orillas del río[25].
- **Utilización de la planta en la zona de estudio:** la utilizan para tratar caries dentales, para lo cual se utiliza de 2 a 4 gramos de hojas, y se mastican por 5 minutos[23].

Los metabolitos presentes en *Calatola costaricensis Standl* fueron los siguientes:

Tabla Nº 2
Los metabolitos de*Calatola costaricensis Standl*

Ensayo	Resultado
Triterpenos	+
Quinonas	-
Flavonoides	-
Lactonas	-
Saponinas	+
Fenoles	-
Aminoácidos	-

Leyenda: Reacción negativa (-); Reacción débil (+); Reacción media (++); Reacción intensa (+++)
Fuente: Laboratorio de fitoquímica-Universidad Nacional de Loja.
Autor: Dr. Luis Morocho.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las bacterias

Son microorganismos procariotas, es decir microorganismos unicelulares sencillos, que a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos, los procariotas poseen un ribosoma más pequeño (el ribosoma 70S); asimismo, la mayoría de las bacterias poseen una pared celular de peptidoglucano cuya estructura es semejante a una malla que rodea las membranas para protegerlas del entorno. Las bacterias son capaces de sobrevivir en el seno de unos ambientes hostiles en los que la presión osmótica

extracelular es tan baja que provocaría la lisis de la mayoría de las células eucariotas, o bien en presencia de temperaturas extremas, en un ambiente seco y con fuentes de energía diversas. Las estructuras y las fusiones bacterianas han sufrido un proceso evolutivo con el fin de adaptarse a estas condiciones adversa[27].

Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza:

- Su tamaño (de 1 a 20µm o más),
- Su forma (esferas, bastoncillos, espirales).
- Su disposición espacial (células aisladas, en cadenas y formando cúmulos).
- Su clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas.

El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente. También se encuentran bacterias en el ambiente como el aire, el agua y los alimentos**;** aunque muchas de ellas son relativamente virulentas, otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles[27].

Estructura de una bacteria:

Estructura de superficie y de cubierta.

- La cápsula, algunas bacterias están rodeadas por una estructura viscosa y pegajosa firmemente adherida a la pared e impermeables, que forma una capa o envoltura alrededor de la célula. Esta capa gelatinomucosa de tamaño y composición variable juegan un papel importante en las bacterias patógenas[28].
- Los cilios o flagelos, son apéndices filamentosos, ondulados, sinuosos, extremadamente finos y frágiles que se originan en una estructura

granular llamada cuerpo basal, localizada en el citoplasma. Su principal función es proporcionar movimiento a las bacterias[28].

- La pared que poseen la mayoría de las bacterias explica la constancia de su forma. En efecto, es rígida, dúctil y elástica. Su originalidad reside en la naturaleza química del compuesto macromolecular que le confiere su rigidez. Este compuesto, un mucopéptido, está formado por cadenas de acetilglucosamina y de ácido murámico sobre las que se fijan tetrapéptidos de composición variable. Las cadenas están unidas por puentes peptídicos. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular Gram positiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular Gram negativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa[27].
- La membrana citoplasmática, ubicada inmediatamente debajo de la pared celular. En las bacterias Gram negativas, es la membrana más interna, limitando con el citoplasma y solo separada de la membrana externa por un espacio llamado espacio periplásmico. En las bacterias Gram positivas se sitúa por debajo de la pared bacteriana. Es soporte de numerosas enzimas, en particular las respiratorias. Los mesosomas, repliegues de la membrana, tienen una gran importancia en esta etapa de la vida bacteriana. Es indispensable porque controla el paso de sustancias químicas en solución: del exterior hacia el interior y viceversa de la célula bacteriana[28].

Estructuras internas

- El núcleo lleva el material genético de la bacteria; está formado por un único filamento de ácido desoxirribonucleico (ADN). El material nuclear se encuentra como una larga molécula de dos cadenas que forman el cromosoma bacteriano.
- Los ribosomas son estructuras extraordinariamente numerosas, son gránulos densos, homogéneos, redondeados pero ligeramente aplanados que se hallan contenidos en el citoplasma bacteriano;

esencialmente compuestos por ácido ribonucleico, desempeñan un papel principal en la síntesis proteínas.

- El citoplasma, lo constituye un sistema coloidal o hidrogel, compuesto por un 85% de agua y el 15% restante por minerales, estructuras y enzimas[28].

Crecimiento bacteriano

Se suele definir el crecimiento de cualquier sistema biológico como el incremento de la población, al número de bacterias, la masa total de todo el conjunto de la población. Considerando así el crecimiento bacteriano, deberemos definir los dos conceptos con los que podemos medir el crecimiento bacteriano:

- **Concentración bacteriana** es el número de células que se encuentran en un volumen determinado del medio de cultivo.
- **Densidad bacteriana** es la masa total del conjunto de la población, sin que importe el número de bacterias[29].

Requerimientos nutritivos para el crecimiento bacteriano

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe estar exento de todo microorganismo contaminante y reunir una serie de condiciones como son:

- ✓ **Disponibilidad de nutrientes adecuados.-** un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener, como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, vitaminas, y sales inorgánicas. Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añade a muchos medios factores estimulantes como suero, sangre, líquido ascítico, etc. Factores de crecimiento que por sí solas son incapaces de sintetizar, como aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidinicas[30].
- ✓ **Consistencia adecuada del medio.-** partiendo de un medio líquido podemos modificar su consistencia añadiendo productos como albúmina, gelatina o agar, con lo que obtendríamos medios en estado semisólido y sólido[30].

- ✓ **El potencial redox.-** gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. Los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones de oxígeno muy reducido, mientras los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones[30].
- ✓ **El pH.-** las bacterias se desarrollan habitualmente a pH próximo a la neutralidad (6,8-7,6), aunque algunas exigen un pH específico distinto[30].
- ✓ **La presión osmótica.-** debido a la composición de la pared bacteriana, los gérmenes se adaptan bien a las variaciones de la presión osmótica; sin embargo, in vitro, los medios de cultivo se preparan en condiciones de isotonía[30].
- ✓ **La hidratación.-** la presencia de agua es indispensable para el crecimiento bacteriano, por lo que deberá estar presente en los medios de cultivo en cantidad suficiente[30].
- ✓ **La temperatura.-** es otro dato importante a tener en cuenta para el crecimiento bacteriano, por lo que deberá estar presente en los medios de cultivo en cantidad suficiente[30].
- ✓ **La atmosfera.-** algunas bacterias, especialmente algunas aerobias y facultativas, necesitan para su óptimo desarrollo de la presencia de ciertos ambientes gaseosos. El más utilizado es el anhídrido carbónico en proporciones que varían del 3 al 10%[30].

Curva de crecimiento bacteriano

Cuando se han satisfecho los requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales cubren los requerimientos físicos y podemos medir la velocidad de multiplicación de las células bacterianas. Se comentarán cuatro de las fases de crecimiento más importantes:[29].

1) **Fase de adaptación:** es la etapa inicial del crecimiento de una población bacteriana en la que no se observa aumento en el número de bacterias, en esta etapa hay una acelerada actividad metabólica con formación de productos intermediarios, y se acumula una alta concentración de ARN y otros productos para el metabolismo[29].
2) **Fase logarítmica (fase exponencial):** en esta fase se observa un trazo recto en la gráfica de forma ascendente; significa un fenómeno logarítmico en la multiplicación bacteriana, y es la máxima velocidad de multiplicación de esa especie[29]. Es decir que las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido, se sintetiza nuevo material celular a una tasa constante y la masa aumenta de manera exponencial[31].
3) **Fase Estacionaria Máxima:** el trazo de la gráfica es horizontal, ya no aumenta el número de bacterias vivas como en la fase logarítmica, en esta etapa el número de bacterias viables y el número de bacterias inactivas se equilibra por un corto tiempo. Esto se debe a que los nutrientes se están agotando, se acumulan productos tóxicos de desecho del metabolismo y el pH vira hacia la acidez, esto genera un ambiente nocivo para la vida bacteriana y sólo las bacterias más resistentes a estos factores logran sobrevivir y multiplicarse[29].
4) **Fase de Declinación (fase de muerte):** en esta etapa llamada muerte logarítmica, se observa un trazo recto descendente en la gráfica de la curva, debido a que un número mucho mayor de bacterias muere en relación con las que sobreviven, es decir, que solamente las más resistentes pueden multiplicarse en las condiciones que se han generado en esta etapa, como son la falta de nutrientes, la concentración crítica de productos tóxicos del metabolismo y el viraje del pH[29].

Es importante mencionar que esta curva puede ser aplicada no solo a las bacterias, sino también a otras muchas especies, sobre todo cuando la sobrepoblación llega a generar condiciones ambientales incompatibles para la vida[29].

Las bacterias utilizadas para el ensayo del presente estudio son:

Staphylococcus aureus

Los *Estafilococos* son cocos esféricos catalasa-positivos y aparecen con frecuencia en grupos arracimados en los frotis teñidos. Crecen bien en cualquier medio nutritivo que contenga peptona tanto en condiciones aerobias como anaerobias y pueden producir la hemólisis de la sangre de varias especies animales y una pigmentación amarilla o anaranjada en agar. El crecimiento de los estafilococo se pueden registrar rápidamente en las placas de agar sangre y en varios tipos de caldo nutritivo[32].

EL *Estafilococo aureus* se diferencia de otras especies de estafilococo principalmente por su producción de coagulasa. Se han reconocido antigénicamente dos tipos de coagulasas, una unida a la pared de la célula y otra que es liberada por la pared celular o está libre de ella. Si bien este mecanismo no se ha aclarado totalmente, se cree que un factor plasmático o coagulasa reactante reacciona con la coagulasa fijada a la célula para formar el complejo coagulasa-trombina, el cual, por su parte, actúa sobre el fibrinógeno para formar el coagulo de fibrina. La coagulasa unida a las células se denomina factor de coagulación por algunos y forma la base de la prueba de la coagulasa en porta. La coagulasa libre o no fijada parece formar un complejo con la protrombina para dar un producto parecido a la trombina[32].

Puede estar presente entre la flora propia de la piel, ojos, vías respiratorias superiores, tubo gastrointestinal, uretra y vagina. La infección puede partir de una fuente endógena o exógena, quedar localizada, afectar el torrente sanguíneo, posiblemente con el desarrollo de puntos metastásicos de infección[32].

- **Morfología e identificación.-** los *estafilococos* son células esféricas de casi 1µm de diámetro dispuestas en grupos irregulares. En líquido de cultivo también se observan como únicos en parejas, tétradas y cadenas. Los cocos jóvenes son fuertemente Gram- positivos; después de envejecer muchas células se hacen Gram-negativas. Los estafilococos están desprovistos de motilidad y no forman esporas. Bajo

la influencia de fármacos como la penicilina, los estafilococos sufren lisis[31].

- **Cultivo.-** los *estafilococos* crecen con facilidad sobre caso todos los medios bacteriológicos en condiciones aerobias o microaerofílicas. Crecen con mayor rapidez a 37ºC, pero el pigmento se forma mejor a temperatura ambiente (20- 25ºC). Sobre medio sólido las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes. El *S. aureus* comúnmente forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso. El *S. aureus* y, en ocasiones, otras especies pueden producir hemólisis de grado variables[31].

Escherichia coli

Pertenece a la familia de las enterobacteriáceae son un vasto grupo heterogéneo de bacilos Gram-negativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales. La *E. Coli* forma parte de la flora normal e incidentalmente causan enfermedad. Son microorganismos aerobios, fermentan una amplia variedad de carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja y producen varias toxinas y otros factores de virulencia[31].

La familia *Enterobacteriaceae* muestra las siguientes características: son bacilos Gram-negativos dotados de motilidad por flagelos perítricos o carentes de motilidad; crecen sobre peptona o medios con extracto de carne sin adhesión de cloruro de sodio ni otros suplementos; crecen en MacConkey; crecen en condiciones aerobias y anaerobias (son aerobios facultativos); fermentan la glucosa en vez de oxidarla y con frecuencia producen gas; son catalasa- positivos, oxidasa negativos y reducen el nitrato a nitrito[31].

- **Morfología.-** son bacilos gramnegativos de 2-3µm, tiene movilidad por flagelos perítricos, poseen fimbrias y pilis, muchas cepas producen una pequeña microcápsula, y muy pocas elaboran macrocápsula, no fabrican esporas y pueden crecer de forma anaerobia y aerobia facultativa. Encontramos antígenos somáticos “O”, antígenos flagelares “H” y antígenos capsulares “K”, que combinados conforman los diferentes serotipos de *E. coli*[29].

- **Cultivo.-** crece con facilidad en el medio de cultivo MacConkey (que distingue las colonias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras) de 18 a 24 horas a 37ºC, formando colonias planas, lisas, circulares, convexas, secas, rosadas con un área circundante de color rosa más oscuro compuesto por sales biliares precipitadas. En las pruebas bioquímicas es positiva para indol, descarboxilasa de lisina, fermentadoras de lactosa y glucosa SIM positivo y citrato negativo[33].

Klebsiella pneumoniae

Es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Pertenece a la familia de las enterobacteriáceae que son un vasto grupo heterogéneo de bacilos Gram-negativos. Son causantes de infecciones del tracto urinario, del sistema respiratorio como neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos y de heridas quirúrgicas.

- **Morfología e identificación.-** son bacilos gramnegativos de 2-3µm, no flagelados, por lo tanto son inmóviles, no esporulados, forman capsulas grandes y regulares, pueden crecer de forma anaerobia y aerobia.
- **Cultivo.-** las colonias de *klebsiella* son grandes, muy mucoides y tienden a confluir cuando la incubación se prolonga. Crece en aerobiosis en agar nutritivo a 37 °C con pH de 7.0. Presentan fermentación rápida de la lactosa, muy viscosa, crecimiento mucoide, en el Agar MacConkey las colonias son de color rosado, no motil, más producción de gas[31].

Pseudomona aeruginosa

Bacteria que pertenece a la familia de las enterobacteriáceae es Gram-negativa bacilares, aerobias, quimiorganotrofas (o quimiolitotrofas facultativas), oxidasa positivas, con metabolismo respiratorio y, generalmente, dotadas de movilidad mediada por uno o varios flagelos polares. A veces coloniza al humano y es el principal patógeno humano del grupo. Es invasora y toxígena, produce infecciones en pacientes con defensas deficientes y es un patógeno nosocomial importante. Se distribuyen ampliamente en el suelo, agua, plantas y animales[31].

La *Pseudomona aeruginosa* con frecuencia se observan en escaso número en la flora intestinal normal y sobre la piel de los humanos, es el principal patógeno del grupo. Se distribuye extensamente en la naturaleza y es común en ambientes húmedos de los hospitales. Puede colonizar a los humanos normales, en quienes es un saprofito. Causa enfermedades en huéspedes humanos con defensas anormales[31].

