UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

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

AUTORA

DANIELA TATIANA CÓRDOVA RIOFRÍO

DIRECTORA

Dra. CLAUDIA CRUZ ERAZO

LOJA-ECUADOR

2012

TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Oryctanthus alveolatus y Costus comosus* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.

AUTORÍA

Los contenidos, ideas, conceptos, metodologías, resultados, discusión y conclusiones obtenidas en la presente investigación es responsabilidad absoluta de la autora.

Daniela Tatiana Córdova R.

CERTIFICACIÓN

Dra.

Claudia Cruz Erazo
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada **"EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus*, POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN DE AGAR"** elaborado por la Srta. Daniela Tatiana Córdova Riofrío ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección, cumpliendo los requerimientos reglamentarios para su aprobación por lo tanto faculto a la autora para su presentación, disertación y defensa.

Loja, Febrero 2012

Atentamente

Dra. Claudia Cruz E.
DIRECTORA DE TESIS

AGRADECIMIENTO

LA culminación de mi carrera especialmente de mi tesis es por el gran apoyo por parte de mi familia, amigos, docentes e instituciones hacia mi persona, es por ello que mi agradecimiento infinito para todos ustedes.

A la Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana, Centro de estudios y desarrollo de la Amazonia (CEDAMAZ) en especial a la Carrera de Laboratorio Clínico por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva.

Al Centro de diagnóstico médico y al personal que labora en está prestigiada entidad por esas palabras de fortaleza y apoyo brindado en el desarrollo de mi tesis.

A mis Docentes, mi gratitud inmensa, por haber compartido sus conocimientos y brindado motivación para la culminación de mis estudios, especialmente a la Dra. Claudia Cruz por la asesoría, paciencia y orientación brindada durante la ejecución del proyecto de tesis.

Dr. Luis Morocho, Licda Karla Montalvo un grato agradecimiento por su apoyo incondicional en las actividades realizadas el Laboratorio de Fitoquímica del Área de la Salud Humana.

Todos estos retos y logros alcanzados hasta este momento de mi vida son gracias a su apoyo, su recuerdo es inmemorable.

Gracias a todos...

Daniela Tatiana Córdova R.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedicó con todo mi amor y afecto a ti Dios que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos. Sin importar en dónde estén o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria quiero darles las gracias por formar parte de mi, por todo lo que me han brindado y por sus bendiciones.

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor.

A mis hermanos, sobrinos y a ti Xavi hijo mío, muchas gracias por los gratos momentos que hemos compartido, por seguirme en mi camino y recuerden que son las personitas más importante en mi vida.

A todos mis amigos Nayis, Vale, Emma y Lenny por estar conmigo en todo este tiempo donde he vivido momentos felices y tristes. Y al equipo de proyecto que logramos llegar hasta el final del camino.

Y no me puedo olvidar de decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos por esos momentos, son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean.

"El tiempo es el mejor autor: siempre encuentra un final perfecto" (Chaplin)

Daniela Tatiana Córdova R.

RESUMEN

La presente investigación titulada "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR", se llevó a cabo en la Universidad Nacional de Loja, en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico Médico del Área de la Salud Humana.

Los pobladores de la Provincia de Zamora Chinchipe, debido a su limitada infraestructura sanitaria y atención de salud deficiente utilizan los recursos naturales para prevenir, aliviar y sanar diversas infecciones a nivel respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, siendo estas enfermedades las primeras causas de morbi-mortalidad en nuestro País; por lo que permite considerar a las plantas naturales como una alternativa rápida y económica para curar diversas dolencias, además de conservar el conocimiento ancestral de las comunidades de esta región amazónica.

El propósito de este estudio fue determinar la presencia o ausencia de actividad antibacteriana y antifúngica de los compuestos activos del extracto etanólico de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus*; además de probar su eficacia para tratar enfermedades y validar científicamente la actividad terapéutica y toxicológica que ejercen dichas plantas.

El estudio se realizó con diluciones etanólicas al 70% 1/100, 1/1.000, 1/10.000 de los extractos de las plantas *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus;* estas diluciones fueron utilizadas para realizar la actividad antimicrobiana por el método de Kirby Bauer modificado frente a cinco cepas microbiológicas puras: *Staphylococcus aureus* (ATCC[1] 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y el hongo *Cándida albicans* (ATCC 26790). Los extractos etanólicos de las plantas en estudio no inhibieron el crecimiento bacteriano, por lo tanto se determinó que las plantas *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* no presentan actividad antibacteriana ni antifúngica frente a los microorganismos antes mencionados; mediante el método y concentraciones aplicadas.

Palabras claves: Actividad antimicrobiana, infecciones, plantas medicinales, *Oryctanthus alveolatus, Costus comosus,* diluciones etanólicas, Kirby Bauer modificado, cepas microbiológicas.

[1] ATCC: American Type Culture Collection

SUMMARY

The present titled investigation "EVALUATION OF THE ACTIVITY ANTIMICROBIAL OF THE EXTRACT ETANÓLICO OF *Oryctanthus alveolatus* and *Costus comosus* FOR THE DIFFUSION METHOD IN AGAR", it was carried out in the National University of Loja, in the Laboratory of Microbiology of the Center of Medical Diagnosis of the Area of the Human Health.
The residents of Zamora's County Chinchipe, due to its limited sanitary infrastructure and attention of faulty health uses the natural resources to prevent, to alleviate and to heal diverse infections to breathing, gastrointestinal level and genitourinary, being these illnesses the first causes of morbi-mortality in our Country; for what allows to consider to the natural plants as a quick and economic alternative to cure diverse ailments, besides conserving the ancestral knowledge of the communities of this Amazon region.
The purpose of this study was to determine the presence or absence of antibacterial activity and antifúngica of the active compounds of the extract etanólico of *Oryctanthus alveolatus* and *Costus comosus*; besides proving their effectiveness to treat illnesses and to validate the therapeutic and toxicological activity that they exercise these plants scientifically.

The study was carried out with dilutions etanólicas to 70% 1/100, 1/1.000, 1/10.000 of the extracts of the plants *Oryctanthus alveolatus* and *Costus comosus*; these dilutions were used to carry out the activity antimicrobial for the method of Kirby Bauer modified in front of five stumps pure microbiological: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) and the mushroom *Candida albicans* (ATCC 26790). The extracts etanólicos of the plants in study didn't inhibit the bacterial growth, therefore it was determined that the plants Oryctanthus alveolatus and Costus comosus don't present antibacterial activity neither antifúngica before in front of the microorganisms mentioned; by means of the method and applied concentrations.

Key words: Activity antimicrobial, infections, medicinal plants, *Oryctanthus alveolatus, Costus comosus*, dilutions ethanolic, Kirby modified Bauer, stumps microbiological.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido **Pág.**

TÍTULO…….. I
AUTORÍA…… II
CERTIFICACIÓN DEL DOCENTE DIRECTOR…… III
AGRADECIMIENTO…… IV
DEDICATORIA…… V
RESUMEN…….... VI
SUMMARY…… VII
INDICE…… VIII

I. **INTRODUCCIÓN**…… 1
II. **REVISIÓN DE LITERATURA**…… 4
III. **MATERIALES Y MÉTODOS**…… 32
IV. **RESULTADOS**…… 40
V. **DISCUSIÓN**…… 43
VI. **CONCLUSIONES**…… 47
VII. **RECOMENDACIONES**…… 49
BIBLIOGRAFÍA…… 51
ANEXOS…… 56

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son bondades de la naturaleza, que desde tiempos inmemorables se han utilizado con fines curativos, por lo que muchas enfermedades y dolencias del hombre tienen la solución en la misma naturaleza; las hierbas son utilizadas con fines farmacéuticos- científicos en la creación de medicinas, remedios naturales y en la aplicación de estudios clínicos para comprobar la efectividad de ciertas plantas medicinales, utilizadas para tratar algunos problemas de salud. (1,2)

El estudio de la relación entre el hombre y las plantas, permite apreciar los recursos vegetales, la influencia del ambiente natural en las culturas interactuantes (3); los aspectos socio-culturales y productivos en que las plantas están siendo usadas. A su vez permite reconocer el valor del complejo creencia conocimiento- práctica en relación al manejo de los recursos naturales y conservación de la biodiversidad. (4, 5)

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes debido a que el conocimiento ancestral es inmenso, se registra el 47% de plantas curativas, la mayoría de estas plantas usadas para aliviar más de 70 dolencias que pueden o no ser diagnosticadas por el enfermo(6,7).La Provincia de Zamora Chinchipe, ofrece gran variedad de especies vegetales, existiendo grandes posibilidades para la investigación de plantas con efectos curativos, ya que posee una pluralidad de plantas para aplacar distintos tipos de enfermedades siendo muchas de estas curadas con extractos de plantas con efectos antiespasmódicos, antiparasitarios, cardiotónicos, diuréticos, estimulantes digestivos y sedantes del sistema nervioso.(8, 9, 10)

De esta manera se puede corroborar que las enfermedades que prevalecen en la provincia de Zamora Chinchipe son las enfermedades respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias ya sea por sus tradiciones ancestrales, deficiente atención primaria de salud, educación sanitaria y uso erróneo de antibioticos, de tal maneraque permite a los sanadores de esta región utilizar las plantas medicinales como terapéutica para aliviar diferentes dolencias, además de mejorar su estilo de vida integrándolos como entes útiles a la sociedad. (11,12)

Con esta referencia la finalidad de este proyecto investigativo fue evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico al 70% de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus*, plantas nativas y de uso medicinal en la provincia de Zamora Chinchipe, el mismo que contribuirá a validar científicamente los saberes ancestrales de esta comunidad.

Para efectuar dicho objetivo se empleó el método de difusión en agar, utilizando diluciones 1/100, 1/1000, 1/10.000 y se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica frente a los microorganismos estandarizados (ATCC) *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomona aeruginosa* y el hongo patógeno *Cándida albicans.* Estas bacterias son los agentes causales más comunes de infecciones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales y cutáneas, el hongo empleado por su patogeneidad provoca micosis superficiales, sistémicas, infecciones genitales, en la cavidad bucal e intestino. (8)

Finalmente tras la evaluación antimicrobiana, con la metodología y diluciones utilizadas, no se logró comprobar la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de ***Oryctanthus alveolatus*** y ***Costus comosus*** al obtener resultados negativos frente a las bacterias y hongo empleados en el estudio. Sin embargo no se descarta la presencia de actividad antimicrobiana de estas plantas, ya que empleando otras metodologías y diferentes concentraciones, se lograría obtener diferentes resultados. Además por la presencia en bajas concentraciones de los metabolitos secundarios de las plantas en estudio pueden matar o inhiben el crecimiento de los microorganismos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

PLANTAS MEDICINALES

Los vegetales hacen posible la vida del organismo animal y condicionan su estado de salud, mediante la elaboración de componentes químicos complejos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo, realizando funciones fisiológicas imprescindibles para mantener la vida.

Su utilidad primordial, es servir como medicamento que alivie la enfermedad, disminuya o neutralice el desequilibrio orgánico producido en el organismo.(13)

Principios activos de las plantas

Los *principios activos* sirven para clasificar a las plantas y seleccionarlas en el control del rendimiento y calidad de productos del cultivo y procesado industrial. Estos metabolitos secundarios de las plantas medicinales pueden aparecer en toda la planta, generalmente en las raíces, corteza flores, semillas o frutos presentan mayor concentración. (14,15)

Formación de los principios activos en la planta medicinal

En un vegetal, la raíz actúa como bomba que absorbe del suelo el agua, las sales minerales y los nitratos, savia bruta, que impulsa y reparte por todo el vegetal, cuyas hojas reciben la savia bruta a través del tallo, mediante acción de unos complejos enzimáticos o fermentos que contienen, elaboran compuestos nitrogenados, nutrientes esenciales para la vida y alcaloides, principios activos de acción fisiológica especifica y enérgica. (14)

Importancia y beneficios de las plantas medicinales

La medicina tradicional es parte de la cultura de los pueblos, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades en las personas, satisfacer sus necesidades básicas, acumulando prácticas ancestrales de selección, manejo y conservación de conocimientos que han transmitido de una generación a otra.

La utilización de las plantas medicinales para la salud es vital, debido al fácil acceso, bajo costo, como fuente de ingresos económicos para cultivadores, comerciantes, colectores y manufactureros de medicinas basadas en plantas.
Las plantas tienen sabor, que puede ser picante, salado, ácido, amargo o dulzón, de acuerdo a la predominancia del sabor, tienen una acción sobre órganos específicos y sobre sus energías. Tienen una disposición a actuar sobre ciertos órganos o sistemas: digestivo, respiratorio, reproductivo, muscular, etc. por tanto no todas son buenas para todos o para todo, hay que conocer que plantas actúan sobre que sistemas energéticos y cómo lo hacen.

