

T
634-772
PER.

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL
LITORAL**

INSTITUTO DE TECNOLOGIAS

PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS

INFORME DE PRACTICAS PROFESIONALES

**PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE TECNOLOGO EN
ALIMENTOS**

**REALIZADO EN:
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLOGICAS DEL
ECUADOR**

AUTOR: Lissethy Pérez Bowen

**Dra. Gloria Bajaña
PROFESOR GUIA**

**Ing. Angela Naupay
SEGUNDA REVISION**

AÑO LECTIVO

2002-2003

GUAYAQUIL – ECUADOR



**ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DEL LITORAL**

CIBT



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

Guayaquil, 11 de Junio del 2002

MTA.

Claudia Icaza

Coordinadora del Programa de Tecnología en Alimentos

En su despacho

De mis consideraciones:

Yo, Lissethy Pérez Bowen con No. de matrícula 199727348 pongo en conocimiento el desarrollo de las prácticas profesionales las mismas que se realizaron en el área de Inmunoquímica del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) con el proyecto de extracción de péptidos microbianos y su interacción con bacterias en un período comprendido entre los meses de Abril, Mayo y Junio del 2002, adjunto el informe correspondiente.

Sin otro particular, me suscribo de ud atentamente,

Lissethy Pérez Bowen





ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

"Ciencia, Tecnología y Educación al servicio del País"

A QUIEN INTERESE:

Por medio de la presente certifico que la Srta. **LISSETHY PEREZ BOWEN** con número de matrícula 199727348, realizó prácticas en el laboratorio de **Inmunoquímica del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (Cibe)** en el periodo comprendido entre el 14 de abril al 14 de junio del 2002.

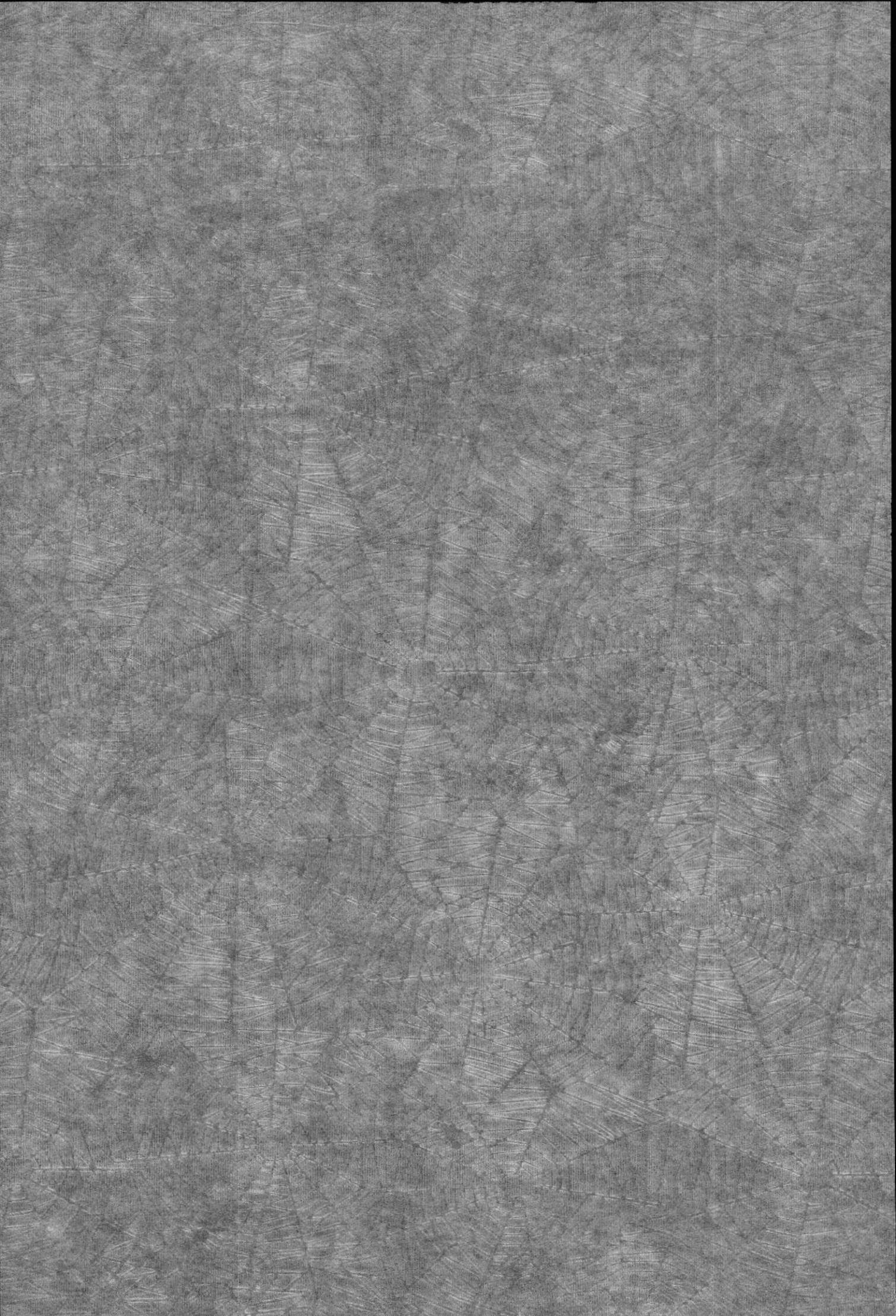
Guayaquil, 30 de junio del 2002

PROYECTO VLIR - ESPOL


Dr. Rodolfo Maribona
PROMOTOR COMPONENTE No. 3

Dr. Rodolfo Maribona H.
Director del CIBE





INDICE

Carta de presentación	
Certificado	
Hoja de calificación	
Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	3
Detalle de las labores realizadas	4
Generalidades de la empresa	5-6

CAPITULO 1: PROCESO

1.1 Diagrama de flujo	7
1.2 Detalle del proceso	8
1.2.1 Extracción de proteínas	8
1.2.1.1 Materiales y Equipos	8-9
1.2.1.2 Procedimiento	9-11
1.2.2 Cromatografía	11
1.2.2.1 Materiales y Equipos	11
1.2.2.2 Procedimiento	11-12
1.2.3 Preparación de cepas microbianas	12
1.2.3.1 Materiales y Reactivos	12-13
1.2.3.2 Procedimiento	13

CAPITULO 2: EXPERIMENTACION

2.1 Ensayo experimental	14-15
2.1.1 Modelo de ensayo experimental	
2.1.2 Resultados	
Conclusiones	16
Recomendaciones	17
Bibliografía	18-19
Anexos	



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

RESUMEN

En el presente informe se detalla el trabajo realizado en el área de Inmunoquímica del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) para la obtención de péptidos a partir de la hoja de banano para su posterior aplicación en microbiología.

Comprende además los inicios CIBE, centro en el que reposa grandes responsabilidades con respecto al desarrollo del país y en donde están funcionando nuevos ensayos experimentales con el fin de promover al Ecuador como país con miras al desarrollo.

Se presenta la metodología empleada con su explicación paso a paso, creando así una guía que podrá ser empleada para posteriores investigaciones, presenta resultados obtenidos hasta ahora, que servirán como base para diferentes hipótesis, mismas que solo con investigaciones serán desarrolladas.

Se concluye y recomienda basándose en la experimentación como en el conocimiento adquirido.

Se anexan también información relacionada con los métodos empleados en laboratorio, así como también se ilustran los equipos empleados para la realización de dichos métodos, además de la información bibliográfica.





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

INTRODUCCIÓN

Debido al hecho de que las tox infecciones alimenticias causadas por microorganismos y sus subsecuentes enfermedades son causas por las que el porcentaje de mortalidad en países subdesarrollados es elevado, por lo tanto se busca a diario nuevas formas de contrarrestar dichas afecciones, además se conoce que todo ser vivo posee un mecanismo de defensa innato frente a invasión infecciosa, el mismo que puede ser poco efectivo dependiendo de las condiciones ambientales y sociales en que se desarrolla el ente vivo.

Es debido a lo antes mencionado que una de las preocupaciones del laboratorio de inmunoquímica del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) se encuentra en proceso experimental en el ensayo con extractos proteicos a partir de la hoja de una variedad de banano (*musa spp*) frente a la acción de dos tipos de microorganismos causantes de las enfermedades alimentarias más comunes.

Se busca entonces con estos experimentos encontrar una fracción dentro de la estructura proteica que conlleve a la posterior inhibición del crecimiento normal del microorganismo y al mismo tiempo darle nuevas aplicaciones en el campo médico, agrícola, alimenticio u otros.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

OBJETIVOS

Del Proyecto

- ❖ El proyecto busca aislar e identificar péptidos antimicrobianos presentes en *Musa* spp. que puedan servir para el mejoramiento genético de plantas susceptibles a Sigatoka negra y para el desarrollo de compuestos antibióticos utilizables en biomedicina.