- **Morfología e identificación.-** es un bacilo dotado de motilidad que mide caso 0.6 x 2 µm. es Gram-negativo y se le encuentra como bacteria única, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas[31].
- **Cultivo.-** es aerobio obligado que crece fácilmente sobre muchos tipos de medio de cultivo, a veces produce un olor dulzón semejante a jugo de uva o de maíz. Algunas cepas causan hemolisis. Forma colonias redondas y lisas de color verde fluorescente. Con frecuencia produce un pigmento azuloso no fluorescente, piocianina, que funde en agar. Muchas cepas de *Pseudomona aeruginosa* también el pigmento fluorescente pioverdina que confiere color verdoso al agar. Algunas cepas producen pigmento rojo oscuro piorrubina o el pigmento negro piomelanina. *Pseudomona aeruginosa* en cultivo puede producir múltiples tipos de colonias y da la impresión de un cultivo de especies bacterianas mixtas. *Pseudomona aeruginosa* de colonias de diferente tipo también pueden presentar actividades enzimáticas y bioquímicas diferente y distintos patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos[31].
- **Características del crecimiento.-** la *P. aeruginosa* crece bien a 37 a 42ºC; su crecimiento a 42ºC ayuda a diferenciarla de otras especies de *Pseudomonas* en el grupo fluorescente. Es oxidasa- positiva. No fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa. La identificación casi siempre se basa en la morfología de las colonias, positividad a oxidasa, presencia de pigmentos característicos y crecimiento a 42ºC. La diferenciación entre la *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* con base en su actividad bioquímica requiere pruebas con una gran diversidad de sustratos[31].

Los hongos

Los hongos difieren de otros organismos vivos: son eucariotas, carecen de clorofila, no pueden ser autótrofos, y por lo tanto, necesitan obtener sus requerimientos nutricionales de material orgánico ya formado. Por su tamaño los hongos se clasifican en dos grandes grupos: macroscópicos y microscópicos. Los hongos microscópicos intervienen en la elaboración de antibióticos. Desde el punto de vista médico, los hongos macroscópicos se reportan en casos de intoxicación alimentaria, a diferencia de los hongos microscópicos que generan diferentes cuadros patológicos, de diversa severidad y consecuencias[29].

Los hongos pueden ser uninucleares o pluricelulares. Los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, tabicándose de un modo más o menos completo, formando largos filamentos llamados hifas que con frecuencia se ramifican. Estos hongos denominados mohos, al crecer forman matas de filamentos entrelazados, como puede apreciarse en pan o frutas enmohecidas[34].

Estructura de los hongos

Los hongos están formados por células eucariotas. El DNA está organizado en cromosomas que se hayan envueltos por la membrana nuclear. El citoplasma, con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas, está limitado por una membrana citoplasmática ricas en ergosterol. Recubriendo la membrana se encuentra una pared celular rígida de estructura polisacárida compleja, compuesta mayoritariamente por quitina, mananos y glucanos, que protegen de lisis osmótica y regulan el paso de moléculas. Tienen un metabolismo de tipo quimioheterótrofo absortivo, es decir obtienen la energía y el carbono absorbiendo los nutrientes de la materia orgánica, que se descompone mediante la producción de exoenzimas. Pueden reproducirse por medio de procesos asexuales mediante división binaria o formando esporas asexuales o a través de esporas sexuales[34].

El hongo utilizado para el ensayo del presente estudio es:

Candida albicans

Es un hongo diploide asexual (forma de levadura). Saprófito de la familia de los Sacaromicetos. Varias especies del género Candida pueden producir candidiasis. Son miembros de la flora normal de la piel, las mucosas y del aparato gastrointestinal. Las especies de *Candida* colonizan las superficies mucosas de todos los humanos durante o poco después del nacimiento, y el riesgo de infección endógena siempre está presente. La candidiasis es la micosis sistémica más común, y los agentes más comunes son *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis* [31-34].

- **Morfología e identificación.-** en cultivos o tejidos crecen como levaduras ovales en gemación (3 a 6 um de tamaño), la *C. albicans* es dimórfica; además de las levaduras y las pseudohifas, también puede producir hifas verdaderas[31].
- **Cultivo.-** el cultivo se logra a temperatura ambiente y en los medios habituales, como Sabouraud simple o con cloranfenicol. El cultivo debe realizarse a la brevedad posible luego de obtener los especímenes para evitar contaminaciones agregadas. Con el propósito de confirmar la patogenicidad de las levaduras aisladas, es necesario obtener colonias abundantes o que los cultivos sean repetidamente positivos, porque *Candida* es un saprófito habitual de cavidades[35].
- **Características del crecimiento.-** sobre medio de agar, o en las primeras 24 h a 37ºC o temperatura ambiente, las especies de *Candida* producen colonias blandas de color cremoso con olor a levadura. Las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar. Existen dos pruebas morfológicas simples que diferencian la C. albicans, el patógeno más común, de otras especies de *cándida*; después de incubación en suero durante casi 90 minutos a 37ºC. Las células de *C. albicans* empieza a formar verdaderas hifas o tubos germinales y en un medio nutrimentalmente insuficiente la *C. albicans* produce clamidosporas grandes y esféricas. También se puede emplear las pruebas de fermentación de carbohidratos y de asimilación para confirmar su identidad[31].

Cepas ATCC

ATCC (Ccolección Americana de Cultivo Tipo).- es un centro de recurso biológico particular, cuya misión se concentra en la adquisición, la autentificación, la producción, preservación, desarrollo y distribución de microorganismos de referencia usuales, líneas de células y otros materiales para investigación en las ciencias naturales.

Cepas Certificadas.- es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes[36].

Clasificación de las cepas ATTC:

- **Cepas de Referencia.-** las cepas de referencia deben obtenerse directamente de una colección con la reseña nacional o internacional de cultivo de referencia reconocido, son microorganismos definidos, por lo menos a nivel de género y especie, catalogados, caracterizados y de origen conocido[36].
- **Cepas de Reserva.-** son cepas idénticas logradas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia. Son preparadas y conservadas en el laboratorio, dentro del cual se destina un lugar para su almacenaje, se trata de cepas potencialmente peligrosas y cuya manipulación queda exclusivamente restringida al personal autorizado[36].
- **Cepas de Trabajo.-** se obtienen por subcultivo de las cepas de reserva, se subcultivan en medios sólidos de enriquecimiento apropiados para cada microorganismo, se debe verificar la calidad, pureza y morfología típica del subcultivo nunca subcultivarlas para sustituir a las cepas de reserva[36].

Utilidad de los cultivos de referencia ATCC en el control de calidad interno:

Se utilizan para evaluar la calidad de los medios de cultivo, asegurar la calidad de los resultados de ensayos de laboratorio (coloraciones y desempeño de reactivos), validar métodos microbiológicos (pruebas de sensibilidad)[36].

Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos[37].

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el Cultivo. Se llama cultivo al proceso de multiplicar microorganismos mediante las condiciones ambientales adecuadas[31].

Utilidad

Es de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos los cuales realizan copias de sí mismos y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química del medio de cultivo, los nutrientes deben proporcionar estos elementos de manera metabólicamente accesible. Además, dichos microorganismos requieren energía metabólica para sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Los factores que se deben controlar durante el crecimiento son nutrimentos, pH, temperatura, aireación, concentración de sales y potencial iónico del medio[34].

Preparación

Los medios de cultivo pueden prepararse en el laboratorio utilizando los ingredientes básicos o con el material deshidratado en polvo que se expende en el comercio; también pueden adquirirse ya listos para su uso. Se recomiendan los polvos deshidratados comerciales porque su transporte y almacenamiento resultan económicos, y su calidad es probablemente mayor que la de los medios preparados en el laboratorio[38]. En general, la preparación de un medio de cultivo consiste siplemente en pesar la cantidad deseada del mismo y disolverlo en agua desionizada libre de inhibidores de crecimiento, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sustancias

termolábiles se esterilizan por filtración y se añaden al resto de componentes previamente esterilizados en autoclave[37].

Clasificación

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

- **Medios selectivos.-** son aquellos que se utilizan para inhibir por completo el crecimiento de bacterias distintas de la que se quiere aislar y que están presentes en la muestra[30].
- **Medios de enriquecimiento.-** son aquellos que favorecen el crecimiento de algún tipo de bacterias que se encuentra en forma minoritaria en una mezcla de varios grupos bacterianos[30].
- **Medios de diferenciación.-**son aquellos que se utilizan para poner en manifiesto a las bacterias que dan positiva alguna propiedad bioquímica y que están presentes en una mezcla[30].
- **Medios de identificación.-** son aquellos que se utilizan para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un determinado sustrato[29].
- **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[30].
- **Medios de conservación.-** son aquellos cuya composición favorece el mantenimiento de los microorganismos que en él se siembran y que posteriormente se incuban a +2-+4ºC[30].

  Existe una variación de los medios de conservación que son los medios de transporte cuya finalidad es mantener en estado viable, aunque sin reproducción los microorganismos presentes en una muestra, permitiendo una posterioridad recuperar incluso a los que están minoritariamente presentes. Actualmente los medios de transporte más utilizados son: el medio de Stuart, el medio Amies, y el medio Cary-Blair[30].

Medios de cultivo utilizados en el estudio:

- **Agar Champan Manitol.-** el ajar Champan Manitol es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Staphylococcus*, basado en la tolerancia que pose a una alta concentración de cloruro sódico. Sirve también como medio diferencial de cepas fermentadoras del manitol. *Staphylococcus aureus* en condiciones anaerobias es la única especie del género que produce la citada fermentación[30].
- **Agar MacConkey.-** el agar MacConkey es un medio selectivo utilizado para el cultivo de *Enterobacteriaceae.* Los organismos fermentadores de la lactosa producen colonias rosadas o rojas que pueden estar rodeadas de una zona de bilis precipitada. Los organismos no fermentadores de la lactosa, forman colonias incoloras y transparentes. La flora Gram positiva es inhibida por el cristal violeta[30].
- **Agar Dextrosa Sabouraud.-** es un medio para el cultivo de levaduras y hongos, al que se ha adicionado cloranfenicol para impedir el desarrollo de la flora acompañante[30].
- **Agar Cetrimide.-** es un medio utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas* que favorece la pigmentación de *Pseudomona aeruginosa*[30].
- **Agar Mueller-Hinton.-** el agar Mueller-Hinton es un medio enriquecido, utilizado como medio de elección para realizar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos[30].

Pruebas bioquímicas para identificación diferencial de bacterias

Las pruebas bioquímicas más empleadas para la identificación de bacterias son prueba de la catalasa, coagulasa, oxidasa, citrato, ácido sulfhídrico, fenilalanina desaminasa, urea, indol, agar lisina hierro, agar triple azúcar hierro (T.S.I) y SIM. Las utilizadas en el estudio son las siguientes:

- **Prueba de la catalasa.-** la enzima catalasa es propia de la mayor parte de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen citocromos, siendo la excepción el estreptococo. Su función es descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) desprendiendo oxígeno libre. La prueba se puede realizar en porta o directamente sobre el cultivo[30].

- **Prueba de la coagulasa.-** esta prueba, indica la presencia de la enzima Coagulasa, que poseen algunos *Staphylococcus*. Estos gérmenes, incluidos en la especie Staphilococos aureus son considerados patógenos. Actualmente se sabe que hay Staphylococos coagulasa negativo, virulentos y productores de cuadros clínicos[30].
- **Prueba del citrato.-** el principio de la prueba de utilización de citrato es determinar la capacidad que poseen algunos microorganismos de utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, produciendo alcalinidad[30,39].
- **Prueba de movilidad.-** la movilidad bacteriana es otro determinante importante para la identificación final de una especie bacteriana. Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y localización varía entre las especies[39].
- **Prueba de ácido sulfhídrico.-** la capacidad de ciertas especies bacterianas para liberar azufre de los aminoácidos que lo contienen azufre, produciendo ácido sulfhídrico. La enzima responsable de esta actividad es la cistinasa[30].
- **Prueba de la fenilalanina desaminasa.-** la determinación de esta prueba es útil para la diferenciación inicial de especies de *Proteus*. *Morganella* y *Providencia* de otros bacilos gramnegativos. Solo miembros de estos géneros y algunos aislados relativamente raros del grupo Enterobacter tienen la enzima responsable de la desaminación oxidativa de fenilalanina[39]. Se fundamenta en la capacidad que poseen algunas bacterias de desaminar la fenilalanina produciendo ácido fenilpirúvico[30].
- **Prueba con agar triple azúcar hierro (T.S.I).-** son medios utilizados preferentemente para la diferenciación de *Enterobacteriaceae*. En él se puede determinar las fermentaciones de los hidratos de carbono, la producción de gas y ácido sulfhídrico.

  El medio TSI contiene: glucosa (0,1 por 100), lactosa (1 por 100) y sacarosa (1 por 100)[30].
- **Prueba de la urea.-** determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, en amoniaco y CO_2 por la acción de la enzima

ureasa, produciendo un cambio de color rojo en el medio. La visualización del proceso se fundamenta en que la alcalinización producida en el medio de cultivo se detecta mediante un indicador de pH (rojo de fenol)[30].

- **Prueba del indol.-** el indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias gracias a la enzima triptofanasa pueden hidrolizar el triptófano y producir indol, ácido pirúvico y amoniaco. La presencia de indol se detecta en el medio de prueba de triptófano observando el desarrollo de un color rojo en el medio al agregar una solución que contiene para-dimetil-aminobenzaldehído (p. ej., reactivo de Ehrlich o de Kovacs)[39]
- **SIM.-** determinar si un organismo es móvil o inmóvil, si es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro y por último la capacidad de desdoblar el indol de la molécula triptófano, además que la consistencia del medio permite la observación de la movilidad de algunas bacterias[40].

Pruebas para identificar hongos

- **Filamentación en suero.-** se toma un inóculo de la colonia y se coloca en 0.5 ml de suero, se incuba a 37ºC; de dos a cuatro horas, se generan tubos germinativos en *C. albicans* o *C. stellatoidea*. Otras especies lo hacen, pero en etapas tardías[35].
- **Auxonograma (prueba de asimilación).-** las levaduras contienen sistemas enzimáticos específicos que determinan su capacidad para utilizar un hidrato de carbono como única fuente de carbono en un medio de cultivo adecuado. La capacidad de utilización de ciertos compuestos orgánicos como única fuente de carbono en crecimiento aerobio es una de las pruebas más utilizadas para la identificación de levaduras. Los compuestos de carbono empleados son fundamentalmente azúcares, ácidos orgánicos y algunos azúcares- alcoholes[37].
- **Fermentacion de azucares.-** las levaduras tienen la capacidad de fermentar uno o varios azucares, es decir, contienen sistemas

enzimaticos especificos que permiten la degradacion anaerobia de los hidratos de carbono específicos con produccion de CO_2.

Esta prueba se rige por unos sencillos postulados, las leyes de fermentacion de azucares por levaduras o leyes de Kluyver-Dekker. Que dice lo siguiente:

1. Toda levadura que no fermenta la glucosa no fermenta a su vez tampoco ningun otro azucar.
2. Toda levadura que fermenta la glucosa ermenta tambien la fructosa y la manosa.
3. Ninguna levadura puede fermentar a la vez la maltosa y la lactosa[37].

Antibiograma

Debido a que muchas plantas presentan actividad antimicrobiana, el antibiograma por el método de difusión en Agar modificado puede ser utilizado para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de determinadas plantas medicinales a microorganismos patógenos.

Las pruebas más utilizadas para evaluar la sensibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano están basadas en el enfrentamiento *in vitro* de los microorganismos con distintas concentraciones del agente o extracto etanólicos de las plantas en el presente estudio[37].

Principalmente la técnica es usada para un gran número de agentes antimicrobianos, susceptibles de ser empleadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. En general, los quimioterápicos son productos químicos con la propiedad común de estar dotados de actividad antimicrobiana y que pueden administrarse tópica o sistémicamente a plantas y animales debido a su reducida toxicidad[37].