En general las plantas con uso medicinal pueden actuar combinadas con otras plantas, que potencializan o modifican sus efectos, esto es que al juntar ciertas plantas el efecto que se busca puede ser más fuerte, o se puede disminuir la potencia de la planta principal para no producir efectos tóxicos.
Las acciones de las plantas son directas sobre el cuerpo, algunas son drenadoras, purgantes, diuréticas (movilizan líquidos), desintoxicantes, o calmantes, por lo tanto es importante saber juzgar que planta utilizar, cuando utilizarla, como prepararla y además conocer si es necesario o no juntarla con otras plantas para modificar o potenciar ciertas características de sus acciones.(16,17)Las plantas aromáticas y medicinales son fuente exclusiva de algunas drogas que se emplean en tratamientos médicos nuevos; se emplean, como suplementos nutricionales, industria de cosméticos y perfumes.
Existen otras especies de plantas reconocidas por sus propiedades demostradas, son ricas en vitamina C considerada como el mejor antioxidante que existe, refuerza los sistemas inmunológicos, mantiene una buena visión, mejora la absorción del hierro, combate el estrés, actúa contra el cáncer en la detoxificación de drogas, toxinas, carcinógenos y mutágenos (como bloqueadores y supresores), neutralizan radicales libres, inhiben enzimas que activan carcinógenos, en las enfermedades cardiovasculares evitando oxidación de LDL (protegiéndolas) y afectando la presión sanguínea.(18)

Propiedades antimicrobianas de las plantas

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. Varios grupos de investigadores han estudiado la actividad biológica de plantas medicinales originarias de diversas regiones del mundo, guiados por el uso popular de las especies nativas. Por otro lado, 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 ocurrencia natural. (19)

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. Se han sugerido usos prácticos de estas actividades en humanos y animales, así como en la industria de alimentos. La actividad antimicrobiana de especies de plantas medicinales estudiadas para diversas bacterias patogénicas y para la levadura *Cándida Albicans*, los extractos, fracciones y compuestos aislados tienen capacidades de controlar el crecimiento de una o más especies de microorganismos, indicando buen potencial de aplicación como antimicrobiano.(20,21)

Componentes antimicrobianos de las plantas

Las plantas tienen una casi ilimitada habilidad de sintetizar sustancias aromáticas, gran cantidad de ellas son fenoles o sus derivados de oxígenos sustituidos. Muchos son metabolitos secundarios de los cuales por lo menos 12000 han sido aislados, un número estimado menor en un 10% del total.

En numerosos casos estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la predacción por microorganismos, insectos y herbívoros.(22)

Los compuestos fitoquímicos antimicrobianos útiles pueden ser agrupados en varias categorías:

Fenoles y Polifenoles: tienen acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica. Se considera que la acción de los fenoles y polifenoles contra los microorganismos se debe a la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos

sulfihidrilos de sus aminoácidos de cisteína.

Quinonas: Son anillos aromáticos, se encuentran en amplia distribución en la naturaleza y son altamente reactivos en reacciones de óxido-reducción. Su actividad antimicrobiana actúa sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas.

Flavonas, flavonoides y flavonoles: Son compuestos sintetizados por las plantas en respuesta a la infección antimicrobiana, y su actividad sobre las bacterias en su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles.

Taninos: estimulan la actividad fagocitaria, actividad antitumoral mediada por el hospedero y un amplio rango de actividad antiinfecciosa. La actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos.

Cumarinas: Son compuestos de los cuales se conoce muy bien su acción antitrombótica, antiinflamatoria y vasodilatadora.

Terpenoides y aceites esenciales: Los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios.

Alcaloides: son útiles contra la infección por VIH y también contra las infecciones intestinales relacionadas con el SIDA. Otros alcaloides tienen efecto contra parásitos como *Giardia* y *Entamoeba*.

Lectinas y Polipéptidos: Su mecanismo de acción es en la formación de canales iónicos en la membrana del microorganismo o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas a los receptores polisacáridos del hospedero,(23, 24, 25,26)

DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

Oryctanthus alveolatus

Oryctanthus alveolatus	
 Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la RSE: estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe	
Nombre común	Escoba de bruja, mata palo
Taxonomía	Reino: *Plantae* División:*Magnoliophyta* Clase: *Magnoliopsida* Orden:*Santalales* Familia:*Loranthaceae* Género*:* ***Oryctanthus*** Especie*:* ***alveolatus*** (27,28)
Países	Planta originaria de Colombia, Costa Rica, Perú, Ecuador, Venezuela, Panamá, Brasil, Nicaragua, Bolivia y Honduras.
Descripción botánica	• Arbusto mediano entrenudos teretes y glabros de 70 centímetro de longitud, de hojas simples opuestas y subopuestas ovadas, pecíolos cortos y gruesos hasta de 4 mm de largo, 1-2 mm de ancho aplanados. • Espigas de 1-4 cm de largo en pedúnculos de 3 mm de largo o a veces casi sésiles y engrosadas; yemas, flores y frutos fuertemente inclinados hacia adelante, frutos verdosos, a veces con la base amarilla. (27,28)
Requerimientos de crecimiento	Poco común, crece en bosques perennifolios y zona atlántica.
Uso en la medicina tradicional	Traumatismos (dislocaduras, golpes y luxaciones), paperas y antiséptico.

Fuente: Escobar E. Presentación de Yotoco "reserva Natural". Colombia 2001.
Vargas W. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales. Universidad de caldas 2002.

Autora: Daniela Córdova

Composición fitoquímica *de Oryctanthus alveolatus*

Los metabolitos secundarios presentes en *Oryctanthus alveolatus* son:

Metabolito Secundario	Concentración
Triterpenos	+
Quinonas	-
Flavonoides	-
Lactonas	-
Saponinas	+ (8mm)
Fenoles	+ (verde)
Aminoácidos	+

Leyenda: Negativo (-); Reacción débil (+);
Reacción media (++); Reacción intensa (+++)
Fuente: Laboratorio de Fitoquímica- ASH
Autora: Daniela Córdova

Costus comosus

Costus comosus	
Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y toxicas de la RSE: estudio fitoquímico y de bioactividad en Zamora Chinchipe	
Nombre común	Caña agria
Taxonomía	Reino: *Plantae* División:*Magnoliophyta* Clase: *Liliopsida* Orden:*Zingiberales* Familia: *Costaceae* Género*:* ***Costus*** Especie*:* ***comosus***(29)
Países	Planta rizomatosa nativa de México, El Salvador, Panamá, Colombia y Venezuela.
Descripción botánica	Planta herbácea perenne, rizomatosa, presenta tallos delgados, altos hasta 2 mts,

	similares a cañas. Hojas largas hasta 40 cm y anchas 10 cm, dispuestas en espiral sobre el tallo, de color verde intenso brillante en su parte superior y pubescente en el lado inferior. Las inflorescencias terminales, cónicas, de larga duración, espigas largas 20 – 30 cm con brácteas imbricadas de color rojo vivo, de aspecto ceroso, en cuyo interno nacen llamativas flores tubulares amarillas de 4 cm. de largo. Frutos globosos de 4 cm de largo y 2,5 cm de ancho, conteniendo semillas de color negro. (29)
Requerimientos de crecimiento	Necesita de un clima caluroso y húmedo, suelos ricos, drenantes, mantenidos húmedos durante el período vegetativo; fuera de estas zonas conviene cultivar en invernadero, aún resistiendo por breves períodos temperaturas próximas a cero grado, difícilmente florezca.(29)
Uso en la medicina tradicional	Se emplea los tallos para el tratamiento de cefalea, cólico hepático, diabetes, fiebre, afecciones renales y garganta. Hojas como antiabortivo.

Fuente: National Tropical Botanical Garden. Currently Viewing: *Costus comosus.* Disponible en: https://ntbg.org/plants/plant_details.
Autora: Daniela Córdova

Composición fitoquímica *de Costus comosus*

Costus comosus planta medicinal utilizada por los sanadores de las comunidades de la Provincia de Zamora Chinchipe posee los siguientes principios activos:

Metabolito Secundario	Concentración
Triterpenos	-
Quinonas	-
Flavonoides	-
Lactonas	-
Saponinas	+ (2mm)
Fenoles	-
Aminoácidos	+++

Leyenda: Negativo (-); Reacción débil (+);
Reacción media (++); Reacción intensa (+++)
Fuente: Laboratorio de Fitoquímica- ASH
Autora: Daniela Córdova

PRINCIPALES MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

La salud es el estado de bienestar físico y mental de una persona; pero por diferentes causas provoca enfermedades alterando el buen funcionamiento de los órganos y sistemas del organismo; siendo algunas enfermedades producidas por microorganismos que pueden ser inofensivas, que ni afectan ni benefician a la salud, beneficiosas o perjudiciales. Los microorganismos más comunes que afectan al ser humano son las bacterias, virus, hongos y parásitos, estos pueden ingresan en el cuerpo a través de la piel, vía respiratoria, ingesta de alimentos y bebidas. (30)

Bacterias

Son organismos unicelulares microscópicos, sin núcleo ni clorofila, que pueden presentarse desnudas o con una cápsula gelatinosa, aisladas o en grupos y que pueden tener cilios o flagelos. Se encuentran abundantes en el medio, pueden vivir en tierra, agua, materia orgánica, plantas y animales.

Son muy importantes en las fermentaciones aprovechadas por la industria, producción de antibióticos, destrucción de plantas y animales muertos.

Las bacterias son muy importantes para el ser humano, debido a sus efectos químicos y en la diseminación de enfermedades.

Morfología y estructura

Las bacterias son microorganismos procariontes (no poseen membrana nuclear por lo que su ADN está libre en la célula) de organización muy sencilla.

La célula bacteriana consta de:

- Citoplasma: Presenta un aspecto viscoso, y en su zona central aparece un nucleoide que contiene la mayor parte del ADN bacteriano, y en algunas bacterias aparecen fragmentos circulares de ADN con información genética, dispersos por el citoplasma: son los plasmidos.
- Membrana plasmática con invaginaciones que son los mesosomas, donde se encuentran enzimas que intervienen en la síntesis de ATP, y los pigmentos fotosintéticos en el caso de bacterias fotosintéticas.
- Flagelos generalmente rígidos, implantados en la membrana mediante un corpúsculo basal. Pueden poseer también fimbrias o pili muy

numerosos y cortos, que pueden servir como pelos sexuales para el paso de ADN de una célula a otra

- Poseen ARN y ribosomas característicos, para la síntesis de proteínas.
- Según la fuente de carbono que utilizan, los seres vivos se dividen en autótrofos, cuya principal fuente de carbono es el CO_2, y heterótrofos cuando su fuente de carbono es materia orgánica.
- Según la fuente de energía, los organismos o seres vivos pueden ser fotótrofos, cuya principal fuente de energía es la luz, y quimiótrofos, cuya fuente de energía es un compuesto químico que se oxida.

Crecimiento bacteriano

El crecimiento es el incremento ordenado de todos los componentes de un microorganismo. Por lo tanto, el aumento de tamaño que resulta cuando una célula capta agua o deposita lípidos o polisacáridos, no es un crecimiento verdadero. La multiplicación celular es una consecuencia del crecimiento; en microorganismos unicelulares, la multiplicación aumenta la cantidad de individuos y da lugar a una población o cultivo. (31)

Medición de las concentraciones microbianas

Las concentraciones microbianas pueden medirse en términos de concentración celular (numero de células viables por unidad de volumen de cultivo) o de concentración de la biomasa (peso seco de las células por unidad de volumen de cultivo). Estos dos parámetros no siempre son equivalentes, porque el promedio del peso seco de las células varía en las distintas etapas de la historia del cultivo.

Concentración celular

La cifra de células viables se considera la medida de la concentración celular. Sin embargo, para muchos propósitos, la turbiedad del cultivo, medida por medios fotoeléctricos, puede vincularse con la cifra viable en forma de *curva estándar*. Cuando se utilizan mediciones turbimetricas debe recordarse que pueden variar la correlación entre la turbiedad y la cifra durante el crecimiento y

la muerte de un cultivo; las células pueden perder viabilidad sin que exista perdida de la turbiedad del cultivo.

Densidad de la biomasa

Se puede medir directamente determinando el peso seco de un cultivo microbiano después de lavarlo con agua destilada. En la práctica, este procedimiento es muy laborioso y el investigador suele preparar una curva estándar que establece una correlación entre el peso seco y la turbiedad. De otra manera, se puede estimar indirecta la concentración de la biomasa a través de la medición de un componente celular como proteínas o del volumen ocupado por las células que han sedimentado de la suspensión. (33)

Crecimiento exponencial

La constante de la tasa de crecimiento de las células, no limitado por los nutrimentos, es el primer orden: la tasa de crecimiento es el producto de la constante de la tasa de crecimiento (medida en gramos de biomasa producida por hora) y la concentración de la biomasa.

Curva de crecimiento bacteriano

Cuando se ha satisfecho los requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales cubren los requerimientos físicos, podemos medir la velocidad de multiplicación de las células bacterianas.

