



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum*.  
POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.**

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

**AUTORA:** ANDREA ALVARADO.

**DIRECTORA:** DRA. CLAUDIA CRUZ.

LOJA – ECUADOR

2012

## **TÍTULO:**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum*.  
POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.**

# ÍNDICE

<b>AUTORÍA.....</b>	<b>i</b>
<b>CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>v</b>
<b>SUMARY .....</b>	<b>vi</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>11</b>
<b>II. Revisión literaria.....</b>	<b>14</b>
<b>1. PLANTAS MEDICINALES.....</b>	<b>14</b>
1.1. Definición.....	14
1.2. Importancia y uso de las plantas medicinales.....	14
<b>2. ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO .....</b>	<b>15</b>
2.1. Zornia reticulata .....	15
2.1.1. Taxonomía: .....	15
2.1.2. Características generales:.....	15
2.1.2.1.Descripción.....	15
2.2. Cestrun sendtherianum .....	16
2.2.1. Taxonomía: .....	16
2.2.2. Características generales:.....	16
2.2.2.1. Descripción .....	16
<b>3. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS:.....</b>	<b>17</b>
3.1. Triterpenos .....	17
3.2. Saponinas .....	17
3.3. Aminoácidos.....	17
<b>4. BACTERIAS .....</b>	<b>18</b>
4.1. Crecimiento bacteriano.....	18
4.2. Curva del crecimiento .....	19
<b>5. PRINCIPALES BACTERIAS EN ESTUDIO .....</b>	<b>20</b>
5.1. Escherichia coli .....	20
5.2. Staphylococcus aureus .....	20
5.3. Klebsiella pneumoniae .....	21
5.4. Pseudomona aeruginosa. ....	22

<b>6. HONGOS .....</b>	<b>23</b>
6.1. <i>Cándida albicans</i> .....	23
<b>7. CEPAS ATCC .....</b>	<b>24</b>
<b>8. MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>24</b>
8.1. Agar Chapman Manitol .....	25
8.2. Agar MacConKey .....	25
8.3. Agar Cetrimide.....	25
8.4. Agar Sabouraud .....	26
8.5. Agar Mueller-Hinton.....	26
<b>9. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA .....</b>	<b>26</b>
<b>10. MÉTODOS DE ANTIBIOGRAMA BASADOS EN DILUCIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>11. MÉTODOS DE ANTIBIOGRAMA BASADOS EN DIFUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>12. ANTIBIÓTICOS .....</b>	<b>32</b>
<b>13. CONTROL DE CALIDAD EN MICROBIOLÓGICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>14. MANTENIMIENTO DE REGISTROS .....</b>	<b>37</b>
<b>III. Materiales y métodos.....</b>	<b>39</b>
• Tipo de estudio .....	39
• Área de estudio.....	39
• Universo.....	39
• Muestra .....	39
• Criterios de inclusión.....	39
• Criterios de exclusión.....	39
• <b>Procedimientos</b> .....	39
• Realización de pruebas piloto .....	40
• Fase 1 .....	41
• Fase 2.....	41
• Fase 3.....	42
• Fase 4.....	42
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>44</b>
• Tabla N. 1 .....	44
• Tabla N. 2 .....	45
<b>V. Discusión .....</b>	<b>47</b>

<b>VI. Conclusiones.....</b>	<b>50</b>
<b>VII. Recomendaciones.....</b>	<b>52</b>
<b>VIII. Bibliografía .....</b>	<b>54</b>

**ANEXOS**

## AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodología, resultados discusiones, conclusiones y recomendaciones emitidas en la presente Tesis de Grado, cuyo título es: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR”, son de responsabilidad absoluta de la autora.

Loja, Enero de 2012.

.....  
Andrea E. Alvarado P.

## **CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN**

Dra. Claudia Cruz.

**DIRECTORA DE TESIS**

### **CERTIFICO:**

Que el trabajo de investigación titulado “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR” elaborado por la señorita Andrea Elizabeth Alvarado Pineda, ha sido revisado y se ajusta a los requisitos legales exigidos por la carrera de Laboratorio Clínico por lo que autorizó su presentación.

Loja, Enero de 2012.

.....  
Dra. Claudia Cruz.

**DIRECTORA DE TESIS**

## DEDICATORIA

La presente investigación va dedicada:

**A mi Dios**, por ser la luz de mi vida que me acompaña siempre.

**A mis padres**, Víctor y Ana que han sido mi mejor apoyo y mi pilar fundamental en todo instante enseñándome que con perseverancia y fe todo es posible.

**A mi hija**, Kerlin fuente de inspiración para conseguir mis metas, ser mejor profesional y ser mejor persona. Te amo.

**A mis hermanos**, Vicente, Alex y Nayely por su cariño y los momentos felices que hemos vivido.

**A mi sobrino** Kelvin por ser un rayito de alegría en mi vida.

**A una persona especial**, Víctor Hugo gracias por su apoyo y ser parte de mi vida.

**A mis tios**, Melva, Albertina, Amable y Flavio por estar siempre a mi lado apoyándome.

**A mi familia** en general por estar conmigo en cada momento con sus palabras de motivación, gracias por su apoyo.

***Para todo ustedes va dedicado este triunfo.***



## AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero darle gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte compañía durante toda mi carrera, especialmente a mi familia.

A mi familia por el apoyo infinito que me ha brindado en el desarrollo de esta experiencia.

A la Universidad Nacional de Loja, Carrera de Laboratorio Clínico por brindarme una formación profesional y humana.

Al Centro de Estudios y Desarrollo de la Amazonia (CEDAMAZ) por permitirme formar parte de tan importante proyecto.

A mi directora de tesis **Dra. Claudia Cruz**, por sus enseñanzas, dedicación, paciencia y motivación para el desarrollo de mi tesis.

Al **Dr. Luis Morocho**, por su colaboración y apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Centro de Diagnóstico de la Universidad Nacional de Loja por la colaboración para poder realizar los procesos investigativos.

A mis compañeras del proyecto Daniela, Guadalupe, Jessica y Angélica por su amistad y apoyo incondicional.

Quizás me olvide de mucha gente que me han ayudado a que finalice con éxito mi carrera profesional, para ellos y ellas van este agradecimiento.

**GRACIAS A TODOS.**

## RESUMEN

El uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. A pesar de la invasión farmacológica mundial, las personas siguen recurriendo a los remedios vegetales para aliviar sus enfermedades, por ello el propósito de esta investigación, es de llevar a la transformación del conocimiento tradicional en científico. En el presente trabajo investigativo, se efectuó con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico al 70% de *Zornia reticulata* (Chanca piedra), utilizada tradicionalmente en varias afecciones, tales como Inflamación del sistema digestivo, enfermedades génito-urinarias, próstatiso, cistitis, anuria y cálculos renales; y *Cestrun sendtherianum* (Saúco) usada frecuentemente en el alivio de Infecciones, cefaleas, espasmos viscerales y fiebre, las plantas en estudio fueron recolectadas en la provincia de Zamora Chinchipe. El estudio se realizó preparando diluciones en tres concentraciones: 1/100, 1/1.000, 1/10.000, a partir del extracto etanólico liofilizado de cada planta, además de controles negativos de etanol al 70% y controles positivos de discos estándares de antibióticos de referencia para cada microorganismo, para esto se utilizó el método de difusión en agar (Kirby Bauer modificado) frente a las bacterias *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 15008), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 14207), y el hongo *C. Albicans* (ATCC 10231). De acuerdo a la metodología empleada, *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* no presentaron actividad antimicrobiana.

**Palabras claves:** actividad antimicrobiana, *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum*, difusión en agar.

## SUMARY

The use of medicinal plants for medicinal purposes in traditional medicine is an important legacy that previous generations have left a part of the culture of peoples. Despite the global drug invasion, people are turning to herbal remedies to alleviate their illnesses, so the purpose of this research is to lead to the transformation of traditional knowledge in science. In this research work, was conducted to evaluate the antimicrobial activity of ethanolic extract 70% of *Zornia reticulata* (Chanca piedra), traditionally used in various conditions such as inflammation of the digestive system, genito-urinary diseases, prostate, cystitis, anuria and renal calculi, and *Cestrun sendtherianum* (saúco) frequently used in the relief of infections, headaches, cramps and fever visceral, the plant under study were collected in the province of Zamora Chinchipe. The study was conducted at three concentrations dilutions: 1 / 100, 1/1.000, 1/10.000, from lyophilized ethanol extract of each plant, as well as negative controls of 70% ethanol and positive control standards antibiotic discs reference for each organism, for this we used the agar diffusion method (Kirby Bauer modified) against the bacteria *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 15008), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 14207), *C. Albicans* (ATCC 10231). According to the methodology used, *Zornia reticulata* and *Cestrun sendtherianum* showed no antimicrobial activity.

**Keywords:** antimicrobial activity, *Zornia reticulata* and *Cestrun sendtherianum*, agar diffusion.

# I. INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos. <sup>(1)</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional como: prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicamentos basados en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación, para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades. <sup>(2)</sup>

Las afecciones gastrointestinales son las causantes de la mayor morbi-mortalidad sobre todo infantil, no solo en Ecuador, sino en general en los países en desarrollo, siendo también muy frecuente las infecciones y micosis cutáneas, todas estas causadas por diversos microorganismos como bacterias y hongos. <sup>(3)</sup>

En la provincia de Zamora Chinchipe al igual que otras provincias amazónicas, se está perdiendo gran parte del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales, también se encuentra la automedicación que se ha constituido en una actitud muy errónea, cotidiana y habitual en la mayor parte de las personas adultas. <sup>(4)</sup>

Frente a esta importante problemática nacional y mundial, es de gran relevancia las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos biológicos a partir de fuentes naturales, para lo cual existen técnicas microbiológicas que han demostrado una amplia gama de productos y extractos de plantas con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas. Existe

una gran variedad de plantas con propiedades antimicrobianas, antioxidantes, alimenticias, medicinales, etc. que poseen efectos asombrosos para mejorar algunos aspectos como la salud. <sup>(5)</sup>

*Zornia reticulata* (Chanca piedra), es una especie vegetal perteneciente a la familia Fabaceae que ha sido empleada tradicionalmente en varias afecciones, tales como inflamación del sistema digestivo, enfermedades génito-urinarias, próstatiso, cistitis, anuria y cálculos renales. *Cestrun sendtherianum* (Saúco), perteneciente a la familia Solanaceae ha sido usada frecuentemente en el alivio de infecciones, cefaleas, espasmos viscerales y fiebre. Estas dos plantas son nativas y utilizadas por las comunidades de la provincia de Zamora Chinchipe.

Por ello en el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico al 70% de las plantas *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* por el método de difusión en agar empleando cinco cepas microbiológicas *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 15008), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 14207), *C. Albicans* (ATCC 10231)., frente a la acción de los extractos de las plantas nos proporcionó resultados negativos en la actividad antimicrobiana, con el método utilizado debido a la presencia de metabolitos secundarios en bajas concentraciones con actividad antimicrobiana.

## **II. REVISIÓN LITERARIA**

## **1. PLANTAS MEDICINALES**

### **1.13. Definición.**

Las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tiende a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituye aproximadamente la séptima parte de las especies existentes. <sup>(6)</sup>

### **1.14. Importancia y uso de las plantas medicinales**

La medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, el único sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades en las personas.

En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.

Debido a sus numerosas propiedades, la utilización de las plantas medicinales y la de sus principios activos proporcionan importantes beneficios medioambientales, económicos y sociales, además de constituir un amplio campo de aplicación de las industrias alimentaria y farmacéutica.



## 2. ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

### 2.13. *Zornia reticulata*

#### 2.13.1. Taxonomía:

- Nombre Científico: *Zornia reticulata*
- Reino : Plantae
- Phylum: Magnoliophyta
- Clase : Magnoliopsida
- Orden: Fabales
- Familia: Fabaceae
- Género: Zornia
- Epíteto Específico: Reticulata
- Autor Epíteto Específico: Sm.

#### 2.13.2. Características generales:

##### 2.13.2.1. Descripción

Es un pequeño arbusto que crece a una altura de 3 -6 cm, silvestre, anual y de tallo erguido. Sus hojas son de 7 - 12 cm de largo, alternas, sésiles oblongas; flores pequeñas de color blanquecino - verdoso, solitarias, auxiliares, pediceladas, apétalas monóicas. Sus frutos de 2 - 3 mm de diámetro, pequeños en una cápsula comprimida y globosa; raíz larga y poco ramificada; la semilla triangular y verrucosa. En el género *Phyllanthus*, las hojas del tallo principal están reducidas y las de las ramas laterales se disponen opuestas en un plano como si fueran folíolos de una hoja compuesta. Sin embargo, no dejan de ser hojas, y de sus axilas pueden salir flores, ramas o inflorescencias dependiendo de la especie en particular.