Específicos

- ❖ Aislar péptidos de banano con actividad antimicrobiana.
- ❖ Caracterizar bioquímicamente los péptidos aislados.





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

DETALLE DE LAS LABORES REALIZADAS

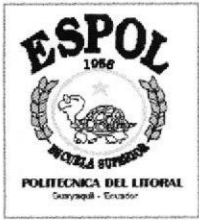
Durante el período de prácticas realizadas en el laboratorio de inmunoquímica se me asignó el cargo de ayudante del proyecto de desarrollo de péptidos antimicrobianos, al cabo de mes quedé como encargada del proyecto asumiéndolo con responsabilidad.

El horario de trabajo comenzaba a las 8:00 a.m. y culminaba a la 16:30 p.m.

La labor desempeñada no era de manera contractual.

La labores a cumplir consistían en:

- ❖ Extracciones de proteínas a partir de la hoja de banano
- ❖ Purificación por cromatografía,
- ❖ Cuantificación por espectrofotometría,
- ❖ Siembra, cultivo, aislamiento e identificación de los microorganismos a utilizar
- ❖ Inoculación microbiana al extracto proteico,
- ❖ Interpretación de resultados,
- ❖ Nuevas experimentaciones.
- ❖ Investigaciones bibliográfica
- ❖ Búsqueda de nuevas técnicas y métodos.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

GENERALIDADES DE LA EMPRESA

ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA EMPRESA

Por iniciativa de la ESPOL, atendiendo una convocatoria de la Unión de Universidades Flamencas, fue presentado un proyecto en el cual se concebía la ejecución de 6 actividades denominadas componentes. Entre estos componentes, el número 3, abordaba la investigación en biotecnología; con un mandato inicial de hacer investigación para la resistencia genética de Musa para el control de la Sigatoka negra, con el fin de lograr una agricultura ambientalmente sustentable.

En el desarrollo de éste proyecto, que fue financiado por el fondo belga y una contrapartida de la ESPOL, el componente 3 ejecutó un curso de diplomado en biotecnología, y 4 cursos de postgrado. De los estudiantes fueron seleccionados 3 candidatos a cursos "sandwich" de PhD en las universidades belgas de Gante y Lovaina.

Esta actividad avanzó en paralelo con la adaptación y construcción de los laboratorios e instalaciones para entrenar especialistas capaces de ejecutar los objetivos de investigación del proyecto.





**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

La integración del sector productivo en las estrategias y ejecución de las actividades de investigación, logró desde el mismo inicio del proyecto, una excelente comunicación y participación, definiendo los programas de investigación coparticipada.

Adicionalmente, se han conseguido recursos para reforzar el desarrollo de los proyectos de investigación y capacitación. Se siguen generando propuestas para la formación de recursos humanos de cuarto nivel, así como para la investigación, en la óptica de convertir a este centro en una entidad auto sustentable para la investigación, la enseñanza y la extensión participativa.

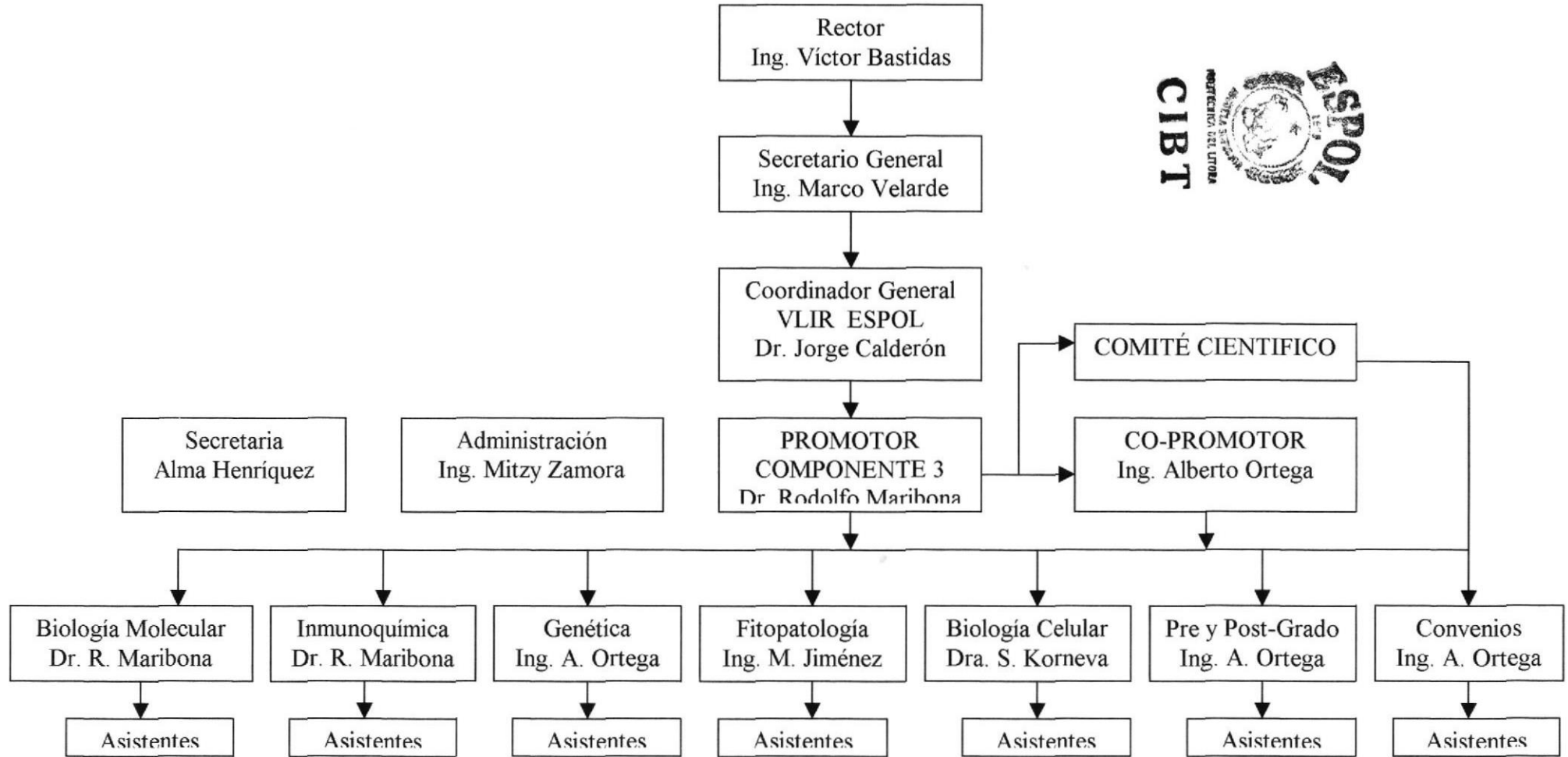
En el breve plazo de 1 año, con un staff de 21 colaboradores, en pleno desempeño de las investigaciones, con la presencia de las máximas autoridades de la ESPOL, representantes de los productores y de la contraparte belga, fue inaugurado el *17 de Enero del 2001*, como el "Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador" de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

LOCALIZACION

ESPOL Campus Prosperina Km 30 ½ vía Perimetral, planta alta del Programa de
Tecnología en alimentos (PROTAL)