Etapas

- **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. Por esto se le ha llamado de crecimiento lento, sin embargo, 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.

- **Fase logarítmica:** en esta fase se observa un trazo recto en la grafica de forma ascendente; significa un fenómeno logarítmico en la

multiplicación bacteriana, y es la máxima velocidad de multiplicación de esa especie.

- **Fase estacionaria máxima:** etapa del trazo en la grafica 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 inactivadas 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, todo lo cual genera un ambiente nocivo para la vida bacteriana y solo las bacterias mas resistentes a estos factores logran sobrevivir y multiplicarse.

- **Fase de declinación:** fase de muerte logarítmica, observamos un trazo recto descendente en la grafica de la curva, debido a que un numero mucho mayor de bacterias muere en relación con las que sobreviven, es decir, que solamente las mas resistentes pueden multiplicarse en las condiciones que se han generado en esta etapa, como son: falta de nutrientes, la concentración critica de productos tóxicos del metabolismo y el viraje del ph. (11)

Requerimientos básicos para cultivos de bacterias

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

El desarrollo de una bacteria en un medio de cultivo, depende de una serie de factores, los más destacables de los cuales son:

a) La composición.- los medios de cultivo deben incluir los elementos indispensables para la vida bacteriana, es decir:

- Fuentes de nitrógeno y carbono.
- Elementos minerales como fosforo, azufre, calcio, magnesio y hierro.
- Factores de crecimiento que por sí solas son incapaces de sintetizar, como aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidinicas.

- Factores estimulantes. O de arranque, como los hidratos de carbono o la sangre.

b) El pH.- las bacterias se desarrollan habitualmente a pH próximo a la neutralidad (6,8-7,6), aunque algunas exigen un pH específico distinto.

c) 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.

d) El potencial redox.- esta en relación con el tipo respiratorio de cada bacteria, que puede ser anaerobia estricta, aerobia y anaerobia facultativa, aerobia estricta y microaerófila.

e) 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.

f) 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.

g) 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 por 100.

Como no existe un medio de cultivo universal que cubra las necesidades de todas las bacterias, la elección del medio de cultivo a utilizar para determinadas bacterias se hace a partir de las necesidades nutritivas de éstas, y del hábitat natural del cual se recuperan. (32)

Cepas patrón ATCC utilizadasel estudio de actividad antimicrobiana

Las cepas certificadas ATCCson microorganismos reconocidos para demostrar que los medios de cultivo poseen características aceptables, validar métodos y controlar los reactivos. (33, 34, 35)

Staphylococcus aureus

Bacteria anaerobia facultativa grampositiva, células esféricas inmóviles de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, caracterizados por agruparse en forma irregular en racimos. Habitualmente se encuentra en la flora normal de las narinas anteriores humanas, nasofaringe, región perineal, y piel; pueden colonizar diversas superficies epiteliales o mucosas.

Metabolismo de tipo fermentativo, coagulasa positiva, son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gases y producen acetil metil carbinol. Fermentan el manitol con formación de ácidos, causan hemolisis, coagulación de plasma y producen enzimas y toxinas extracelulares.

Características del medio de cultivo y colonias

Crece bien en Agar Chapman Manitol medio con elevado contenido en cloruro sódico; la presencia de manitol y rojo fenol convierten a este medio en diferencial: así se puede identificar presuntivamente el Staphylococcus aureus, ya que este germen crece bien en medios salados y fermenta el manitol.

Crecen con facilidad en condiciones aerobias o microaerofílicas. Crecen a 37ºC sobre medios sólidos, las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes de color gris o amarillo dorado.

Espectro de enfermedades e infecciones

Las infecciones por lo general involucran una intensa supuración y destrucción de tejido. En general pueden agruparse en infecciones cutáneas localizadas en infecciones cutáneas localizadas como la foliculitis, forúnculo, antraces e impétigo; infecciones de diversas heridas; infecciones profundas que se diseminan a partir de la piel para causar bacteriemia y para prometer huesos, articulación, órganos y tejidos profundos.

Escherichia coli

Bacilo gramnegativo, aerobio o anaerobio facultativo, de 2-4um de longitud por 0.4-0.6 um de anchura, con extremidades redondeadas, que pueden ser móviles con flagelación perítrica o inmóviles. Se localiza en la flora normal del intestino de seres humanos y otros animales; también puede habitar el aparato genital femenino.

No producen oxidasas, pero reducen los nitratos, descomponen la glucosa, fermentan a los carbohidratos, tienen reacciones positivas para el Indol, lisina descarboxilasa y producción de gas a partir de glucosa.

Características del medio de cultivo y colonias

Para aislamiento de la mayoría de enterobacterias, utilizan el Agar EMB (Eosina azul de metileno) contiene azul de metileno actúa como indicador e inhibidor, las colonias fermentadoras de la lactosa presentan un tono violeta más o menos intenso.

Las colonias de *E. coli* son brillantes, lisas, circulares, convexas con bordes bien definidos de color negruzco con un brillo metálico característico.

Espectro de enfermedades e infecciones

Infecciones urinarias, bacteriemia, infecciones nosocomiales en varios sitios del cuerpo. Es la causa más frecuente de infecciones nosocomiales por gramnegativos.

Klebsiella pneumoniae

Bacilos gramnegativos cortos; crecen sobre peptona o medios con extracto de carne, asimilan y fermentan la lactosa, produce gas, dan pruebas positivas para la lisina descarboxilasa y citrato.

Características del medio de cultivo y colonias

El agar MacConkey es apropiado para el aislamiento de K. pneumoniae se caracterizan por contener lactosa y un indicador de cambio de pH que detecta la actividad fermentadora sobre este azúcar. El medio de Mac Conkey se considera selectivo de bajo nivel, las sales biliares el cristal violeta actúan como inhibidores. El indicador vira a rojo ladrillo en medio acido. Las bacterias fermentan la lactosa producen colonias de color rojo que pueden estar rodeadas de una zona opaca debida a la precipitación de las sales biliares; las no fermentadoras dan colonias incoloras mas o menos transparentes.

Espectro de enfermedades e infecciones

Klebsiella pneumoniae, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales, tracto urinario, neumonías, sepsis y contaminaciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, con diabetes mellitus o alcohólicos.

Pseudomona aeruginosa

Bacilos gramnegativos, móviles, aerobio mide 0.6x 2um. Se encuentra en el medio ambiente (suelos, agua, plantas); sobrevive bien en los ambientes domésticos (bañeras, hidromasajes, soluciones para lentes de contacto) y rara vez forma parte de la flora normal de los seres humanos sanos.

Bacteria oxidasa positiva, no fermenta los carbohidratos, presenta pigmentos característicos.

Características del medio de cultivo y colonias

Bacilo gramnegativo que crece bien en agar Cetrimidecontiene peptona que sirve como fuente de nitrógeno, y el glicerol se utiliza como fuente de carbono y energía. La producción de piocianina se estimula mediante el cloruro de magnesio y el sulfato potásico en el medio. La cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) es un compuesto de amonio cuaternario que inhibe una amplia variedad de otros organismos.

Produce olor dulzón, forma colonias redondas, mucoides y lisas de color verde fluorescente pioverdina.

Espectro de enfermedades e infecciones

Patógeno oportunista que puede causar infecciones adquiridas en la comunidad o en el hospital.

Las infecciones extrahospitalarias: cutáneas, del conducto auditivo externo, oculares, óseas, postraumáticas, cardiacas.

Infecciones adquiridas en el hospital: del aparto respiratorio, urinarias, de heridas del torrente sanguíneo y del sistema nervioso central. (33)

Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias

Prueba de la coagulasa

Diferencia *Staphylococcus aureus* de los estafilococos coagulasa negativos.

S. aureus produce dos formas de coagulasa: ligada y libre. La coagulasa ligada o factor de aglutinación se encuentra unida a la pared celular bacteriana y reacciona en forma directa con el fibrinógeno. Esto produce una alteración del fibrinógeno, de forma que este se precipita sobre la célula estafilocócica y genera la agrupación de las bacterias con el plasma.
La presencia de la coagulasa ligada se correlaciona bien con la coagulasa libre, una proteína enzimática extracelular que produce la formación de un coagulo cuando se incuban colonias de *S aureus* en plasma. Positivo: *Staphylococcus aureus*

Hidrólisis del DNA

Capacidad de un microorganismo para hidrolizar el DNA, el medio es de color verde pálido debido al complejo DNA-verde de metilo. Si el microorganismo que crece en el medio hidroliza el DNA, el color verde desaparece y la colonia esta rodeada por un halo incoloro.
Positivo: *Staphylococcus aureus*

Utilización de citrato

Determina la capacidad de un microorganismo para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono y las sales inorgánicas de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden crecer en este medio viran el indicador azul de bromotimol del verde al azul.
Positivo: *Klebsiella pneumoniae*

Prueba de descarboxilasa

Capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina. La descarboxilación o la hidrólisis del aminoácido producen un cambio en la alcalinidad del pH.
Positivo de lisina: *Klebsiella pneumoniae*

Hidrólisis de la esculina

Determina si un microorganismo es capaz de hidrolizar el glucósido esculina, el medio se tiñe de color negro, que también mostrara una perdida de fluorescencia bajo la lámpara de Wood.
Positivo: *Klebsiella pneumoniae*

Producción de Indol

Determina la capacidad de un microorganismo para degradar el triptófano para formar el compuesto Indol. Se produce un anillo rosa a vino tinto después del agregado del reactivo apropiado.
Positivo: *Escherichia coli*

Prueba de la movilidad

Determina el microorganismo que es móvil. Formación de rompimiento del medio.
Positivo: *Escherichia coli*

Reducción del nitrato

La reducción de nitratos a nitritos se determina al agregar acido sulfanilico y α-naftilamina. El acido sulfanilico y los nitritos reaccionan para formar una sal de diazonio. La sal de diazonio se une a continuación con la α-naftilamina para producir colorante rojo hidrosoluble.
Positivo NO_3^+ sin producción de gas: *Escherichia coli*
Positivo NO_3^+ gas: *Pseudomona aeruginosa*

Prueba de cetrimida

Se usa para determinar la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de cetrimida, una sustancia toxica que inhibe el desarrollo de muchas bacterias.
Positivo: *Pseudomona aeruginosa*(36)

Hongos

Los hongos constituyen un complejo grupo de organismos, son heterótrofos deben nutrirse a partir de materias orgánicas ya elaboradas, tienen la habilidad

de descomponer organismos muertos. Son seres eucariotas, poseen núcleo, mitocondrias, sistema de endomembranas, carecen de plastidios, su pared celular contiene quitina y almacenan glucógeno en sus células como compuesto de reserva.

Los hongos tienen gran importancia para conservar el equilibrio de la naturaleza, ya que desintegran o reciclan casi todos los restos orgánicos; intervienen en la producción del humus del suelo, indispensable en la biosfera y en programas de control biológico. (37)

Cándida albicans

Célula oval con un tamaño medio de 2 a 4 micras; con paredes finas; en tejidos infectados se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y seudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí.

El metabolismo de C. albicans se ha relacionado de una forma directa o indirecta con la patogenicidad, la morfología o con los efectos de los antibióticos antimicóticos. El metabolismo de los carbohidratos juega un papel importante en la morfogénesis, en tanto que el metabolismo de aminoácidos y lípidos tiene poca importancia para el crecimiento de este microorganismo.

Características del medio de cultivo y colonias

La levadura C. albicans crece en agar Sabouraud medio adaptado al cultivo de la mayoría de levaduras u hongos patógenos, tanto en forma solida como liquida. El medio contiene nutrientes en cantidad mínima y lleva un pH acido 5.6, que lo hace selectivo. Suelen adicionarse antibióticos para potenciar su selectividad. (38)

Hongo de temperatura óptima de crecimiento es 37º C. Además, para su supervivencia necesita humedad, las colonias son blandas de color cremoso con olor a levadura. (39)

Pruebas fisiológicas de identificación de levaduras

Los hongos contienen sistemas enzimáticos específicos que determinan su capacidad patogénica para ello se realizan las siguientes pruebas de identificación.

Auxanograma: Prueba que determina la capacidad de las levaduras para utilizar los hidratos de carbono como única fuente de carbono. Los compuestos de carbono empleados son azucares, ácidos orgánicos y algunos azucares-alcoholes. Son pruebas de asimilación y se utilizan para valorar la capacidad de cada levadura para usar estos compuestos en crecimiento aerobio.