Esta planta tiene múltiples usos en la medicina tradicional más conocida por ser utilizada en las afecciones renales de cálculos a los riñones. Como anti-inflamatorio, pero es más conocida por su propiedad diurética y para el tratamiento de los cálculos renales (piedras del riñón). Debido a esta última propiedad es que

se le da el nombre común de "chanca piedra" o "quiebra piedra". También se usa para la Hepatitis B. <sup>(7)</sup>

## **2.14. *Cestrun sendtherianum***

### **2.14.1. Taxonomía:**

- Nombre Científico: *Cestrun sendtherianum*
- Reino: Plantae
- Phylum: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Solanales
- Familia: Solanaceae
- Género: *Cestrum*
- Epíteto Específico: *Sendtherianum*
- Autor Epíteto Específico: C. Mart

### **2.14.2. Características generales:**

#### **2.2.2.1 Descripción**

El saúco es un arbusto o árbol de entre 2 y 10 metros de alto. Sus hojas son dentadas y desprenden un olor poco agradable. Las flores se disponen en falsa umbela con 5 pétalos, 5 sépalos y 5 estambres con anteras amarillas. Las bayas son verdes primero y negras cuando maduran. El tallo es hueco y frágil, con una médula blanca.

La infusión de flores secas es un buen remedio para las afecciones de las vías respiratorias altas, anticatarral y eficaz contra los resfriados gracias a su acción sudorífica. Es calmante, útil en el tratamiento de trastornos nerviosos ligeros, tales como insomnios, migrañas, dolores de cabeza e inflamaciones dolorosas. Es depurativo, diurético, útil en afecciones renales (nefritis) y laxante; entra en la composición de tisanas adelgazantes. Se usa externamente en compresas y baños para los ojos. El agua de saúco es un buen astringente ocular. Los frutos frescos y maduros también se emplean en mermeladas, jarabes y vinos. La planta tiene un particular aroma y es amarga. <sup>(8)</sup>

### 3. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS:

METABOLITO	PLANTAS	
	<i>Zornia reticulata</i>	<i>Cestrun sendtherianum</i>
<b>Triterpenos</b>	+	++
<b>Saponinas</b>	+	+
<b>Aminoácidos</b>	++	++

FUENTE: Proyecto de fitoquímica.

AUTOR: Andrea Alvarado

#### 3.13. Triterpenos

Los triterpenos son incoloros, cristalinos, ópticamente activos de alto punto de fusión, además son compuestos con un esqueleto carbono en seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Son de estructura relativamente completa generalmente tetracíclicos o pentacíclicos y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran como glicósidos formando las llamadas saponinas triterpenoides.

#### 3.14. Saponinas

Las saponinas son de ambos, triterpenos y esteroides, dan soluciones jabonosas, y algunos extractos crudos de plantas han encontrado uso como detergentes, y para la producción de espumas estables. Ellos causan hemólisis de la sangre aún en soluciones muy diluidas, una propiedad que ha sido utilizada para su detección en extractos de plantas las saponinas no son fáciles de aislar por ello muchas veces se prefiere hidrolizar el extracto crudo de la planta y aislar la sapogenina libre de azúcares.

#### 3.15. Aminoácidos

Un aminoácido, como su nombre lo indica, es una molécula orgánica con un grupo amino y un grupo carboxilo. Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas. <sup>(9)</sup>

## 4. BACTERIAS

Las bacterias son organismos unicelulares. Sus células carecen de núcleo, por lo que se denominan procariontes. Las tres morfologías principales de las bacterias son bacilos, cocos y espirilos.

Las bacterias tienen una pared celular con péptido glucano, se dividen por fisión binaria y pueden presentar flagelos, para su nutrición las bacterias pueden utilizar una amplia gama de sustancias. Son muy variables en cuanto al modo de obtener la energía y el alimento, y viven en casi todos los ambientes, incluido el interior de los seres humanos

### 4.13. Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano es el crecimiento ordenado de todos los componentes de un microorganismo. La multiplicación celular es una consecuencia del crecimiento, es decir aumenta la cantidad de individuos y da lugar a una población o cultivo.

Este proceso involucra un sin número de reacciones químicas, y el incremento depende fundamentalmente de la especie bacteriana, del pH, composición del medio, temperatura de incubación, edad del cultivo, factores inhibidores, etc.

**Crecimiento individual.-** Incremento del tamaño y peso de la bacteria antes de la división celular.

**Crecimiento poblacional.-** Incremento en el número de células, como consecuencia del crecimiento y división celular.

#### 4.14. Curva del crecimiento

El crecimiento de las bacterias es claramente exponencial y la determinación del crecimiento se puede representar mediante una curva en la que se distinguen las siguientes fases o periodos representados por las letras A hasta la F.

- **Fase de Rezago (A) y Aceleración (B):** (*Latencia*).- En esta fase inicial las células microbianas se adaptan a las nuevas condiciones de su nuevo ambiente. No crecen inmediatamente. En este lapso de tiempo se forman enzimas y los metabolitos intermediarios hasta alcanzar las concentraciones necesarias para reiniciar el crecimiento.
- **Fase Exponencial (C) y Retraso (D):** (*Crecimiento exponencial*).- Las células se dividen regularmente a ritmo constante, en condiciones apropiadas, el grado de desarrollo es máximo, hasta que uno o más nutrientes se agoten, o se acumule tal cantidad de metabolitos tóxicos que se inhiba el crecimiento.
- **Fase Estacionaria Máxima (E):** (*Estacionaria*).- El número de células no se incrementa más porque los nutrientes del medio escasean y las posibles sustancias tóxicas se acumulan. Existe una pérdida lenta de células por muerte, dicha pérdida lenta se compensa exactamente por la formación de nuevas células a través de crecimiento y división.
- **Fase de Declinación (F):** (*Muerte*).- El número de células que mueren es superior a las que se originan debido al agotamiento de los nutrientes y/o excesiva acumulación de sustancias tóxicas. Un número pequeño de sobrevivientes pueden persistir gracias a los nutrientes liberados por las células que mueren.

## 5. PRINCIPALES BACTERIAS EN ESTUDIO

Los principales microorganismos utilizados en este proyecto son:

### 5.13. *Escherichia coli*

Pertenece a la familia de las enterobacteriáceas cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales.

Es un bacilo gram negativo, forma parte de la flora normal, crecen bien en agar MacConKey en condiciones aerobias y anaerobias, ocasionan reacciones positivas para indol, lisina descarboxilasa y fermentación del manitol, glucosa, producen gas, son catalasa positiva, oxidasa negativos y reducen el nitrato en nitrito.

#### 5.13.1. Características de crecimiento.

La *E. coli* forman colonias lisas, circulantes, convexas con bordes bien diferenciados. Las cepas de *E. coli* ocasionan reacciones positivas para indol, lisina descarboxilasa y fermentación del manitol y produce gas a partir de la glucosa.

#### 5.13.2. Pruebas diagnósticas de laboratorio

**Cultivo:** las muestras se siembran sobre placas con agar sangre, y medio diferencial como el agar MacConKey.

*Escherichia coli* produce fermentación rápida de la lactosa, brillo metálico sobre medio diferencial; dotado de motilidad; colonias no viscosas, aplanadas.

### 5.14. *Staphylococcus aureus*

Es el agente causal de la mayoría de infecciones, se caracteriza por producir coagulasa o fermentar el manitol, elaborar diversas toxinas, en especial la toxina a, y sintetizar en su mayoría un pigmento amarillo dorado, no difusible, que colorea las colonias.

#### **5.14.1. Características de crecimiento.**

El *S. aureus* produce catalasa además fermentan lentamente muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas la actividad proteolítica varía mucho de una cepa a otra.

Son relativamente resistentes a la desecación al calor y al cloruro de sodio al 9%, resisten 50 grados centígrados durante 30 minutos pero se inhiben con facilidad mediante ciertas sustancias químicas por ejemplo, hexaclorofeno al 3%.

#### **5.14.2. Pruebas diagnósticas de laboratorio.**

**Prueba de la catalasa:** *S. aureus* produce catalasa que convierte el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, la prueba se realiza sobre un portaobjetos y su positividad se da por la formación de burbujas.

**Prueba de la coagulasa:** *S. aureus* produce coagulasa una proteína parecida a una enzima que coagula plasma oxalatado o citratado. La prueba se realiza mezclando el plasma citratado con una colonia del cultivo y se incuba de 1 a 4 horas hasta la formación del coagulo que indica su positividad.

**Pruebas serológicas:** estas pruebas tienen poco valor práctico.

### ***5.15. Klebsiella pneumoniae***

Es un bacilo gram negativo (color fucsia); la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el Agar MacConKey donde las colonias son de color rosado y en el medio Kligler o TSI donde son Ácido/Ácido, es decir fermentador de la lactosa más producción de gas; y en la fermentación acetónica son positivos.

#### **5.15.1. Características de crecimiento.**

Muestran crecimiento mucoso, grandes capsulas de polisacáridos, ausencia de motilidad y por lo general dan pruebas positivas para la lisina descarboxilasa y para el citrato.

### **5.15.2. Pruebas diagnósticas de laboratorio**

**Cultivo:** las muestras se siembran sobre placas con agar sangre, y medio diferencial como el agar MacConKey.

Las colonias de *K. pneumoniae* son grandes muy mucoides y tienden a confundir cuando la incubación se prolonga.

### **5.16. *Pseudomona aeruginosa*.**

Es un bacilo gram negativo dotado de motilidad que mide casi 0.6 por 2 um. Se la encuentra como bacteria en pares y ocasionalmente en cadenas cortas. Además se distribuye extensamente en la naturaleza y es común en ambientes húmedos de los hospitales.

La *P. aeruginosa* es aerobio obligado que crece fácilmente sobre muchos tipos de medios de cultivo: Agar sangre agar chocolate y agar MacConKey; a veces produce un olor dulzón semejante a jugo de uvas o de maíz, forman colonias redondas, lisas de color verde fluorescente. Esta bacteria crece bien de 37 a 42°C, es oxidasa positiva, no fermentadora de carbohidratos.

Con frecuencia produce un pigmento fluorescente pioverdina, que difunde en agar, que confiere el color verdoso al agar, algunas cepas producen pigmento rojo oscuro piorrubina o el pigmento negro piomelanina.

#### **5.16.1. Características de crecimiento.**

La *P. aeruginosa* crece bien de 37 a 42 grados centígrados, es oxidasa positiva, no fermenta carbohidratos pero algunas cepas oxidan la glucosa.

#### **5.16.2. Pruebas diagnósticas de laboratorio**

**Frotis:** con frecuencia en los frotis se observan bacilos gramnegativos.

**Cultivo:** las muestras se colocan sobre agar sangre y en los medios diferenciales que comúnmente se emplean para crecer los bacilos entéricos gramnegativos.

La *P. aeruginosa* no fermenta la lactosa y es fácil de diferenciar de las bacterias que se la fermentan.



## 6. HONGOS

Los hongos (setas, mohos y levaduras) tienen células eucariontes (con núcleo verdadero). La mayoría de ellos son pluricelulares. Los hongos obtienen nutrientes absorbiendo compuestos orgánicos del medio ambiente.

Su reproducción puede ser por esporas asexual o sexual, se presentan en forma de levaduras que se reproducen por gemación y están formados por estructuras tubulares llamadas hifas. La ramificación y extensión de las hifas se conoce con el nombre de micelio.

### 6.13. *Cándida albicans*

Es una levadura difórmica que puede producir hifas verdaderas, sobre el medio en agar Saboraud las primeras 24 horas a 37°C produce colonias blandas de color cremoso con olor a levadura.

#### 6.13.1. Morfología e identificación.

Las pruebas morfológicas que diferencian a la *C. Albicans* de otras especies son: después de incubación en suero durante casi 90 minutos a 37°C, las células de *C. Albicans* empiezan a formar verdaderas hifas o tubos germinales y en un medio nutrimentalmente insuficiente *C. Albicans* produce clamidosporas grandes y esféricas. Se puede emplear la prueba de fermentación de carbohidratos (Auxonograma) el cual es positivo para este hongo. Otro medio que se basa en la reacción enzimática es la siembra en agar CHROMagar- *Cándida*, producen colonias para *C. albicans* de color azul verdoso.