Los antimicrobianos también se pueden dividir en bactericidas capaces de eliminar a las bacterias, estos antimicrobianos lesionan la membrana celular producen una liberación de los metabolitos celulares al exterior, y por tanto su muerte, o bacteriostáticos bloquean el crecimiento y multiplicación celular. Los fármacos bacteriostáticos resultan eficaces debido a que las bacterias inhibidas

en su crecimiento morirán con el tiempo o serán atacadas por los mecanismos de defensa del huésped[27].

La capacidad de determinar la sensibilidad a los antimicrobianos viene dada por el método de difusión y el método de dilución[38].

Antibiograma por difusión en medio sólido o Kirby Bauer

Es el de más fácil ejecución y prácticamente el que más se realiza rutinariamente en la mayoría de laboratorios. El método relaciona mediante unas curvas de concordancia (regresión), el diámetro del halo de inhibición se produce alrededor del disco, comprimido o pocillo, al difundir por el medio el antimicrobiano en ellos contenido[30]. En el presente trabajo investigativo se utiliza este método realizando una modificación uitilizando discos de papel filtro Whatman Nº 1 impregnados con los extractos liofilizados de las plantas en estudio **(Anexo Nº3 – Protocolo 028)**.

Procedimiento

Este medio de cultivo utilizado es el Mueller-Hinton puede ser suplementado con un 5 % de sangre desfibrinada de caballo, oveja u otro animal, cuando la bacteria lo requiera para su desarrollo. El pH del medio debe estar entre 7,2 y 7,4 y el grosor entre 4 y 6 mm **(Anexo Nº3 – Protocolo 004)**.Los discos se preparan con los extractos en sus diferentes diluciones estos deben contener la cantidad establecida del extracto **(Anexo Nº3 – Protocolo 028)**, además se utilizan antimicrobianos comerciales para cada microorganismo empleado. El inóculo bacteriano debe tener una turbidez al 0,5 de la escala de McFarland, aproximadamente 10^8 UFC/ml, y se prepara en solución salina estéril o caldo de cultivo. La inoculación se puede efectuar con hisopo de algodón estéril[37] **(Anexo Nº3 – Protocolo 021)**.

Los medios de cultivo se deben incubar a 37ºC en la atmosfera adecuada. La lectura se debe realizar entre 18 y 24 horas. Este método es adecuado únicamente para bacterias patógenas de crecimiento rápido. Una incubación más prolongada puede dar lugar a interpretaciones erróneas del halo de inhibición[37] **(Anexo Nº3 – Protocolo 029)**.

Los resultados se informan de acuerdo a los normas de Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos (NCCLS), el diámetro del halo de inhibición se relaciona con la susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico estudiado[30].

El tamaño de la zona de inhibición de crecimiento permite establecer tres categorías:

La categoría **sensible** indica que la cepa estudiada es afectada por concentraciones normales de antimicrobianos, alcanzadas en el organismo administrando dosis habituales.

La categoría **sensible intermedia** indica que para actuar sobre el microorganismo se debe forzar la dosis (cosa que por efectos tóxicos no siempre es posible).

Un microorganismo está dentro de la categoría **resistente**, cuando la concentración máxima del antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección (tejido o suero), no es suficiente para afectarle[30].

Factores que afectan el tamaño del halo de inhibición

La carga de antibiótico en los discos, la difusión del antibiótico es el medio de cultivo, el tamaño del inoculo bacteriano, la composición y el grosor del medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación[29].

Prueba de dilución

Se utilizan para evaluar cuantitativamente la actividad de un antibiótico o extracto de las plantas en estudio,puede agregarse diluciones de éste a un caldo de cultivo o un medio de agar en el que luego se siembra el microorganismo problema[38].

Concentración Mínima inhibitoria (CMI)

Es el parámetro fundamental para determinar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibiótico[41].La sensibilidad de una bacteria a un antibiótico determinado viene dada por la CMI, que se define como la menor

concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada[37] **(Anexo Nº3 – Protocolo 031)**.

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Es la menor concentración de antimicrobiano (muerte celular) de una cepa bacteriana dada[37]. En este caso se extiende sobre agar una gota de cada uno de los tubos de la prueba CMI en los que se detecta turbidez. La observación del crecimiento bacteriano en estas placas de agar demuestra que los microorganismos del inóculo inicial quedaron inhibidos por el antibiótico, pero no fueron destruidos por esté. Si las bacterias sobreviven en los tubos que tienen una dilución superior al doble de la CMI se considera que las bacterias son tolerantes al antibiótico[41] **(Anexo Nº3 – Protocolo 032)**.

El objetivo terapéutico será alcanzar en el organismo la CMI o CMB con dosis no toxicas. A veces la CMI o CMB se suelen encontrar en los límites entre sensible y resistente, lo que se llama puntos de corte o concentraciones críticas; en este caso se clasifica la cepa como intermedia y se aconseja repetir la prueba[37].

Antifungigrama

El antifungigrama es una técnica similar al antibiograma esta es de gran utilidad al permitir confirmar la sensibilidad esperada de los hongos aislados en clínica o poder detectar la adquisición de resistencias en el curso de tratamientos prolongados con algunos antifúngicos. Las técnicas de sensibilidad de los hongos permite cuantificar la inhibición de crecimiento de la levadura o moho en un control sin antifúngico y establece diferentes categorías de sensibilidad: sensible, sensible dosis dependiente, intermedio y resistente. Se realizan para obtener datos confiables que permitan elegir el agente antifúngico más activo para usarlo en el tratamiento de infecciones humanas[34].

CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANALISIS MICROBIOLÓGICOS

El laboratorio clínico de microbiología requiere para su correcto funcionamiento de un adecuado y constante control de calidad. El control de calidad en microbiología clínica abarca un conjunto de técnicas, actividades y el monitoreo

de material, equipos, pruebas bioquímicas, medios de cultivos preparados, reactivos, pruebas de sensibilidad, y discos para asegurar una adecuada práctica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos y su correspondiente prueba de susceptibilidad para obtener resultados verdaderos acerca de la actividad antimicrobiana de las especies vegetales.

Control de material y equipos

- Control de temperatura de estufas: refrigeradores y congeladores **(Anexo Nº 9)**.
- Control de campanas de incubación: se debe comprobar que las atmósferas creadas permiten el crecimiento de los microorganismos en cuestión.
- Control de autoclave: se realizará con sondas internas y con cintas de autoclave que garanticen una correcta esterilización en cada ciclo.
- Control de pipetas automáticas: se calibrará cada cierto tiempo la capacidad de toma y expulsión de volúmenes[(42)].

Control de calidad de las pruebas bioquímicas

El control de calidad de las pruebas bioquímicas incluye por lo menos la supervisión de dos productos distintos.

1) Los medios de cultivo que van destinados a poner de manifiesto pruebas bioquímicas **(Anexo Nº3 – Protocolo 011, 013)** y fisiológicas.
2) Los reactivos que se utilizan para visualizar algún proceso bioquímico, ya sea de forma directa con el microorganismo (catalasa, coagulasa, etc.) **(Anexo Nº3 – Protocolo 015, 016)**, o indirectamente como resultado de la actuación del germen sobre el medio de cultivo (indol, Voges Proskauer, etc)[(30)].

Control de Calidad de los medios preparados:

- **Comprobación del pH**: cuando el medio se prepara correctamente a partir de polvo deshidratado no es necesario comprobar sistemáticamente el pH. Si el medio se elabora con sus ingredientes básicos, habrá que dejarlo enfriar antes de hacer esta comprobación. En

este caso de los medios sólidos, la comprobación deberá hacerse con un electrodo de superficie o tras maceración de agua destilada. Si el pH difiere en más de 0,2 unidades del valor especificado, ajústese con ácido o álcali o prepárese un nuevo lote[30] **(Anexo Nº3 – Protocolo 004)**.

- **Control de esterilidad**: se efectúa incubando algunas placas, escogidas del lote al azar (5 por 100), durante dos días a 35º C. y cinco días a temperatura ambiente. El resto de las placas se guarda en refrigerador a 4ºC, y solo se utiliza si el grupo control muestra ausencia de cualquier tipo de crecimiento después de los 7 días[30] **(Anexo Nº3 – Protocolo 004)**.
- **Comprobación de la actividad**: el laboratorio debe mantener un conjunto de cepas patrón para vigilar en buen estado de los medios. Estas pueden obtenerse en el curso de los trabajos ordinarios del laboratorio o de proveedores comerciales[30].

  Para las comprobaciones se utilizan por lo menos dos gérmenes distintos, uno que crece sobre el medio, o da positiva una determinada prueba, y otro que no crece, o da negativa[30].
- **Control de caducidad:** para ponerlo en práctica es necesario que en el momento de empaque se rotule en algún lugar visible de la placa la fecha de preparación, además del nombre del medio. De esta manera se podrá saber en todo momento el tiempo que falta para llegar al límite de su utilización[30] **(Anexo Nº3 – Protocolo 004)**.

Control de calidad de reactivos

Actuales disposiciones exigen que su reactividad se verifique cada día de uso. Es necesario establecer un inventario que enumere todos los materiales en uso, incluyendo productos sólidos y soluciones. La forma y las condiciones de almacenamiento deben indicarse junto con las fechas de vencimiento para los recipientes abiertos y sin abrir. Debe hacerse supervisión periódica del almacenamiento y rotulado de todos los materiales, en general la reactividad de cualquier reactivo o colorante químico o biológico debe establecerse cuando se recibe un nuevo lote. La vigilancia adicional debe hacerse permanentemente o cada vez que se usa el material[33]. En el área de microbiologia que es nuestro

caso se debe tener en cuenta la revision de los medios de cultivo deshidratados antes de usarlos, los colorantes utilizados para realizar la tincion de GRAM y KOH que se encuentren en condiciones favorables para obtener resultados fidedignos.

Control de Calidad de las pruebas de sensibilidad

El resultado final de una prueba de difusión por discos depende de muchas variables. Algunos factores, como la densidad del inóculo y la temperatura de incubación, son fáciles de controlar; en cambio, el laboratorio rara vez conoce la composición exacta de un medio comercial o las diferencias de calidad entre un lote y otro, ni tampoco puede dar por sentado que el contenido de antimicrobiano de los discos sea el declarado. Por tanto, habrá que someter los resultados de la prueba a un escrutinio constante mediante un programa de control de calidad[38].

Las metas de un programa de control de calidad van destinadas a monitorear: (a) la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, (b) el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba (c) y la actuación de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.

Control de discos para antibiograma

Los discos antibióticos se conservarán en el refrigeradorLos discos –20 y +8°C en frascos cerrados con desecadoresy se controlarán al recibirlos, y una vez por semana[30]. El control de actividad de los discos se efectúa con cepas tipo cuya sensibilidad se conoce (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923)[42].

Control de resultados intralaboratorios e interlaboratorios.

La introducción periódica de muestras artificiales, preparadas con un microorganismo conocido, sirve para reflejar el nivel de resultados que puede ofrecer el laboratorio y evaluar la calidad del personal que las analiza. Es fundamental participar en los programas de evaluación externa de la calidad que ofrecen las organizaciones científico-profesionales, para asegurar la calidad de los resultados emitidos[42].

III
MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

La presente investigación sobre la Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl por el método de difusión en agar, corresponde a un estudio de tipo experimental.

Área de estudio:

La provincia de Zamora Chinchipe, ubicada en la región sur de la Amazonía ecuatoriana, con una población de 76.601 habitantes, posee 10.556 Km2 de superficie, equivalente al 4.4% de la superficie total del país, está constituida por 9 cantones (Zamora, Yantzaza, Centinela del Cóndor, Yacuambi, El Pangui, Nangaritza, Paquisha, Chinchipe y Palanda) con un total de 33 parroquias, de las cuales 9 son urbanas y 24 rurales.

Universo:

Todas las hojas y flores de las plantas medicinales propias de la provincia de Zamora Chinchipe de uso medicinal colectadas en el Pangui y Jimbuetza.

Muestra:

Extracto liofilizado obtenido a partir de hojas y flores de *Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng y hojas de *Calatola costaricensis* Standl.

Criterios de inclusión:

- Plantas nativas de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Plantas más comunes usadas tradicionalmente para tratar procesos infecciosos.
- Plantas que no cuenten con estudios previos similares (actividad antimicrobiana).

Criterios de exclusión:

- Plantas que se encuentren en peligro de extinción.

PROCEDIMIENTOS:

Pruebas piloto

Se realizaron varias pruebas piloto previas a la realización de los procedimientos, con el propósito de validar las técnicas, medios de cultivo y discos de sensibilidad para lo cual se realizó lo siguiente:

- Los discos de sensibilidad se validaron utilizando, una ampolla de amikacina en una concentración de 30 mg impregnándolo en discos de papel Whatman N°1 (diámetro de 6 mm y espesor 0.6 mm) comparando con un disco de amikacina comercial, el halo de inhibición se presentó del mismo diámetro evidenciando así que la difusión de los discos se encontraban dentro de los diámetros establecidos para el antibiótico **(Anexo Nº3 – Protocolo 027).**
- Se prepararon medios de cultivo descritos en los protocolos **(Anexo Nº3 – Protocolo 002, 013).**
- Se prepararon varias diluciones a partir del extracto seco: 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000, se descartó esta última debido a su poca concentración de extracto; también se realizó la dilución 1/10, lo cual se omitió debido a la incapacidad de dilución del extracto, eligiendo únicamente las diluciones 1/100, 1/1.000, 1/10.000.
- Se ejecutaron pruebas para comprobar el método utilizado, empleando extractos de plantas cuya actividad antimicrobiana era conocida, como aceite de clavo de olor, obteniendo resultados positivos **(Anexo Nº3 – Protocolo 029).**
- Se practicaron ensayos de la CMI obteniendo como resultado el tubo nº 5 y CMB realizando una siembra en agar Mueller Hinton y agar sangre, empleando el aceite de clavo de olor, el resultado del tubo nº 5 fue de 30 UFC **(Anexo Nº3 – Protocolo 031, 032)**.