Fermentación de azucares: algunas levaduras tienen sistemas enzimáticos específicos que permiten la degradación anaerobia de los hidratos de carbono específicos con producción de CO_2. (40)

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana in vitro son útiles para elegir los quimioterápicos activos frente al microorganismo responsable de la infección. Las pruebas in vitro son sencillamente una medida del efecto del antibiótico frente al microorganismo en condiciones especificas. La selección del antibiótico y la respuesta del paciente vienen determinadas por una serie de factores interrelacionados, que incluyen las propiedades farmacocinéticas del antibiótico, la toxicidad del fármaco, la enfermedad clínica y el estado medico general del enfermo. Por tanto, algunos gérmenes que son susceptibles a un antibiótico persistirán en la infección, mientras que otros resistentes serán eliminados por este antibiótico. (41)

Esta técnica de laboratorio clínico en la actualidad se la esta empleando para el estudio de plantas medicinales, utilizando el método de Kirby-Bauer modificado, determinando la actividad antimicrobiana del extracto vegetal contra ciertas bacterias que invaden principalmente el sistema respiratorio y gastrointestinal. (2)

Actividad antibacteriana

Antibióticos

Un antibiótico es una sustancia química producida por un microorganismo capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Un agente antimicrobiano es activo contra los microorganismos y puede ser producido en forma natural por microorganismos o sintéticamente en el laboratorio. El término agente quimioterápico ha sido empleado para referirse a agentes antimicrobianos sintéticos o no y también se refiere a agentes que actúan contra células humanas como inmunomoduladores y drogas antitumorales.

Cinética de los antibióticos

Para potenciar las defensas naturales del organismo y eliminar una infección bacteriana, el antibiótico debe estar presente a una concentración eficaz y durante el tiempo suficiente. La concentración debe ser una o varias veces superior a la CMI. Sin embargo, la concentración del antibiótico no tiene que ser tan elevada como para causar toxicidad en el paciente.

La mayor parte de los antibióticos presentan una semivida de 12 horas y tras su distribución en los diferentes comportamientos corporales, son eliminados del organismo generalmente a través de los riñones o el hígado.

En líneas generales y en función sobre su forma de actuar sobre los microorganismos, hablamos de dos grandes grupos de antibióticos

- Antibióticos primariamente **bactericidas**: Ejercen una acción letal e irreversible sobre el microbio (Fosfomicina Vancomicina. B-Lactámicos Polimixina. Aminoglucósidos Rifampicina. Acido Nalidíxico Quinoleinas. Nitrofurantoinas)

- Antibióticos primariamente **bacteriostáticos**: Inhiben el crecimiento pero no matan al microorganismo, permitiendo que las propias defensas del huésped pueden eliminar a las bacterias (Tetraciclina Cloranfenicol. Sulfonamidas Trimetroprim. Lincomicina Clindamicina. Macrólidos). (42, 43)

Antibiograma

Un antibiótico es una sustancia de origen biológico que inhibe el crecimiento de los microorganismos a concentraciones muy bajas.

Un antibiograma es un estudio de la sensibilidad "in vitro" de un microorganismo patógeno frente a las sustancias antimicrobianas.
Existen distintos métodos siendo los más importantes:

Método de difusión en placa

El antibiograma por el método de difusión en agar es una de las pruebas utilizadas para determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico.
Se basa en la difusión radial de una solución de extracto o de antibiótico desde un reservorio a través de una capa de agar que ha sido inoculada con un microorganismo sensible al antibiótico. Se confrontan diferentes medidas de la sustancia a ensayar en placas con medios de cultivo sólido inoculado con microorganismos adecuados. Las placas se incuban para permitir el desarrollo del microorganismo. Durante la incubación, el antibiótico difunde desde su reservorio (que puede ser un disco de papel filtro, un pozo excavado en el mismo medio de cultivo con inóculo bacteriano, o pequeños cilindros colocados en la superficie del medio) mientras la población microbiana aumenta por división celular. La respuesta obtenida es una zona clara o halo de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a los reservorios. El límite de la zona de inhibición se forma cuando se alcanza la concentración crítica del antibiótico, es decir, la mínima concentración que inhibe el crecimiento de la población microbiana presente.
Los halos de inhibición se miden con la mayor precisión posible: se utiliza regla.
La base cuantitativa del ensayo es la relación entre el diámetro de la zona de inhibición y la concentración del antibiótico. (44)

Método de dilución

La sensibilidad de una bacteria a un antibiótico viene dada:
C.M.I:es la concentración mínima inhibitoria, representa la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo, se realiza diluciones dobles seriadas de un antibiótico determinado, enfrentándose con

una suspensión bacteriana y determinando la mínima cantidad de antibiótico que combate una determinada infección ya que los mecanismos inmunitarios se encargan de eliminar al microorganismo. (44)

C.M.B. es laconcentración mínima bactericida, donde la concentración mínima que mata el microorganismo.

Actividad antifúngica

Antifúngicos

Son sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

Mecanismo de acción de los antifúngicos

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana.

Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro están relacionadas con hongos patógenos.

El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico. (45)

Definición clínica de las pruebas de sensibilidad

En las pruebas de sensibilidad, lo que se notifica al clínico a modo de resultado es la clasificación del microorganismo en un sistema de dos o mas categorías de sensibilidad. El sistema más sencillo comprende de tres categorías:

Sensible: un microorganismo se considera sensible a un medicamento cuando lo probables es que la infección que causa responda al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada.

Sensibilidad intermedia: corresponde a dos situaciones. Por un lado se incluyen en ellas las cepas moderadamente sensibles aun antibiótico que puede aplicarse en el tratamiento en dosis mas altas por ser poco toxico.

Resistente: significa que no es probable que el microorganismo responda a un medicamento determinado, cualesquiera que sean la dosis y la localización de la infección. (46)

CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Control de calidad de los materiales y equipos

Temperatura de estufas, refrigeradoras y congeladores

Se realiza mediante termometría de los mismos, colocando en la parte mas uniforme un termómetro de máximas y mínimas introducido en un baño de glicerina. Las temperaturas se registran en una grafica diariamente para controlar su homogeneidad. Las aconsejadas son:

Estufas: 35 a 37ºC
Frigoríficos: 4 a 8ºC
Congeladores: -20 a -14ºC
En los baños maría se coloca un termómetro, introducido permanentemente en la cubeta, que nos permite comprobar si la temperatura del agua es la marcada en el termostato regulable que posee, graduable de 30 a 60ºC.

Campanas de incubación para CO2 y anaerobiosis

Las campanas de incubación para anaerobiosis se controlan mediante un cultivo en agar chocolate de un microorganismo CO2 dependiente. Otra placa se incuba paralelamente sin CO2 como control negativo.
Las campanas de incubación para anaerobiosis se controlan mediante tiras de papel con azul de metileno decolorado con sulfito, las cuales en su estado reducido, adquieren color blanco; mientras que en presencia de oxigeno se tornan de color azul.

Autoclave y estufa de esterilización

Tanto las autoclaves como las estufas llevan en su exterior un registrador de la temperatura que se alcanza en el interior.
Para el control de la esterilización en autoclave existen unas ampollas coloreadas que modifican su color cuando se llega a la temperatura deseada.
La esterilización en horno se controla con el llamado papel de confitero que adquiere un color tostado a temperatura de 160-180ºC.

Pipetas automáticas y dispensadores

La capacidad de toma y expulsión se comprueba como control de su bien funcionamiento, los microdispensadores pueden ser calibrados a distintos volúmenes para comprobar su exactitud.

Control de calidad de los Medios de cultivo

Los medios de cultivo se deben establecer controles antes de considerarlos aptos para utilizar, entre los cuales tenemos:

- Apariencia de los medios: Observar cualquier signo de deterioro, como: evidencias de deshidratación, cambio de color, escasovolumen, etc.
- Control de calidad de desarrollo bacteriano: Controlar el crecimiento de las bacterias a evaluar y que muestre resultados aceptables en pruebasde sensibilidad. Utilizar cepas referenciales.
- Control de esterilidad: Tomar el 5-10% del total del lote producido, e incubar en estufa de 35℃ durante 48 h. Luego, obse rvarcualquier presencia de contaminación, si éste fuera significativo (>10% del medio controlado)descartar el lote completo. Además se debe descartar todo medio utilizado.
- Control de pH: Controlar todo lote preparado (autoclavado) ya frío y a temperatura ambiente. (47,48,49)

Control de calidad de los Medios de cultivo preparados

1. 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.

2. Comprobación de la esterilidad. Compruébese sistemáticamente la esterilidad de los medios a los que, después de pasar por el autoclave, se les agrega sangre u otros componentes. Tómese un 3-5% de cada lote e incúbese a 35° C durante dos días. Refrigérese el resto. Si se observan más de dos colonias por placa, deséchese todo el lote.
3. 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. (52)

Control de calidad de los Antibiogramas

Incluye la descripción de las especificaciones que se deben aplicar para verificar la validez y confiabilidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad, incluyen:

Medio Mueller Hinton

- π pH: Se debe controlar el pH del medio de cada lote de preparación. Un pH fuera del rango de 7.2 a 7.4 a temperaturaambiente puede afectar la sensibilidad de la prueba. Algunos antibióticos parecen perder potencia mientrasque en otros los efectos opuestos son posibles si el pH es demasiado alto.
- π Espesor del medio: Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino dará una falsansensibilidad y si es más grueso, dará una falsa resistencia.
- π Humedad: Las placas deben mantenerse húmedas pero sin mostrar gotas sobre su superficie. El exceso de humedaddebe ser eliminado incubándolas a 35℃ durante 10-30 min.
- π Almacenamiento: Las placas de Mueller Hinton pueden conservarse en el refrigerador (2℃ – 8℃) hasta 1 semana sin prec aucionesparticulares. Si el tiempo de conservación debe superar los 7 días se recomienda sellarlas con parafilmy guardarlas en bolsas de plástico para evitar la

desecación del agar (2℃ – 8℃).

- π Efecto de la timina o timidina: La excesiva cantidad de timina o timidina en los medios pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidasy trimetoprim, produciendo así zonas más pequeñas, no tan nítidas o sin halo dando una falsa resistencia en lalectura.
- π Se debe evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de timidina utilizando la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186 y probándola con discos de cotrimoxazol. Se debe obtener un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más.
- π Efectos por variación en la composición de cationes divalentes: La variación en cationes divalentes principalmente Ca++ y Mg++ afectarán los resultados con tetraciclina yaminoglucósidos frente a *P. aeruginosa.* Un exceso de dichos cationes reducirán las zonas de inhibición, ybajas concentraciones aumentarán las zonas de inhibición.El exceso de zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenems.

Control de calidad de Discos de sensibilidad

· Los discos para antibiograma individuales o en multidiscos deben conservarse en refrigeración a 8℃ o ser congelados a –14℃ (o a temperaturas aún menores).

· Los discos para antibiograma nunca deben ser utilizados más allá de su fecha de expiración.

· Los discos que contienen un antibiótico betalactámico deben ser almacenados en el congelador para mantener su potencia. Una pequeña cantidad de discos y/o multidiscos que serán usados en el trabajo diario pueden ser solo refrigerados.

· Retirar los envases del refrigerador o del congelador una o dos horas antes de usarlos y dejarlos atemperar antes de abrirlos.

· Reemplazar los cartuchos cuando el indicador del desecador usado cambia de color, el cual se interpreta como un exceso de humedad.

· Una vez colocados los discos y multidiscos en el agar éstos no deben retirarse, debido a que algunos antibióticos difunden casi instantáneamente. (50)

Control de calidad de las Cepas de referencia

- Trabajar según el procedimiento previamente descrito y usando los materiales y métodos empleados para evaluar las cepas clínicas.
- Conservar las cepas de referencia de trabajo diario en agar tripticasa soja, agar nutritivo (bacterias no exigentes) o en agar chocolate enriquecido (bacterias exigentes) a 4℃ y 8℃, real izar subcultivos semanales, y reemplazar los cultivos de trabajo al menos mensualmente, a partir de los cultivos congelados, liofilizados o comerciales.
- Los cultivos stock pueden ser almacenados a una temperatura £ –20℃ (de preferencia a –60℃ o en nitrógeno líquido) en caldo 50% de suero fetal bovino o TSB con 10-15% glicerol, sangre desfibrinada de carnero o leche descremada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

La presente investigación de tipo Experimental.

Área de estudio

Provincia de Zamora Chinchipe, perteneciente a la Amazonia Ecuatoriana.

Universo

Diez extractos liofilizados de plantas medicinales utilizadas por los sanadores de las comunidades de la provincia de Zamora Chinchipe.

Muestra

- Extracto liofilizado de *Oryctanthus alveolatus*
- Extracto liofilizado de *Costus comosus*

Criterios de inclusión

- Extractos liofilizados de plantas naturales procedentes de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Extractos liofilizados de plantas con uso medicinal usadas para tratar enfermedades o procesos infecciosos causados por diversos microorganismos.
- Extractos liofilizados de plantas medicinales que no hayan sido objeto de estudios similares.

Criterios de exclusión

- Extractos de plantas que no sean de uso medicinal.
- Extractos de plantas medicinales que hayan tenido estudios preliminares de actividad antimicrobiana.