#### 6.13.2. Pruebas diagnósticas de laboratorio

**Examen microscópico:** las muestras se examinan con hidróxido de potasio al 10% y calcoflúor blanco.

**Cultivo:** todas las muestras se cultivan en medio Saboraud a temperatura ambiente o a 37 grados centígrados. <sup>(10)</sup>

## 7. CEPAS ATCC

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

**Significado de ATCC:** American Type Culture Collection [ATCC], que es una Organización norteamericana no gubernamental sin fines de lucro que se ocupa de la preservación de las muestras de cultivos celulares y microbiológicos y de la distribución de los cultivos a los centros y laboratorios de investigación en las comunidades académica, científica y médica.

- *Escherichia coli* (ATCC 25922),
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008),
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883),
- *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 14207)
- *Cándida Albicans* (ATCC 10231).

Pueden obtenerse en las colecciones nacionales de cultivos. También se pueden adquirir en el comercio en forma de gránulos de cultivo puro desecado. <sup>(11)</sup>

## 8. MEDIOS DE CULTIVO

En el laboratorio los nutrientes se incorporan dentro de los medios de cultivo en el que se desarrollan las bacterias. Si un medio de cultivo cubre los requerimientos de una célula bacteriana, está se multiplicará en cantidades suficientes para permitir la visualización a simple vista. De hecho, el desarrollo bacteriano después de la siembra también requiere que los medios sean dispuestos en condiciones ambientales óptimas. Ya que algunas bacterias patógenas tienen necesidades nutricionales diferentes, se desarrollaron diversos tipos de medio de cultivo para su uso en el diagnóstico microbiológico. <sup>(12)</sup>

Los medios de cultivo empleados en este proyecto son:

### **8.1. Agar Chapman Manitol**

El agar Chapman Manitol es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *S. aureus*. En este medio las peptonas y el extracto de carne proporcionan la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El D. manitol es el carbohidrato. La alta concentración de cloruro de sodio inhibe el crecimiento de flora acompañante. El rojo de fenol actúa como indicador de pH. El agar es adicionado como agente solidificante. Sirve también como medio diferencial de cepas fermentadoras del manitol.

### **8.2. Agar MacConKey**

El Agar MacConKey es un medio selectivo y diferencial recomendado para el cultivo y aislamiento de microorganismos Gram negativos (*Enterobacteriaceae*). En este medio se aíslan y diferencian bacilos entéricos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de la lactosa.

Este medio contiene cristal violeta y sales biliares como inhibidores de organismos Gram positivos. Las colonias aisladas de bacterias que fermentan la lactosa son rosadas y pueden estar rodeadas de una zona de precipitado de sales biliares el cual es debido a una caída en el pH por la fermentación de la Lactosa.

### **8.3. Agar Cetrimide**

Se utiliza para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*. La peptona que contiene el agar 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, incluidos otras determinadas especies de *Pseudomonas* y organismos relacionados.

#### **8.4. Agar Sabouraud**

Este medio de cultivo es utilizado para cultivo de mohos y levaduras patógenas y no patógenas.

Este medio es utilizado para el cultivo de hongos patógenos, particularmente de aquellos asociados con infecciones de piel. La alta concentración de dextrosa y la acidez del pH hacen a éste un medio selectivo para hongos.

El bajo pH del medio resulta favorable para el crecimiento de los hongos y ligeramente inhibitorio para las bacterias

#### **8.5. Agar Mueller-Hinton**

El Agar Mueller Hinton es un medio utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en microorganismos por el método de Bauer-Kirby. En este medio la infusión de carne y la peptona de caseína proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos. <sup>(13)</sup>

### **9. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA**

La susceptibilidad antimicrobiana es 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.

La actividad antimicrobiana se mide in vitro en el laboratorio empleando microorganismos frente a medicamentos con concentraciones ya conocidas, de la misma forma hoy en día por estudios que han sido realizado en plantas se ha

comprobado que el método de difusión en agar modificado de determinación de susceptibilidad antimicrobiana pueden ser realizados en extractos de plantas; obteniéndose así resultados confiables.

## 9.1. ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

### 9.1.1. Antibiograma

Es el estudio de la sensibilidad del germen productor de la infección a los antimicrobianos.

Hay un doble interés en el antibiograma: Terapéutico y epidemiológico.

- El primer objetivo del antibiograma es el de medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico. El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales.
- El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país, es como puede adaptarse la antibioterapia empírica, revisarse regularmente los espectros clínicos de los antibióticos y adoptarse ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales.

Un microorganismo se considera **sensible** a un determinado antibiótico cuando este puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria (CMI), en el lugar de la infección. Se considera como CMI, la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo.

Un microorganismo se considera **resistente** a un antibiótico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección (líquidos, tejidos, sueros) no es suficiente para afectarle, o dicho de otra forma, que la concentración de la droga en aquel punto es inferior a la CMI necesaria para eliminar el germen, y que por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis.

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

#### **9.1.1.1. Tipos de antibiograma**

Según las necesidades respiratorias de los microorganismos, se pueden diferenciar los estudios de sensibilidad a los antibióticos y quimioterápicos en dos grupos, que utilizan distinta metodología para su realización:

- a) antibiograma para gérmenes aerobios.
- b) antibiograma para gérmenes anaerobios.

Cada uno de ellos presenta sus propias peculiaridades y difiere sustancialmente del otro. En ambos grupos, el estudio de sensibilidad se realiza incorporando el antimicrobiano en el medio de cultivo. Atendiendo a la forma en que se efectúa dicha incorporación y a la fase del medio, se clasifican en:

##### **9.1.1.1.1. Antibiogramas por dilución.**

- En medio líquido. Permite investigar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).
- En medio sólido. Permite investigar la (CMI) que en este caso coincide con la (CMB).

##### **9.1.1.1.2. Antibiogramas por difusión.**

- En medio sólido. Relaciona el resultado con la CMI. <sup>(14)</sup>

## **10. MÉTODOS DE ANTIBIOGRAMA BASADOS EN DILUCIÓN**

En los métodos de dilución en caldo, base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller-Hinton suplementado con los cationes magnesio y calcio. Los agentes antimicrobianos se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.

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

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un microorganismo (CMB) se debe realizar la prueba de actividad bactericida, que emplea el mismo sistema de dilución en caldo que para medir la sensibilidad.

Al mismo tiempo que la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento, inmediatamente después de ser sembrado, y se inocular también en una placa de agar para determinar el número real de unidades formadoras de colonias (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la incubación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación por el factor de dilución. Por ejemplo, usando un asa calibrada de 0,01 ml para sembrar la placa y contando unas 250 colonias, en 1 ml del tubo original habrá 250/0,01.

Una vez determinada la CMI, se siembra una cantidad conocida de inóculo de cada uno de los tubos de caldo que no presentaban turbidez en placas de agar (la pequeña cantidad del agente antimicrobiano que es llevada junto con el inóculo se elimina por dilución en el agar), y el número de colonias que crece en estos subcultivos, después de incubar durante la noche, se compara con el número de

UFC/ml del cultivo original. Dado que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0,1 % del inóculo original se denomina concentración bactericida mínima (CBM) o concentración letal mínima (CLM).

Las CMI y las CMB de un agente antimicrobiano pueden ser determinadas, con este método o con alguna variante, para cualquier bacteria que crezca en un medio líquido.

Pero según se pudo disponer de mayor número de agentes antimicrobianos para el tratamiento de una gran variedad de bacterias, se hicieron aparentes las limitaciones del macrométodo de dilución en caldo y se desarrollaron variantes de esta técnica que permitieran, por ejemplo, probar simultáneamente un germen aislado de un paciente frente a más de un agente antimicrobiano.

## **11. MÉTODOS DE ANTIBIOGRAMA BASADOS EN DIFUSIÓN**

Entre estos tenemos la técnica de Kirby Bauer.

### **Técnica de Kirby-Bauer**

El Método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

En este método, el antibacteriano o fármaco se difunde en la superficie del medio de cultivo en agar alrededor del disco que contiene el antibacteriano. La difusión se hace en forma radial, siendo más intensa en contorno del disco y disminuyendo hacia la periferia del medio.

### **Forma de aplicación:**

Sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad) se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas en forma pareja para obtener



después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel filtro impregnado con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. La elección de los antibióticos a probar depende del germen y del foco de infección. El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar en forma radial. Se incuba la placa por 18/24 horas a 37°C (respetar este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento del germen y la difusión del antibiótico dando halos irregulares difíciles de medir), luego se miden los halos de inhibición de desarrollo y se interpretan de acuerdo a tablas confeccionadas previamente. Los resultados se expresan como: *Sensible* (S), *Intermedio* o *Moderadamente sensible* (I) y *Resistente* (R).

### **Comportamiento de Inhibición**

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

1. La concentración de la droga
2. Sensibilidad bacteriana
3. Coeficiente de difusión de la droga en el agar
4. Tiempo y Temperatura de incubación
5. pH y composición del medio. Se usan preparados comerciales que den resultados reproducibles, por ejemplo: Agar Müller-Hinton. Son cultivos aceptados por el comité de la OMS para la normalización de las pruebas de susceptibilidad
6. Profundidad del medio en las placas. Esto está estandarizado: se emplean placas de 9 cm. de diámetro, y se agrega siempre el mismo volumen de medio de cultivo: 15 ml. por placa. De esta manera las placas poseen siempre la misma altura de agar
7. Tamaño del inóculo. Debe estar estandarizado ya que si éste es muy pequeño dará una sensibilidad mayor de la real y si el inóculo es muy denso pueden aparecer mutables resistentes. En los métodos de difusión

de mutantes resistentes aparecen como colonias aisladas dentro del halo de inhibición, por lo tanto esto indica que no se puede usar ese antibiótico y se debe informar como resistente. La forma rigurosa de estandarizar un inóculo es normalizando la turbidez por un método fotométrico utilizando una suspensión de Sulfato de Bario como estándar, según escala de Mac Farland. <sup>(15)</sup>

## **12. ANTIBIÓTICOS**

### **12.1. Definición.**

Los antibióticos son sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas, que a concentraciones bajas, inhiben el crecimiento o provocan la muerte de las bacterias.

La elección de uno u otro antibiótico en el tratamiento de una infección depende:

- Del microorganismo (obtenido por cultivo o supuesto por la experiencia),
- De la sensibilidad del microorganismo (obtenida por un antibiograma o supuesta por la experiencia),
- La gravedad de la enfermedad,
- La toxicidad,
- Los antecedentes de alergia del paciente y
- El costo.

### **12.2. Discos de antibiótico:**

Pueden utilizarse cualquier disco comercial con un diámetro y una concentración apropiados. De preferencia, estos discos deben guardarse a -20°C para ello se puede recurrir al congelador de un refrigerador doméstico, donde pueden conservarse hasta por un mes unos cuantos discos para irlos utilizando.

Cuando se vayan a usar, los recipientes se sacarán del refrigerador y se dejarán a la temperatura ambiente por espacio de una hora aproximadamente para que se equilibre la temperatura. <sup>(16)</sup>

## 13. CONTROL DE CALIDAD DE LOS PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

### 13.1. Control de calidad de los medios empacados

Con los medios de cultivo se deben establecer tres tipos de controles antes de considerarlos aptos para utilizar.

**Control de esterilidad:** se efectúa incubando algunas placas, escogidas del lote al azar (5 por 100), durante dos días a 35 °C y cinco días a temperatura ambiente. El resto de las placas se guarda en refrigerador a 4°C, y solo se utiliza si el grupo control muestra ausencia de cualquier tipo de crecimiento después de los 7 días.

**Control de calidad:** se realiza para comprobar que el medio contiene aquellos componentes que le caracterizan. Para las comprobaciones se utilizan por lo menos dos gérmenes distintos, uno que crece sobre el medio, o da positiva una determinada prueba, y otro que no crece, o la da negativa.

**Control de caducidad:** para ponerlo en práctica es necesario que en el momento de empaque se rotule en algún lugar visible de la placa la fecha de preparación, además del nombre del medio. De esta manera se podrá saber en todo momento el tiempo que falta para llegar al límite de su utilización.

### 13.2. Control de calidad de los antibiogramas

En una situación ideal, para detectar y definir los mecanismos de resistencia bacteriana se necesitaría una combinación basada en metodología convencional y molecular; sin embargo, en países en desarrollo esto no es posible en el laboratorio de rutina. Como una medida alternativa para solucionar lo anterior, surgieron los sistemas expertos que son bases de datos con reglas establecidas acerca del comportamiento de bacterias y antibióticos, según el género y la especie de bacteria, el tipo de antibiótico y los mecanismos de resistencia. Estos programas son utilizados por los equipos automatizados y semiautomatizados de identificación bacteriana.

La prueba de sensibilidad a los antibióticos consta de varios elementos que deben ser tenidos en cuenta: El medio de cultivo, inóculo, incubación, lectura e interpretación y el reporte.