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

- ***Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl** fueron previamente identificadas por un botánico del herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja, *Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng fue recolectada el día 4 de agosto de 2011, en la comunidad el Pangui, *Calatola costaricensis* Standl fue recolectada el día 3 de agosto de 2011, en Jimbuetza en la Provincia de Zamora Chinchipe. De *Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng se utilizó las hojas y flores iniciándose la extracción el 26 de agosto y culminando el 30 de agosto de 2011; de *Calatola costaricensis* Standl se utilizó las hojas la extracción se inició el 21 de agosto y culminando el 25 de agosto de 2011 **(Anexo Nº2 – Protocolo 01)**.
- En el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de Loja se obtuvo el extracto concentrado el mismo que procede de la planta secada y macerada de 24 a 48 horas **(Anexo Nº2 – Protocolo 02)**.Los extractos fueron concentrados a 45ºC en rotavapor, secados a 45ºC **(Anexo Nº2 – Protocolo 03)** y luego liofilizados y a partir de éstos se prepararon las soluciones.
- Para la concentración 1:100 (solución madre) se pesó 100 mg del extracto liofilizado y diluyó en 10 ml de etanol al 70% v/v en agua, para la dilución 1:1000 se obtiene 10 ul de la solución madre y se coloca en 90 ul de etanol al 70%, 1:10000 se obtiene 10 ul de la solución 1:1000 y se coloca en 90 ul de etanol al 70% y con cada una de estas soluciones se preparará los discos de sensibilidad con papel Whatman Nro. 1 de 6 mm de diámetro y 0.6 mm de espesor. La impregnación de los discos se realizó con 20 µm de cada uno de los extractos, **(Anexo Nº3 – Protocolo 028)** por lo que para las tres diluciones, cada disco contendrá:

Tabla Nº 3
Concentración de los extractos en los discos de sensibilidad

Diluciones	µg/disco
1/100	200
1/1.000	20
1/10.000	2

FASE 2: Preparación de los cultivos bacterianos

- Durante la preparación de los medios de cultivo se aplicó las normas de Bioseguridad **(Anexo Nº3 – Protocolo 001).**
- Se prepararon medios de cultivos y pruebas bioquímicas específicos para cada microorganismo **(Anexo Nº3 – Protocolo 005 -017).**
- Se utilizaron 5 cepas de referencia internacional ATCC (*American Type Culture Collection*) las cuales son:

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

  Se viabilizaron las 5 cepas de referencia, realizándose resiembras y asegurándose que las cepas se encuentren en fase de crecimiento exponencial **(Anexo Nº3 – Protocolo 022-026).** Para la identificación de cada microorganismo, se realizaron pruebas de identificación macro y microscópicas y pruebas bioquímicas. **(Anexo Nº3 – Protocolo 011-019).**

FASE 3: Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana utilizando el método de Kirby-Bauer modificado (difusión en agar con discos impregnados de antibióticos). **(Anexo Nº3 – Protocolo 029, 030).**

Método de difusión en Agar (Kirby – Bauer)

1) Se preparó el medio Agar Mueller-Hinton para bacterias y Agar Sabouraud Dextrosa para hongos **(Anexo Nº3 – Protocolo 004, 009).**
2) Se preparó un inoculo por suspensión de las cepas en caldo tripticasa soja, equivalente al estándar 0.5 de la escala de MacFarland aproximadamente 10^8 UFC/ml **(Anexo Nº3 – Protocolo 020, 021)**.
3) Se Inoculó la superficie de una placa de agar de Mueller-Hinton y Agar Sabouraud Dextrosa. Se colocaron los discos de papel filtro impregnado

con 20ul de las diferentes concentraciones de los extractos **(Anexo Nº3 – Protocolo 028)**. utilizando etanol al 70% como control negativo y antibióticos específicos para cada cepa ATCC como control positivo como: ampicilina + sulbactan para *S. aureus*; ciprofloxacina para *E. coli***;** gentamicina para *P. aeruginosa;* amoxicilina + ácido clavulánico para *K. pneumoniae; y* fluconazol para *C. albicans*, sobre la superficie del agar **(Anexo Nº3 – Protocolo 029, 030)**.

4) Se Incubaron las cajas petri en posición invertida a 37ºC durante 18-24 horas para bacterias y 48 horas para hongos y se midió los diámetros de las zonas de inhibición con una regla milimetrada utilizando luz refleja sobre fondo negro **(Anexo Nº3 – Protocolo 031, 032)**.

FASE 4: Difusión de resultados

La difusión de resultados se realizó a los estudiantes de los séptimos módulos de la carrera del Laboratorio Clínico, mediante una conferencia realizada en el Auditorio Antonio Peña Celi, del Área de la Salud humana de la UNL, el día 14 diciembre del 2011 a las 16h00 **(Anexo Nº4, 5, 6)**.

IV
RESULTADOS

Tabla Nº 4

Resultados de la Actividad Antimicrobiana del extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl, frente a cinco cepas ATCC empleadas en el estudio.

MICROORGANISMO	DILUCIONES	RESULTADOS	CONTROLES			
				POSITIVO		NEGATIVO (ETANOL 70%)
				Cuphea racemosa	*Calatola costaricensis*	
Escherichia coli	1/100 1/1000 1/10.000	Negativo Negativo Negativo	**Cp**	29 mm (s) 30 mm (s) 30 mm (s)	30 mm (s) 30 mm (s) 31 mm (s)	Negativo Negativo Negativo
Staphylococus aureus	1/100 1/1000 1/10.000	Negativo Negativo Negativo	**Amc**	27 mm (s) 26 mm (s) 27 mm (s)	29 mm (s) 29 mm (s) 29 mm (s)	Negativo Negativo Negativo
Klebsiella pneumoniae	1/100 1/1000 1/10.000	Negativo Negativo Negativo	**Sam**	16 mm (s) 15 mm (s) 15 mm (s)	16 mm (s) 15 mm (s) 15 mm (s)	Negativo Negativo Negativo
Pseudomona aeruginosa	1/100 1/1000 1/10.000	Negativo Negativo Negativo	**Gn**	23 mm (s) 24 mm (s) 24 mm (s)	24 mm (s) 24 mm (s) 24 mm (s)	Negativo Negativo Negativo
Candida albicans	1/100 1/1000 1/10.000	Negativo Negativo Negativo	**Fl**	23 mm (s) 24 mm (s) 24 mm (s)	23 mm (s) 23 mm (s) 23 mm (s)	Negativo Negativo Negativo

Leyenda: (s) sensible; mm, milímetros; Cp, ciprofloxacina; Amc, ampicilina + sulbactan; Sam, amoxicilina + ácido clavulanico; Gn, gentamicina; Fl, fluconazol.
Fuente: Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la región sur del Ecuador. Estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.
Autora: Jéssica Vanessa Castro Córdova.

Interpretación:

En las diluciones empleadas 1/100, 1/1000, 1/10.000 se evidencio crecimiento microbiano alrededor del disco, lo que indica resistencia de los microorganismos en estudio frente al extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl, de igual manera el control negativo, a diferencia del control positivo que no presentó crecimiento microbiano alrededor del disco.

No se realizó CMI y CMB debido a que solo se realiza cuando hay actividad antimicrobiana.

V
DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico liofilizados de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl. Los extractos fueron obtenidos con etanol (70% v/v), concentrados a 45ºC en rotavapor, secados a 45ºC, luego liofilizados y a partir de estos se prepararon las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000; se empleó el método de Kirby Bauer modificado, frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); y el hongo *Candida albicans* (ATCC 26790).

Los resultados obtenidos con la metodología y cepas microbianas utilizadas, no poseen actividad antimicrobiana. Se verificó que los controles positivos inhibieron el crecimiento bacteriano y los controles negativos no formaron halo de inhibición, lo que valida a su vez la técnica empleada.

Rodríguez Óscar (2007), determinó la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos con éter de petróleo, acetato de etilo y etanol del material seco de tallo y hojas de *Cuphea ciliata* Ruiz & Pav. (Lythraceae), de la misma familia de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng, por el método de difusión en gel por perforación en placa usando *Escherichia coli, Proteus mirabilis, Pseudomona aeruginosa y Staphylococcus aureus*. En los resultados obtenidos se evidenció inhibición significativa del crecimiento bacteriano en los extractos etanólicos, en esta investigación no se menciona la concentración utilizada en el solvente[43].

Cuphea racemosa (L. f.) Spreng pertenece a la familia Lythraceae pero no todas las especies de esta familia presentan las mismas propiedades, cabe indicar que la metodología y solventes utilizados por este autor son diferentes a los empleados en el presente estudio, por lo que estos resultados podrán atribuirse a estos factores.

Bucay José (2003), realizó un estudio preliminar etnobotánico, fitoquímíco de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae). En lo que concierne a el análisis de la actividad antimicrobiana siguiendo el método de impregnación de disco de Bawer, se determinó mediante hojas, flores y tallo, con y sin diluir contra *Staphylococcus aureus,*

Staphylococcus sp. (Coagulasa negativo), *Enterococcus faecalis, Escherichia coli,* y *Candida albicans.* Las pruebas de actividad antimicrobiana no mostraron inhibición significativa del halo de crecimiento de los microorganismos utilizados al compararlos con antibióticos de uso común[44].

Los resultados obtenidos por el autor son similares al logrado en este estudio, pero es necesario aludir que en este ensayo no se mencionan los solventes.

Estudios acerca de la actividad antimicrobiana de *Calatola costaricensis* Standl no se lograron encontrar mediante una revisión bibliográfica en línea debido a que esta planta no presenta investigaciones referentes a este tema, hasta el periodo de tiempo del estudio establecido.

Es importante mencionar que no se descarta la presencia de actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl, al emplear distintas metodologías, cepas microbianas, partes de las plantas y concentraciones del solvente que las utilizadas en la presente investigación. Por lo que es necesario continuar con la realización de estos estudios.

VI
CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl, en las diluciones: 1/100, 1/1000 y 1/10.000 no presentaron actividad antibacteriana, por el método de difusión en agar o Kirby Bauer frente a *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa y Klebsiella pneumoniae.*
- El extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl, en las diluciones: 1/100, 1/1000 y 1/10.000 no presentaron actividad antifúngica, empleando el método de difusión en agar o Kirby Bauer frente a *Candida albicans.*
- Los resultados obtenidos en el trabajo investigativo, se difundieron mediante una exposición y entrega de trípticos informativos a los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja que cursan el VII módulo, relacionado a Microbiología.

Vll
RECOMENDACIONES

- Incentivar a los estudiantes que realicen estudios de tipo experimental acerca de las plantas medicinales, para dar un aporte científico de su uso.
- Utilizar otras partes de las plantas en estudio, para profundizar la investigación y poder encontrar en ellas actividad antimicrobiana y de esta manera contribuir con información sustentable a las personas que utilizan estas plantas para mejorar su salud.
- Realizar estudios de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl, utilizando diferentes metodologías, microorganismos, solventes y diluciones, para poder confirmar o descartar la presencia de actividad antimicrobiana.
- Mencionar dentro de los criterios de exclusión, parte de la droga vegetal que se encuentre en mal estado, debido a que los procesos de selección y recolección de las plantas se pueden reflejar en los resultados.
- Realizar varias repeticiones de los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas, para poder ratificar la presencia o ausencia de actividad antibacteriana y antifúngica.

VIII
BIBLIOGRAFÍA

1. Muñoz, Fernando. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Artes Gráficas Cuestas, S.A. Madrid- España. 2002. Pág. 15.
2. Cavendish, M. El mundo de las Hierbas. 1ra edición. España. Editorial Vidorama. Págs. 8-11.
3. Lázaro, D. Plantas Medicinales. Barcelona- España. Editorial MAXTOR. 2008. Págs. 8-9.
4. Palacios, Enrique. Economía y plantas medicinales. CSI Boletín 52. Perú. Pág 28 y 29.
5. L. de la Torre, H. Navarrete, P. Muriel M., M. J. Macía & H. Balslev. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. 2008. Pág. 105.
6. Gobierno provincial de Zamora Chinchipe, "Plan de ordenamiento y desarrollo territorial", (http://www.zamora-chinchipe.gob.ec/otzch/documentos/Ordenamiento%20Territorial.pdf). Consultado el 09 de Agosto del 2011.
7. Ministerio de salud pública. Proceso de control y mejoramiento de la salud pública. Sub - proceso epidemiologia / epi-2 enfermedades y eventos de notificación obligatoria sujetas a vigilancia epidemiológica. Diez primeras causas de morbilidad por provincias Ecuador-2007. (http://es.scribd.com/doc/20876528/Diez-Principales-Causas-de-Morbilidad-Ecuador-a-F1o-2007). Consultado el 09 de Agosto del 2011.
8. Barone, L. Medicina Alternativa. Plantas que curan y recetas naturales. Buenos Aires-Argentina. Cultural librera americana S.A. Edición 2003.
9. Jiménez, J. Plantas medicinales. Medicina naturista fitoterapia.2007. Pág. 28, 29, 32.
10. Torres, C. Manual Agropecuario. Tecnologías Orgánicas de la Granja Integral Autosuficiente. Primera Edición. Colombia. Quebecor World Bogotá S.A. 2002. Pág. 897, 898.
11. Fonnegra, R. Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. 2da Edición. Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 2007. Pág. 4.
12. Schavenberg, P. Guía de las plantas medicinales. 4ta Edición. Barcelona. Editorial Omega. 1980. Pág. 25, 26.

13. Teixeira, Marta, “Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales”, (http://www.multiciencia.unicamp.br/art05_7_e.htm) 2006. Consulado el 10 de septiembre del 2011.

14. Torres, C. Investigacion en la transformacion secundaria de frutos, tuberculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Bogotá D. C. 2004. Pág 2-14.

15. Bruneton, J. Farmacognosia, Fitoquímica de Plantas Medicinales. 2da Edición. Editorial Acribia. Zaragoza. 2001. Págs. 119-121.

16. Domingo. D. Plantas con acción antimicrobiana. Prous Science 16 (Nº 4): 386-388. 2003.

17. Oscanoa, Julio, “Terpenoides” (http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/web_terpenos.htm) 2005. Consultado el 15 de septiembre del 2011.

18. Paz, Arraiza, “Plantas aromáticas y medicinales” (http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema6.pdf) 2009. consultado el 17 de septiembre del 2011.

19. Instituto de Biología. "*Cuphea racemosa* (L.f.) Spreng” (http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn42404) 2010. Consultado el 28 de septiembre del 2011.

20. Vargas, W. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales. 1era edición. Colombia. Editorial Universidad de Caldas. 2002. Pág. 400.

21. Grahan, Shirley. “Cuphea racemosa” (http://www.tropicos.org/name/19200007?projectid=3) 2009. Consultado el 28 de septiembre del 2011.

22. Claudio. “Cuphea racemosa” (http://naturalezaentrerriana.blogspot.com/2011/06/cuphea-racemosa-var-palustris.html) 2011. Consultado el 28 de septiembre del 2011.

23. Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la región sur del Ecuador. Estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe.

24. Instituto de Biología. "Calatola costaricensis", (http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX659354)2010. Consultado el 29 de septiembre del 2011.

25. Ley, Juan, "Calatola costaricensis" (http://www.lagamba.at/researchdb/upload/files/Praktikumsbericht%20Juan%20Manuel.pdf) 2010. Consultado el 29 de septiembre del 2011.

26. *"Calatola costaricensis"* (http://zipcodezoo.com/Plants/C/Calatola_costaricensis/Default.asp) 2009. Consultado el 29 de septiembre del 2011.

27. Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier.2009.Pág. 4, 9, 11, 12, 13, 14, 15,16, 204.

28. Montoya, H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2da. Edición. Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 2008. Págs. 30-48.

29. Cabello, R.Microbiología y Parasitología Humana. México. Médica Panamericana. 2007. Pág. 229, 753, 641, 646.

30. Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 17, 18, 28, 29, 32, 33, 35, 38, 226, 227, 234, 235, 236, 238.

31. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 17ªEdición.Publicación México. D .F - Santafé de Bogotá. Editorial El Manual Moderno. Año 2002. Pág. 58, 243, 269, 271, 285, 286, 641.

32. Bernard, J. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Parte VI Microbiología Médica. 9ª Edición. Barcelona-España. Editorial Masson-Salvat Medicina.1993. Pág.1069, 1070.

33. Lennette, E.Manual de Microbiología Clínica. Buenos Aires : Médica Panamericana, 1989. Pág.44, 343, 344.

34. Prats, G. Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. 2008. Pág. 83, 101, 103.

35. Arenas, R. Microbiología Medica Ilustrada. Tercera edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A. 2008. Pág.229, 231.

36. Montoya, María, (www.labcarecolombia.com/descargas_2.php?id=59). Consultado el 30 de septiembre del 2011.

37. Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 61, 63, 121, 122.

38. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica. 1993. Pág. 9, 10, 78, 82, 94.

39. Koneman. Diagnostico microbiológico. 6ta edición. Buenos Aires-Argentina. Editorial Médica Panamericana. 2008. Pág.217, 218, 219, 220.

40. Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias. México. 2003. Pág. 92.