Procedimiento

Estandarización de procedimiento: Prueba piloto

La prueba piloto, es la demostración que indica que el método aplicar en este estudio tiene validez y fiabilidad, por lo que en este ensayo se validó cada

procedimiento empleado en las fases de la metodología; dentro de las cuales se consideraron:

ξ**Elaboración y validación de los discos de sensibilidad:** En la elaboración de los discos de sensibilidad se utilizó un sacabocados para realizar perforaciones en papel Whatman Nº1, los mismos que tienen 6mm de diámetro y 0.6mm de espesor.

En la validación de los discos de sensibilidad se realizó con Amikacina (ampolla 100mg/2ml), preparando diluciones hasta llegar a la concentración de 30ug/L, comparado con un disco de sensibilidad comercial con la misma concentración, tras este ensayo se comprobó la difusión de los discos sobre el medio previamente inoculado con un microorganismo; evidenciando que el halo de inhibición formado tras incubación, tanto en el disco preparado como el comercial es del mismo diámetro.

ξ**Medios de cultivo y pruebas bioquímicas:** Los medios de cultivo y pruebas bioquímicas se realizaron de acuerdo a los requerimientos exigidos por el fabricante, en el ejercicio de este procedimiento se comprobó:

* pH del medio Mueller Hinton, su medición se realizó en un potenciómetro, obteniendo el pH de 7.3, medición que está dentro de los parámetros establecidos para este medio de 7.2 a 7.4.
* El control de calidad de los medios de cultivo y pruebas bioquímicas de identificación bacteriana, se realizó tomando el 5% del lote preparado e incubando a 37ºC por 24 horas, evidenciando ausencia de crecimiento bacteriano o contaminación alguna.

ξ**Actividad antimicrobiana del extracto de aceite esencial de Clavo de olor:** Después de la actividad antimicrobiana, se comprobó que el aceite esencial de Clavo de Olor presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*. Además de validar la técnica a emplear en la actividad antibacteriana y antifúngica de las plantas medicinales en estudio.

ξ**Ensayos de Concentración mínima inhibitoria (CMI)y Concentración**

mínima bactericida (CMB): Para estos ensayos se utilizó el aceite esencial de clavo de olor, la cepa bacteriana *E. coli* y el agente antimicrobiano Ciprofloxacina.

La **concentración mínima inhibitoria** del aceite esencial de clavo de olorse evidenció en el tubo Nº5ya que presentó mayor dilución y ausencia de crecimiento bacteriano, con respecto al tubo testigo utilizado como blanco.

Posteriormente se realizó la **concentración mínima bactericida** a partir de los resultados del CMI, de los tubos con menor concentración inhibitoria y tubos con mayor y menor dilución. Tras la realización del CMB se determinó que la CMB del aceite esencial del clavo de olor es aproximadamente de 30 UFC/ml.

El presente trabajo investigativo: Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* se realizó en tres fases:

Antecedente

- Las especies de uso medicinal *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus*, previamente identificadas por el botánico del Herbario Reinaldo Espinoza de la UNL, recolectadas el 02 de agosto del 2011 en la Provincia de Zamora Chinchipe, cantones El Pangui y Yacuambi respectivamente.
- Una vez recolectadas, fueron lavadas, separadas las partes a utilizar en el estudio y seleccionar las hojas de ambas plantas, para posterior secado a temperatura ambiente, protegido de la luz, en el Laboratorio de Fitoquímica del Área de la Salud Humana.**(Ver anexo Nº4)**
- Luego de que se hayan secado las partes de las plantas seleccionadas, se obtuvieron los extractos de las plantas por maceración, el cual consistió en pesar una cantidad preestablecida de droga seca previamente molida en molino de cuchillos (Wiley Mini Mill) con tamaño del tamiz de 2 mm.
- Agregar el solvente elegido (Etanol 70%) en pequeñas cantidades hasta unos 2 cm por sobre la superficie de la droga, dejar reposar por 48 horas, 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 anexo Nº 2,3)**
- La concentración en rotavapor de las drogas se efectuó en el Rotavapor Yamato Re200 (tipo A), luego se procedió al secado final o liofilización. **(Ver anexo Nº 2,3)**

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

Para aprovechar las substancias activas de una planta, se recurre frecuentemente a los extractos que consiste en incorporar las substancias activas de una planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol; con la concentración necesaria.

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por trituración en contacto con etanol al 70% en agua ($^{V}/_{V}$),

seguida de la desecación del extracto de la planta con alcohol, eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico, filtración y posterior concentración del mismo en forma sólida (polvo).

- ♣ Con el concentrado del extracto liofilizado de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* se prepara las diluciones 1/100; 1/1000; 1/10.000. Las diluciones de los extractos se realizó pesando 0,1gr o 100mg del extracto liofilizado de cada planta, luego agregar 10 ml de etanol al 70%, obteniendo la solución madre; seguidamente se realizan las prediluciones de cada extracto; colocando 100 ul de la solución madre y agregar 900 ul de etanol 70%, consiguiendo la dilución 1/100, para la dilución 1/1.000 colocar 100 ul de la dilución 1/100 y agregar 900 ul de etanol al 70% y para la dilución 1/10.000 colocar 100 ul de la dilución 1/1000 y añadir 900ul de etanol 70%.

- ♣ Para preparar los discos se utilizó papel Whatman Nro. 1 y un sacabocados; los mismos que deben tener 6mm de diámetro y 0.6mm de espesor.**(Ver anexo Nº31)**

FASE B: Preparación de los cultivos bacterianos

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos; es por ello que hemos empleado cuatro diferentes medios de cultivo para las 5 cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), considerando una bacteria mínima para cada ensayo de susceptibilidad.

Los medios de cultivo y cepas microbiológicas utilizadas fueron:

- ♣ Agar Chapman Manitol: *Staphylococcus areus* ATCC 25923
- ♣ Agar EMB o Agar Mac-Conkey: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883*; Escherichia coli* ATCC 25922
- ♣ Agar Cetrimide: *Pseudomona aeruginosa ATCC 27853*
- ♣ Agar Sabouraud dextrosa: *Cándida albicans* (levadura) ATCC 26790

Las cepas microbiológicas conservadas en congelación, para su empleo se realizaron siembras por estría en la superficie del medio de cultivo adecuado para cada tipo de microorganismo. Posteriormente incubar por 24 horas a 37ºC

en aerobiosis; se realizan una resiembra de la cepa para asegurar que se encuentre en fase de crecimiento exponencial, donde se diferencie las características morfológicas propias de cada cepa.

Además de diferenciar las propiedades de cada cepa ATCC se complementó su identificación con pruebas bioquímicas y gram.**(Ver anexo Nº 6-23; 26-30)**

FASE C: Evaluación de la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica)

Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar con discos impregnados basados en el método de Kirby-Bauer modificado:

Pasos:

- Preparación del inóculo: Se realiza por suspensiones de las cepas microbiológicas en solución salina estéril y comparada con el tubo 5 de la escala de McFarlan de quivalente a 10^8 UFC/ml.
- Plateado en la superficie del agar Mueller-Hinton en el caso de las bacterias o Agar Sabouraud dextrosa para la levadura.
- Impregnación de los discos con 20 ul de las diferentes concentraciones de los extractos, las concentraciones de las diluciones fueron: Dilución 1/100: concentración 200 ug/20ul; 1/1000: 20 ug/20ul y 1/10.000: 2 ug/20ul además de los controles negativos (etanol-agua destilada).
- Colocación de los discos en la superficie del agar previamente inoculado, poner los discos de las diluciones, los controles negativos y el controles positivos que son antibióticos estándares de referencia para cada microorganismo.
- Incubar a 37ºC durante 24 horas en las bacterias y 48 horas en el hongo.
- Realizar la lectura de los halos de inhibición en el tiempo indicado, con una regla milimetrada. **(Ver anexo Nº 24, 32, 33)**
- Los ensayos se realizaron por duplicado de cada dilución de los extractos de las plantas en estudio.

FASE D: Difusión de resultados

Los resultados de la actividad antimicrobiana de las plantas *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus*, se difundieron a los estudiantes y docentes de la

Carrera de Laboratorio Clínico con una presentación visual, además de la entrega de un tríptico con información sobre el proyecto de Fitoterapia y los resultados obtenidos.

IV. RESULTADOS

Tabla Nº1

Resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de *Oryctanthus alveolatus.*

Microorganismos ATCC	Diluciones	Resultados	Controles		
			Positivo	Diámetro	Negativo
Escherichia coli	1/100	Negativo	Ciprofloxacina	29mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		30mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		29mm (S)	Negativo
Staphylococcus aureus	1/100	Negativo	Ampicilina + Sulbactan	26mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		27mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		26mm (S)	Negativo
Klebsiella pneumoniae	1/100	Negativo	Amoxicilina + Ácido clavulánico	15mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		15mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		16mm (S)	Negativo
Pseudomona aeruginosa	1/100	Negativo	Gentamicina	24mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		24mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		24mm (S)	Negativo
Cándida albicans	1/100	Negativo	Fluconazol	24mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		23mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		24mm (S)	Negativo

Leyenda: (s) sensible; (mm) milímetros
Fuente: Registro de resultados de actividad antimicrobiana.
Autor: Córdova Riofrío Daniela Tatiana

Interpretación de resultados

En las distintas diluciones empleadas 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 del extracto etanólico de la planta medicinal *Oryctanthus alveolatus* se evidenció la presencia de crecimiento bacteriano alrededor del disco de dichas diluciones; en el control positivo se observó halo de inhibición alrededor del disco de sensibilidad sintético utilizado para cada microorganismo y el control negativo no formó halo de inhibición, por lo que se validó la técnica empleada. No se realizaron los ensayos de CMI y CMB porque los resultados de la actividad antimicrobiana de la planta en estudio son negativos.

Tabla Nº2

Resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de *Costus comosus.*

Microorganismos ATCC	Diluciones	Resultados	Controles		
			Positivo	Diámetro	Negativo
Escherichia coli	1/100	Negativo	Ciprofloxacina	30mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		30mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		30mm (S)	Negativo
Staphylococcus aureus	1/100	Negativo	Ampicilina + Sulbactan	27mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		26mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		26mm (S)	Negativo
Klebsiella pneumoniae	1/100	Negativo	Amoxicilina + Ácido clavulánico	15mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		15mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		14mm (S)	Negativo
Pseudomona aeruginosa	1/100	Negativo	Gentamicina	24mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		25mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		24mm (S)	Negativo
Cándida albicans	1/100	Negativo	Fluconazol	24mm (S)	Negativo
	1/1.000	Negativo		24mm (S)	Negativo
	1/10.000	Negativo		24mm (S)	Negativo

Leyenda: (s) sensible; (mm) milímetros
Fuente: Registro de resultados de actividad antimicrobiana.
Autor: Córdova Riofrío Daniela Tatiana

Interpretación de resultados

El extracto etanólico de *Costus comosus* en las diluciones 1/100; 1/1.000 y 1/10.000 no presentaron halo de inhibición frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans,* ya que los microorganismos mencionados poseen resistencia frente a la actividad de esta planta.

El control positivo y negativo tuvieron la reacción esperada propia de la metodología empleada. Los ensayos de CMI y CMB no se realizaron ya que los resultados de la actividad antimicrobiana de la planta fueron negativos.

V. DISCUSIÓN

La presente tesis titulada: Evaluación antimicrobiana del extracto etanólico de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* por el método de difusión en agar, estudio de tipo experimental realizado en el Área de la Salud Humana- UNL, cuya finalidad fue evaluar si las plantas medicinales empleadas tiene actividad antibacteriana y antifúngica frente a diferentes microorganismo causantes de infecciones a nivel respiratorio, gastrointestinal, cutáneo y genitourinario en las comunidades de la Provincia de Zamora Chinchipe.

En esta investigación los extractos liofilizados, diluciones etanólicas al 70%, y screening fitoquímico fueron ejecutados en el Laboratorio de fitoquímica- ASH y la determinación antimicrobiana de las plantas se realizó en el Laboratorio del Centro de Diagnóstico médico del Área de la Salud Humana.

Los resultados obtenidos en el ensayo de sensibilidad bacteriana y fúngica se evidenció que las plantas*Oryctanthus alveolatus y Costus comosus,* no poseen actividad antimicrobiana contra las bacterias *Staphylococcus aureus (ATCC 25923); Escherichia coli (ATCC 25922); Pseudomona aeruginosa (ATCC 27853); Klebsiella pneumoniae (ATCC 13883)* y el hongo *Cándida albicans (ATCC 26790)*, se demostró que el control positivo inhibió el crecimiento bacteriano y el control negativo no formó halo de inhibición, por lo tanto se validó la técnica aplicada.

A nivel mundial especialmente en Latinoamérica existen numerosas investigaciones encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Estos estudios evalúan la actividad antimicrobiana en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello se han empleado las técnicas *in vitro* dada la sencillez y reproducibilidad de las mismas.