**Control de calidad del medio de cultivo:**

- a) Utilizar agar de Mueller-Hinton.
- b) La calidad del agua es determinante, ya que la misma debe estar libre de iones metálicos. Un contenido excesivo en catión, reducirá la zona de inhibición, mientras que un escaso contenido en catión, puede dar un inaceptable aumento en el tamaño de la zona.
- c) Volúmenes mayores de medio provocan disminución en el tamaño del halo de inhibición, y volúmenes menores halos más pequeños.
- d) Se deben seguir las normas generales establecidas para almacenamiento del medio de cultivo.
- e) Los platos Petri deben ser colocados en la incubadora para secarlos de restos de agua producto de la condensación, antes de ser utilizados para no diluir el inóculo bacteriano.

**13.3. Control de calidad de los discos de sensibilidad:**

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

- a) Los discos deben ser almacenados a una temperatura entre  $-20$  y  $+8^{\circ}\text{C}$ .

### **Control de calidad de la lectura e interpretación:**

El técnico debe estar bien preparado para poder interpretar de la manera correcta los resultados obtenidos en el antibiograma.

### **Verificación de antibiogramas atípicos:**

- a) Examine primero por errores de transcripción.
- b) Reexamine el plato de sensibilidad.
- c) Evalúe reportes previos del paciente para observar su patrón de sensibilidad anterior.
- d) Repita los test de identificación y sensibilidad a los antibióticos.

### **13.4. Control de calidad de las cepas atcc**

Las cepas de control se mantienen en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medios para la conservación de cepas con el fin de preservar su viabilidad y minimizar posibles modificaciones. <sup>(17)</sup>

### **13.5. Control de calidad de equipos y materiales de trabajo:**

#### **13.5.1. Incubadoras:**

- a. Controle diariamente la temperatura de las incubadoras, antes de sacar los platos y anote en una hoja control el resultado.
- b. Observe el termorregulador por cualquiera alteración en su posición preestablecida.
- c. Coloque las muestras, platos y tubos, en una posición segura.
- d. Un papel de filtro humedecido con agua en el fondo de la incubadora, es adecuado para mantener la humedad requerida.
- e. El jefe de sección debe ser notificado cuando una incubadora falla en mantener el rango de temperatura aceptable.
- f. Observe macroscópicamente las cajas Petri para observar desecación.
- g. Todas las incubadoras deben ser limpiadas mensualmente y llevar un récord de mantenimiento preventivo.

### **13.5.2. Autoclaves:**

#### **Procedimiento Por corrida Diario Semanal Mensual**

1. Examine récord de Temperatura y Presión diario.
2. Utilice Indicadores de Esterilización semana.
3. Récord de uso, fecha, temperaturas, presión diariamente.
4. Chequeo del nivel de agua diario.
5. Uso de Indicadores biológicos de Esterilidad mensual.
6. Chequeo de la válvula de seguridad mensualmente.
7. Limpieza del Interior y Exterior Semanal.
8. Limpieza de la Pantalla de Temperatura diario.
9. Limpieza del drenaje y sellos semanal.

### **13.5.3. Cámaras de seguridad:**

- a. Apague la lámpara Ultravioleta antes de comenzar a trabajar.
- b. Prenda el blower 15 minutos antes de utilizar.
- c. Observe que no se obstruye el flujo de aire.
- d. Si hay derrame dentro de la cabina, limpie con un desinfectante apropiado, manteniendo apagada la cabina.
- e. Evite el uso de mecheros de flama dentro de la cabina.
- f. Lleve un control de la medida del flujo de aire.
- g. Lleve un control de la calibración del flujo de aire.
- h. Lleve un control del remplazo de los filtros.
- i. Compruebe los sistemas de alarma de funcionamiento.
- j. La superficie interior de la mesa de trabajo de la cabina, puede ser cultivada semanalmente para detectar contaminación.
- k. Desinfecte la cabina antes y después de utilizar.
- l. No utilice las cabinas biológicas para hacer mezclas de sustancias químicas y viceversa.
- m. Cuando trabaje en la cabina, evite la entrada brusca de aire y el uso innecesario de las puertas del área.

#### **13.5.4. Refrigeradoras:**

- a. Control diario de la temperatura.
- b. Coloque las cajas Petri en posición invertida con la tapa hacia abajo.
- c. Mantenga la temperatura entre 4 – 8 ° C.
- d. Utilice refrigeradoras que no hacen escarcha.
- e. No coloque medios de cultivo a un ligeramente caliente dentro de la refrigeradora.
- f. Evite abrir con frecuencia la puerta de la refrigeradora.
- g. Lleve un registro de problemas de funcionamiento, causa y solución.
- h. No guarde alimentos en refrigeradoras para especímenes clínicos. <sup>(18)</sup>

### **14. Mantenimiento de registros**

Todos los resultados de control de calidad se deben registrar en un formulario adecuado de control de calidad, en el que se anotan las acciones correctivas. Si se ajusta la temperatura o se repite una prueba bioquímica se deben anotar las lecturas nuevas dentro de los límites de tolerancia. Los registros de control de calidad se deben guardar durante dos años por lo menos, salvo lo de equipamiento, que se deben guardar durante la vida útil de cada instrumento. <sup>(19)</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **TIPO DE ESTUDIO.**

El presente estudio está enmarcado en la modalidad de la investigación experimental.

## **ÁREA DE ESTUDIO**

La zona de estudio en el presente proyecto es la provincia de Zamora Chinchipe. Posee una extensión de 15.556 Km<sup>2</sup>. La mayor parte del territorio se encuentra cubierto por bosques donde se puede apreciar una exuberante flora y fauna.

## **UNIVERSO.**

Plantas propias de la provincia de Zamora Chinchipe de uso medicinal.

## **MUESTRA.**

Extracto etanólico de *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum*.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Plantas propias de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Plantas usadas para tratar procesos infecciosos.
- Plantas que no cuenten con estudios realizados.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Plantas que se encuentren en peligro de extinción.
- Aquellas plantas que ya cuenten con estudios previos similares.

## **PROCEDIMIENTOS**

Realización de pruebas piloto:

Las pruebas piloto se realizaron con la finalidad de validar el método utilizado mediante la elaboración de protocolos para la evaluación de la actividad antimicrobiana adaptada a plantas de uso medicinal los mismos que

permanecerán en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana, como constancia de la investigación realizada, que servirá como guía para posteriores estudios de este tipo.

- Se realizó pruebas con antibióticos conocidos como la Amikacina que se impregnaron en los discos y se observó difusión en el medio frente a una cepa microbiana. (Ver protocolo N° 27)
- Se realizaron los medios de cultivo y para control de calidad se dejó un lote en la incubadora por 48 horas de 35 a 37 grados centígrados. (Ver protocolos N° 2 a 10)
- Para la realización del inóculo se realizó la escala de MacFarland con la lectura en el espectrofotómetro y de aquí se utilizó el tubo 5 para comprobar con el inóculo realizado con solución salina. (Ver protocolos N° 20 y 21)
- Se comprobó la viabilización de las cepas siguiendo la técnica dada por cada casa comercial al realizar un pase sobre un medio específico (Ver protocolos N° 22 a 26) y se realizó las pruebas bioquímicas de la cepa para identificarla. (ver protocolos N° 11 a 19)
- Se realizó la actividad antimicrobiana con la cepa de *E. coli* y el extracto de clavo de olor, obteniendo resultados positivos en la actividad antimicrobiana. (Ver protocolos N° 28 y 29)
- Se realizó la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida realizando las distintas diluciones del extractos de clavo de olor, utilizando caldo tripticasa soja a una concentración similar al tubo 5 de la escala de MacFarland al que se diluye 1/200 obteniéndose una concentración microbiana final de  $10^5$ - $10^6$  e incubando durante 24 horas, considerando como CMI la del tubo con mayor dilución del extracto que no presenta aumento de turbidez. (Ver protocolos N° 30 y 31)

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

Se parte de un extracto concentrado de *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum*, el mismo que proviene de la planta secada y macerada de 24 a 48 horas y extracciones sucesivas hasta agotamiento.

El extracto concentrado en rota vapor se diluyó con una mezcla Etanol-Agua y se preparó tres concentraciones del extracto 1: 100, 1: 1000, 1:10000

Con el extracto concentrado se preparó diluciones 1: 100, 1: 1000, 1:10000.

Para preparar los discos utilizamos papel Whatman Nro. 1, los mismos que deben tener un diámetro de 6 mm y 0.6 mm de espesor, a los cuales se les agregó 20 ul de cada dilución con una concentración de 200 ug/20ul, 20 ug/20 ul y 2 ug/20 ul. (Ver protocolos N° 27)

### **FASE 2 Preparación de los cultivos bacterianos**

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

- *Escherichia coli* (ATCC 25922),
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008),
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883),
- *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 14207)
- *Cándida Albicans* (ATCC 10231).

De las cepas conservadas en refrigeración se realizó siembras por estría en medios de cultivo adecuados de acuerdo al tipo de bacteria: Agar Chapman Manitol, Agar MacConKey, Agar Cetrimide, Agar Sabouraud dextrosa, se incubó por 24 horas a 37°C en aerobiosis. Se realizó pases sucesivos de tal manera que se asegure que la cepa se encuentre en la fase de crecimiento exponencial. (Ver protocolos N° 22 a 26)

El inóculo se preparó por suspensión de las cepas en caldo tripticasa soja, equivalente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland ( $10^8$  UFC/ml). (Ver protocolos N° 20 y 21).

### **FASE 3 Evaluación de la actividad antimicrobiana**

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó un método:

- Método cualitativo de difusión en agar con discos impregnados basada en el método de Kirby-Bauer modificado.
- Las pruebas se realizaron por duplicado de cada dilución para mayor eficacia del método aplicado.

#### **Método de difusión en Agar**

Para esta técnica se preparó placas Petri con Agar Müeller-Hinton en el caso de las bacterias o Agar Sabouraud Dextrosa en el caso de la levadura, una vez solidificado se preparó el inóculo de cada microorganismo al patrón de turbidez MacFarland N° 0.5 descrito anteriormente, se sembró en la superficie del agar con un asa estéril. Luego se colocó en la superficie del agar inoculado los discos de papel de filtro previamente impregnados con 20ul de las diferentes concentraciones de los extractos y con controles negativos (etanol-agua destilado) y controles positivos que son los discos estándares de antibiótico de referencia para cada microorganismo en particular.

Los medios de cultivos inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas las bacterias y 48 horas los hongos. (Ver protocolos N° 28 y 29)

### **FASE 4 Difusión de resultados**

Para la difusión de resultados realizaron los integrantes del proyecto de fitoquímica, con la autorización adecuada de la coordinadora el 14 de diciembre de 2012 a las 16 horas, se citaron en el auditorio a estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico que se encuentran cursando el módulo de microbiología y se realizó una presentación con los resultados obtenidos y entrega de trípticos con el fin de contribuir al conocimiento científico sobre medicina tradicional.

## **IV. RESULTADOS**

**TABLA N. 1**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PLANTA  
*Zornia reticulata* FRENTE A 5 MICROORGANISMOS.**

NOMBRE CIENTÍFICO: <i>Zornia reticulata</i> NOMBRE COMÚN: CHANCA PIEDRA					
MICROORGANISMO	DILUCIONES DEL EXTRACTO			CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO Etanol al 70%
	1/100	1/1.000	1/10.000		
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Ciprofloxacina	Negativo
				31mm (s)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Ampicilina + Sulbactan	Negativo
				27mm (s)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Amoxicilina + Acido clavulánico	Negativo
				15mm (s)	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Gentamicina	Negativo
				24mm (s)	
<i>Candida albicans</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Fluconazol	Negativo
				24mm (s)	

**LEYENDA:** (s) sensible, (mm) milímetros.

**FUENTE:** Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y tóxicas de la región sur del Ecuador.

**AUTOR:** Andrea Alvarado.

**INTERPRETACIÓN:**

En las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 del extracto etanólico de *Zornia reticulata*, frente a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* presentó crecimiento bacteriano alrededor del disco lo que indica resistencia de dichos microorganismos frente al extracto y al control negativo, en tanto que en el control positivo no mostro crecimiento microbiano alrededor del disco.

El CMI y CMB no se realizó, ya que los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Zornia reticulata*, frente a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* fueron negativos.