41. J. Keith Struthers & Roger P. Westran. Bacteriología Clínica. Editorial Masson S.A. 2005 Capitulo 4. Pág. 49, 51.

42. Fernandez, C.Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico.Buenos Aires.Editorial Médica Panamericana. 2005. págs. 500, 501, 502.

43. Rodríguez, O. Actividad antimicrobiana de Cuphea ciliata Ruiz & Pav. (Lythraceae). Scientia et Technica Año XIII (33): 259-260. 2007.

44. Bucay, J. Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímíco de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae). Polibotánica (15): 99-108. 2003.

ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

Anexo Nº 1. **Págs.**

Certificación de ensayos……..4

Anexo Nº 2.

Protocolos laboratorio de fítoquimica……..5

- **Protocolo 01** instructivo para la colecta de drogas.
- **Protocolo 02**obtención de extractos de plantas medicinales por maceración.
- **Protocolo 03** operación de concentración en rotavapor.

Anexo Nº 3.

Protocolos laboratorio de Microbiología……...11

- **Protocolo 001:**Bioseguridad
- **Protocolo 002:** Preparación de medio de cultivo: agar sangre.
- **Protocolo 003:** Preparación de medio de cultivo: agar Mac-Conkey.
- **Protocolo 004:** Preparación de medio de cultivo: agar Mueller Hinton.
- **Protocolo 005:** Preparación de medio de cultivo: agar Chapman Manitol.
- **Protocolo 006:** Preparación de medio de cultivo: agar Cetrimide.
- **Protocolo 007**: Preparación de medio de cultivo: caldo Tripticasa de Soja.
- **Protocolo 008:** Preparación de medio de cultivo: agar Tripticasa de Soja.
- **Protocolo 009:** Preparación de medio de cultivo: agar Dextrosa Sabouraud.
- **Protocolo 010:** Preparación de medio de cultivo: caldo agar de Infusión Cerebro Corazón.
- **Protocolo 011:** Preparación del medio Citrato de Simmons.
- **Protocolo 012:** Preparación del medio Triple Azúcar Hierro: TSI.
- **Protocolo 013:** Preparación del medio Sulfuro Indol Movilidad (SIM).
- **Protocolo 014**: Preparación del medio de Fenilalanina Desaminasa.

- **Protocolo 015:** Procedimiento para la realización de la prueba de Catalasa.
- **Protocolo 016:** Procedimiento para la realización de la prueba de Coagulasa.
- **Protocolo 017:** Procedimiento para la realización de la prueba de identificación micótica: KOH.
- **Protocolo 018:** Procedimiento para la realización del test de Filamentación.
- **Protocolo 019:** Procedimiento para la realización de la tinción de Gram.
- **Protocolo 020:** Procedimiento para la preparación del patrón n.- 5 de Mac Farland.
- **Protocolo 021:** Procedimiento para la preparación del Inóculo.
- **Protocolo 022:** Viabilización y conservación de *Staphylococcus aureus*.
- **Protocolo 023:** Viabilización y conservación de *Escherichia coli.*
- **Protocolo 024:** Viabilización y conservación de *Klebsiella pneumoniae*.
- **Protocolo 025:** Viabilización y conservación de *Pseudomona aeruginosa***.**
- **Protocolo 026:** Viabilización y conservación de *Cándida albicans*.
- **Protocolo 027:** Validación de los discos.
- **Protocolo 028**: Preparación de discos de sensibilidad.
- **Protocolo 029:** Procedimiento para evaluar la actividad antibacteriana por el método de difusión en discos.
- **Protocolo 030:** Procedimiento para evaluar la actividad antifúngica por el método de difusión en discos.
- **Protocolo 031:** Procedimiento para la realización de la concentración mínima inhibitoria en la evaluación antimicrobiana.
- **Protocolo 032:** Procedimiento para la realización de la concentración mínima bactericida en la evaluación antimicrobiana.

Anexo Nº 4.

Autorización para difusión de resultados……..….117

Anexo Nº 5.

Certificación de difusión de resultados……...118

Anexo Nº 6.

Registro de asistencia a la difusión de resultados……...119

Anexo Nº 7.

Tríptico…….124

Anexo Nº 8.

Formato de registro de resultados……..125

Anexo Nº 9.

Formato de registro diario de temperatura de la Incubadora…….126

Anexo Nº 10.

Fotografías de los procedimientos realizados……..127

Anexo Nº 1

Certificado de la realización de los ensayos de la tesis en el Centro de Diagnóstico Médico de la Universidad Nacional de Loja.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
AREA DE LA SALUD HUMANA
COORDINACIÓN DE LAB. DE DOCENCIA-ASH
CENTRO DE DIAGNOSTICO MEDICO

Loja, 20 de diciembre de 2011

LCDO. ÁNGEL MINOS LUZÓN RAMÍREZ
COORDINADOR DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA Y CENTRO DE *DIAGNÓSTICO MÉDICO DEL ASH-UNL.*

A petición verbal de la interesada.

C E R T I F I C A

Que la Egda. JESSICA VANESSA CASTRO CÓRDOVA, desarrolló el trabajo de campo que corresponde a su proyecto denominado: EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓTICO DE *CUPHEA RACEMOSA* Y *CALATOLA COSTARICENSIS* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR en el Centro de Diagnóstico Médico del Área de la Salud Humana.

Es todo cuanto se puede certificar en honor a la verdad, autorizo a la interesada hacer uso de la presente para los fines pertinentes.

LCDO. ÁNGEL MINOS LUZÓN RAMÍREZ
COORDINADOR DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA Y CENTRO DE DIAGNÓSTICO MÉDICO DEL ASH-UNL.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECCIÓN
Centro de Diagnóstico

Anexo Nº 2.

Protocolos laboratorio de fítoquimica.

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PEO-LF- 01**

1. **TITULO: INSTRUCTIVO PARA LA COLECTA DE DROGAS.**

2. **OBJETIVO:** 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. **RESPONSABILIDADES:**

Aplicación: Técnico de Laboratorio, Estudiantes/Tesistas, Pasantes.
Verificación: Responsable del laboratorio de fitoquímica.
Control: Director de Laboratorios, Control de Calidad.

5. **PROCEDIMIENTO:**

Requisitos previos a la recolección

Personal Técnico:

- Botánico
- Guía
- Colector(es)

Instrumentos/equipos:

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

a) Recolección y transporte

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

a) **Hojas**: Se colectan generalmente cuando la fotosíntesis es más activa, cuando están verdes, antes y durante la floración y antes de la maduración de los frutos.
b) **Flores:** Antes o durante la época de polinización.
c) **Frutos:** Generalmente cuando ya están de desarrollados o cuando están verdes o maduros.
d) **Semillas:** Cuando el fruto ya está maduro, antes de que expulse las semillas.
e) **Corteza:** Cuando empiezan los proceso vegetativos, cuando hay más circulación de sabia.
f) **Raíces y rizomas:** Cuando finalizan los procesos vegetativos.

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

b) Secado

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

1. **TITULO: OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES POR MACERACIÓN.**

2. **OBJETIVOS:** Definir el procedimiento para la elaboración de extractos de plantas medicinales por el método de maceración.

3. **ALCANCE**: El presente procedimiento es aplicable al procedimiento de obtención de extractos de plantas medicinales en el Laboratorio de 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).

AUTOR: DR. LUIS MOROCHO – PROYECTO DE FITOQUÍMICA

1. TITULO: OPERACIÓN DE CONCENTRACIÓN EN ROTAVAPOR.

2. OBJETIVOS: 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. A 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 aíre del sistema.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

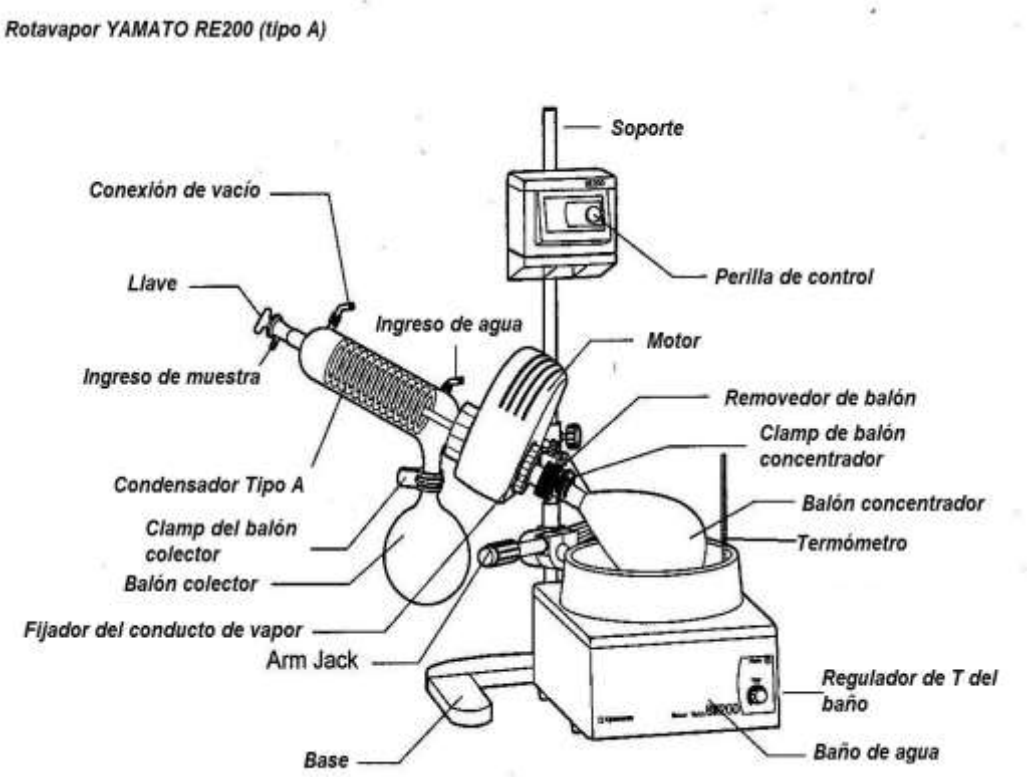
o) Deposite en contenido del balón concentrador en un cristalizador o recipiente adecuado para proceder al secado final o liofilización.

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 piseta lave el serpentín y las paredes del condensador, colectando el líquido para posteriormente ser reciclado.

r) Apague el baño maría y el rotavapor, desconéctelo de la red de alimentación eléctrica.

5.- DIAGRAMA/ANEXOS



Anexo Nº 3

Protocolos laboratorio de Microbiología

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-NB** **UNL- 001**

1. **TITULO: BIOSEGURIDAD**

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

3. **ALCANCE:** Aplicar las buenas prácticas de Laboratorio en cuanto a bioseguridad en el Laboratorio 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:**

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

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

Antisepsia: Procedimiento de aplicación de sustancias que no son quimioterapia, y se aplica estrictamente sobre los tejidos vivos, como la piel y las mucosas internas del organismo humano, para destruir o prevenir la multiplicación de microorganismos patógenos.

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

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

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

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

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

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

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

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

7. DESARROLLO:

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

2	**Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio**	- Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos. - Nunca se pipeteará con la boca. - Todo el personal se lavará las manos al ingresar al laboratorio y después de haber manipulado material y al salir del laboratorio. - Quitarse los guantes para utilizar equipos o instrumentos no contaminados como teléfonos, computadoras, y material de escritorio - Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito. - El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido. - Emplee mascarilla y protectores oculares durante procedimientos que salpicaduras, aerosoles o derrames importantes de sangre u otros líquidos orgánicos. - Absténgase de tocar con las manos enguantadas alguna parte de su cuerpo puedan generar salpicaduras o gotitas aerosoles de sangre u otros líquidos corporales. - Evite la atención directa de pacientes si usted presenta lesiones exudativas o curitas. - Mantenga actualizado su esquema de vacunación contra Hepatitis B. - Evitar las distracciones y permanecer en el lugar de trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Garcés A. Normas de seguridad en el laboratorio de microbiología. Abril 2008
- OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3era edición. Ginebra. 2005. Págs. 89-90
- Vega E. normas de bioseguridad del Sistema Nacional de Laboratorios de Diagnóstico. 2002. Págs. 31-32

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: AGAR SANGRE**

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

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

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

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

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

4	**Esterilización del medio de cultivo**	del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave a por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Colocación de la sangre humana desfibrinada**	Enfriar el medio de cultivo preparado hasta la temperatura entre 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5% y homogenizar.
6	**Distribución del medio de cultivo y solidificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles, hacerlo sobre un nivel recto, siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se tapan adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
7	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
8	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- Los medios de cultivo en microbiología: disponible en http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/medioscult/_madre_medios.html Consultado 20 de noviembre de 2011 18:00

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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

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

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

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

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar

directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

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

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

6. METODOLOGÍA:

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer el envase del polvo para la preparación de Agar Mac-Conkey (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual se debe suspender 49.53 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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. Colocar un papel sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave a por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Colocación de la sangre humana desfibrinada**	Enfriar el medio de cultivo preparado hasta la temperatura entre 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5% y homogenizar.
6	**Distribución del medio de cultivo y sodificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se cierran adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
7	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
8	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pág 64

- Prats Pastor G. Microbiología Clínica. 1era edición. Editorial medica panamericana. Madrid 2007

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL AGAR: MUELLER HINTON**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para 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, y Agar 17.00g

Condiciones necesarias para la preparación del agar Mueller-Hinton

- **pH del medio de cultivo**: El agar debe tener un pH de 7,2 a 7,4 a temperatura ambiente.
  Si el pH es menor de 7,2, parecerá que algunos antibióticos pierden potencia (por ejemplo, aminoglucósidos y macrólidos), mientras que otros agentes pueden mostrar una actividad excesiva (ej., tetraciclinas). Si el pH es mayor de 7,4 se espera el efecto opuesto.

- **Humedad**: Si las placas a utilizar presentan humedad excesiva deben colocarse en una estufa (35º C.) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos).

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

varían desde los sencillos compuestos inorgánicos de las autótrofas hasta las complicadas vitaminas y factores de crecimiento de algunas heterótrofas.

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

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 (Casa Comercial HIMEDIA), según el cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 38 g de polvo. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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. Colocar un papel sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave a por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Medición del pH.**	Colocar 5ml de medio de cultivo en un tubo de ensayo, esperar que se solidifique, introducir una varilla, realizar un orificio y con la ayuda de la aguja del potenciómetro introducir en el orificio del agar y medir el pH; que oscile ente (7,2 ± 0.2 a 7,4), a temperatura ambiente (25ºC).
		Verter con ayuda de una probeta de 25ml del medio recién preparado en una placa de petri, colocadas

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10, 198 y 199.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer el envase del polvo para la preparación de Agar Champan Manitol (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual se debe suspender 111 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la

	de una fuente de calor	solución este homogénea, 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. Colocar un papel sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave a por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo y solidificación.**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se cierran adecuadamente y se etiquetan con el tipo de medio y fecha de elaboración. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pág. 67

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR CETRIMIDE.**

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

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

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

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

Agar Cetrimide: Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento e identificación del género Pseudomonas (principalmente *P. Aeruginosa)*; y que sobre la base de este agar se promueve tanto la producción de la piocianina como la fluoresceína. Esta última solo puede observarse bajo una lámpara de luz ultravioleta. Contiene cetrimide, que es el agente selectivo contra flora microbiana alterna (2).Está compuesto por digerido pancreático de gelatina 20,0 g, Cloruro de magnesio 1,4 g, Sulfato de potasio 10 g, Agar 13,6 g, Bromuro de N-cetil N,N,N- Trimetil amonio (cetrimide) 0,3 g, Glicerina 10,0 mL, Agua destilada 1.000 mL, pH final 7,2 ± 0,2.