Blair (2005), estudio sobre plantas antimaláricas de Tumaco- Colombia determinó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Costus discolor*, planta que pertenece ala familia *Costaceae*, demostrando que esta planta posee actividad antifúngica contra *Aspergillus ochraceous*, no menciona el método y concentraciones utilizadas.(51)

En Costa rica, un estudio realizado por Fayette (2007), en extractos liofilizados a partir de raíces, hojas, tallos, flores, frutos y rizomas de *Costus*

*bracteus*y*Costus pulverulentus,*(plantas que pertenecen a la familia de *Oryctanthus alveolatus*)evaluaron el efecto antimicrobiano de extractos etanólicos a una concentración de 250 mg/L en dimetilsulfóxido sobre el crecimiento in vitro de bacterias y hongos fitopatógenos, tras la evaluación antibacteriana y antifúngica de los extractos mencionados mostraron una alta actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* y ninguno de los extractos evaluados mostró actividad inhibitoriasobre el crecimiento micelial de *P. palmivora* y *C. gloeosporioides.*(52)

El Instituto de Estudios Ecologistas del Tercer Mundo (ILDIS) determinaron que el extracto metanólico de *Phthirusa stellis* perteneciente a la familia *Loranthaceae*, demuestra que la planta *Phthirusa stellis* no presenta actividad antimicrobiana por el método de Mitscher frente a C*ándida albicans (*ATCC 10231) y *Staphylococcus aureus (*ATCC 13709)este estudio no manifiesta las concentraciones de los extractos utilizados.(53)

Según el estudio realizado por el Centro de Desarrollo de la Medicina Tradicional en Managua (2005), sobre “Diagnóstico situacional sobre producción, industrialización y comercialización de plantas medicinales y otras especies útiles” demuestra que *Viscum album* L. cuyo nombre común es muérdago o injerto de manzanilla perteneciente a la familia Loranthaceae tiene actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante el método de perforación en placa, además de tener efectos antitumorales y antiespasmódicos, no se menciona la concentración utilizada. (54)

Los estudios antes mencionados realizan ensayos de actividad antimicrobiana de la familia o género correspondiente a las plantas empleadas en este estudio, dichos ensayos se diferencian a la investigación realizada ya que emplean distintas cepas ATCC, diferentes solventes, concentraciones, métodos y formas de obtención del extracto; consiguiendo resultados negativos y positivos de actividad antibacteriana y antifúngica frente a diferentes microorganismos.

Los vegetales de uso medicinal contienen principios activos que realizan diversos efectos en el organismo, por lo que la planta medicinal *Oryctanthus alveolatus* comúnmente denominada escoba de bruja presenta estructuras de triterpenos, saponinas, fenoles y aminoácidos; y en la planta *Costus comosus* usualmente llamada caña agriase encontraron metabolitos secundarios tales como saponinas y aminoácidos, los mismos que coinciden por lo ensayado por Burneo (2009), que realizó un tamizaje fitoquímico de las plantas utilizadas en este estudio, demostrando la presencia de ciertos metabolitos en bajas concentraciones, relacionando la escasa actividad antimicrobiana de estas plantas. (55)

Finalmente no se descarta la presencia de actividad antimicrobiana de las plantas *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* por lo que se considera utilizar otras concentraciones y metodologías para obtener diferentes resultados.

VI. CONCLUSIONES

- Los extractos etanólicos de hojas de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* no presentaron actividad antibacteriana en las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 mediante el método de difusión en agar descrito por Bauer.

- Los extractos de hojas de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* no mostraron actividad antifúngica empleando el método de difusión en agar en las diluciones etanólicas 1/100, 1/1.000 y 1/10.000.

- Las plantas medicinales *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* no tienen actividad antimicrobiana frente a los microorganismos y diluciones ensayas mediante el método de Kirby-Bauer modificado, empleando otras técnicas y concentraciones de los extractos de las plantas se lograría obtener resultados eficaces.

- La metodología aplicada, los protocolos preestablecidos y las cepas microbiológicas, se validaron y comprobaron mediante la evaluación antimicrobiana de las plantas medicinales en estudio, lo que servirá como guía para futuras investigaciones de este tipo.

- Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimicrobiana de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus* se difundieron a los estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio clínico que cursan el módulo de “Análisis microbiológicos y los Procesos Infecciosos Virales y Micóticos”

VII. RECOMENDACIONES

- ξ Explotar otras metodologías de obtención del extractos, concentraciones, diluciones y solventes para evaluar la actividad antimicrobiana de nuevas plantas en estudio.

- ξ Almacenar las cepas microbiológicas ATCC a -60 o -70ºC para conservar la viabilidad de las mismas y ser utilizadas posteriormente.

- ξ Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, pruebas bioquímicas, reactivos y discos de sensibilidad para comprobar su eficacia.

- ξ En los ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica utilizar una cepa joven es decir en fase exponencial, donde se diferencien las características propias de la cepa microbiana a utilizar.

- ξ Comprobar las cepas ATCC a emplear con procedimientos de siembra, pruebas bioquímicas e identificación microscópica.

- ξ Controlar diariamente la temperatura de la incubadora, con la finalidad de que el microorganismo crezcan en las condiciones necesarias.

- ξ Impulsar a los estudiantes a continuar con estudios de tipo experimental sobre plantas utilizadas con fines medicinales para tratar diversas dolencias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida, E. Culturas prehispánicas del Ecuador. Viajes Chasquiguiñán. Quito. 2000. Pag. 180
2. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos 2000
3. Given, W. Techniques and methods of ethnobotany. Lincoln University Printery, Lincoln. Pag.148
4. Toledo, V. Ecología, sustentabilidad y modernidad alternativa: la filosofía política del milenio. 2000. Págs. 27-36
5. Ministerio de Salud Publica (MSP) Perfil epidemiológico (EPI 2): Dirección provincial de Zamora Chinchipe. 2008
6. Universidad Católica del Ecuador Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Capítulo II. Quito. Plantas medicinales. pdf
7. Cerón, C. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos Escuela de Biología de la Universidad Central del EcuadorQuito, Ecuador. 2006
8. Geo Loja. Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Oficina Regional para América Latina y el Caribe, la Municipalidad de Loja y Naturaleza y Cultura Internacional Perspectivas del medio ambiente. 2007. Págs. 96-98
9. French, C. Automedicación y Uso Racional del Medicamento en el IPSS. Boletín Terapéutico Toxicológico. Perú. 1997
10. Angeles, P. Automedicación en Población Urbano de Cuernavaca, Morelos. Salud Pública de México. 1992
11. Romero, R. Microbiología Y Parasitología Humana. 3^{era} edición. Editorial médica panamericana. 2007. Págs. 33-48-50-641-647
12. Martos, G. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Madrid.Pág. 133
13. Muñoz, F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 2006. Pag 12
14. William, M. Guía Práctica Ilustrada de las plantas medicinales. Edición BLUME. Barcelona. 2007
15. http://www.zonamedica.com.ar/categorias/medicinailustrada/infeccionbacte/definicion.htm. Consultado 04/08/11 22:08
16. Importancia de las plantas medicinales: http://fastonline.org/cd3wd_40/hlthes/aps/aps10s/es/ch04.htm#capitulo%20ii:%20plantas%20medicinales Consultado 07/09/2011 17:29

17. http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/plantas-medicinales.html

18. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Beneficios de la fitoterapia. Ciencias Médicas. Mayo 2011

19. Ruiz, S. Plantas de uso medicinal. Perú, Octubre 2000

20. Caleb, R. Revista El Vegetariano 2008. Pag. 35-39

21. Revista indisciplinar dos centros e núcleos da Unicamp. Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales y Aromáticas usadas en Brasil. Universidad Estadual de Campinas. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas de Microbiología. Octubre 2006

22. Conservación de los recursos naturales para una Agricultura sostenible Materia orgánica y actividad biológica. 2006 pdf

23. Fuertes, C. Flavonoides y alcaloides de Lupinus ballianus con actividad antibacteriana y antifúngica. Instituto de Microbiología. 2006

24. http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/plantas-medicinales.html

25. Cowan, M.Plant Products as antimicrobial agents. Clinical Microbiological Reviews. 2001 Pag. 564 – 582.

26. Araujo, J. "Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus"*. Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia.2004

27. Escobar, E. Presentación de Yotoco "reserva Natural". Colombia 2001 Pag 80

28. Vargas, W. Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales. Universidad de caldas 2002. 1^{era} edición. Pag 397

29. National Tropical Botanical Garden. Currently Viewing: *Costus comosus*https://ntbg.org/plants/plant_details.php?rid=1613&plantid=11852 Consultado 01/10/2011 21:15

30. Prats, G. Microbiología Clínica. 1^{era} edición. Editorial médica panamericana. 2007. Págs. 48-50

31. Jawetz, A. Microbiología médica. 22^{ava} edición. Manual moderno. Santa fé de Bogotá 2002 Págs. 55-57, 243-246, 269-274,285-288

32. Alvarez, E. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 28

33. Davel, G. Cultivos microbianos de referencia cepas certificadas 2001

34. García, F. Pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Pág. 6

35. Montoya, M. Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Microbiología Clínica. 2006

36. Bailey, S. Diagnóstico microbiológico. 11ava edición. Editorial medica panamericana. Madrid- España 2004. Pags 274-287

37. Arenas, R. Micología medica ilustrada. 3era edición. MCGraw-Hill interamericana. México 2008. Pags 11-12-17-18

38. García, P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pág 64-70-156-162

39. González, M. Microbiología y Parasitología. Cándida albicans. 2007

40. Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Masson 2005. Barcelona-España. Pág. 127,61-67

41. Murray, P. Microbiología Médica. 6ta edición. Editorial Elsevier Mosby. 2009. Pag 194-197

42. http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm consultado 02/08/2011 20:13

43. Struthers, R. Bacteriología clínica. Edición Masson 2005 Capitulo 4. Pag 53-54

44. Harvey, A. Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products. Drug Discovery. 2000. Pags 5-7

45. Valdés, R. Cubana Farm: Estructura y actividad de los Antifúngicos. 2005. Pags 1-4

46. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica. Ginebra 1993. Pag 10,80

47. Clavell, L. Microbiología. Manual de Métodos Generales. 2da edición. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. 2001

48. Difco, B. Manual de Medios de Cultivo Microbiológicos.Merck. 2003. Microbiology Manual

49. Ortega, Y. Garantía de la Calidad de los Laboratorios de MicrobiologíaAlimentaria. Organización Panamericana de la Salud. Harla S.A. México D.F.

50. Ministerio de salud del Perú. Instituto Nacional de Salud Organismo Público. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima 2002. Pag 55-57

51. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Volumen 5. Habana 2000.Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028479620000001000 06&lang=es Consultado el 05 de diciembre de 2011

52. Fayette, J. evaluación in vitro del efecto antimicrbiano de extractos vegetales sobre el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos. Costa rica. 2007

53. ILDIS: Biodiversidad, bioprospecciony bioseguridad**.** Quito-Ecuador Fuentes de antimicrobianos naturales Tripodanthus acutifolius y Psittacanthus cuneifolius: Loranthaceas.

54. Centro para el Desarrollo de la Medicina Tradicional (CEDEMETRA). Plantas medicinales y otras especies útiles. Diagnostico situacional sobre la producción, industrialización y comercialización. Managua, Octubre del 2005.

55. Burneo, P.“Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad Antioxidante de los extractos totales de doce especies vegetales nativas del sur del Ecuador 2009

ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

Anexo Nº1:Certificado de los ensayos realizados

Anexo Nº2:Protocolo: Obtención del extracto de las plantas

Anexo Nº3:Protocolo: Operación de concentración en rotavapor

Anexo Nº4:Protocolo: Instructivo para la recolecta de drogas

Anexo Nº5:Protocolo: Bioseguridad

Anexo Nº6: Protocolo: Preparación de Agar Sangre

Anexo Nº7: Protocolo: Preparación de Agar Mac-Conkey

Anexo Nº8: Protocolo: Preparación de Agar Mueller Hinton

Anexo Nº9:Protocolo: Preparación de Agar Chapman Manitol

Anexo Nº10: Protocolo: Preparación de Agar Cetrimide

Anexo Nº11: Protocolo: Preparación de Caldo Tripticasa de soja

Anexo Nº12: Protocolo: Preparación de Agar Tripticasa de soja

Anexo Nº13: Protocolo: Preparación de Agar Dextrosa Sabouraud

Anexo Nº14: Protocolo: Preparación de Caldo de ICC

Anexo Nº15: Protocolo: Preparación de medio de cultivo Citrato S

Anexo Nº16: Protocolo: Preparación de medio de cultivo TSI

Anexo Nº 17: Protocolo: Preparación de medio de cultivo SIM

Anexo Nº 18: Protocolo: Preparación de medio de cultivo FD

Anexo Nº19: Protocolo: Realización de la prueba de la Catalasa

Anexo Nº 20: Protocolo: Realización de la prueba de la Coagulasa

Anexo Nº 21: Protocolo: Realización de la prueba de KOH

Anexo Nº 22: Protocolo: Realización de la prueba de Tubo germinal

Anexo Nº 23: Protocolo: Realización de la Tinción de gram

Anexo Nº 24: Protocolo: Preparación del Patrón Nº5- Escala de MF

Anexo Nº 25: Protocolo: Preparación del inóculo

Anexo Nº 26: Protocolo: Viabilización de *Staphylococcus aureus*

Anexo Nº 27: Protocolo: Viabilización de*Escherichia coli*

Anexo Nº 28: Protocolo: Viabilización de *Klebsiella pneumoniae*

Anexo Nº 29: Protocolo: Viabilización de *Pseudomona aeruginosa*

Anexo Nº 30: Protocolo: Viabilización de *Cándida albicans*

Anexo Nº 31: Protocolo: Preparación de discos de sensibilidad

Anexo Nº 32: Protocolo: Evaluación de actividad antimicrobiana

Anexo Nº 33: Protocolo: Evaluación de actividad antifúngica

Anexo Nº 34: Protocolo: Realización de CMI

Anexo Nº 35: Protocolo: Realización de CMB

Anexo Nº 36:Permiso para la difusión de resultados

Anexo Nº 37: Formato de registro de asistencia a la difusión de resultados

Anexo Nº 38:Tríptico: Resultados de actividad antimicrobiana

Anexo Nº 39: Fotografías de los procedimientos realizados

Anexo Nº 40: Formato de registro de resultados actividad antimicrobiana

Anexo Nº 41:Formato de registro de control de temperatura

Anexo Nº1

CERTIFICADO DE LOS ENSAYOS REALIZADOS

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. DANIELA TATIANA CÓRDOVA RIOFRÍO, desarrolló el trabajo de campo que corresponde a su proyecto denominado: EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓTICO DE *ORYCTANTHUS ALVEOLATUS* Y *COSTUS COMOSUS* 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

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).