**TABLA N. 2**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PLANTA  
*Cestrun sendtherianum* FRENTE A 5 MICROORGANISMOS.**

NOMBRE CIENTÍFICO: <b><i>Cestrun sendtherianum</i></b>						
NOMBRE COMÚN: <b>SAÚCO</b>						
MICROORGANISMO	DILUCIONES DEL EXTRACTO			CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO etanol al 70%	
	1/100	1/1.000	1/10.000			
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Ciprofloxacina	Negativo	
				30mm (s)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Ampicilina + Sulbactan	Negativo	
				29mm (s)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Amoxicilina + Acido clavulánico	Negativo	
				16mm (s)		
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Gentamicina	Negativo	
				24mm (s)		
<i>Candida albicans</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Fluconazol	Negativo	
				24mm (s)		

**LEYENDA:** (s) sensible, (mm) milímetros.

**FUENTE:** Proyecto de plantas medicinales, plaguicidas y tóxicas de la región sur del Ecuador.

**AUTOR:** Andrea Alvarado.

**INTERPRETACIÓN:**

En las diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 del extracto etanólico de la planta *Cestrun sendtherianum*, frente a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* presentó crecimiento bacteriano alrededor del disco lo que indica resistencia de dichos microorganismos frente al extracto y al control negativo, en tanto que en el control positivo no mostro crecimiento microbiano alrededor del disco.

El CMI y CMB no se realizó, ya que los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la planta *Cestrun sendtherianum*, frente a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* fueron negativos.

## **V. DISCUSIÓN**



En el presente estudio se evaluó la actividad in vitro de dos extractos etanólicos de las especies vegetales *Zornia reticulata* (flores y tallo) y *Cestrun sendtherianum* (hojas y flores) frente a cuatro cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 14207) y a una cepa micótica *Cándida Albicans* (ATCC 10231), empleando diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000, control positivos (antibióticos) y control negativo (disco con etanol al 70%).

El resultado obtenido de *Zornia reticulata* que pertenece a la familia Fabaceae tiene relación con un estudio de la familia Fabaceae género *Cassia grandis* del artículo “ Evaluación de la actividad contra *Fonsecaea pedrosoi* usada en Guatemala para el tratamiento de infecciones mucocutaneas” realizado por Ana Beatriz Suárez Días de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias químicas y farmacia, en donde utilizaron hojas frescas de la especie vegetal obteniéndose resultados negativos en la actividad antimicrobiana para la cepa microbiana empleada utilizando extracto etanólico al 95% con el método de difusión en agar, a diferencia del estudio realizado de *Zornia reticulata*, que se utilizó extracto etanólico al 70% y las partes de la especie vegetal fueron las flores y tallo. Esto sería comparable con los resultados obtenidos en los ensayos del proyecto titulado “Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* por el método de difusión en agar” realizado por estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

No así el estudio de la actividad antimicrobiana de *Zornia reticulata* se diferencia de otro estudio de la misma familia Fabaceae género *Cassia reticulata* sobre “Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-Oriente peruano” por Julio Ruíz y Mirtha Roque de la Facultad de Farmacia y Bioquímica en el año 2009, utilizando la parte entera de la especie vegetal, en donde se obtuvieron extractos etanólico, metanólicos e hidroalcoholicos con el método de difusión en agar contra cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*, dando resultados positivos.

Según el estudio realizado de la familia Solanaceae género *Solanum americanum Mill*, con el tema “Actividad antimicrobiana del extracto acuoso de hojas secas de *Solanum americanum Mill*” elaborado por María Julia Martínez y colaboradores de la revista Cubana de plantas medicinales, 2009; se obtuvo actividad antimicrobiana frente a *C. Albicans* que pueden ser atribuidos a los metabolitos secundarios que se encuentran en esta especie, a diferencia de *Cestrun sendtherianum* que pertenece a la misma familia Solanaceae y es la planta que se estudió en este proyecto no presentó actividad antimicrobiana a ninguna de las cepas bacterianas ni al hongo *C. Albicans*.

Finalmente se puede concluir que en extracto etanólico de *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum*, no presentaron actividad antimicrobiana según la metodología empleada, sin embargo no se descarta la posibilidad de que presente dicha actividad, por el empleo de otras metodologías, diferentes solventes en el proceso de extracción de los principios activos de las plantas o distintas concentraciones de las diluciones y la utilización de un mayor número de microorganismos.

## **VI. CONCLUSIONES**

Al obtener los resultados del presente trabajo investigativo se puede concluir lo siguiente:

- El extracto etanólico al 70% de las plantas *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* frente a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; no presentó actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar en la diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000.
- El extracto etanólico al 70% de las plantas *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* frente a *C. albicans*; no presentó actividad antifúngica mediante el método de difusión en agar en la diluciones 1/100, 1/1.000 y 1/10.000.
- Se difundió los resultados de la investigación realizada a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja que se encuentren cursando el módulo de Microbiología.
- En conclusión el extracto etanólico al 70% de las plantas *Zornia reticulata* y *Cestrun sendtherianum* con la metodología que se empleo en este proyecto presentaron resultados negativos en la actividad antimicrobiana frente a los cinco microorganismos utilizados, pero cabe indicar que si se aplica otros métodos, diferentes solventes o distintas concentraciones de la diluciones puede presentar dicha actividad.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Al finalizar el presente trabajo investigativo se recomienda:

- Realizar el estudio de la actividad antimicrobiana de las plantas empleando nuevos métodos y se hagan a toda las partes de las plantas por individual.
- Medir el pH de medio Mueller Hinton en cada preparación ya que se altera por diversos factores.
- Verter los medios en un lugar nivelado y colocar exactamente 20 ml de agar a cada caja.
- Llevar el control de temperatura de la incubadora y el control de calidad de los medios preparados.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Bermúdez, A. Etnobotánica sobre plantas medicinales. INCI. Caracas Agosto, 2005; 8: 30.
2. Rangel, D; García, I. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos, acetónico y acuoso. Revista de la facultad de farmacia. (42). 2001.
3. Naranjo, P; Escaleras, R. La medicina tradicional en el Ecuador, 1<sup>ra</sup> Ed. Quito, Corporación editorial nacional.
4. Segunda parte: plantas medicinales promisorias de la amazonia. [Internet]. [Consulta 29 de agosto del 2011. Hora 20:46 pm]. Disponible. <http://www.siamzonía.org.pe/archivos/publicaciones/amazonia/libre.html>.
5. Rangel, D; García, I. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos, acetónico y acuoso. Revista de la facultad de farmacia. (42). 2001.
6. Muñoz, F. plantas medicinales y aromáticas. 4<sup>ta</sup> Ed. España: Artes Gráficas Cuesta, S.A; 2002: p. 15.
7. *Zornia reticulata*. [Internet]. [Consulta 1 de octubre del 2011. Hora 20:46]. Disponible: <http://www.fitoperu.com/plantas-top.php?pub=19>.
8. *Cestrun sendtherianum*. [Internet]. [Consulta 1 de octubre del 2011. Hora 20:46 pm]. Disponible: <http://www.hierbitas.com/nombrecomun/Sauco.htm>.
9. Lock, O de. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. [Internet]. [Consulta 20 de Septiembre del 2011. Hora 20:46 pm]; 41-64. Disponible: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>.



10. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 18<sup>a</sup> Ed. México: El Manual Moderno; 2005: p. 51–54.
11. Romero, M. LAS CEPAS ATCC Herramienta indispensable en el Control de Calidad Interno en Microbiología. [Internet]. [Consulta 25 de Septiembre del 2011]; Disponible en: [www.microbiologics.com](http://www.microbiologics.com).
12. Bailey & Scott: Diagnostico microbiológico. 11<sup>a</sup> Ed. Editorial medica panamericana. Buenos Aires 2004: p. 137.
13. Koneman. Diagnostico microbiológico. 6<sup>a</sup> Ed. Editorial Médica Panamericana. 2008: p. 1111.
14. Álvarez M.V; BOQUET, E; FEZ, M. I. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1<sup>ra</sup>Ed. Marzo 1995: p. 227 - 229.
15. Gamazo Carlos, López Ignacio. Manual práctico de Microbiología. 3<sup>ra</sup> Ed: Barcelona-España: Masson S.A; 2005: p. 21, 45. 131.
16. Álvarez M.V; BOQUET, E; FEZ, M. I. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1<sup>ra</sup> Ed. Marzo 1995: p. 38.
17. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica. 1993: p. 85-94.
18. Manual de control de calidad en Microbiología clínica. [Internet]. [Consulta 24 de Septiembre del 2011. Hora: 21:12pm]; Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos/mmbiologia/mmbiologia.shtml>
19. John Bernad Henry. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9<sup>na</sup> Ed., microbiología. p. 21.

# ÍNDICE DE ANEXOS

## **ANEXO Nº 1**

Certificado de realización de ensayos.

## **ANEXO Nº 2**

Autorización para la realización de la difusión de resultados.

## **ANEXO Nº 3**

Fotos de la realización de la tesis.

## **ANEXO Nº 4**

Tríptico.

## **ANEXO Nº 5**

### **PROTOCOLOS.**

**Protocolos Nº. 1:** BIOSEGURIDAD

**Protocolos Nº. 2:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: AGAR SANGRE

**Protocolos Nº. 3:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: MAC-CONKEY

**Protocolos Nº. 4:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL AGAR: MUELLER HINTON

**Protocolos Nº. 5:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO: AGAR CHAPMAN MANITOL

**Protocolos Nº. 6:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR CETRIMIDE.

**Protocolos Nº. 7:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: CALDO TRIPTICASA DE SOJA.

**Protocolos Nº. 8:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR TRIPTICASA DE SOJA.

**Protocolos Nº. 9:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: AGAR DEXTROSA SABOURAUD.

**Protocolos Nº. 10:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: CALDO AGAR DE INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN.

**Protocolos Nº. 11:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO CITRATO DE SIMMONS.

**Protocolos Nº. 12:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO TRIPLE AZUCAR HIERRO: TSI

**Protocolos Nº. 13:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO SULFURO INDOL MOVILIDAD (SIM).

**Protocolos Nº. 14:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FENILALANINA DESAMINASA.

**Protocolos Nº. 15:** PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA PRUEBA DE LA CATALASA.

**Protocolos Nº. 16:** PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA PRUEBA DE LA COAGULASA.

**Protocolos Nº.17:** PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN MICÓTICA: KOH.

**Protocolos Nº. 18:** PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN DE GRAM.

**Protocolos Nº. 19:** PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL TEST DE FILAMENTACIÓN.

**Protocolos Nº. 20:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL PATRÓN N.- 5 DE MAC FARLAND.

**Protocolos Nº. 21:** PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

**Protocolos Nº. 22:** VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Staphylococcus aureus*.

**Protocolos Nº. 23:** VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Escherichia coli*.

**Protocolos Nº. 24:** VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Kebsiella pneumoniae*.

**Protocolos Nº.25:** VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Pseudomona aeruginosa*.

**Protocolos Nº.26:** VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Cándida albicans*.

**Protocolos Nº. 27:** PREPARACION DE DISCOS DE SENSIBILIDAD.

**Protocolos Nº. 28:** PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCOS.

**Protocolos Nº. 29:** PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCOS.

**Protocolos Nº. 30:** PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN LA EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.

**Protocolos Nº. 31:** PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA EN LA EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.