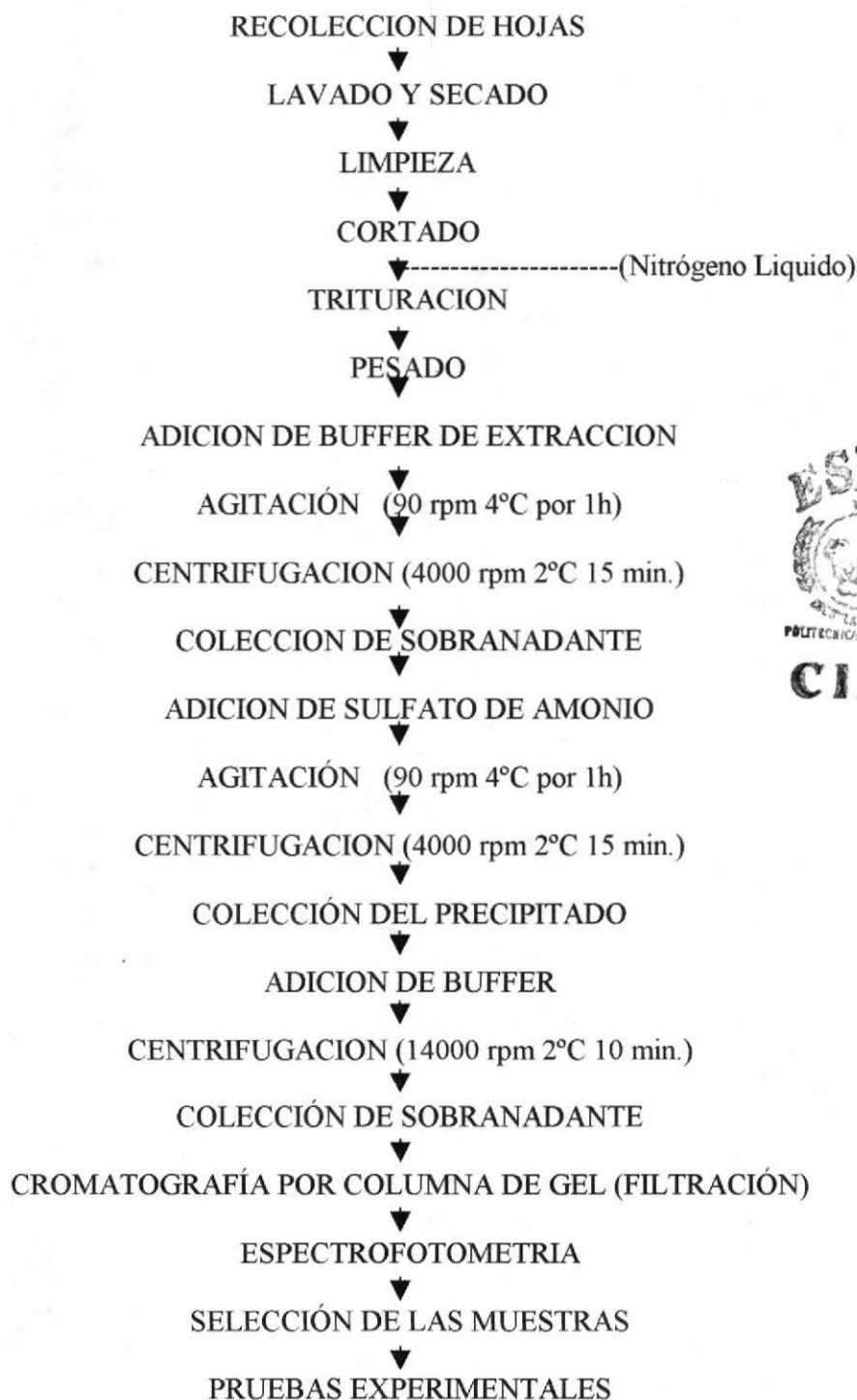
ORGANIGRAMA DE LA EMPRESA





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

DIAGRAMA DE FLUJO





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

1.2 DETALLE DEL PROCESO

1.2.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

FUNDAMENTO

Se fundamenta en la liberación de las proteínas contenidas dentro de la membrana celular por lisis ocasionada por la acción de un agente detergente (Tritón) que solubiliza la estructura de la pared celular asociándose con las lipoproteínas de la membrana permitiendo así la liberación de las proteínas transmembranales y las fuertemente unidas a la misma (Alberts, B. et al 1997).

1.2.1.1 Materiales y equipos

- ❖ Fundas de papel
- ❖ Navajas, marcadores
- ❖ Coolers con hielo
- ❖ Agua destilada,
- ❖ Detergente.
- ❖ Congelador
- ❖ Nitrógeno líquido,
- ❖ Morteros
- ❖ Tubos de centrífuga





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

- ❖ Centrífuga,
- ❖ Pipetas automáticas



1.2.1.2 PROCEDIMIENTO

Para el desarrollo del proyecto se trabajó con dos variedades de banano, Yangambi y Calcuta, variedades que son poco conocidas debido a que no producen frutos, se tomaron hojas del estadio 1 y 4 debido a la concentración de proteínas que éstas poseen dentro de las membranas celulares.

Las muestras recolectadas se colocan en hielo hasta su transportación al laboratorio, son lavadas con agua destilada y secadas, se limpian eliminando las partes quemadas (rastros de fenoloxidasa) y la parte de la nervadura central, dependiendo si el trabajo es realizado inmediatamente o no se las coloca en conservación en temperaturas de -80°C , una vez realizadas éstas tareas se procede a cortar la hoja en cuadros de aproximadamente 1.5 cm y se colocan en un mortero para su trituración, para facilitar esta operación se utiliza nitrógeno líquido que congela la estructura de la hoja y permite mejor acabado en el triturado, el empleo de esta sustancia no interfiere con la prueba puesto que se evapora a temperatura ambiente.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

Una vez obtenido el triturado (debe ser muy fino) se coloca en tubos eppendorf, las proteínas solubles contenidas en este se extrajeron con buffer de extracción alcalino (Tris-base pH 7.5, 10mM EDTA, 0.2% ácido ascórbico, 150mM ClNa, PMSF, mercapto, Tritón 1.5%) en relación 1:3 (p/v), se coloca el tubo dentro de un recipiente con hielo y se lo deja en agitación por espacio de 1 hora para que la acción extractora del buffer sea efectiva, luego de este tiempo el tubo es centrifugado por espacio de 10 minutos a 3 °C a 4000 rpm, por decantación el sobrenadante es recolectado en otro tubo en donde será adicionado sulfato de amonio en relación 525.5 g/l que tiene la acción de precipitar la proteína por su asociación con esta, nuevamente se lleva a incubación por una hora en las mismas condiciones de la incubación anterior, pasado este tiempo el tubo es nuevamente sometido a centrifugación 4000 rpm a 3 °C por 10 minutos, después de este proceso se elimina el sobrenadante y el precipitado es resuspendido en buffer de extracción incompleto (sin contener tritón), es centrifugado varias veces hasta evitar aparición de pellet a 14000 rpm por espacio de 5 min.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

1.2.2 CROMATOGRAFIA

FUNDAMENTO

Se basa en la separación de sustancias haciéndolas pasar por una columna sosteniendo un gel de poliacrilamida que servirá de tamiz para dichas sustancias ocasionando que las de mayor diámetro sean liberadas rápidamente ocurriendo lo contrario con las que coinciden con el diámetro de la matriz del gel.

1.2.2.1 Materiales y Equipos

- ❖ Tubos de vidrio
- ❖ Tubos de cromatografía
- ❖ Solventes
- ❖ Mangueras.
- ❖ Colector de fracciones,
- ❖ Columnas de cromatografía



1.2.2.2 PROCEDIMIENTO

Una vez terminada la extracción proteica se procede a la purificación del extracto por cromatografía en columna de gel de poliacrilamida (ver anexo # 2) que lo que hace es



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

eliminar las partículas de amonio sulfato para evitar posterior acción en el ensayo, este gel de poliacrilamida tiene unos poros que permite el paso de proteínas de bajo peso molecular y del sulfato de amonio lo que va a ocasionar que las proteínas de mayor peso molecular recorran más rápido la columna y sean expulsada primero mientras que las de bajo peso molecular y el sulfato de amonio tardaran en ser expulsadas debido ha que habrán debido recorrer los poros de la matriz del gel. Este proceso cromatográfico tiene la finalidad de eliminar sustancias (parte del proceso de extracción) evitando así que pasen al filtrado e interfieran en los resultados, el filtrado es recolectado en tubos pequeños. Por medio de espectrofotometría y empleando el reactivo de Bradford (ver anexo #1) se determina cuales de estos tuvo serán los que tengan mayor cantidad de proteínas y serán empleados para el ensayo, el reactivo de Bradford colorea azul las muestras con mayor cantidad de proteínas, las muestras de proteínas son diluidas 10 100 y 1000 veces para el ensayo experimental.

1.2.3 PREPARACION DE LAS CEPAS MICROBIANAS

Se utilizaron cepas prificadas de E.coli y S. aureus

1.2.3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- ❖ Pipetas automáticas
- ❖ Cajas petri
- ❖ Placas ELISA
- ❖ Medios de cultivo



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

- ❖ Espectofotometro
- ❖ Cubetas de espectofotometria
- ❖ Pinzas
- ❖ Lector de Elisa



1.2.3.2 PROCEDIMIENTO

Basándonos en el protocolo de péptidos antimicrobianos (Shafer, 1997) la preparación de los microorganismos a usar consiste en:

1. De una colonia del microorganismo a tratar prepare un cultivo “overnigth” en Luria Broth (ver anexo # 1) a 37 °C y en agitación 90 rpm.
2. Luego tomar con asa de platino una muestra y dejarlo en incubación en medio de cultivo Poor Broth (ver anexo #1) por aproximadamente 5 horas a 37 °C y en agitación.
3. Medir la absorbancia en espectrofotómetro a 600nm
4. Diluir la bacteria hasta obtener una absorbancia de 0.001 nm.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

2.1 ENSAYO EXPERIMENTAL

Se realizaron alrededor de 20 ensayos experimentales los mismos que siguieron la siguiente metodología:

Tomar las proteínas extraídas de Yangambi y Calcuta en diluciones 10^0 10^1 10^2 10^3 , colocar en placas de Elisa con inóculo del microorganismo a tratar (ver anexo # 3 y 4), realizar los respectivos controles en la misma placa, se procedió a la lectura.