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PEO-LF- 02**

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.

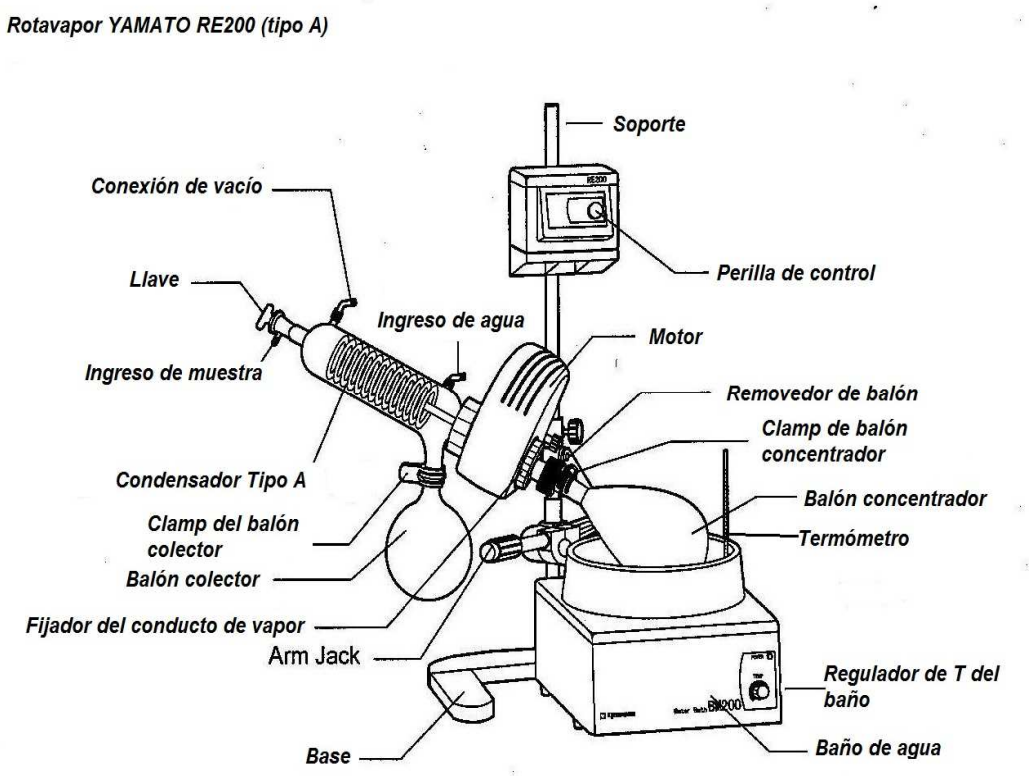
o) Deposite en contenido del balón concentrador en un cristalizador o recipiente adecuado para proceder al secado final o liofilización.

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



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.

Anexo Nº 5

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

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

7. DESARROLLO:

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

2	**Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio**	- Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos. - 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. Pags 89-90

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

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**	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la

	calor	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℃, 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.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Los medios de cultivo en microbiología: disponible en http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/medioscult/_madre_medios.html Consultado 20 de noviembre de 2011 18:00

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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 hum edad 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:** Lapreparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

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 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.
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℃, agregar sangre desfibrinada al 5% y homogenizar.
6	**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. 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.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pag 64
- Prats Pastor G. Microbiología Clínica. 1era edición. Editorial medica panamericana. Madrid 2007

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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 (35 ºC) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos).

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

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

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

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

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_P

reparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.

- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10, 198 y 199.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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 hum edad 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:** Lapreparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

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 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 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.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pág. 67

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

Anexo Nº 10

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 agarse promueve tanto la producción de la piocianina como la fluoresceína. Esta

última solo puede observarse bajo una lámpara de luz ultravioleta. Contiene cetrimide, que es el agente selectivo contra flora microbiana alterna (2).Está compuesto pordigerido 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 hum edad 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:** Lapreparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

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.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más

		exacta la preparación. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**Disolución del polvo a través de una 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 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, 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.
- Araceli García del Valle. Manual de Microbiología Médica. 1998. Pág. 229.

- María del Rosario Pascual Anderson. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2ª edición. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid- España. 2000. Pág. 304.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier. 2009. Pág. 162.
- Bailón, L. Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias (http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf) consultado el 27 de Noviembre del 2011.

Anexo Nº 11

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

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.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación y completando con agua destilada hasta 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 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:

1. Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
2. Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
3. Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.

4. Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
5. Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 37, 38.
6. Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9 y 10.
7. Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
8. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

Anexo Nº 12

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-ATS** **UNL-008**

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

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.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más

		exacta la preparación. Adicionar agua destilada hasta 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 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. 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:

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

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

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

Anexo Nº 13

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-ADS** **UNL-009**

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

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.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más

		exacta la preparación. Adicionar agua destilada hasta 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 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. 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.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Murray, P. Microbiología Médica. 6ª edición. España. Elsevier. 2009. Pág. 162.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

Anexo Nº 14

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-AICC** **UNL.- 010**

1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: CALDO 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 hum edad 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:** Lapreparación de medios de cultivo se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio de cultivo a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo para la preparación de Caldo de Infusión Cerebro-Corazón (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada litro de agua destilada debe haber 37g de agar. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de

		vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Adicionar agua destilada hasta llegar al 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.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

Anexo Nº 15

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-MCS** **UNL-011**

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 Microbiologíal 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 po ca 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:** Lapreparación de pruebas bioquímicas se realiza teniendo en cuenta las indicaciones que vienen en el envase del medio a preparar como la rehidratación, pesaje, esterilización.

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 medio, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que

		también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	**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.

10	**Lectura de resultados**	La producción de un color azul en el medio indica la presencia de productos alcalinos y es un resultado positivo; y en caso de no haber viraje de color es negativo.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Editorial medica panamericana. 6ta edición. Argentina 2008. Pag 64, 217
- Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria del Instituto Catalán de la Salud. Volumen II.1era edición. Marzo 2006. Pags 189-190
- Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial medica panamericana. 3era edición. Madrid 2003
- Tortora B. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9na edición. Madrid 2007. Pag 139

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

Anexo Nº 16

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-MTSI** **UNL-012**

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

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.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmayer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir agua destilada hasta 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 35 ºC en aerobiosis por un tiempo de 18 a 24 horas.
10	**Lectura de resultados**	Agar inclinado alcalino/sin cambio de color en el fondo (K/NC) = no utilizador de la glucosa, lactosa y la sacarosa; esto puede registrarse como K/K (agar inclinado alcalino/fondo alcalino). Agar inclinado alcalino/fondo ácido (K/A)= fermentación de la glucosa solamente. Agar inclinado ácido/fondo acido (A/A)= fermentador de la glucosa, la sacarosa o la lactosa. La formación de CO_2 e H_2 es indicada por la presencia de burbujas o grietas en el agar. La producción de H_2S se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Agar. (http://es.wikipedia.org/wiki/Agar-agar). Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245.
- Medio de Cultivo. (http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/pdf/p11.pdf) Consultado el 24 de Noviembre del 2011.
- Garcé, A. Preparación de medios de cultivo (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparaci%C3%B3n_de_medios_de_cultivo.pdf) Publicado en el 2008. Consultado el 26 de Noviembre del 2011.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ra edición. Barcelona-España. MASSON S.A. 2005. Pág. 9,10 y 43.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-MSIM** **UNL-013**

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Lectura de las indicaciones.**	Se lee el envase del polvo de la preparación de Sulfuro IndolMovilidad 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.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Añadir agua

		destilada hasta 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. Lostubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya sólidos 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 35-37 ºC en aerobiosis por un tiempo de 24 a 48 horas.
10	**Lectura de resultados.**	Ácido sulfhídrico Positivo: ennegrecimiento del medio

		Negativo: sin ennegrecimiento. Indol (añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs). Positivo: anillo rojo en la superficie del medio. Negativa: no se produce color. Movilidad Positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad. Negativa: crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea se siembra.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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 Fe3+. Además el medio de cultivo, el extracto de levadura aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

Conservación y almacenamiento de pruebas bioquímicas: En frasco cerrado se deben almacenar de 15 a 25° C, hasta 5 años, con po ca 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:** Lapreparación 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 Agarfenilalanina desaminasa,según la cual se debe suspender 23 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	**Pesaje.**	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Añadir agua

		destilada hasta 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. 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 ℃, 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.
- Preparación de medios de cultivo. (http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/ClaseProcariontes/Alejandra/Pr%C3%A1ctica%204%20%20Medios%20de%20cultivo.pdf) Consultado el 27 de Noviembre del 2011.
- Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. 1993. Pág. 10.
- Agar de Fenilalanina “http://www.mcd.com.mx/pdfs/agar_fenilalanina.pdf” 27 de Noviembre del 2011.
- Koneman, E. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ta ed. Editorial Médica Panamerica. Argentina 2008. Págs. 1401-1402.

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-PC-UNL.-015**

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

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

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 mas 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 ha 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

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.

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

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 KOHse 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. Seudohifas que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre si. 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

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 *Cándidaalbicans.*

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.

Elaborado por: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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 mecherode Bunsen.

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

5 DEFINICIONES:

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

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

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

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

7 DESARROLLO:

<table>
<tr><th>ITEM</th><th>ACTIVIDAD</th><th>PROCEDIMIENTO</th></tr>
<tr><td>1</td><td>Preparación del material.</td><td>En una gradilla disponer de un tubo de ensayo de 10ml totalmente estéril, rotularlo.</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla N.- 1.</td><td>Añadir una solución al 1% de Cloruro de Bario Anhídrido y una solución al 1% (en volumen) de Ácido Sulfúrico químicamente puro, según el siguiente tabla:
Tabla N.- 1
<table>
<tr><td>Tubo N.</td><td>Cl_2Ba (1%)</td><td>SO_4H_2 (1%)</td><td>U.F.C/ml</td></tr>
<tr><td>5</td><td>0.5</td><td>99.5</td><td>$1.5x10^8$</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>3</td><td>Calibración del Patrón N. 5 de Mc Farland por espectrofotometría.</td><td>Encender el espectrofotómetro utilizando un filtro de 625nm. Colocar la suspensión en una cubeta estéril. Se procede a medir la turbidez, la misma que debe oscilar entre 0.085 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.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-IN** **UNL.-021**

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 este 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 McFarland (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**	Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina en un tubo estéril. Utilizando un aplicador (estéril), tomar de

	la solución salina.	cuatro a cinco colonias de la cepa seleccionada, de forma suave y tocando solamente la punta del aplicador. Suspenderlas en la solución salina al 0,85%, para lograr una suspensión turbia. Mezclar bien y tapar el tubo.
3	**Estandarización visual de la turbidez del inóculo.**	Comparar la turbidez de la suspensión del microorganismo con el Patrón No. 5 de Mac Farland, para lo cual se debe colocar juntos la suspensión bacteriana y el tubo de Mac Farland, observándolos contra un fondo de rayas negras. Es muy importante agitar bien los tubos antes de realizar este paso.
4	**Verificar la turbidez de la suspensión a través 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.