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Cetrimide (Casa Comercial HIMEDIA), según el cual por cada 1 litro de agua destilada que contenga 10 ml de glicerol, deben haber 46.7 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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 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 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se cierran adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Araceli García del Valle. Manual de Microbiología Médica. 1998. Pág. 229.

- María del Rosario Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2ª edición. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid- España. 2000. Pág. 304.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier. 2009. Pág. 162.

- Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias (http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf) consultado el 27 de Noviembre del 2011.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: CALDO TRIPTICASA DE SOJA.**

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

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

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

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

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

Conservación y almacenamiento de medios de cultivo: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con poca humedad y protegidos de la luz solar

directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Caldo Triptona de Soja (Casa Comercial HIMEDIA), según el cuál por cada 1 litro de preparación deben haber 27.5 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.
		Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca

4	**Esterilización del medio de cultivo.**	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 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en los tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 37, 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR TRIPTICASA DE SOJA.**

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

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

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

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

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

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

vapor. Una vez preparados se debe mantener en refrigeración de 2 a 8º C hasta antes de tres meses.

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Triptona de Soja (Casa Comercial HIMEDIA), según el cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 40 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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 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

		121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se cierran adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9, 10 y 203.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR DEXTROSA SABOURAUD.**

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

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

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

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Dextrosa Sabouraud (Casa Comercial HIMEDIA), según el cuál por cada 1 litro de preparación debe haber 65 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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 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 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo y sodificación**	Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Las cajas no pueden ser destapadas a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidas, se cierran adecuadamente. Previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier. 2009. Pág. 162.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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

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

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

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

Control de calidad de medios de cultivo: El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo es considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Este es un proceso continuo que se extiende desde las materias primas, a

través del productor hasta el producto final. Por esta razón, se le confiere una gran importancia y está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que se emite en los Laboratorios de Microbiología.

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo para la preparación de Agar Cerebro-Corazón (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada litro de agua destilada debe haber 37g de agar. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	La preparación debe hervir hasta que tome un aspecto transparente. Evitar que se derrame.
4	**Esterilización del medio de cultivo.**	El matraz debe ser taponado con algodón o gasa, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca papel aluminio sobre

		la boca del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Esterilizar en autoclave a 121 ° C. se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en los tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 28, 29, 37, 39 y 45.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología 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 mucilaginosa que se extrae de algunas algas rojas o rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

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

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

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones**	Leer el envase del polvo para la preparación de Medio Citrato de Simmons, según la cual se debe suspender 24.3 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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. Colocar un papel sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico. Esterilizar en autoclave a por 15 minutos a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo**	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35º-37ºC durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación**	Colocar los medios en una gradilla. Roturar con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Método de inoculación en el medio.**	Sembrar: punción y estría en pico de flauta con un pequeña colonia de crecimiento del microorganismo.
9	**Incubación del medio**	Colocar en incubación de 35 a 37ºC por 24 horas.
19	**Lectura de resultados**	La producción de un color azul en el medio indica la presencia de productos alcalinos y es un resultado positivo; y en caso de no haber viraje de color es negativo.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Editorial medica panamericana. 6ta edición. Argentina 2008. Pág 64, 217.

- Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria del Instituto Catalán de la Salud. Volumen II.1era edición. Marzo 2006. Págs. 189-190

- Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial medica panamericana. 3era edición. Madrid 2003

- Tortora B. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9na edición. Madrid 2007. Pág 139

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO TRIPLE AZUCAR HIERRO: TSI**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del medio de cultivo: Triple azúcar hierro (TSI), como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.

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

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

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

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Agar Triple azúcar hierro TSI. (Casa Comercial HIMEDIA), según el cuál por cada 1 litro de preparación deben haber 6.5 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido.

		Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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 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 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Método de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Se siembra en TSI primero por punción a través del centro del medio hasta el fondo del tubo y después por formación de estrías en la superficie del agar inclinado.
9	**Incubación del medio**	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35º C. en aerobiosis por un tiempo de 18 a 24 horas.
10	**Lectura de resultados**	Agar inclinado alcalino/sin cambio de color en el fondo (K/NC) = no utilizador de la glucosa, lactosa y la sacarosa; esto puede

		registrarse como K/K (agar inclinado alcalino/fondo alcalino). Agar inclinado alcalino/fondo ácido (K/A)= fermentación de la glucosa solamente. Agar inclinado ácido/fondo acido (A/A)= fermentador de la glucosa, la sacarosa o la lactosa. La formación de CO_2 e H_2 es indicada por la presencia de burbujas o grietas en el agar. La producción de H_2S se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Sulfuro Indol Movilidad SIM (Casa Comercial HIMEDIA), según el cuál por cada 1 litro de preparación deben haber 36.23 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, 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 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 121º C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml de medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya solidos se cierran adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad de los medios de cultivo.**	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Procedimiento de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Luego se realiza una picadura en el medio en forma vertical.
9	**Incubación del medio.**	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35-37º C. en aerobiosis por un tiempo de 24 a 48 horas.
10	**Lectura de resultados.**	Ácido sulfhídrico Positivo: ennegrecimiento del medio Negativo: sin ennegrecimiento. Indol (añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs). Positivo: anillo rojo en la superficie del medio. Negativa: no se produce color. Movilidad Positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad. Negativa: crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea se siembra.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias (http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf) consultado el 27 de Noviembre del 2011.

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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

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

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

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

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

el extracto de levadura aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo para la preparación de Agar, según la cual se debe suspender 23 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una fuente de calor.**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.
		Con algodón hidrófobo se tapa el matraz, teniendo cuidado de dejar el algodón compacto. Se coloca un papel sobre la boca

4	**Esterilización del medio de cultivo.**	del matraz y se ajusta con un elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Esterilizar en autoclave a 121 ° C.
5	**Distribución del medio de cultivo.**	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Luego de verter el medio en los tubos a estos se lo inclina para que formen un pico de flauta. Ya sólidos, se tapan adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.
6	**Control de calidad**	Realizar el control de calidad retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35º C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	**Almacenamiento y conservación.**	Colocar los medios en una gradilla. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar a una temperatura de 2- 8ºC, hasta que el medio sea utilizado.
8	**Procedimiento de inoculación en el medio.**	Con un asa recta se toca la parte superior de una colonia bien aislada. Sembrar con asa por agotamiento, estriando la superficie del medio.
9	**Incubación del medio**	Se deja la tapa floja y se Incuba de 18 a 24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.
10	**Lectura de resultados**	El análisis de los resultados debe realizarse dentro de los primeros 5 minutos. **Positivo:** desarrollo de color verde pálido a intenso en el pico de flauta y en el líquido de condensación. **Negativo:** sin cambios de color. El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.

- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.

- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

- Agar de Fenilalanina "http://www.mcd.com.mx/pdfs/agar_fenilalanina.pdf" 27 de Noviembre del 2011.

- Koneman, E. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ta ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina 2008. Págs. 1401-1402.

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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:**

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

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

7. **DESARROLLO:**

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

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott. Diagnostico Microbiológico. Onceava Edición. Editorial Médica Panamericana. Año 2004 Buenos Aires. Pag.157-160

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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:**

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

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

7. **DESARROLLO:**

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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:

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

KOH: Examen directo que permite observar la morfología celular de los elementos micóticos y su pigmento. Se suelen utilizar en dos concentraciones, una más fuerte del 20-30% para uñas o muestras muy queratinizadas, y al 10% para el resto de muestras.
El KOH disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar a la llama ligeramente la preparación. Adicionalmente, se puede emplear colorante para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización.

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

7. DESARROLLO:

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- MSP. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos y Técnicas de laboratorio para la Identificación de los principales Hongos oportunistas causantes De micosis humanas. PERU 2007 Pág. 28

- Bailey & Scott. Diagnostico microbiológico. Editorial medica panamericana. 11ª edición. Madrid 2007 Pág. 821

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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:**

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

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

Suspensión: Acción y efecto de suspender o disolver.

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

7. DESARROLLO:

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott: Diagnostico microbiológico. 12ªEd. Editorial medica panamericana. Buenos Aires 2009: p. 825.

- Koneman. Diagnostico microbiológico. 6ªEd. Editorial Médica Panamericana. 2008: p. 1165.

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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:**

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

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

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

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

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

8. **BIBLIOGRAFÍA:**

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

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

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:**

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

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

Patrón MacFarland: es una escala de turbidez, cuya finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Es la más usada, y se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1% y de cloruro de bario al 1.175%, para obtener soluciones con densidades ópticas especiales. El estándar 0.5 de MacFarland, proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

6. **METODOLOGÍA:** la preparación del Patrón MacFarland 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:

<table>
<tr><th>ITEM</th><th>ACTIVIDAD</th><th>PROCEDIMIENTO</th></tr>
<tr><td>1</td><td>Preparación del material.</td><td>En una gradilla disponer de un tubo de ensayo de 10ml totalmente estéril, rotularlo.</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla N.- 1.</td><td>Añadir una solución al 1% de Cloruro de Bario Anhídrido y una solución al 1% (en volumen) de Ácido Sulfúrico químicamente puro, según el siguiente tabla:
Tabla N.- 1
<table>
<tr><th>Tubo N.</th><th>Cl_2Ba (1%)</th><th>SO_4H_2 (1%)</th><th>U.F.C/ml</th></tr>
<tr><td>5</td><td>0.5</td><td>99.5</td><td>$1.5x10^8$</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>3</td><td>Calibración del Patrón N. 5 de McFarland por espectrofotometría.</td><td>Encender el espectrofotómetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar la suspensión en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.085 y 0.10. Es conveniente verificar mensualmente la turbidez de dicho Patrón.</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Almacenamiento y conservación.</td><td>Sellar los tubos y mantenerlos en refrigeración. Cuando el fino precipitado blanco de Sulfato de Bario se sacude, cada tubo posee una densidad diferente que corresponde aproximadamente a cada suspensión bacteriana.</td></tr>
</table>

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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 inóculo debe estar estandarizada por una técnica reconocida de modo que los controles sean comparables y reproducibles.
- No deje pasar más de 15 minutos después de preparar el inóculo.
- Verificar que la solución salina no esté contaminada, debe estar totalmente esteral.

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Preparación del material.**	Se utilizará una cepa joven (Protocolo 13-17), disponer de 1 tubo de ensayo, un aplicador y una cubeta para espectrofotómetro, solución salina. Todo el material a utilizar debe encontrarse estéril.
2	**Suspensión de la cepa en la solución salina.**	Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina 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.
3	**Estandarización visual de la turbidez del inóculo.**	Comparar la turbidez de la suspensión del microorganismo con el Patrón No. 5 de MacFarland, para lo cual se debe colocar juntos la suspensión bacteriana y el tubo de MacFarland, observándolos contra un fondo de rayas negras. Es muy importante agitar bien los tubos antes de realizar este paso.
4	**Verificar la turbidez de la suspensión a través del turbidímetro.**	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.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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 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:**

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

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

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

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

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

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

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	**Obtención de la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran de positiva en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***S. aureus***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Chapman manitol, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Chapman manitol inoculado, a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Chapman manitol específico para ***Staphylococcus aureus***. Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Staphylococcus aureus*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *S.*

		aureus. **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, bordes enteros, prominentes, y brillantes. Sus colonias son de color amarillo dorado intenso por la fermentación del manitol, inclusive el medio se torna a amarillo. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** cocos Gram positivos, dispuestos en pares, tétradas o racimos, con morfología celular redonda. **Pruebas bioquímicas:** **Catalasa:** Positivo **Coagulasa:** Positivo

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Naryáez 2011

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 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:**

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

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

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

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Obtención de la *Escherichia coli* ATCC 25922**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Escherichia coli* ATCC 25922 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***E. coli***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Mac Conkey, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Escherichia coli* ATCC 25922**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, específico para ***Escherichia coli***. Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Escherichia coli*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *E. coli.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, convexas, bordes enteros,

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.

- Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.

- Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.

- Benintende, S."Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.

- Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.

- Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.

- Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".

- Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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 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:**

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

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

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

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

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

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

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	***Klebsiella pneumoniae*** **ATCC 13883**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***K. pneumoniae***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Mac Conkey, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Mac Conkey inoculado, a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Mac Conkey, específico para ***Klebsiella pneumoniae*** Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y**	El Control de Calidad de ***Klebsiella pneumoniae*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos.

	conservados	Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *K. pneumoniae.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, muy mucoides, bordes enteros, crecimiento regular. Se observa la fermentación de lactosa en el Agar MacConkey donde las colonias son de color rosado. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** bacilos largos Gram negativos. **Pruebas bioquímicas:** **TSI:** A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **SIM:** Movilidad (-), Indol (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-) **Citrato:** Positivo **Lisina:** Positivo **Urea:** Positivo **Catalasa:** Positivo

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.

- Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.

- Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.

- Benintende, S."Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.

- Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.

- Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.

- Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".

- Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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 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:**

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

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

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

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

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

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

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	***Pseudomona aeruginosa*** **ATCC 27853**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***P. aeruginosa***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar Cetrimide, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Cetrimide inoculado, a 37º - 42º C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Cetrimide, específico para ***Pseudomona aeruginosa***. Incubar a 37ºC – 42ºC durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
		El Control de Calidad de ***Pseudomona aeruginosa*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos.

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.

- Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.

- Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.

- Benintende, S."Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.

- Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.

- Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 257-258.

- Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".

- Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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 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:**

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

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

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

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

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

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Candida albicans* ATCC 26790**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Cadida albicans* ATCC 26790** **Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***C. albicans***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos. **3**. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Sabouraud, realizar primeramente una descarga y con el mismo hisopo sembrar en línea recta; luego en otro medio sembrar con asa por agotamiento, se realiza una descarga y se estría por toda la superficie de la placa. **4.** Incubar inmediatamente el medio de Agar Sabouraud inoculado, a 37º - 42º C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.
3	**Obtención del cultivo secundario de *Candida albicans* ATCC 26790**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Sabouraud, específico para ***Candida albicans***. Incubar a 37ºC – 42ºC durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Candida albicans*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y pruebas específicas de las mismas. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *C. albicans.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, bordes enteros, aspecto cremoso, mucoides, y de color blanco. **Características Microscópicas (morfología):** **Hidróxido de potasio (KOH):** esporas y levaduras

		aisladas y en gemación. **Otras pruebas:** **Test de filamentación:** Presencia de tubo germinal a las 2 horas.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.

- Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.

- Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.

- Benintende, S."Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Ceciliahttp://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf) 27 noviembre del 2011.

- Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.

- Tortora B. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9na edición. Madrid 2007. Págs. 346-347.

- Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".

- Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

1. **TITULO: VALIDACIÓN DE LOS DISCOS**

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado sobre los procedimientos para la validación de los discos.

3. **ALCANCE:** Validar los discos, para la impregnación de las diluciones de los extractos de las plantas, en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

4. **RESPONSABLES:**

Director del laboratorio: 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:**

Validación: es un requisito primordial cuando deseamos obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables. Es necesario realizarla ya que permite conocer los parámetros de desempeño del método y proporciona un alto grado de confianza y seguridad en la metodología y en los resultados que se obtienen al aplicarlo.

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

Papel Whatman Nº1: Papel de alta pureza, son filtros de papel endurecidos, de alta resistencia a la humedad, resistentes a químicos para realizar filtración al vacío de soluciones ácido/alcalinas.