En placas de Elisa colocar las siguientes alícuotas en el siguiente orden:

Columna Uno.- Elaborada como control negativo, esta nos mostrará si en el transcurso de la preparación o de la medición se presentó contaminación microbiana.

Columna Dos.- Elaborada como control negativo de la hoja, demuestra si en el proceso de extracción existieron errores que conllevaron a la posterior contaminación del extracto proteico.

Columna tres, cuatro y cinco: Se dejaron libres por seguridad, para evitar contaminación y así obtener un resultado preciso.



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

Columna Seis.- Elaborada para control positivo, en esta se obtendrá la curva de desarrollo normal de la bacteria y se usara para comparar con las curvas que se obtendrán en los tratamientos efectuados posteriormente a la misma.

Columna Siete.- Se elabora el primer tratamiento adicionando el extracto proteico e inoculándolo con la bacteria.

Columnas Ocho, Nueve, Diez.- Se elaboran tratamientos con la misma metodología de la columna siete pero esta vez con la proteína diluida 10, 100, y 1000 veces respectivamente para cada columna.

La placa una vez preparada es colocada dentro del lector de Elisa el mismo que es programado para realizar mediciones de 25 ciclos cada 30 minutos por 12 horas y con agitación entre cada medición.

Se observa el resultado de las mediciones, se realizan las gráficas correspondientes, y se concluye.



2.1.1 Modelo de Ensayo Experimental

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		
B	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		
C	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		
D	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		
E	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		
F	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		
G	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		
H	100µl Poor Broth + 10µl PBS	100µl Poor Broth + 10µl Proteína				100µl Bacteria + 10µl de PBS	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ⁰	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ¹	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ²	+ 100µl Bacteria + 10µl de Proteína 10 ³		

* Pruebas hechas con Yangambi

* Pruebas hechas con Calcuta

Pruebas hechas con Yangambi hoja 1

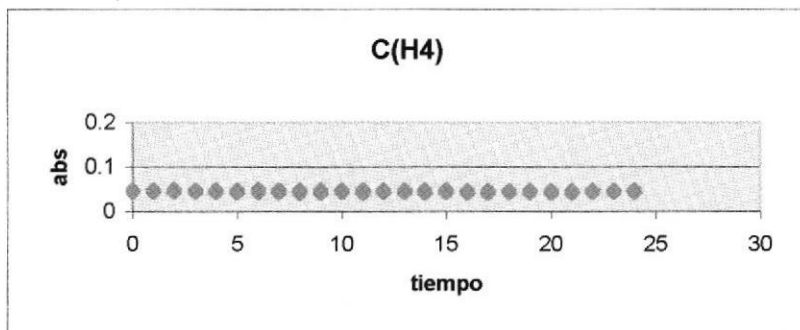
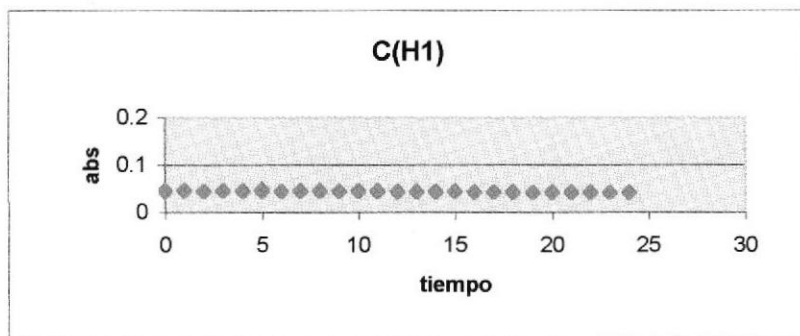
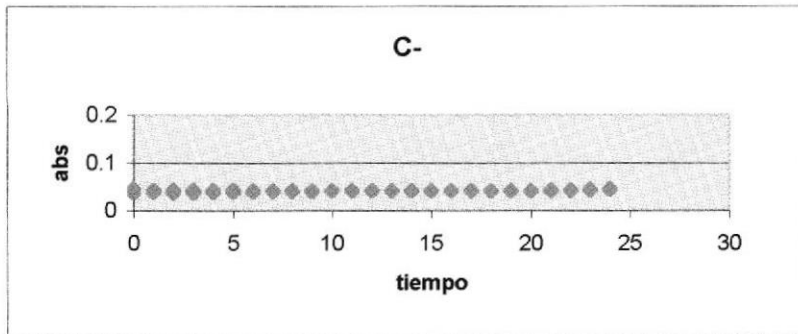
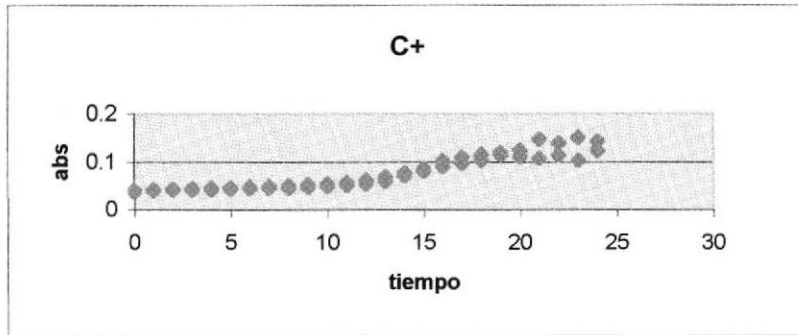
Pruebas hechas con Calcuta hoja 1

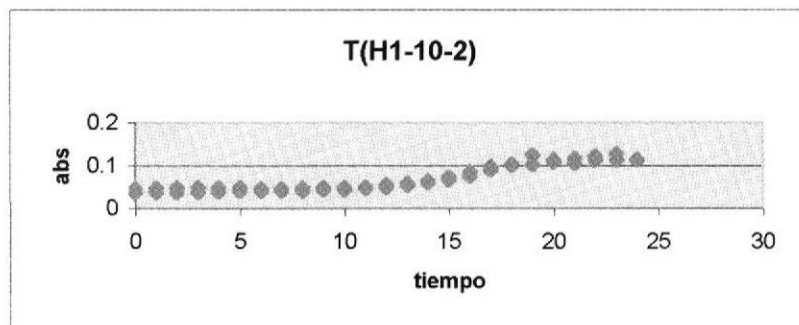
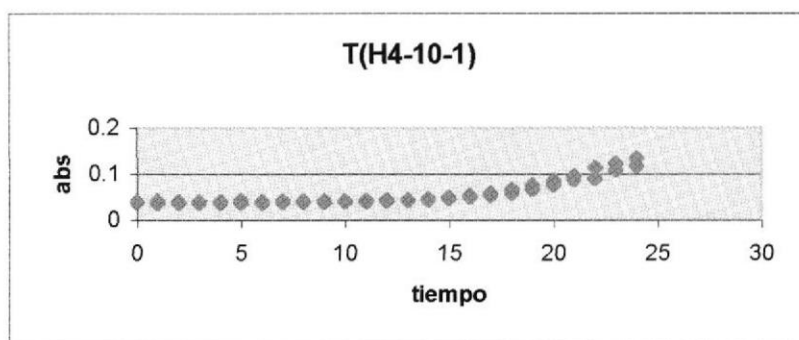
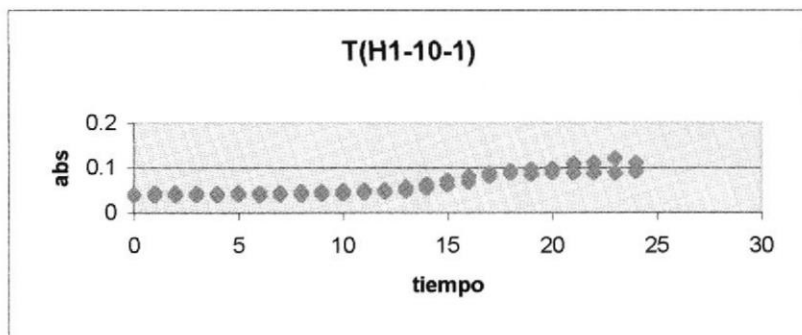
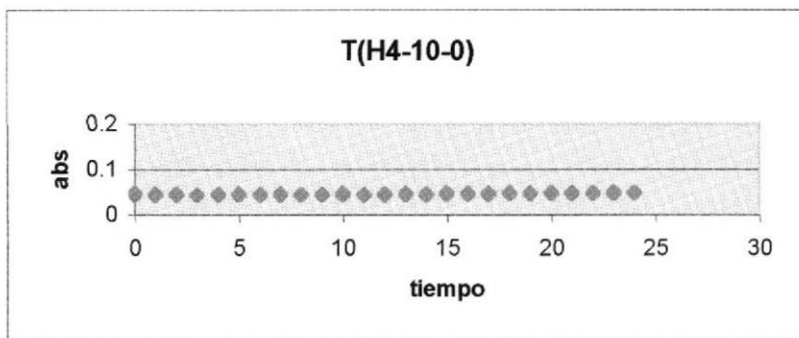
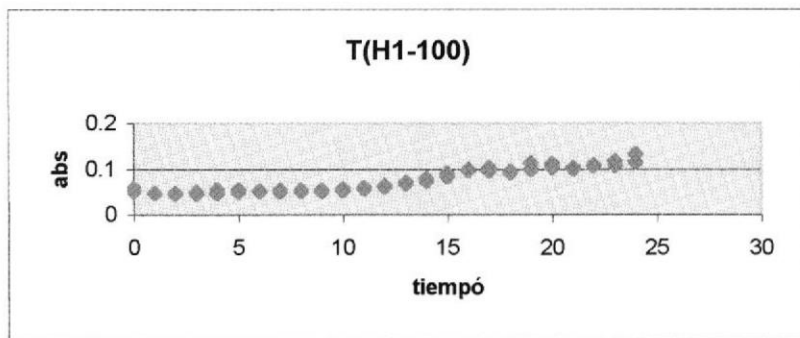
Pruebas hechas con Yangambi hoja 4