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 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:

- 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.
- 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.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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 depositada 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**	El Control de Calidad de ***Escherichia coli*** viabilizados se lo realiza mediante la

	viabilizados y conservados	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/Afermentador 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:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. 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.
5. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.
6. Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Perez “Identificaión Bioquímica de Bacterias más frecuentes”.
7. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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 ***Klebsiellapneumoniae*** Incubar a 37ºC durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso

		respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Klebsiella pneumoniae*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *K. pneumoniae.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, muy mucoides, bordes enteros, crecimiento regular. Se observa la fermentación de lactosa en el Agar MacConkey donde las colonias son de color rosado. **Características Microscópicas (morfología):** **Tinción de Gram:** bacilos largos gram negativos. **Pruebas bioquímicas:** **TSI:** A/Afermentador 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:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. 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.
5. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 243.
6. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Pseudomona aeruginosa*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de *P. aeruginosa.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Grandes, redondas, bordes irregulares, mucoides, produce un olor dulzón semejante al jugo de uva o de maíz, de color verde fluorescente. *P. aeruginosa* también produce el pigmento fluoresecente 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/Afermentador 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:

1. Alvarez, M. V. Boquet, E. Y M. I. DE FEZ. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Ed. Marzo 1995. Págs. 28.
2. Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.
3. Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
4. 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.
5. Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 257-258.
6. Gamazo, C, López, I. Manual Práctico de Microbiología. 3ra ed. Editorial MASSON S.A. Barcelona-España. 2005. Pág 47.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

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

2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de ***Cándida 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 ***Cándida albicans*** **ATCC 26790,** con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial).

7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	***Cándida albicans*** **ATCC 26790**	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en la asociación *American Type Culture Collection* (ATCC)
2	**Recuperación de *Cándida albicans* ATCC 26790 Cultivo primario**	**1**. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8ºC), permitir que alcance la temperatura ambiente. **2**. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de ***C. albicans***, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 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 *Cándida albicans* ATCC 26790**	A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Agar Sabouraud, específico para ***Cándida albicans***. Incubar a 37ºC – 42ºC durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	**Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados**	El Control de Calidad de ***Cándida albicans*** viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y pruebas específicas de las mismas. Este se lo

		realiza a partir del cultivo primario de *C. albicans.* **Características Macroscópicas de las colonias:** Pequeñas, redondas, bordes enteros, aspecto cremoso, mucoides, y de color blanco. **Características Microscópicas (morfología):** **Hidróxido de potasio (KOH):** esporas y levaduras aisladas y en gemación. **Otras pruebas:** **Test de filamentación:** Presencia de tubo germinal a las 2 horas.

8. BIBLIOGRAFÍA:

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

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

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

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.**	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN Nº 1 de 6 mm de diámetro.
2	**Esterilización de los discos.**	Esterilizar los discos colocándolos en una caja petri estéril en la cabina de flujo laminar mediante rayos ultravioleta (UV), por el lapso de dos horas.
3	**Impregnación del extracto. Vegetal.**	Utilizar la caja petri, y colocar una malla metálica estéril en esta, a su vez colocar los discos estériles, impregnarlos con 10 ul, luego eliminar el solvente con la ayuda de una secadora y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de dilución, realizar el mismo procedimiento con cada una de 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. DiagnósticoClínico por el laboratorio. 8ª ed. Salvat; 2001. P. 487.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-EAA-UNL-028**

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

DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	**Inoculación de las placas.**	- Una vez preparados los medios de cultivo, 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, se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton, estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 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, 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.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 2011

1859	**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA** **CEDAMAZ-ASH** **LABORATORIO DE FITOQUÍMICA** **PROYECTO PLANTAS MEDICINALES**	**PR-EAA-UNL-029**

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, 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, se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. Se debe rotar el hisopo varias veces y presionar firmemente por las paredes internas del tubo, por encima del nivel del líquido. Esto elimina el exceso de líquido del hisopo. - Inocular la superficie seca de una placa de agar Sabouraud, estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 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, 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.

Elaborado por: Solmayra Agreda, Tannya León, Diana Montaño, Liseth Cueva, Karla Montalvo / Año 2010
Actualización: Andrea Alvarado, Jéssica Castro, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera, Daniela Córdova / Año 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.

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 Clinica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 49 – 53.

Anexo Nº 36

PERMISO PARA LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS

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

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LIC. LABORATORIO CLINICO ÁREA DE LA SALUD HUMANA

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

cc. Archivo

Elaborado:
María Jiménez

Anexo Nº 37

FORMATO DE REGISTRO DE ASISTENCIA DE LOS ESTUDIANTES A LA DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Registro de asistencia a la difusión de resultados de la evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Oryctanthus alveolatus Costus comosus*por el método de difusión en agar

Nombre	Número de cédula	Estudiante	Docente	Carrera	Firma

Anexo Nº 38

TRIPTICO: 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 antifungica 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 Córdova, 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, indaguen 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 traves 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 Bioacividad en Zamora Chinchipe, ésta 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, ademas 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 39

FOTOGRAFÍAS DE LOS PROCEDIMIENTOS REALIZADOS

Estandarización de procedimientos:prueba piloto

Cepa bacteriana: *Escherichia coli*

Validación del papel Whatman Nº1 con Amikacina

Actividad antimicrobiana con extracto de Ruda y aceite esencial de Clavo de olor

CMI y CMB de aceite esencial de Clavo de olor

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO Y DISCOS

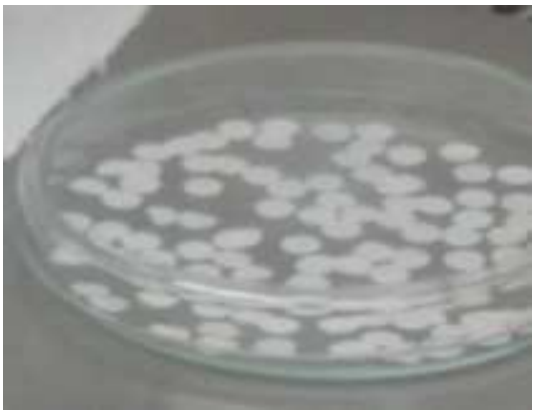
Extractos secos de *Oryctanthus alveolatus y Costus comosus*

Extractos liofilizados de *Oryctanthus alveolatus* y *Costus comosus*

Solución 1/100

Prediluciones 1/10.000 y 1/10.000

Discos papel Whatman Nº1



PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Pesaje

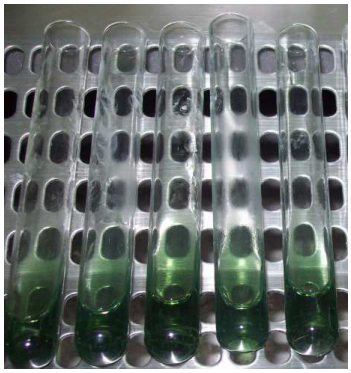
Disolución del polvo a través de una fuente de calor

Pruebas bioquímicas

Esterilización

Vertido de los medios de cultivo

Solidificación



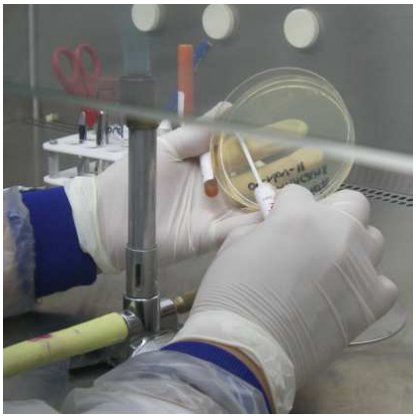
Control de calidad: pH- medio Mueller Hinton

VIABILIZACIÓN DE LAS CEPAS MICROBIOLÓGICAS

Cepas Microbiológicas: vial

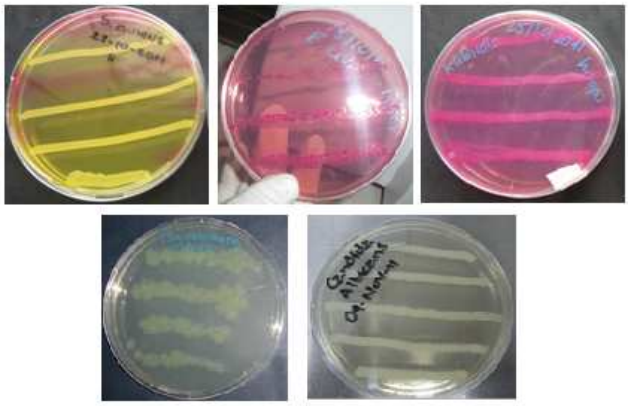
Viabilización: Caldo infusión cerebro corazón

Siembra

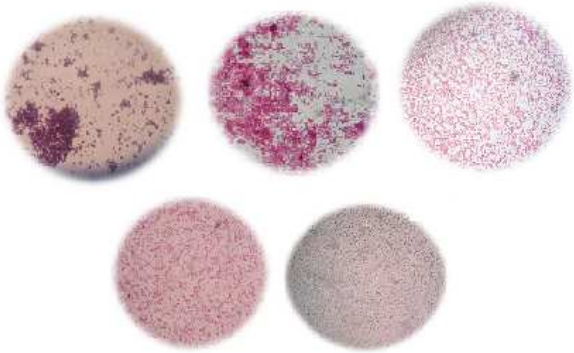


Resiembra

Identificación macroscópica de las cepas



Identificación microscópica de las cepas



IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba de Indol

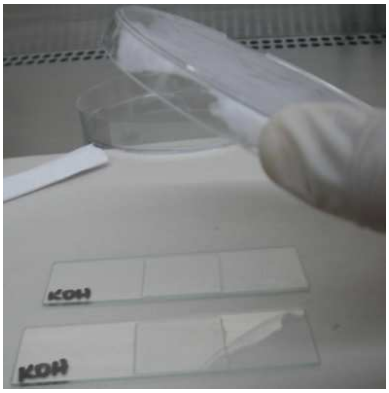
Citrato, TSI, SIM, Fenilalanina

Prueba de la Catalasa

Test de filamentación

Prueba de Coagulasa

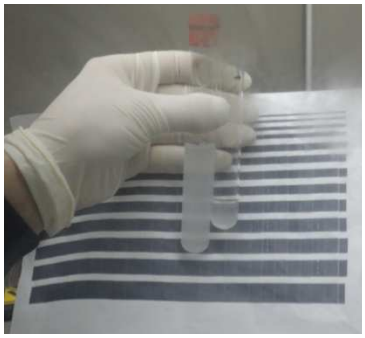
Prueba de KOH



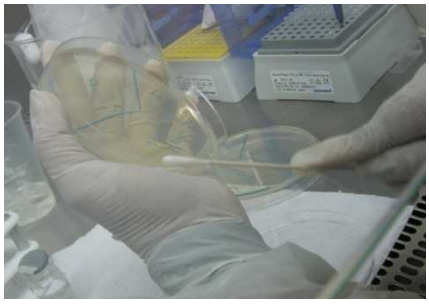
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Esterilización del material en UV

Inoculo: Turbidez- Mc-Farland: tubo 5

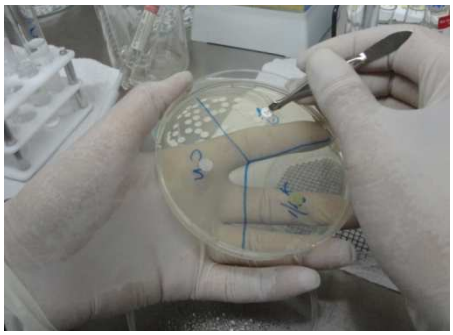


Plateado



Impregnación de los discos con los extractos y secado

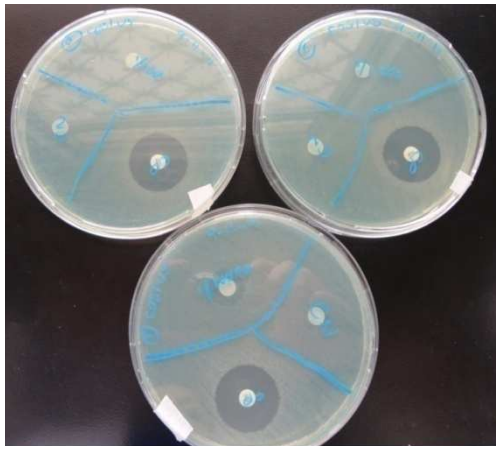
Colocación de los discos



Incubación 24 horas a 37ºC

Lectura: regla milimetrada

RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA



DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Anexo Nº 40

FORMATO DE REGISTRO DE RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

LECTURA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
Bacteria *Escherichia coli*

PLANTA	EXTRACTOS (mm)			CONTROL POSITIVO CIPROFLOXACINA (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 (ORYCTANTHUS)										
Repetición 1										
Planta 2 (COSTUS)										
Repetición 2										

Nota: El formato para las siguientes lecturas se diferencia de este ya que cambia el nombre de la bacteria y el antibiótico.

Anexo Nº 41

FORMATO DE REGISTRO DE CONTROL DE TEMPERATURA DE LA INCUBADORA

REGISTRO DIARIO DE TEMPERATURA DE LA INCUBADORA

Fecha	Temperatura	Observaciones