Amikacina: Antibiótico bactericida aminoglucósido, actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la lectura del ARNm y la síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento y desarrollo bacteriano.

Diluciones: se refiere a la reducción de la concentración de soluciones estandarizadas siguiendo una relación algebraica definida a partir de una dilución para preparar la solución a la concentración de uso.

6. **METODOLOGÍA:** Procedimiento para validar los discos de sensibilidad, método y medio de cultivo a emplearen el Laboratorio de Microbiología.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Elaboración de los discos: Papel Whatman Nº1**	Utilizar un sacabocados de 6mm de diámetro para perforar el papel Whatman Nº1. El procedimiento debe desarrollarse en condiciones asépticas para ello se utilizó la cabina de seguridad biológica, con luz UV durante dos horas, para esterilizar el material a utilizar en el ensayo.
2	**Diluciones de la Amikacina**	Utilizar una ampolla de amikacina con la concentración de 100mg/2ml. Rotular 6 tubos Añadir 20µl de agua destilada estéril en todos los tubos. Colocar en el tubo Nº 1, 20 µl de la ampolla de amikacina, luego realizar diluciones dobles hasta llegar al tubo 6. Las concentraciones que presenta cada tubo son: Tubo Nº 1: 1000µg Tubo Nº 2: 500µg Tubo Nº 3: 250µg Tubo Nº 4: 125µg Tubo Nº 5: 62.5µg Tubo Nº 6: 31.25µg. La concentración del tubo Nº 6 es la utilizada para validar los discos papel filtro Whatman Nº 1 debido a que presenta una concentración próxima al disco de amikacina comercial.
3	**Impregnación de los discos de Amikacina**	Colocar un disco de papel filtro Whatman Nº 1 en una caja Petri sobre una malla metálica estéril e impregnarlo con 10 ul de la dilución de amikacina, evaporar el solvente con la ayuda de una secadora y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 µl.
4	**Colocación de los discos en el medio de cultivo**	En el medio de cultivo inoculado con el microorganismo conocido, colocar el disco de amikacina comercial con la concentración de 30 µg y el disco amikacina preparado con una concentración aproximada de 31.25 µg.

5	**Incubación**	Incubar 24 a 37ºC.
6	**Lectura**	Realizar la lectura con la ayuda de una regla milimetrada. La lectura debe ser similar tanto del disco preparado como el disco comercial.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Medio de Cultivo: disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf. Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

- Validación del método de ensayo: disponible en: http://www.lysconsultores.com/Descargar/NT004.pdf Consultado el 24 de Enero del 2012.

- Papel filtro Whatman: disponible en: http://www.humboldtdemexico.com/datos/webs/producto/lab/tmwhatma.htm consultado 24 de enero de 2012.

AUTORAS: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio 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:**

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

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

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

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

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.**	Utilizar un sacabocados de 6mm de diámetro para perforar el papel Whatman Nº1. El procedimiento debe desarrollarse en condiciones asépticas para ello se utilizó la cabina de seguridad biológica, con luz UV durante dos horas, para esterilizar el material a utilizar en el ensayo.
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 las diluciones.
4	**Elaboración de controles negativos.**	Colocar un disco de papel filtro WHATMAN Nº 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.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Concepto de Dilución [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.pcb.ub.edu/centredepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo_patentesextractosplantas.pdf

- Significado de etanol, [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: http://www.t3quimica.com/pdfs/49i_etanol.pdf

- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf

- Todd-Sanford. Diagnóstico Clínico por el laboratorio. 8ª ed. Salvat; 2001. P. 487.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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 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:**

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

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

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

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.**	- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 002-009), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente. - Rotular los medios de cultivo. - Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo (protocolo Nº 020-021), se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton (protocolo Nº 004), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar. - La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antimicrobiano (solución de extracto seco de drogas vegetales).
2	**Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada**	- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo Nº 028), sobre la superficie inoculada del agar. - Realizar por triplicado en la misma caja. - Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm.

		Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.
3	**Incubación**	- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35ºC ± 2ºC (las temperaturas de >35ºC pueden impedir la detección de estafilococos a meticilina) antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos. - Para la incubación no se debe apilar muchas cajas porque la distribución del oxígeno no sería igual, tanto en la parte superior como en la inferior, es decir; no habría una adecuada recirculación de oxígeno.
4	**Lectura de los resultados**	- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura. - Las placas se examinan después de 18 a 24 horas de incubación. - Si la placa se estrió como corresponde y el inoculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares. - Si se observan colonias aisladas, significa que el inoculo estaba diluido y la prueba debe repetirse. - Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.
5	**Interpretación de los resultados**	- ‹ 6mm Negativo (Resistente) - 6 – 9 mm‹ Intermedio - › 9mm Positivo (Sensible)

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott: Diagnostico microbiológico. 12ªEd. Editorial medica panamericana. Buenos Aires 2009: p. 187

- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf

- Koneman. Diagnostico microbiológico. 6ªEd. Editorial Médica Panamericana. 2008: p. 966.

- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 122-124.

- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 425-436.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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 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:**

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.**	- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente. - Rotular los medios de cultivo. - Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo (protocolo Nº 020-021), se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Sabouraud (protocolo Nº 009), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60º cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar. - La tapa puede dejarse entreabierta durante tres a cinco minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir que el exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar los discos impregnados con el antimicrobiano (solución de extracto seco de drogas vegetales).
2	**Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada.**	- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo Nº 028), sobre la superficie inoculada del agar. - Realizar por triplicado en la misma caja. - Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. - Los discos colocados individualmente o con un dispensador deben distribuirse de manera equidistante uno del otro con una separación que no debe ser menor de 24mm de centro a centro. Normalmente, no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 5 en una placa de 100mm.

		- Invertir las placas para la incubación esto con la finalidad de evitar la acumulación de humedad en la superficie del agar que puede interferir en la interpretación de los resultados de la prueba.
3	**Incubación**	- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35ºC ± 2ºC antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos. - Para la incubación no se debe apilar muchas cajas porque la distribución del oxígeno no sería igual, tanto en la parte superior como en la inferior, es decir; no habría una adecuada recirculación de oxígeno.
4	**Lectura de los resultados**	- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura. - Las placas se examinan después de 48 horas de incubación. - Si la placa se estrió como corresponde y el inoculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares. - Si se observan colonias aisladas, significa que el inoculo estaba diluido y la prueba debe repetirse. - Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.
5	**Interpretación de los resultados**	- ‹ 6mm Negativo (Resistente) - 6 – 9 mm‹ Intermedio - › 9mm Positivo (Sensible)

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bailey & Scott: Diagnostico microbiológico. 12ªEd. Editorial medica panamericana. Buenos Aires 2009: p. 187

- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf

- Koneman. Diagnostico microbiológico. 6ªEd. Editorial Médica Panamericana. 2008: p. 966.

- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 122-124.

- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 425-436.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio 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:**

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

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

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

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

CMI: Se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada.

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

7. DESARROLLO:

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

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 411-412.

- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 121

- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 49 – 53.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

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

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

3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio 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:**

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

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

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

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

CMB: Es la menor concentración de antimicrobiano capaz de eliminar una cepa bacteriana dada.

Variables biológicas de las pruebas del CMB:

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

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

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

8. **BIBLIOGRAFÍA:**

- Salazar Wilson E. Guía de prácticas de laboratorio de microbiología. II tomo. 1988. P. 411-412.

- Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3ra Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 121.

- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 49 – 53.

AUTORAS: Karla Montalvo, Tania León, Solmayra Agreda, Liseth Cueva, Diana Montaño 2010
ACTUALIZACIÓN: Jéssica Castro, Daniela Córdova, Guadalupe Rivera, Andrea Alvarado, Angélica Narváez 2011.

Anexo Nº 4

Autorización para utilizar el auditórium del área para difundir los resultados obtenidos.

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

MEMORANDUM Nro. 651 – CLC-ASH- UNL.

PARA: Dr. Jorge Reyes Jaramillo
DIRECTOR (e) DEL AREA DE LA SALUD HUMANA

DE: LIC. CARMEN ALEJANDRA ULLAURI
COORDINADORA (e) DE LA CARRERA DE LABORATORIO *CLINICO*

ASUNTO: Solicitar autorización para utilizar el Auditorio del Area

Me es grato dirigirme a Usted con la finalidad de solicitarle de la manera mas comedida que se autorice la utilización del Auditorio del Área, el día miércoles 14 de diciembre del 2011 a partir de la 16hoo, con la finalidad de llevar a cabo la ***Difusión de los resultados del Proyecto de Fitoquímica.***

Loja, 08 de diciembre del 2011

Atentamente,
EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA
ESTA LA GLORIFICACION DE LA VID

Lic. Carmen Ullauri González
COORDINADORA (e) DE LA CARRERA
DE LABORATORIO CLINICO ASH

cc. Archivo

Elaborado:
María Jiménez

Anexo Nº 5

Certificación de difusión de resultados

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECTOR DE TESIS:

Certifico:

Que la egresada Jéssica Vanessa Castro Córdova de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la UNL, realizó la difusión de resultados, dando cumplimiento con el objetivo planteado en el trabajo de Investigación titulado **"Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cuphea racemosa* (L. f.) Spreng y *Calatola costaricensis* Standl por el método de difusión en agar"**, el mismo que se realizó el día 14 de diciembre de 2011 a las 16h00, en el Auditórium del Área de la Salud Humana.

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

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana
DIRECTOR DE TESIS

Anexo Nº 6

Registro de asistencia de estudiantes de la carrera de laboratorio clínico a la difusión de resultados

Registro de asistencia a la difusión de resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Piper pseudochurumayo, Olyra latifolia, Oryctanthus alveolatus, Sida poeppigiana, Zornia reticulata, Costus comosus, Cuphea racemosa, Halimolobos hispidula, Calatola costaricensis, Cestrum sendtherianum* por el método de difusión en agar

Nombre	Número de cédula	Estudiante	Docente	Carrera	Firma
Yohanna Ruiz	1103857320		X	Lab. Clínico	
Paulina Villalba	1900720879	X		Lab. Clínico	
María Soto	1900640911	X		Lab. Clínico	
Ana Torres	1900597558	X		Lab. Clínico	
Tatiana Solano	1104791072	X		Lab Clínico	
Olga Vera	0705403004	X		Lab. Clínico	
María Guamán	1104161999	X		Lab. Clínico	
Digna Enríquez	1103863096	X		Lab Clínico	
Martha Ambulodi	1104969905	X		Lab. Clínico	
Diana E. Enríquez	1104170129	X		lab. clínico	
Marjoriel. Alvarez	1104367113	X		Lab. Clínico	
Silvana Pizarro	1104901507	X		Lab. Clínico	
JOHANNA QUIZHPE	1104116130	X		Lab. Clínico	
Gabriela Ordóñez	1105049827	X		Lab. Clínico	

Johnatan Maldonado	1900380583	X		Lab. Clínico	
Carmen Pineda	1104222276	X		Lab. Clínico	
Andrea Vivanco	1105007775	X		Lab Clínico	
Siluano Ordóñez	1104245301	X		Lab Clínico	
Eduardo Maza	1104746225	X		Lab Clínico	
Carlos Pardo	0705590057	X		Lab. Clínico	
Kathérin Sanchez	0705040012	X		Lab. Clínico	
Areli Bertemente	1104637655	X		Lab Clínico	
Andrea Alvarado	0705698702	X		Lab. Clínico	
Digna Enriquez	1103863096	X		Lab. Clínico	
Maritza Ambatab	1104969405	X		Lab. Clínico	
Tania Ogeno	1104621758	X		Lab. Clínico	
Diana E. Enriquez	1104170129	X		Lab. Clínico	
Marjorie R. Alvarez	1104367113	X		Lab. Clínico	
Siluana Pizarro	1104901507	X		Lab. Clínico	
Johanna Guamp	1104116130	X		Lab. Clínico	

Lenin Coronado	1900219433-9	X		Laboratorio Clínico	
Diana Amigo	1104708233	X		Laboratorio Cl	
Gina Sanger	1104708279	X		Laboratorio C	
Andrea Cabrera	1105286049	X		L.C	
Mireya Lauro	1104262338	X		Laboratorio C	
Ingrid Agreda	1900750661	X		L. Clínico	
Nayeli Flores	1104551672	X		L. Clínico	
Sandy Calle	0925004848	X		L. Clínico	
Fiscella Carrera	1105042525	X		L Clínica	
Katina C. Pangay	1104945625	X		Lab Clínico	
Lorena Espejo	1104752270	X		Lab. Clínica	
Daniela Alvarado	1104746449	X		Lab Clínica	
Tatiana Astudillo	1104745169	X		Lab Clínica	
Gabriela Sotelo	1104604016	X		Lab. Clínico	
Margoli Saranga	1900676803	X		Lab Clínica	
Alejandra Tamayo	1900751965	X		Lab-Clínico	
MARIA BELEN ALBARA TRUJILLO	1104750466	✓		Lab. Clínico	

Mabel Lima M	1105289556	X		Lab. Clínico	
Miguel Ángel León	1105005819	✓		Lab clínico	
Rina León Grande	0705036451	✓		Lab. Clínico	
Alexandra Granda	1104825764	✓		Lab. Clínico	
Luis Ochoa	1104982683	✓		Lab. Clínico	
Nathaly Quezada	1104983694	✓		Lab. Clínico	
Verónica Gómez	1104591078	✓		Lab. Clínico	
Carlos Villacís	1104285976	X			
Jaime Luzo	1104134718	X			
Carlos Joca	1104895331	✓		Lab Clínico	
Alexandra Jaramillo	1104331861	✓		Lab. Clínico	
Karina Aguirre	1104680481	X		Lab Clínico	
Mayra Carrión	1104603899	✓		Lab. Clínico	
Liliana Jiménez	1104554184	✓		Lab. Clínico	
Ximena Astudillo	1104980880	✓		Lab Clínico	
Evelyn Cordero	1104661291	✓		Lab. Clínico	

ROBERTO CARRIO	1104851300	Estudiante		L. Clinico	
Paola Mino	1900707876	Estudiante		Lab. Clínico	
Daniel Alvarado	1104996218	Estudiante		Lab. Clínico	
Diego Rey	1900408863	Estudiante		Lab. Clínico	
Nilagos Gien	1104604127	Estudiant		Lab. clínico	
Ibet Jarvis	1105031239	Estudiante		Lab. Clínico	
Gabriela Siacco	1105141251	Estudiante		Lab. Clínico	
Juliana Chéñes	1105141269	Estudiante		Lab. Clínico	
Roberto Camacho	1104413255	Estudiante		Lab. Clínico	
Alex Vélez	1104051131	Estudiante		Lab clínico	
Luciano Cocos	1105[illegible]03	estudiante		Lab. Clínico	
Johana Maroia	1900510626	X		Lab. Clinico	
Eduardo Patricio Valdivieso Ludeña	1104623127	✓		Laboratorio Clínico	
Pablo marcelo Pimón Olmedo	1104629892	✓		Laboratorio Clínico	
Francisco Edwin Torres Paredes	0705563743	✓		Laboratorio Clínico	
Carlos Alfredo Castillo Montoya	1104543200	✓		Laboratorio Clínico	

Anexo Nº 7

Tríptico de resultados de actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las plantas en estudio

FASE C: Evaluación de la actividad antimicrobiana por el Método de difusión en Agar (Kirby - Bauer)

RESULTADOS

De las plantas empleadas en el estudio de actividad antimicrobiana: *Piper pseudochurumayo; Olyra latifolia; Oryctanthus alveolatus; Sida poeppigiana (K. Schum) Fryxell; Zornia reticulada; Costus comosus; Cuphea racemosa (L.f) Spreng; Halimolobos hispidula (D.C) O.E.Schulz; Calatola costaricensis Standl y Cestrum sendtherianum* se obtuvo resultados negativos en las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10.000

frente a las bacterias *Escherichia coli (25922), Staphylococcus aureus (25923), klebsiella Pneumonae (13883), Pseudomona aeruginosa,(27853) y el hongo Cándida albicans (26790)*, lo que indica que las plantas no presentan actividad antimicrobiana con el método y las diluciones empleadas.