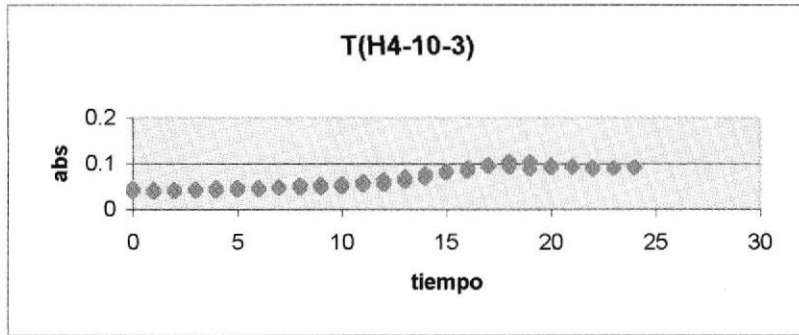
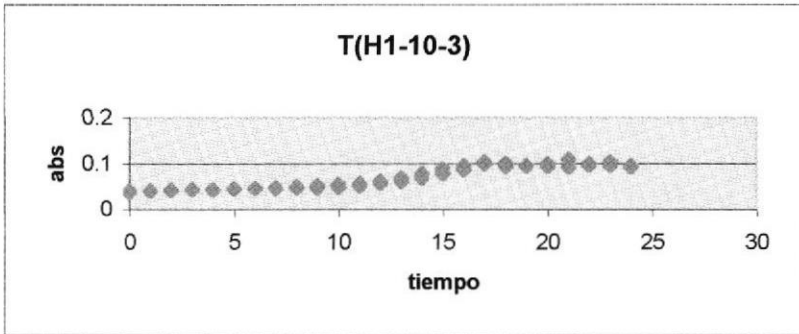
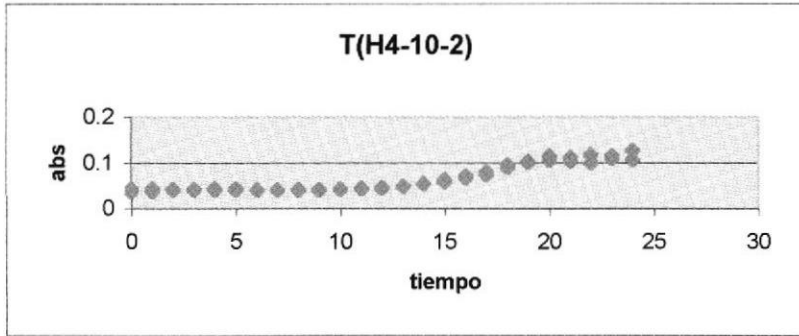
Pruebas hechas con Calcuta hoja 4

2.1.2 RESULTADOS

YANGAMBI





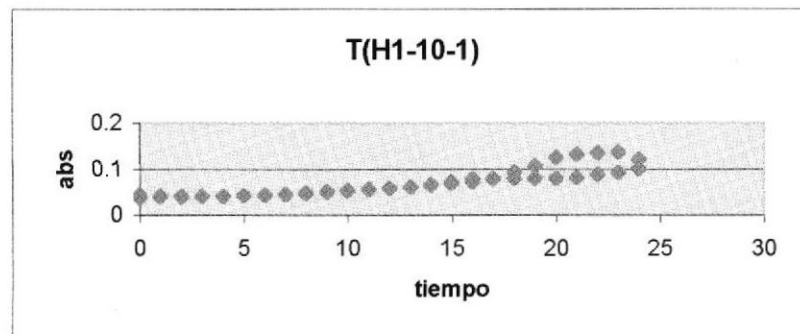
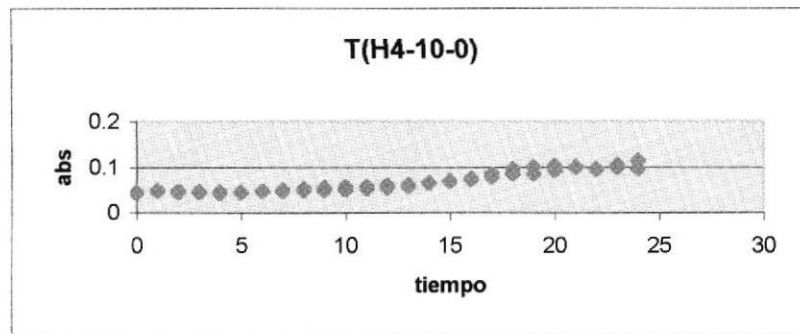
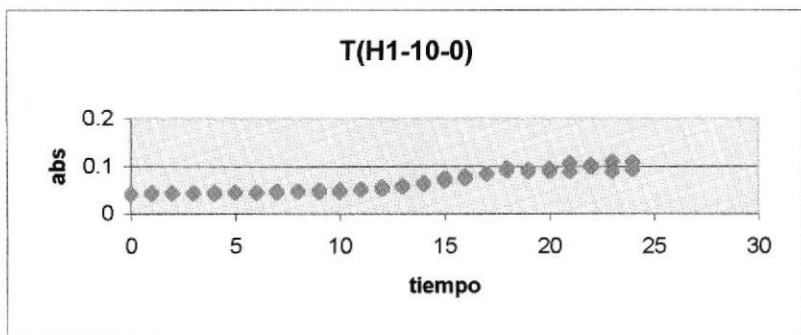
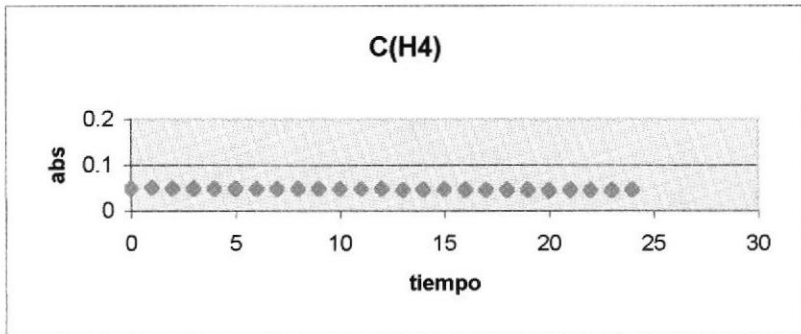
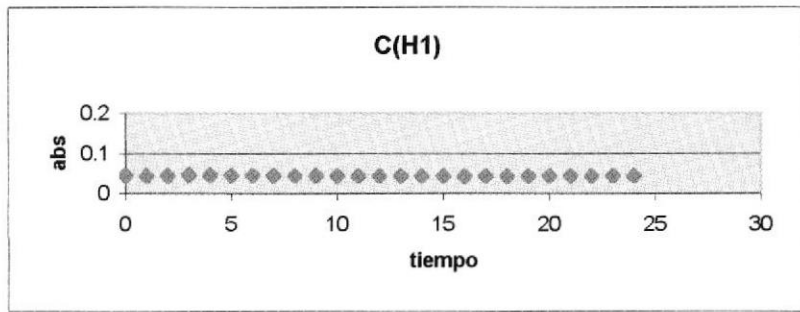