**ANEXO N° 1**

**ANEXO N° 2**

ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

1. *ZORNIA RETICULATA*



2. *CESTRUM SENDTHERIANUM*



REALIZACIÓN DE DILUCIONES

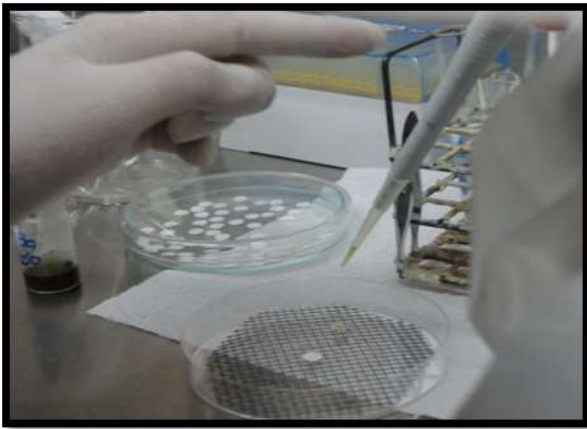


## ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

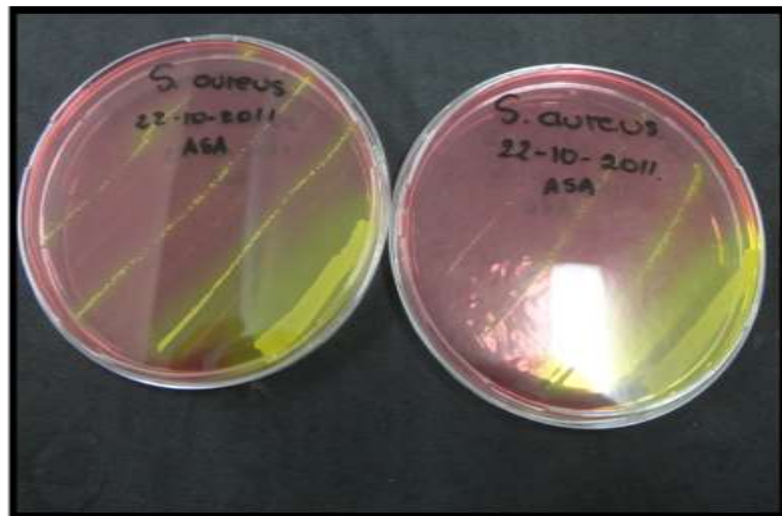




## IMPREGNACIÓN DE DISCOS

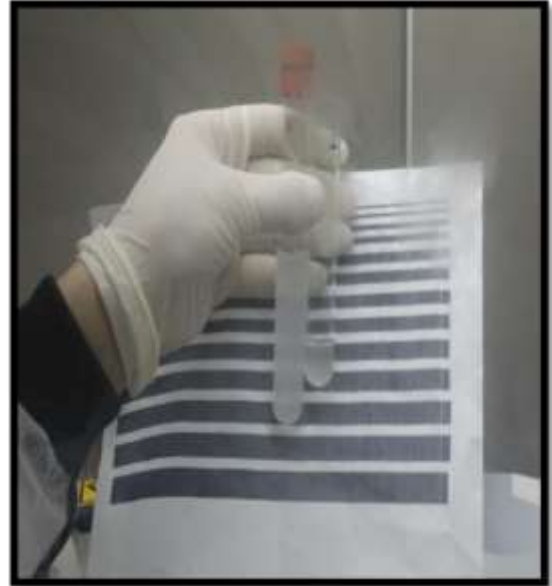


## RECONSTITUCIÓN DE CEPAS ATCC



## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

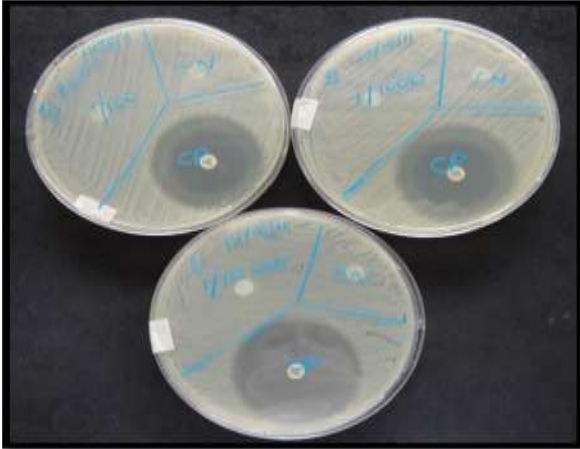
### PREPARACIÓN DE INOCULO



### ESTRIACIÓN EN EL MEDIO Y COLOCACIÓN DE DISCOS



## LECTURA DE RESULTADOS



## DIFUSIÓN DE RESULTADOS





**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* (E. Schum) Pymoull, *Zornia reticulada*, *Croton comosus*, *Caphos racemosa* (L.) Spreng, *Hallimolobos hispida* (JAC) O.E.Schultz, *Calatola costaricensis* Standl y *Cestrum sandwicense* se obtuvieron resultados negativos en las diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10.000.

frente a las bacterias *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (29823), *Methicillin Pseudomonas* (13845), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) y el hongo *Candida 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 observaron 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*, *Croton comosus*, *Caphos racemosa*, *Hallimolobos hispida*, *Calatola costaricensis*, *Cestrum sandwicense* no presentaron actividad antibacteriana ni antifúngica frente a *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (29823), *Methicillin Pseudomonas* (13845), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) y *Candida 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, David Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera.



**CEDAMAZ**



**PROYECTO DE PLANTAS MEDICINALES, PLAGUICIDAS Y TIÑEAS DE LA RES. SVTU. DRO. FITOQUÍMICO Y DE BIOMAGNITUD EN ZAMORA CHINCHIPE**

**TEMA:**  
Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Piper pseudochurumayo*, *Olyra latifolia*, *Oryctanthus alveolatus*, *Sida poeppigiana*, *Zornia reticulada*, *Croton comosus*, *Caphos racemosa*, *Hallimolobos hispida*, *Calatola costaricensis*, *Cestrum sandwicense*.

**OBJETIVOS**

**- General:**  
Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Piper pseudochurumayo*, *Olyra latifolia*, *Oryctanthus alveolatus*, *Sida poeppigiana*, *Zornia reticulada*, *Croton comosus*, *Caphos racemosa*, *Hallimolobos hispida*, *Calatola costaricensis*, *Cestrum sandwicense* plantas medicinales de uso tradicional de la Provincia de Zamora Chinchipe por el método de difusión en agar.

**- Específico:**  
Conocer la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Piper pseudochurumayo*, *Olyra latifolia*, *Oryctanthus alveolatus*, *Sida poeppigiana*, *Zornia reticulada*, *Croton comosus*, *Caphos racemosa*, *Hallimolobos hispida*, *Calatola costaricensis*, *Cestrum sandwicense*.

Determinar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de *Piper pseudochurumayo*, *Olyra latifolia*, *Oryctanthus alveolatus*, *Sida poeppigiana*, *Zornia reticulada*, *Croton comosus*, *Caphos racemosa*, *Hallimolobos hispida*, *Calatola costaricensis*, *Cestrum sandwicense*.

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 muerte mortalidad en el País y la Provincia de Zamora Chinchipe.

es por ello que surge la necesidad de recurrir a plantas medicinales que han sido utilizadas de generación en generación por los pobladores como primera alternativa rápida y económica para controlar diversas patologías, ya que las comunidades de esta provincia tienen acceso limitado a la medicina occidental y a la deficiente infraestructura sanitaria.

La Universidad Nacional de Loja a través de la Carrera de Laboratorio Clínico y el Centro de estudios y desarrollo de la Amazonia (CEDAMAZ) promueve la investigación científico-técnica sobre los problemas del entorno, en el desarrollo económico y social de la Amazonia Ecuatoriana mediante la ejecución del Proyecto de Plantas Medicinales, Plaguicidas y Tiñeas de la Región Sur del Ecuador: Estudios Fitogénicos y de Biomagnitud en Zamora Chinchipe, esta enfocada en la evaluación antimicrobiana complementada con estudios microbiológicos de las plantas usadas con fines medicinales, recuperando de esta manera los conocimientos ancestrales de los sanadores de la Provincia de Zamora Chinchipe, además de brindar un aporte científico sobre el uso correcto de las plantas medicinales.

**METODOLOGÍA**

**Estandarización de procedimientos**  
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, resistencias.**





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

PR-NB  
UNL- 1

#### 1. TITULO: BIOSEGURIDAD

- 2. OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado sobre normas y procedimientos de bioseguridad.
- 3. ALCANCE:** Aplicar las buenas prácticas de Laboratorio en cuanto a bioseguridad en el Laboratorio Clínico de Microbiología del Centro de Diagnóstico del Área de la Salud Humana de la UNL.

#### 4. RESPONSABLES:

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

#### 5. DEFINICIONES:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<p style="text-align: center;"><b>Normas de Bioseguridad para el Laboratorio de microbiología</b></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>- El acceso al laboratorio estará limitado solo al personal autorizado.</li><li>- En la zona de laboratorio no se permitirá comer, guardar alimentos, beber, fumar, ni usar cosméticos.</li><li>- Las superficies de trabajo se deben descontaminar antes y después de cada jornada de trabajo y siempre que haya un derrame.</li><li>- Utilizar cabina de bioseguridad biológica, no olvidar encender la lámpara y el flujo antes de abrir la ventana.</li><li>- Colocar el símbolo de riesgo biológico en las áreas biocontaminadas.</li><li>- No guardar alimentos en las neveras ni en los equipos de refrigeración de trabajo deben ser confortables.</li><li>- El transporte de las muestras dentro o entre laboratorios se realizará en cajas herméticas, para evitar que se produzcan salpicaduras.</li><li>- Todos los cultivos se autoclavan antes de ser eliminados.</li><li>- Todos los desechos biológicos ya sean líquidos o sólidos deben ser descontaminados antes de eliminarlos.</li></ul>

2	<p style="text-align: center;"><b>Normas de Bioseguridad para el Personal del Laboratorio</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilizar terno protector, mandil, guantes, gorro, mascarilla, zapatos adecuados y gafas para evitar la contaminación con los microorganismos.</li> <li>- Nunca se pipeteará con la boca.</li> <li>- Todo el personal se lavará las manos al ingresar al laboratorio y después de haber manipulado material y al salir del laboratorio.</li> <li>- Quitarse los guantes para utilizar equipos o instrumentos no contaminados como teléfonos, computadoras, y material de escritorio</li> <li>- Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al Supervisor y al Jefe del Laboratorio y hacerse constar por escrito.</li> <li>- El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido.</li> <li>- Emplee mascarilla y protectores oculares durante procedimientos que salpicaduras, aerosoles o derrames importantes de sangre u otros líquidos orgánicos.</li> <li>- Absténgase de tocar con las manos enguantadas alguna parte de su cuerpo puedan generar salpicaduras o gotitas aerosoles de sangre u otros líquidos corporales.</li> <li>- Evite la atención directa de pacientes si usted presenta lesiones exudativas o curitas.</li> <li>- Mantenga actualizado su esquema de vacunación contra Hepatitis B.</li> <li>- Evitar las distracciones y permanecer en el lugar de trabajo.</li> </ul>
---	---	---

**8. AUTORES:**

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.





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

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

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

**4. RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5. DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones</b>	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	<b>Pesaje</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.

4	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	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	<b>Colocación de la sangre humana desfibrinada</b>	Enfriar el medio de cultivo preparado hasta la temperatura entre 45-50°C, agregar sangre desfibrinada al 5% y homogenizar.
6	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
8	<b>Almacenamiento y conservación</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2-8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 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 MacConKey.

**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 MacConKey:** 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 ácido. Las sales biliares y el cristal violeta actúan como inhibidores, además este medio tiene sustancias inhibidoras de Gram positivos.

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

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

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

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

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

## 7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones	Leer el envase del polvo para la preparación de Agar Sangre (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual se debe suspender 49.53 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	Pesaje	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer. Limpiar la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Anadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	Disolución del polvo a través de una fuente de calor	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.

4	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2-8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 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 °C) o en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente con las tapas entreabiertas hasta que el exceso de humedad de la superficie se evapore (generalmente entre 10 y 30 minutos).

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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	<b>Medición del pH.</b>	Colocar 5ml de medio de cultivo en un tubo de ensayo, esperar que se solidifique, introducir una varilla, realizar un orificio y con la ayuda de la aguja del potenciómetro introducir en el orificio del agar y medir el pH; que oscile ente (7,2 ± 0.2 a 7,4), a temperatura ambiente (25°C).



6	<b>Distribución del medio de cultivo y solificación.</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
7	<b>Control de calidad del medio de cultivo.</b>	<p>Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35<sup>o</sup>-37<sup>o</sup>C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.</p> <p>Comprobar si hay signos de deterioro como: contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, o agrietamiento en el medio de cultivo el lote debe ser eliminado.</p>
8	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	<p>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.</p> <p>Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8<sup>o</sup>C, hasta que el medio sea utilizado.</p> <p>La duración de este medio de cultivo es de 7 a 14 días.</p>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

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

## 4. RESPONSABLES:

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

## 5. DEFINICIONES:

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

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

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

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

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones</b>	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	<b>Pesaje</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.
4	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2-8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

PR-AC-  
UNL-6

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 Cetrímide.

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	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	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

PR-CTS-  
UNL-7

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

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

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

4. **RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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



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

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

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

### 7. DESARROLLO:

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

4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	elástico. Se escribe en el papel el tipo de medio de cultivo que se ha preparado. Se lleva a autoclave a 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

PR-ATS-  
UNL-8

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

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

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

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

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.

4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

PR-ADS-  
UNL-9

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

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

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

4. **RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.

3	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	<b>Distribución del medio de cultivo y solidificación</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011





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

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

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

**4. RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5. DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	Se lee el envase del polvo para la preparación de Agar Cerebro-Corazón (Casa Comercial HIMEDIA), según la cual por cada litro de agua destilada debe haber 37g de agar. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	<b>Pesaje.</b>	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.