En los controles positivos (antibióticos), se formaron halos de inhibición, mostrando sensibilidad frente a cada microorganismo utilizado y los controles negativos demostraron la veracidad del método aplicado

CONCLUSIÓN

El extracto etanólico de *Piper pseudochurumayo, Olyra latifolia, Oryctanthus alveolatus, Sida poeppigiana , Zornia reticulada, Costus comosus, Cuphea racemosa, Halimolobos hispidula, Calatola costaricensis , Cestrum sendtherianum* no presentaron actividad antibacteriana ni antifúngica frente a *Escherichia coli (25922), Staphylococcus aureus (25923), klebsiella Pneumonae (13883), Pseudomona aeruginosa,(27853) y Cándida albicans (26790)* mediante el método de difusión en agar en las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000.

Elaborado por: Jessica Castro, Andrea Alvarado, Daniela Cárdenas, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CEDAMAZ

PROYECTO DE PLANTAS MEDICINALES, PLAGUICIDAS Y TÓXICAS DE LA RSE: ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DE BIOACTIVIDAD EN ZAMORA CHINCHIPE

TEMA:
Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Piper pseudochurumayo, Olyra latifolia, Oryctanthus alveolatus, Sida poeppigiana, Zornia reticulada, Costus comosus, Cuphea racemosa, Halimolobos hispidula, Calatola costaricensis, Cestrum sendtherianum*

OBJETIVOS

- General:
Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Piper pseudochurumayo, Olyra latifolia, Oryctanthus alveolatus, Sida poeppigiana, Zornia reticulada, Costus comosus, Cuphea racemosa, Halimolobos hispidula, Calatola costaricensis, Cestrum sendtherianum* plantas medicinales de uso tradicional de la Provincia de Zamora Chinchipe por el método de difusión en agar.

- Específicos:
Conocer la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Piper pseudochurumayo, Olyra latifolia, Oryctanthus alveolatus, Sida poeppigiana, Zornia reticulada, Costus comosus, Cuphea racemosa, Halimolobos hispidula, Calatola costaricensis, Cestrum sendtherianum*.

Determinar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de *Piper pseudochurumayo, Olyra latifolia, Oryctanthus alveolatus, Sida poeppigiana, Zornia reticulada, Costus comosus, Cuphea racemosa, Halimolobos hispidula, Calatola costaricensis, Cestrum sendtherianum*.

Difundir los resultados obtenidos tras la evaluación analítica del extracto etanólico de las plantas en estudio a los estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

INTRODUCCIÓN

La salud y la enfermedad son parte integral de la vida, del proceso biológico y de las interacciones medioambientales y sociales. A lo largo del desarrollo de las culturas humanas, la relación entre el hombre y su medio vegetal a sido íntima y vital, permitiendo que los investigadores, indagaen y utilicen las plantas medicinales como medio principal en la terapéutica de las diversas enfermedades que afectan al ser humano. Las enfermedades infecciosas son las principales causas de morbi-mortalidad en el País y la Provincia de Zamora Chinchipe.

es por ello que surge la necesidad de recurrir a plantas medicinales que han sido utilizadas de generación en generación por los pobladores como primera alternativa rápida y económica para controlar diversas patologías, ya que las comunidades de esta provincia tienen acceso limitado a la medicina occidental y a la deficiente infraestructura sanitaria.

La Universidad Nacional de Loja a través de la Carrera de Laboratorio Clínico y el Centro de estudios y desarrollo de la Amazonía (CEDAMAZ) propicia la investigación científico-técnica sobre los problemas del entorno, en el desarrollo económico y social de la Amazonía Ecuatoriana mediante la ejecución del Proyecto de Plantas Medicinales, Plaguicidas y Tóxicas de la Región Sur del Ecuador: Estudio Fitoquímico y de Bioactividad en Zamora Chinchipe, esta enfocado en la evaluación antimicrobiana complementada con estudios microbiológicos de las plantas usadas con fines medicinales, recuperando de esta manera los conocimientos ancestrales de los sanadores de la Provincia de Zamora Chinchipe, además de brindar un aporte científico sobre el uso correcto de las plantas medicinales.

METODOLOGÍA

Estandarización de procedimiento
Se validó la técnica a utilizar mediante el ensayo de actividad antimicrobiana, con la cepa bacteriana conocida *Escherichia coli* y el extracto de clavo de olor. Tras el ensayo se determinó que el extracto esencial del clavo de olor presenta actividad antimicrobiana frente a *E. coli*.

Procedimiento analítico
Fase A: Preparación de medios de cultivo, pruebas bioquímicas y diluciones de los extractos de las plantas (1/100, 1/1000, 1/10.000)

FASE B: Viabilización de las cepas ATCC, pruebas bioquímicas, gram, resiembra.

Anexo Nº 8 **REGISTRO DE RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

LECTURA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Bacteria……..

PLANTA	EXTRACTOS (mm)			CONTROL POSITIVO …… (mm)			CONTROL NEGATIVO ETANOL 70% (mm)			OBSERVACIONES
	1/100	1/1000	1/10.000	1/100	1/1000	1/10.000	1/100	1/1000	1/10.000	
Planta 1 (PIPER)										
Repetición 1										
Planta 2 (OLYRA)										
Repetición 2										
Planta 3 (ORYCTANTHUS)										
Repetición 3										
Planta 4 (SIDA)										
Repetición 4										
Planta 5 (ZORNIA)										
Repetición 5										
Planta 6 (COSTUS)										
Repetición 6										
Planta 7 (CUPHEA)										
Repetición 7										
Planta 8 (HALIMOLOBOS)										
Repetición 8										
Planta 9 (CALATOLA)										
Repetición 9										
Planta 10 (CESTRUM)										
Repetición 10										

Anexo Nº 9

Registro diario de temperatura de la Incubadora

Fecha	Temperatura	Observaciones

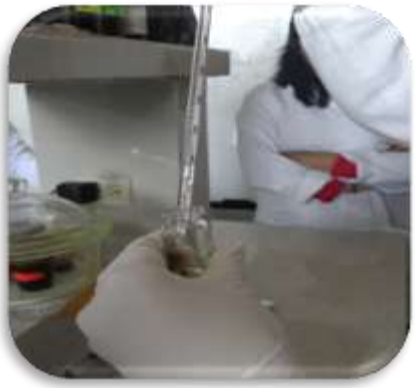
Anexo Nº 10

Fotografías de los procedimientos realizados

Preparación de la solución de trabajo
Laboratorio de fitoquímica del Área de la Salud Humana de la UNL

Extractos liofilizados

Preparación de las diluciones



Diluciones de *Cuphea racemosa* (L.f) Spreng.

Diluciones de *Calatola costaricensis Standl*

Preparación de medios de cultivo
Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

Pesaje

Hidratación y disolución

Distribución

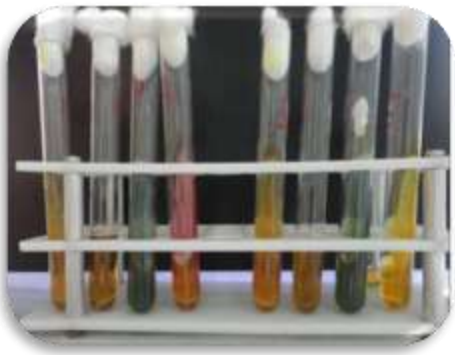
Viabilización de cepas de referencia (ATCC) Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

Reconstitución-Caldo Cerebro Infusión 0.5ml

Inoculación en medios de cultivo

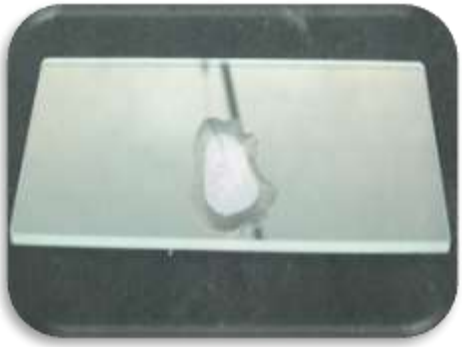
Pruebas de identificación para bacterias y hongos
Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

Batería de Pruebas Bioquímicas



Tinción de GRAM

Prueba de la Catalasa



Prueba de la Coagulosa

Prueba del Tubo Germinal

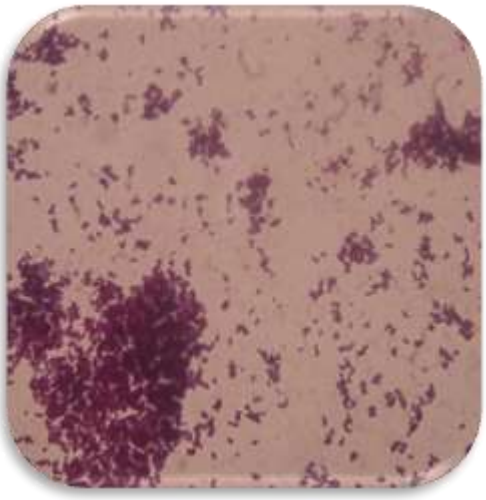
Prueba de KOH

Cepas de referencia viabilizadas (ATCC)
Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

Bacteria *Staphylococcus aureus* en medio de Chapman Manitol

Características Macroscópicas

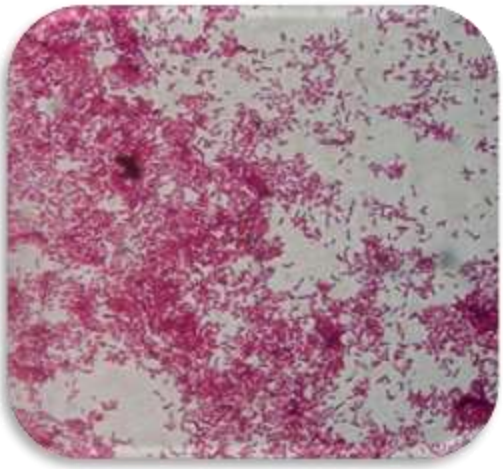
Características Microscópicas



Bacteria *Escherichia coli* en medio de MacConkey

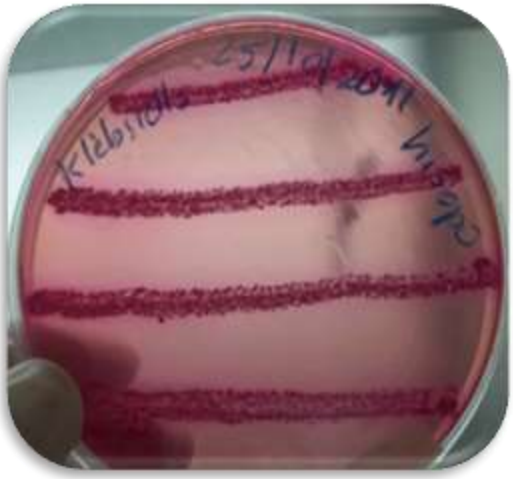
Características Macroscópicas

Características Microscópicas

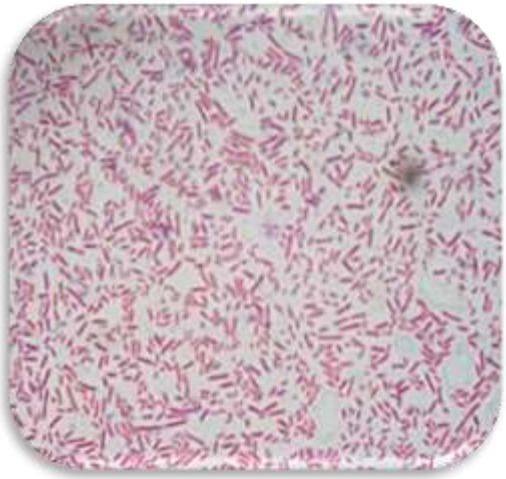


Bacteria *Klebsiella pneumoniae* en medio MacConkey

Características Macroscópicas



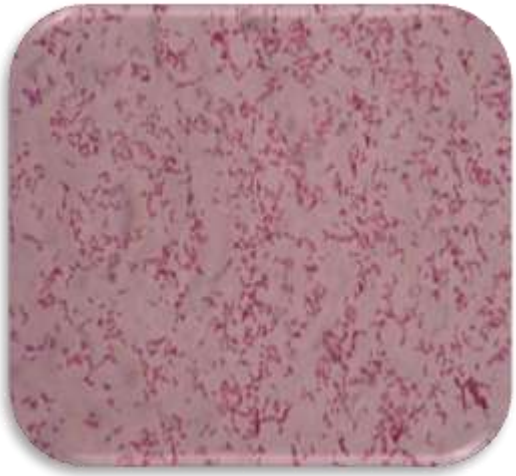
Características Microscópicas



Bacteria *Pseudomona aeruginosa* en medio Cetrimide

Características Macroscópicas

Características Microscópicas



Hongo *Candida albicans* en medio Sabouraud Dextrosa

Características Macroscópicas

Características Microscópicas

Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana
Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

Preparación de inóculo

Colonias microbianas

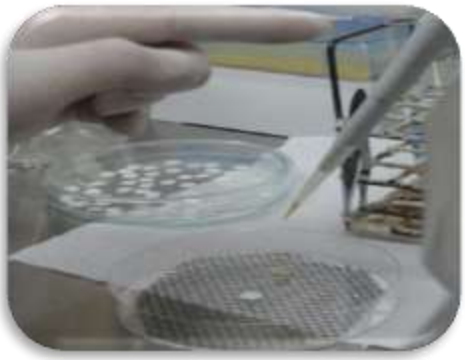
Colocación en solución salina 0.9%

Comparación con el tubo N °5 MacFarland

Inoculación de las placas

Discos

Impregnación de discos

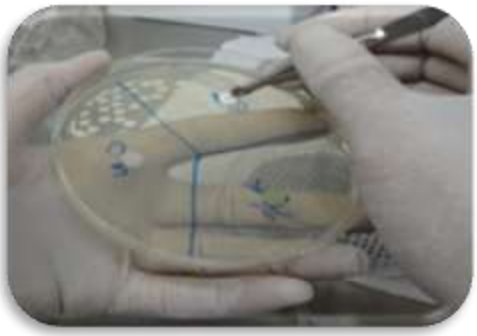


Evaporar el solvente

Colocación de discos y controles

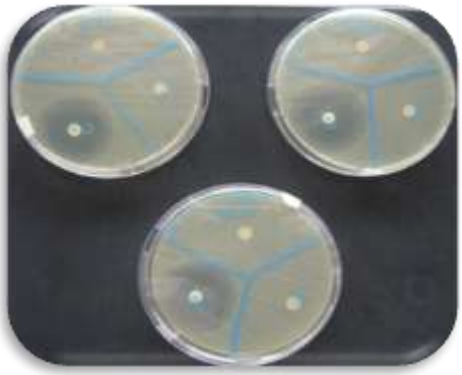
Discos con los extractos

Control positivo



Control negativo

Resultados de la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.



DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS
Auditórium Antonio Peña Celi del Área de la Salud Humana