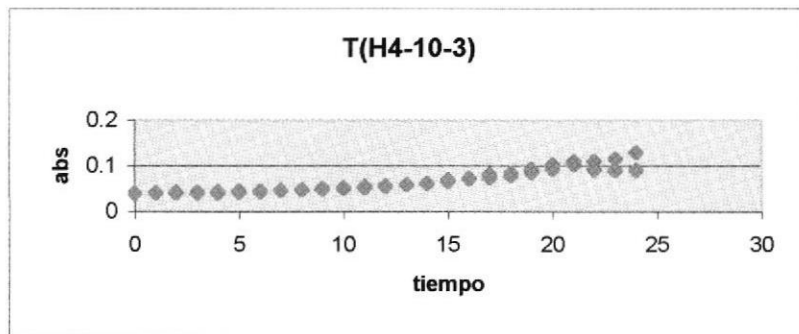
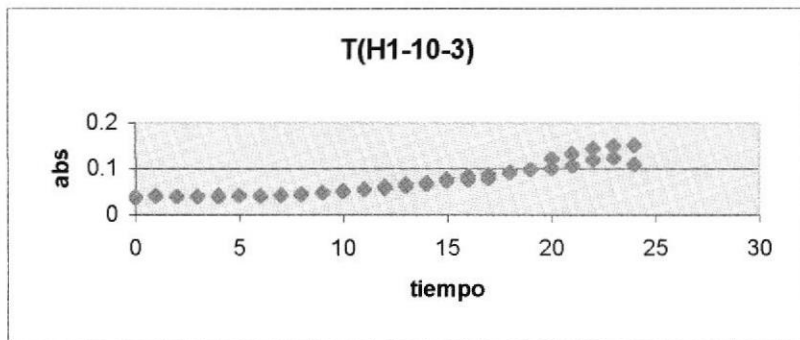
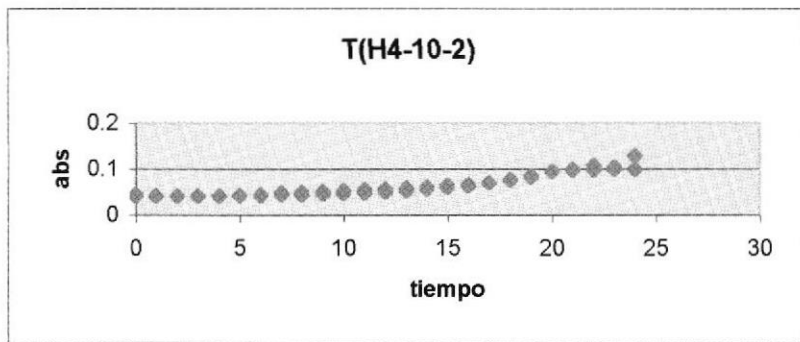
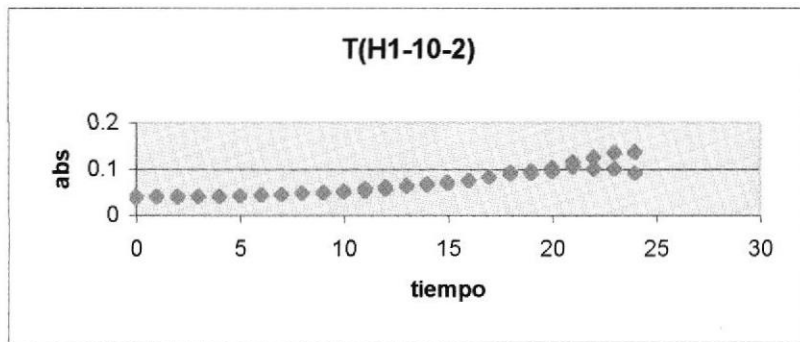
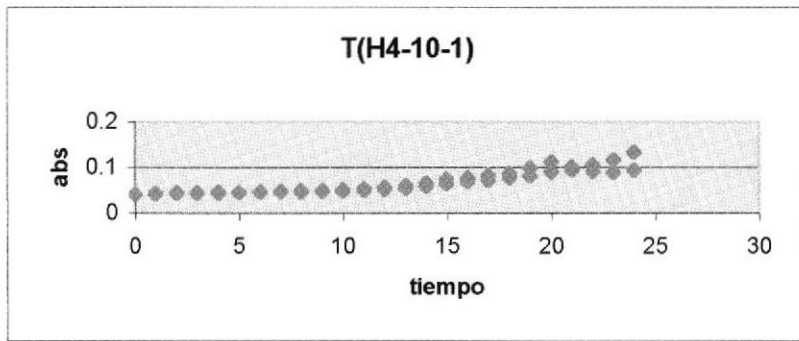
CIBT



CIBT

CALCUTA







ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

CONCLUSIONES

- ❖ Se realizaron pruebas con las variedades de banano Calcuta y Yangambi con las dos hojas (1 y 4) para las pruebas inhibitorias con E. coli. En los tratamientos no se presentaron cambios en el crecimiento de la bacteria.
- ❖ Luego se hicieron pruebas con Yangambi y Calcuta inoculando S. aureus observándose una variación notable en el crecimiento normal de la bacteria solo con el extracto proteico a partir de hoja Yangambi del estadio cuatro (anexo # 5), con este resultado se procedió a realizar nuevas pruebas para comprobación de sus efectos.
- ❖ Las siguientes pruebas arrojaron datos similares a las primeras realizadas con S. aureus, su crecimiento era plenamente mermado frente a la proteína de Yangambi.
- ❖ Las ultimas pruebas realizadas consistieron en provocar la desnaturalización de la proteína por medio de ebullición de agua en baño María, estos últimos ensayos arrojaron dato iguales a los obtenidos con hoja Yangambi 4 en las pruebas preliminares, sabiendo que proteínas son desnaturalizadas a esta temperatura (100 ° C) se supone probablemente la alteración de su estructura lo que conlleva a la separación en aminoácidos, péptidos, etc., siendo uno de estos componentes el responsable de la inhibición en el crecimiento del microorganismo.





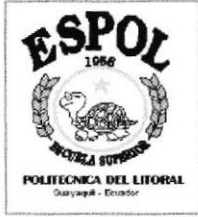
**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

RECOMENDACIONES

- ❖ Uno de los puntos importantes a considerar en el proceso de purificación de proteínas es el riesgo que se corre de su desnaturalización por efecto de la temperatura, pH, etc., por esta razón se recomienda que el área de trabajo deberá de mantenerse a 15°C y conservar las muestras a -17° C, así mismo todas las operaciones que involucren la manipulación de proteínas se deberán llevar a cabo a temperatura de 4° C, lo que se facilita con el empleo de hielo.
- ❖ Al trabajar con microorganismos se recomienda utilizar colonias con un periodo de inoculación no mayor a una semana.
- ❖ Se recomienda utilizar métodos de precipitación alternos como es el caso de TCA (Ácido Tricloroacético) cuya acción desnaturalizante permitirá obtener proteínas de bajo peso molecular llamados péptidos (Gallo y Hutner, 1998).



CIBT



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**



CIBT

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B. et al. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Editorial Omega. 1996. España.521-522.
- Boman, H. G. 1998. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: An update review. *Scandinavian Journal of Immunology* 48:15-25.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., Samblanx, G. W., and Osborn, R. W. 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:297-323.
- Cole, A. M. and Ganz, T. 2000. Human antimicrobial peptides: analysis and application. *Biotechniques* 29:822-826.
- Delost, M. *Introduction to Diagnostic Microbiology a text and workbook*. Editorial Mosby.1997. EEUU. 98-102,112,170,171.
- *Manual de medio de cultivo Merck*.1994. 88, 122.
- Gallo, R. L. and Huttner, K. M. 1998. Antimicrobial peptides: An emerging concept in cutaneous biology. *Journal of Investigative Dermatology* 111:739-743.



- **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**
- **INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS**

- Ganz, T. and Lehrer, R. I. 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today* 5:292-297
- Hancock, R. E., and Lehrer, R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology* 16:82-8
- Hetru, C. and Bulet, P. 1997. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *In Antibacterial peptide protocols* (W. M. Shafer, ed.), Humana Press, NJ. *Methods in Molecular Biology* 78: 35-49.
- Shafer, W. *Methods in Molecular Biology. Volume 78: Antibacterial Peptide Protocols.* Humana Press. 1997. EEUU. 43-46.
- van der Biezen, E. A. 2001. Quest for antimicrobial genes to engineer disease-resistant crops. *Trends in Plant Science* 6:89-91.



ANEXO #1

PREPARACION DE REACTIVOS

Buffer alcalino

Se prepara con:

Trisma base 50 mM

EDTA 10 mM

NaCl 150 mM

Acido Ascórbico 0.2 %

Buffer de extracción alcalino

Se prepara igual que el buffer de extracción alcalino, pero adicionando:
Mercapto 140µl/100ml

PMSF 1µml/ml

Tritón 1.5%

Reactivo de Bradford

Diluir 1 ml del reactivo de Bradford en 4 ml de agua destilada.

Medio de cultivo Luria Broth (100ml)

Triptona 1%

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 150 mM

Esterilizar a 121.1 °C por 15 min.

Medio de cultivo Poor Broth

Triptona 1%

NaCl 150 mM

Esterilizar a 121.1 °C por 15 min.