3	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	La preparación debe hervir hasta que tome un aspecto transparente. Evitar que se derrame.
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	Empaquetar los medio de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



1. **TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO CITRATO DE SIMMONS.**
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la preparación del Medio Citrato de Simmons, como prueba bioquímica para la identificación bacteriana.
3. **ALCANCE:** Este procedimiento es aplicado en el Laboratorio Clínico de Microbiología 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 rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 además en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

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

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Lectura de las indicaciones	Leer el envase del polvo para la preparación de Medio Citrato de Simmons, según la cual se debe suspender 24.3 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	Pesaje	Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación. Colocar el polvo del 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	<b>Esterilización del medio de cultivo</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo</b>	Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35°-37°C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.
8	<b>Método de inoculación en el medio.</b>	Sembrar: punción y estría en pico de flauta con un pequeña colonia de crecimiento del microorganismo.
9	<b>Incubación del medio</b>	Colocar en incubación de 35 a 37°C por 24 horas.
19	<b>Lectura de resultados</b>	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. AUTORES:

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



1. **TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DEL MEDIO TRIPLE AZÚCAR 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 rodófitas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Índico. 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 además 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<sub>2</sub>S). 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<sub>2</sub>S, respectivamente. La formación de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>S requiere un medio ácido y se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	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	<b>Pesaje.</b>	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz Erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.
5	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	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	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.

7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.
8	<b>Método de inoculación en el medio.</b>	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	<b>Incubación del medio</b>	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35 °C en aerobiosis por un tiempo de 18 a 24 horas.
10	<b>Lectura de resultados</b>	<p>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.</p> <p>Agar inclinado ácido/fondo ácido (A/A)= fermentador de la glucosa, la sacarosa o la lactosa.</p> <p>La formación de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> es indicada por la presencia de burbujas o grietas en el agar. La producción de H<sub>2</sub>S se manifiesta por un color negro del medio en el fondo del tubo.</p>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

PR-MSIM-  
UNL-13

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 además en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, gracias a ello se lo determina según el grupo, género o especie.

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	Se lee el envase del polvo de la preparación de Sulfuro Indol Movilidad SIM (Casa Comercial HIMEDIA), según el cuál por cada 1 litro de preparación deben haber 36.23 g de polvo de preparación. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	<b>Pesaje.</b>	Se coloca una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y se tara. Se pesa la cantidad necesaria de polvo de preparación. Se introduce el polvo ya pesado en el matraz erlenmeyer y se limpia la luna de reloj de vidrio con agua destilada que también se vierte dentro del matraz para que sea más exacta la preparación. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.

3	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	<p>Se coloca el matraz a calentar</p> <p>. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.</p>
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	<p>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 121° C. Se retira del autoclave con cuidado y teniendo todas las precauciones de su uso.</p>
5	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	<p>Distribuir 3 ml de medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. Los tubos no pueden ser destapados a menos que sea entre los mecheros o dentro de la cabina de flujo laminar. Ya solidos se cierran adecuadamente, previo a este procedimiento se coloca el material a utilizar en la cabina de seguridad biológica durante 30 minutos en UV.</p>
6	<b>Control de calidad de los medios de cultivo.</b>	<p>Realizar el control de calidad de los medios, retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.</p>

7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.
8	<b>Procedimiento de inoculación en el medio.</b>	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	<b>Incubación del medio.</b>	Se deja la tapa floja y se incuba el tubo a 35-37 °C en aerobiosis por un tiempo de 24 a 48 horas.
10	<b>Lectura de resultados.</b>	<p>Ácido sulfhídrico          Positivo: ennegrecimiento del medio          Negativo: sin ennegrecimiento.</p> <p>Indol (añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs).          Positivo: anillo rojo en la superficie del medio.          Negativa: no se produce color.</p> <p>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 de siembra.</p>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 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 además 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 fenil pirúvico resultante se detecta mediante la adición de cloruro férrico con el cual se forma un quelato de color verdoso entre el ácido fenil pirúvico y los iones Fe<sup>3+</sup>. Además el medio de cultivo, el extracto de levadura aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano.

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

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

7. **DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Lectura de las indicaciones.</b>	Se lee el envase del polvo para la preparación de Agar, según la cual se debe suspender 23 g del polvo en un litro de agua destilada. Realizar el cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto del polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2	<b>Pesaje.</b>	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. Se lleva la preparación a aforo con agua destilada. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.



3	<b>Disolución del polvo a través de una fuente de calor.</b>	Se coloca el matraz a calentar. Cuando la solución este homogénea, se retira de la fuente de calor.
4	<b>Esterilización del medio de cultivo.</b>	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	<b>Distribución del medio de cultivo.</b>	Distribuir 3 ml del medio en tubos de ensayo estériles siguiendo la técnica aséptica. Estos deben estar tapados con algodón estéril o tapones. 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	<b>Control de calidad</b>	Realizar el control de calidad retirando 1 al 5% de la partida y colocándolo en un incubador bacteriológico a 35° C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.
7	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	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- 8°C, hasta que el medio sea utilizado.

8	<b>Procedimiento de inoculación en el medio.</b>	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	<b>Incubación del medio</b>	Se deja la tapa floja y se Incuba de 18 a 24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.
10	<b>Lectura de resultados</b>	El análisis de los resultados debe realizarse dentro de los primeros 5 minutos. <b>Positivo:</b> desarrollo de color verde pálido a intenso en el pico de flauta y en el líquido de condensación. <b>Negativo:</b> sin cambios de color. El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.

**8. AUTORES:**

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

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

**4 RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5 DEFINICIONES:**

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

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

**7 DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Preparación del material.</b>	Se debe tener listo un porta objetos, lápiz graso, un hisopo, agua oxigenada y la colonia en la se va a ser el estudio.
2	<b>Suspensión de la cepa.</b>	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.	<p>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.</p> <p>Nota: Dado que la prueba de catalasa es clave para el esquema de identificación de muchos microorganismos Gram positivos, la Interpretación debe hacerse con cuidado. Por ejemplo, los <i>estafilococos</i> son positivos para catalasa, mientras que los <i>estreptococos</i> y los <i>enterococos</i> son negativos.</p>
---	-------------------------------	--

#### 9. AUTORES:

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

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

**4 RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5 DEFINICIONES:**

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

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

## 7 DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Preparación del material.	Tubo de ensayo, lápiz graso, plasma, asa, incubadora y cepa en estudio
2	Suspensión de la cepa.	Colocar 0.5ml de plasma en el tubo de ensayo luego con el asa coger de dos a tres colonias y suspender en el tubo, dejar reposar en la incubadora a 37°C 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. AUTORES:

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

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

**4. RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5. DEFINICIONES:**

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

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

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

## 7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Procedimiento	En una placa portaobjetos colocar una gota de KOH a la concentración requerida (10-20%), con un asa previamente flameada tomar una colonia y suspender en la gota de KOH, colocar un cubreobjetos, llevar al microscopio.
2	Enfoque	Enfocar y observar con lente de 10x a fin de observar los elementos micóticos, para diferenciar con un aumento de 40x.
3	Observación microscópica	<i>Cándida albicans</i> : células ovals 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. AUTORES:

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.





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

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

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

4. **RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

5. **DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Preparación del frotis.</b>	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	<b>Tinción de gram.</b>	La tinción de gram requiere la utilización de cuatro soluciones en el siguiente orden:
	<b>2.1. Primer colorante.</b>	Cubrir el frotis con cristal violeta dejando que el colorante actúe por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar escurrir.
	<b>2.2. solución mordiente</b>	Cubrir el frotis con solución de lugol dejando que el colorante actúe por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
	<b>2.3. Agente decolorante</b>	Cubrir el frotis con alcohol cetona por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente.
	<b>2.4. Colorante de contraste</b>	Cubrir el frotis con solución de Safranina dejando que el colorante actúe por un minuto. Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y dejar secar la preparación al aire libre.

**8. AUTORES:**

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

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

**4. RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5. DEFINICIONES:**

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

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

**Suspensión:** **Acción** y efecto de suspender o disolver.

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

## 7. DESARROLLO:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Suspensión del inóculo.</b>	Colocar un inóculo muy pequeño de una colonia aislada en 0,5 ml de suero.
2	<b>Incubación</b>	Incubar de 35 a 37°C durante no más de 3 horas.
3	<b>Observación microscópica</b>	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. AUTORES:

- **Elaborado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

**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 escala de turbidez, cuya finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Es la más usada, y se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1% y de cloruro de bario al 1.175%, para obtener soluciones con densidades ópticas especiales. El estándar 0.5 de Mac Farland, proporciona una densidad óptica comparable a la densidad de una suspensión bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  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:

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO								
1	<b>Preparación del material.</b>	En una gradilla disponer de un tubo de ensayo de 10ml totalmente estéril, rotularlo.								
2	<b>Mezcla de los reactivos de acuerdo a la tabla N.- 1.</b>	<p>Añadir una solución al 1% de Cloruro de Bario Anhidrido y una solución al 1% (en volumen) de Ácido Sulfúrico químicamente puro, según el siguiente tabla:</p> <p>Tabla N.- 1</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tubo N.</th> <th>Cl<sub>2</sub>Ba (1%)</th> <th>SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> (1%)</th> <th>U.F.C/m I</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>0.5</td> <td>99.5</td> <td>1.5x10<sup>8</sup></td> </tr> </tbody> </table>	Tubo N.	Cl <sub>2</sub> Ba (1%)	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> (1%)	U.F.C/m I	5	0.5	99.5	1.5x10 <sup>8</sup>
Tubo N.	Cl <sub>2</sub> Ba (1%)	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> (1%)	U.F.C/m I							
5	0.5	99.5	1.5x10 <sup>8</sup>							
3	<b>Calibración del Patrón N. 5 de Mc Farland por espectrofotometría.</b>	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.								
4	<b>Almacenamiento y conservación.</b>	<p>Sellar los tubos y mantenerlos en refrigeración.</p> <p>Cuando el fino precipitado blanco de Sulfato de Bario se sacude, cada tubo posee una densidad diferente que corresponde aproximadamente a cada suspensión bacteriana.</p>								

## 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



**1 TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO.**

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

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

**4 RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5 DEFINICIONES:**

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

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

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

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

**7 DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	Preparación del material.	Se utilizará una cepa joven (Protocolo 22-26), disponer de 1 tubo de ensayo, un aplicador y una cubeta para espectrofotómetro, solución salina. Todo el material a utilizar debe encontrarse estéril.

2	<b>Suspensión de la cepa en la solución salina.</b>	Colocar de 3 a 5 ml (de acuerdo a la necesidad) de solución salina en un tubo estéril. Utilizando un aplicador (estéril), tomar de cuatro a cinco colonias de la cepa seleccionada, de forma suave y tocando solamente la punta del aplicador. Suspenderlas en la solución salina al 0,85%, para lograr una suspensión turbia. Mezclar bien y tapar el tubo.
3	<b>Estandarización visual de la turbidez del inóculo.</b>	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	<b>Verificar la turbidez de la suspensión a través del turbidímetro.</b>	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. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.





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

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

#### 5. DEFINICIONES:

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

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

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

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

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

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

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

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<p><b>Obtención de la <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b></p>	<p>Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)</p>
2	<p><b>Recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b></p> <p><b>Cultivo primario</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <b><i>S. aureus</i></b>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos.</li> <li>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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Chapman manitol inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	<p><b>Obtención del cultivo secundario de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b></p>	<p>A partir del crecimiento bacteriano del cultivo primario obtenido, realizar un pase de la bacteria con la ayuda de un hisopo estéril, en el medio de Chapman manitol específico para <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>.</p>

		<p>Incubar a 37°C durante 24 horas.</p> <p>Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.</p>
4	<p><b>Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</b></p>	<p>El Control de Calidad de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>S. aureus</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b></p> <p>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.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b></p> <p><b>Tinción de Gram:</b> cocos gram positivos, dispuestos en pares, tétradas o racimos, con morfología celular redonda.</p> <p><b>Pruebas bioquímicas:</b></p> <p><b>Catalasa:</b> Positivo</p> <p><b>Coagulasa:</b> Positivo</p>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 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	<b>Obtención de la <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	<b>Recuperación de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b> <b>Cultivo primario</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <i>E. coli</i>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos.</li> <li>3. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar MacConKey, 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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar MacConKey inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	<b>Obtención del cultivo secundario de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	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 MacConKey, específico para <i>Escherichia coli</i> .  Incubar a 37°C durante 24 horas.

		Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	<b>Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</b>	<p>El Control de Calidad de <i>Escherichia coli</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>E. coli</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b></p> <p>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.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b></p> <p><b>Tinción de Gram:</b> bacilos cortos gram negativos.</p> <p><b>Pruebas bioquímicas:</b></p> <p><b>TSI:</b> A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-)</p> <p><b>SIM:</b> Movilidad (+), Indol (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-)</p> <p><b>Citrato:</b> Negativo</p> <p><b>Lisina:</b> Positivo</p> <p><b>Fenilalanina:</b> Negativo</p> <p><b>Urea:</b> Negativo</p>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



1. **TITULO:** VIABILIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Kebsiella pneumoniae*.
2. **OBJETIVOS:** Establecer un protocolo estandarizado para la viabilización y conservación de *Kebsiella 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 *Kebsiella pneumoniae* ATCC 13883, con el fin de mantenerlas viables. (Fase exponencial).