ANEXO #2

Laboratorio Integrado I



CIBT

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL (PENETRABILIDAD)

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

En esta práctica el primer día se preparará la columna de filtración en gel, lo que supone el empaquetamiento del gel previamente hinchado en el tampón adecuado y la aplicación de las sustancias correspondientes para determinar el volumen de exclusión y el volumen de la fase estacionaria. En el segundo día se aplicará la muestra y se procederá al desarrollo de la cromatografía.

INTRODUCCION

Los métodos cromatográficos se emplean para separar los componentes de una mezcla. La separación puede tener una finalidad analítica, es decir, averiguar cuales son los componentes de una mezcla, o una finalidad preparativa, para obtener separadamente alguno de los componentes de la mezcla en mayor cantidad para su mejor estudio o utilización posterior.

Dentro de las macromoléculas biológicas, las proteínas son las que poseen una mayor diversidad de tamaño y estructura. Su estudio viene realizándose desde hace varias décadas utilizando una gran variedad de técnicas y aproximaciones metodológicas. En la mayoría de los casos se requiere de un paso previo de aislamiento o purificación.

Existen varias técnicas cromatográficas para la purificación de proteínas, si bien una de las mas utilizadas es la **filtración en gel**. Esta técnica permite la separación de moléculas atendiendo a su tamaño molecular. La separación de los componentes se consigue al hacer pasar la mezcla a través de un gel en una columna de vidrio, la muestra debe ser del menor volumen posible. Una vez la muestra ha penetrado en el gel por completo, se arrastra mediante un eluyente, normalmente el mismo tampón o solución en el que esta equilibrado el gel en la columna. Los diferentes componentes de la mezcla descienden a lo largo de la columna a diferentes velocidades, separándose unos de otros. El líquido que sale o eluye de la columna se recoge en pequeñas fracciones en diferentes tubos por lo que puede llevarse a cabo una separación total o parcial de los componentes.

La explicación de que los componentes de la mezcla desciendan por la columna a diferentes velocidades está, por un lado en el diferente tamaño de dichos componentes y por otro en la estructura intima del gel. Los geles utilizados son polímeros glucídicos insolubles en agua con diferente grado de porosidad, estos polímeros forman partículas esféricas microscópicas que constituyen un verdadero entramado molecular. El grado

de porosidad es tal que algunas moléculas más pequeñas pueden penetrar en el gel pero otras de mayor tamaño no pueden hacerlo por lo que descienden libremente entre los intersticios del gel, sin embargo las moléculas que por su menor tamaño pueden penetrar a través de los poros del gel son retardadas pues se entretienen durante algo más de tiempo en el laberinto o entramado poroso que supone el interior del gel, este retraso será mayor cuanto más pequeña sea la molécula.

Para cada tipo de gel existen dos valores límite a tener en cuenta según el grado de porosidad, un valor máximo que hace referencia al peso molecular a partir del cual las moléculas son excluidas del gel y un valor mínimo por debajo del cual todas las moléculas son incluidas completamente en el gel. Existen diferentes tipos de geles de filtración y de diferentes casas comerciales, uno de los más utilizados es el denominado Sephadex del que existen varios tipos atendiendo principalmente al rango de fraccionamiento, es decir los límites de pesos moleculares entre los que el gel es capaz de discriminar, así por ejemplo el Sephadex G-50 posee un rango de fraccionamiento para proteínas globulares entre 1500- 30000. Esto quiere decir que este gel podría resolver una mezcla de dos proteínas de digamos 8000 y 20000 pero no nos serviría para separar dos proteínas de 35000 y 50000. Para cada caso según el tamaño de las proteínas de la mezcla elegiremos un gel u otro.

Los resultados de una cromatografía de filtración en gel se expresan en forma de un **diagrama de elución** donde se representa la aparición del soluto en forma de concentración, absorbancia, etc., en función del volumen de eluyente que pasa por la columna. El **volumen de elución** (V_e) para una sustancia corresponde con el volumen de eluyente que ha pasado por la columna desde la aplicación de la muestra hasta la aparición del máximo de concentración de dicha sustancia.

En una cromatografía es importante considerar dos parámetros:

En primer lugar el **volumen de exclusión** o volumen muerto (V_o) es decir el volumen que queda en el exterior del gel, o en otras palabras el volumen de eluyente de las moléculas que son excluidas por el gel. Para su determinación se suele emplear una sustancia coloreada de alto peso molecular como el Azul dextrano ($PM=2.000.000$). Bastará medir el volumen eluido por la columna desde la aplicación hasta la aparición del color azul del dextrano característico.

El otro parámetro importante es el **volumen de la fase estacionaria** (V_i) es decir el volumen de eluyente en el interior del gel al cual pueden acceder las moléculas más pequeñas, para calcularlo podemos recurrir al mismo sistema que antes utilizando en este caso una sustancia coloreada de muy bajo peso molecular pudiendo ser una sal como el dicromato potásico, la vitamina B12, etc.

Para normalizar los resultados de la cromatografía, en lugar de expresar el volumen de elución de un componente se puede expresar el **coeficiente de distribución** (K_d) que representaría la fracción de la fase estacionaria accesible a la difusión del soluto.

$$Kd = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

En algunos casos no es posible determinar con precisión V_i , en este caso se puede aproximar su valor conociendo el volumen del lecho (V_t), cuya determinación podemos hacer bien matemáticamente o bien midiendo el volumen equivalente de agua con una probeta, en este caso $V_t - V_o$ nos daría el volumen que ocuparía el gel tanto de la fase estacionaria de su interior como el volumen de las fibras que constituyen su matriz.

En este caso el coeficiente normalizado que emplearíamos sería K_{av}

Tanto K_d como K_{av} definen la conducta cromatográfica del soluto independientemente de la longitud del lecho o grado de empaquetamiento. Existen otras formas de normalizar los resultados por ejemplo: V_e/V_t o V_e/V_o

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de la práctica es el de separar mediante cromatografía de filtración en gel una muestra (1ml aprox.) que contiene una mezcla de proteínas de diferente peso molecular.

Igualmente se dibujará el perfil cromatográfico y se determinará el coeficiente de distribución y otras características cromatográficas a contestar en el cuestionario adjunto.

IMPORTANTE: Lee el cuestionario antes de empezar

MATERIALES Y REACTIVOS

Columna rellena de gel de filtración Sephadex G-75. Tubo con la mezcla a separar, pipeta pasteur, pipetas graduadas, tubos de ensayo, gradilla y colector de fracciones. Colorímetro.

METODO

1^{er} día:

- Extraer de la columna el líquido que sobrepasa la superficie del gel, dejando en seco dicha superficie, con cuidado de no distorsionar el ras superior del gel.
- Aplicar un pequeño volumen de la mezcla problema constituida por: Azul dextrano y dicromato potásico.
- **Colocar bajo la salida de la columna el primer tubo y abrir el paso de líquido liberando la pinza correspondiente. Cuando la muestra coloreada haya penetrado en el gel continuar el proceso de elución con la solución**



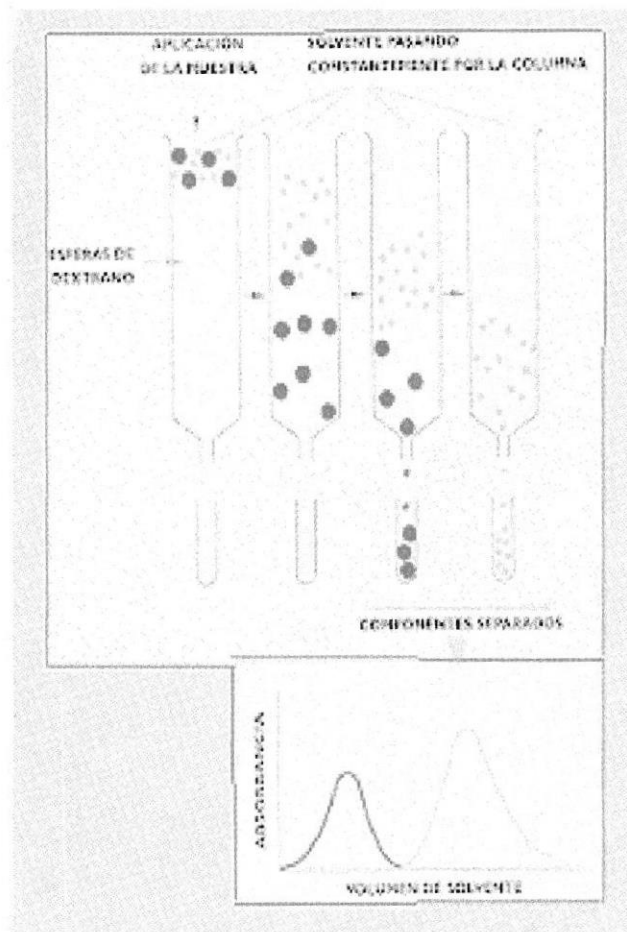
correspondiente (eluyente) añadida a la columna por la parte superior, y no añadir el eluyente hasta que la muestra haya penetrado en el gel.