**7. DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b><i>Kebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883</b>	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	<b>Recuperación de <i>Kebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 Cultivo primario</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <i>K. pneumoniae</i>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos.</li> <li>3. Saturar inmediatamente un hisopo con material disuelto y transferir el material en el medio de Agar MacConKey, 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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar MacConKey inoculado, a 37°C durante 24 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	<b>Obtención del cultivo secundario de <i>Kebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883</b>	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 MacConKey, específico para <i>Kebsiella pneumoniae</i>  Incubar a 37°C durante 24 horas.



		Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.
4	<b>Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</b>	<p>El Control de Calidad de <i>Kebsiella pneumoniae</i> viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica de estos. Este se lo realiza a partir del cultivo primario de <i>K. pneumoniae</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b></p> <p>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.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b></p> <p><b>Tinción de Gram:</b> bacilos largos gram negativos.</p> <p><b>Pruebas bioquímicas:</b></p> <p><b>TSI:</b> A/A fermentador de glucosa, lactosa y sacarosa, Producción de Gas (+), Producción de Ácido Sulfhídrico (-)</p> <p><b>SIM:</b> Movilidad (-), Indol (-), Producción de Ácido Sulfhídrico (-)</p> <p><b>Citrato:</b> Positivo</p> <p><b>Lisina:</b> Positivo</p> <p><b>Urea:</b> Positivo</p> <p><b>Catalasa:</b> Positivo</p>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 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	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	Recuperación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 Cultivo primario	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li> <li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <i>P. aeruginosa</i>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos.</li> <li>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.</li> <li>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Cetrimide inoculado, a 37° - 42° C durante 24- 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li> </ol>
3	Obtención del cultivo secundario de <i>Pseudomona aeruginosa</i> 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 <i>Pseudomona aeruginosa</i> . Incubar a 37°C – 42°C durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas.

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

**8. AUTORES:**

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 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	<b><i>Cándida albicans</i></b> <b>ATCC 26790</b>	Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente la misma que se encuentran depositada en la asociación <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)
2	<b>Recuperación de <i>Cándida albicans</i></b> <b>ATCC 26790</b> <b>Cultivo primario</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Sacar el frasco con el vial del almacenamiento (2-8°C), permitir que alcance la temperatura ambiente.</li><li>2. Tomar el vial y colocar 0.5 ml de caldo de infusión cerebro corazón, en el vial de la cepa ATCC de <b><i>C. albicans</i></b>, tapar y mezclar el paquete de bacterias con el caldo por un lapso de 10 minutos.</li><li>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.</li><li>4. Incubar inmediatamente el medio de Agar Sabouraud inoculado, a 37° - 42° C durante 24-48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para las transferencias indicadas.</li></ol>
3	<b>Obtención del cultivo secundario de <i>Cándida albicans</i></b> <b>ATCC 26790</b>	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 <b><i>Cándida albicans</i></b> . Incubar a 37°C – 42°C durante 24 - 48 horas. Después de la inoculación, seleccionar colonias representativas bien aisladas para su uso respectivo.

4	<p><b>Control de Calidad de los microorganismos viabilizados y conservados</b></p>	<p>El Control de Calidad de <b><i>Cándida albicans</i></b> 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 <i>C. albicans</i>.</p> <p><b>Características Macroscópicas de las colonias:</b></p> <p>Pequeñas, redondas, bordes enteros, aspecto cremoso, mucoides, y de color blanco.</p> <p><b>Características Microscópicas (morfología):</b></p> <p><b>Hidróxido de potasio (KOH):</b> esporas y levaduras aisladas y en gemación.</p> <p><b>Otras pruebas:</b></p> <p><b>Test de filamentación:</b> Presencia de tubo germinal a las 2 horas.</p>
---	--	--

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

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

**4. RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5. DEFINICIONES:**

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

**Etanol:** El Etanol o alcohol etílico es un compuesto líquido, incoloro, volátil, inflamable y soluble en agua cuyas moléculas se componen de carbono, hidrógeno e hidróxilos (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-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	<b>Obtención de los discos.</b>	Obtención de los discos mediante perforaciones con un sacabocados del papel filtro WHATMAN N° 1 de 6 mm de diámetro.
2	<b>Esterilización de los discos.</b>	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	<b>Impregnación del extracto. Vegetal.</b>	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	<b>Elaboración de controles negativos.</b>	Colocar un disco de papel filtro WHATMAN N° 1 de 6 mm de diámetro en una caja petri que va a contener la malla metálica estéril e impregnarlo con 10 ul de etanol al 70%, luego eliminar el solvente con la ayuda de una secadora y repetir el procedimiento una vez más, hasta llegar a los 20 ul de etanol al 70%.
5	<b>Controles positivos.</b>	Usar un disco de antibiótico comercial específico para cada bacteria.

## 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

PR-EAA-  
UNL-28

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:**

<b>ITEM</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>
<b>1</b>	<b>Inoculación de las placas.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente.</li><li>- Rotular los medios de cultivo.</li><li>- Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inoculo (protocolo N° 21), 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.</li><li>- Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton (protocolo N° 4), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inoculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.</li><li>- 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).</li></ul>
<b>2</b>	<b>Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo N° 27), sobre la superficie inoculada del agar.</li><li>- Realizar por triplicado en la misma caja.</li><li>- 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.</li></ul>

		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	<b>Incubación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35°C ± 2°C (las temperaturas de &gt;35°C pueden impedir la detección de estafilococos a meticilina) antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos.</li> <li>- 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.</li> </ul>
4	<b>Lectura de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura.</li> <li>- Las placas se examinan después de 18 a 24 horas de incubación.</li> <li>- Si la placa se estrió como corresponde y el inóculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluyente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares.</li> <li>- Si se observan colonias aisladas, significa que el inóculo estaba diluido y la prueba debe repetirse.</li> <li>- Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.</li> </ul>
5	<b>Interpretación de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- &lt; 6mm Negativo (Resistente)</li> <li>- 6 – 9 mm&lt; Intermedio</li> <li>- &gt; 9mm Positivo (Sensible)</li> </ul>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

PR-EAA-  
UNL-29

**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	<b>Inoculación de las placas.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Una vez preparados los medios de cultivo (protocolo N° 2-10), retirarlos de la refrigeradora y mantenerlos a temperatura ambiente.</li> <li>- Rotular los medios de cultivo.</li> <li>- Dentro de los 15 minutos después de haber ajustado la turbidez del inóculo (protocolo N° 21), 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.</li> <li>- Inocular la superficie seca de una placa de agar Sabouraud (protocolo N° 9), estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril. Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Como paso final, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.</li> <li>- 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).</li> </ul>
2	<b>Dispensación de los discos en las placas de agar inoculada.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Depositar los discos impregnados con el antimicrobiano (protocolo N° 27), sobre la superficie inoculada del agar.</li> <li>- Realizar por triplicado en la misma caja.</li> <li>- Cada disco debe presionarse para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.</li> <li>- 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.</li> </ul>

		- 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	<b>Incubación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los medios de cultivo se colocan en la incubadora a 35°C ± 2°C antes de que transcurran 15 minutos de haberse colocado los discos.</li> <li>- 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.</li> </ul>
4	<b>Lectura de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Retiramos las cajas Petri de la incubadora y procedemos a la lectura.</li> <li>- Las placas se examinan después de 48 horas de incubación.</li> <li>- Si la placa se estrió como corresponde y el inculo estaba bien preparado y adecuado, la placa tendrá un fondo confluyente de crecimiento y los halos de inhibición formados serán uniformemente circulares.</li> <li>- Si se observan colonias aisladas, significa que el inculo estaba diluido y la prueba debe repetirse.</li> <li>- Utilizando una regla transparente y dividida en milímetros, procedemos a medir el diámetro del halo transparente de inhibición y anotar el número en milímetros.</li> </ul>
5	<b>Interpretación de los resultados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- &lt; 6mm Negativo (Resistente)</li> <li>- 6 – 9 mm&lt; Intermedio</li> <li>- &gt; 9mm Positivo (Sensible)</li> </ul>

#### 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica
- Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 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.



**DESARROLLO:**

ITEM	ACTIVIDAD	PROCEDIMIENTO
1	<b>Dilución del inóculo.</b>	Se prepara el inóculo con las cepas en solución salina a una concentración similar al patrón 0.5 de la escala de MacFarland.
2	<b>Preparación de subdiluciones.</b>	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	<b>Preparación de las muestras.</b>	En la diluciones anteriores se colocan en los 8 tubos 1ml del inóculo.
4	<b>Incubación.</b>	Se incuba 24 horas a 37°C.
5	<b>Lectura de resultados.</b>	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. AUTORES:**

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.



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

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

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

**4. RESPONSABLES:**

**Director del proyecto:** Aprobar el procedimiento.

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

**Técnico de laboratorio:** Ejecutar y evaluar el procedimiento.

**Tesistas:** Aplicar el procedimiento.

**5. DEFINICIONES:**

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

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

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

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

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

## Variables biológicas de las pruebas del CMB:

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

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

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

**6. METODOLOGÍA:** La concentración mínima bactericida se obtiene de la concentración del tubo con menos concentración 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 37°C por 24 horas y observar los resultados.

## 8. AUTORES:

- **Elaborado:** Solmayra Agreda, Lisseth Cueva, Tania León, Diana Montaña, Karla Montalvo. Diciembre 2010.
- **Actualizado:** Andrea Alvarado, Jessica Castro, Daniela Córdova, Angélica Narváez, Guadalupe Rivera. Diciembre 2011.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE PROTOCOLOS

- Garcés A. Normas de seguridad en el laboratorio de microbiología. Abril 2008
- OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3era edición. Ginebra. 2005. Págs. 89-90
- Vega E. normas de bioseguridad del Sistema Nacional de Laboratorios de Diagnóstico. 2002. Págs. 31-32.
- 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.
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- Gamazo, C. Manual práctico de Microbiología. 3ª 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%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](http://danival.org/600%20microbio/6000notasmicro/medioscult/_madre_medios.html) Consultado 20 de noviembre de 2011 18:00
- Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ª Edición. Marzo 1995. Pág. 38.
- García Martos P. Microbiología clínica práctica. 2da edición. Pag 64
- Prats Pastor G. Microbiología Clínica. 1era edición. Editorial medica panamericana. Madrid 2007

- 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.
- 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.
- Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Editorial medica panamericana. 6ª edición. Argentina 2008. Pag 64, 217
- Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria del Instituto Catalán de la Salud. Volumen II.1ª edición. Marzo 2006. Pags 189-190
- Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial medica panamericana. 3ª edición. Madrid 2003
- Tortora B. Introducción a la microbiología. Editorial medica panamericana. 9ª edición. Madrid 2007. Pag 139
- John Bernard Henry. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. Parte VI Microbiología Médica. 9ª Edición. Editorial Masson-Salvat Medicina. Pág.1070.
- 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
- Keith J. Bacteriología Clínica. Edición original. Barcelona: Masson S.A; 2005: p. 9 – 10.
- Hernández, A. Microbiología. 3ra ed. Editorial Amazon. México. 2002. Pág. 21.

- Cabello, R. Microbiología y Parasitología Humana. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2007. Pág. 641.
- Benintende, S., "Crecimiento Bacteriano. Unidad Temática 3" (Cecilia [http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano.pdf](http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf)) 27 noviembre del 2011.
- Flannigan, B. Sansón R; Miller JD. Microorganismos en el hogar y los ambientes de trabajo. La diversidad, impactos en la salud, investigación y control. Editores Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2001. Pág. 1.
- Jawetz, M. Adelberg. Microbiología Médica. 18ª edición. Editorial el Manuel Moderno. México D.F. 2002. Págs. 219-220.
- Documento 10. Instituto Leopoldo Izquieta Pérez "Identificación Bioquímica de Bacterias más frecuentes".
- Concepto de Dilución [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a:  
[http://www.pcb.ub.edu/centrepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo\\_pate ntesextractosplantas.pdf](http://www.pcb.ub.edu/centrepatents/pdf/cursos/dillunsCP/pardo_pate ntesextractosplantas.pdf)
- Significado de etanol, [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. Disponible a: [http://www.t3quimica.com/pdfs/49i\\_etanol.pdf](http://www.t3quimica.com/pdfs/49i_etanol.pdf)
- Obregón G. Rev Med Exp 2000;. [Consulta el 22 de noviembre de 2011]. 17 (1-4). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v17n1-4/a04v17n1-4.pdf>
- Todd-Sanford. Diagnóstico Clínico por el laboratorio. 8ª ed. Salvat; 2001. P. 487.