Recoger fracciones de 2 ml de forma sucesiva y ordenada en tubos previamente numerados. Observar en los tubos la presencia de sustancias coloreadas.

2º día:

- Extraer de la columna el liquido que sobrepasa la superficie del gel, dejando en seco dicha superficie, con cuidado de no distorsionar el lecho del gel.
- Aplicar un pequeño volumen de la mezcla problema constituida por proteínas de diferente peso molecular.
- **Colocar bajo la salida de la columna el primer tubo y abrir el paso de liquido liberando la pinza correspondiente. Cuando la muestra haya penetrado en el gel continuar el proceso de elución con la solución correspondiente (eluyente) añadida a la columna por la parte superior. No añadir el eluyente hasta que la muestra haya penetrado en el gel.**

Recoger fracciones de 2 ml de forma sucesiva y ordenada en tubos previamente numerados. Determinar en que fracciones aparecen las distintas proteínas aplicadas.



ANEXO # 3

Staphylococcus

El genero Staphylococcus esta compuesto aproximadamente de 24 especies muchas de las cuales están asociadas con la colonización o infección humana. La lista de especies encontradas en humano o animales incluye S. Aureus, epidermis, saprofiticus, hominis, hemolítico y warneri.

Todas las especies señaladas, excepto S. Aureus son clasificadas como coagulasa negativo debido a la deficiencia de producción de esta enzima.

CARACTERÍSTICAS

- Gram +
- Anaerobios facultativo
- Catalasa +
- No forman esporas
- Reducen nitratos a nitritos
- Crece en 7.5% - 10% CINA



S. aureus

La mayoría de las cepas de S aureus aparecen como colonias medianas y largas de 2-3 mm de diámetro con una apariencia cremosa y convexa. El borde es entero, y las colonias pueden ser blancas o amarilla dorada.

La mayoría de las cepas de S aureus muestran una pequeña zona hemolítica, mientras algunas cepas son hemolíticas.

Para diferenciar S aureus de otras especies de estafilococos, el test de coagulasa es el más confiable procedimiento. S aureus es la única especie de estafilococos patógeno para el hombre que produce coagulasa.

En el test en placa de coagulasa el limite de coagulasa o factor de apilamiento es medido. Una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano es emulsificada en medio salino estéril sobre una placa de microscopio, y una gota de plasma de conejo es adicionada. La suspensión es mezclada y se observa la aparición de un coagulo blanco de fibrina indicando la conversión de fibrinógeno a fibrina, el cual indica una reacción positiva.

Si el resultado fuera negativo, el test de coagulasa en tubo puede ser efectuado. El test en tubo detecta coagulasa libre, una toxina extracelular que actúa en presencia del "coagulase reacting factor" CRF, un compuesto normalmente encontrado en el plasma para formar coagulasa-CFR complejo el cual asemeja a la trombina y convierte fibrinógeno en fibrina.

En el tubo 0.5 ml de plasma de conejo es inoculado con el microorganismo y es incubado a 35 - 37°C en baño María, si existe una lisis parcial o completa del coagulo en 1 a 4 horas. El test deberá ser chequeado cada 30 min.

Puesto que algunas cepas de *S. aureus* producen fibrinolisisina, resultados negativos falsos pueden ocurrir si la prueba no es observada periódicamente o si la prueba es observada solamente para la formación de coágulo al final de 18-24 horas de incubación. Las pruebas que son negativas a las 4 horas pueden ser incubadas a temperatura ambiente "overnight" por 16-18 horas para una producción lenta de coagulasa.



CIBT

CARACTERÍSTICAS

Medianas o grandes colonias en agar sangre y con pigmentación cremosa o amarilla dorada.

Gram +

Beta hemolítico o no hemolítico en agar sangre de oveja

Coagulasa +

Manitol-Sal-Agar +

S. aureus libera un número de toxinas extracelulares y compuestos los cuales conllevan a su importancia como patógeno serio.

El organismo es casi siempre infeccioso cuando es aislado del paciente. La excepción es en el portador cuando el organismo puede ser portado asintómicamente en un individuo sin presentar signos de ser patogénico.

Además *S. aureus* posee varias características superficiales que juegan un rol en el establecimiento y curso de la infección incluyendo.

PROTEINA A: une a la molécula de anticuerpo. La cual causa interferencia en la fagocitosis y fijación del complejo.

POLISACARIDO CAPSULAR: permite al organismos a resistir fagocitosis

PEPTIDOGLICAN Y ACIDOS TEICOICOS: encontrados en la pared celular ayuda a la fijación del organismo a la mucosa de la membrana y permite resistir al organismo a condiciones ambientales desfavorables.

Infecciones causadas por *S. aureus* están acompañadas por hinchazón, enrojecimiento, incremento en temperatura del área afectada y acumulación de leucocitos. Las infecciones más comunes con estafilococos incluyen aquellas de la piel como la foliculitis (infección en los folículos capilares), quemaduras, furúnculos.

Envenenamiento estafilococal con alimentos, el tipo más común de envenenamiento con alimentos en los EEUU provocado por mala refrigeración.

Flanes, natillas, cremas pasteleras, papas, huevos, ensalada de pollo, carnes procesadas.

La toxina es producida a temperatura ambiente e inactivada a temperatura de refrigeración.

SINTOMAS

Nauseas

Vómito 2 – 6 horas después de la ingestión

Diarrea

Puede darse dolores abdominales y calambres.

COMPROBACIÓN

AGAR MANITOL SAL

PROPÓSITO

Agar manitol sal es un medio selectivo y diferencial usado para aislamiento de estafilococos.

PRINCIPIO

MSA contiene altos niveles de cloruro de sodio (7.5%). Especies de estafilococos(y algunas cepas halotolerantes de micrococcos y enterococos) son capaces de crecer a este nivel de ClNa, donde la mayoría de microorganismos gram- y otros gram+ no pueden.

MSA contiene extracto de carne, NaCl, D-manitol, y indicador rojo fenol, S aureus crece en MSA y fermenta manitol produciendo colonias amarillas. La mayoría de cepas de estafilococos coagulasa negativos no fermentan manitol y crecen como colonias pequeñas y rojas rodeadas por zonas rojas o purpuras.

Las diferencias son causadas por la reacción del indicador rojo fenol, el cual es rojo a ph 8.4 y amarillo a ph 6.8

PROCEDIMIENTO

Raye la caja petri conteniendo MSA con la colonia a ser evaluada
incubar a 35-37°C por 18-24 horas
interpretar los resultados de crecimiento y fermentación
registrar resultados

INTERPRETACIÓN

Crecimiento sin fermentación: la placa se mantiene rosada-roja, sin halo amarillo rodeando el crecimiento.

Crecimiento y fermentación: halos amarillos bordeando el crecimiento

CONTROL DE CALIDAD

S. aureus: crecimiento, zona amarilla alrededor de colonias.

S. epidermis: crecimiento, zona alrededor de colonias.

AGAR- MANITOL-SAL-ROJO FENOL

Agar selectivo para la demostración de estafilococos patógenos en alimentos y otros materiales objeto de investigación, según CHAPMAN (1995), modificado.



CIBT

FORMA DE ACTUACIÓN

Debido a la concentración extremadamente alta de sal, permite solamente el crecimiento de microorganismos tolerantes a ella, entre los que se encuentran entre otros los del genero estafilococos. La degradación del manitol, con formación de ácido, está notablemente correlacionado con la patogenicidad del germen en cuestión y sirve, por lo tanto, como indicativo de la presencia de estafilococos aureus.

COMPOSICIÓN (g/l)

Peptona 10.0, extracto de carne 1.0, ClNa 75.0, D (-) manitol 10.0, rojo fenol 0.025, agar agar 12.0

PREPARACIÓN

Disolver 108 g/lit, esterilizar en autoclave (15 min a 121° C) y verter en placas.
PH 7.4 +/- 0.1

Las placas con medio de cultivo son claras y de color rojo.

EMPLEO E INTERPRETACIÓN

La siembra se realiza en superficie por estría. Debido al potente efecto inhibidor de este medio, debe sembrarse masivamente.

Incubación: hasta 3 días a 37° C

Colonias	Microorganismos
Con halo amarillo luminoso; crecimiento intenso	Manitol positivos (S aureus)
Sin cambio de color; crecimiento débil, casi siempre	Manitol negativo (S epidermis y otros)

CONTROL DE CALIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO

CEPAS DE ENSAYO	VIRAJE DEL MEDIO A AMARILLO
S aureus ATCC25923	+
S aureus ATCC6538-P	+
S aureus ATCC12	+

ANEXO # 4

ESCHERICHIA COLI

E. coli es flora normal del tracto intestinal y es por lo tanto encontrado en heces fecales. Es el más comúnmente en la familia de las Enterobacteriaceae.

Es lactosa positivo. E. coli es fácilmente identificada por la presencia de colonias rosadas-rojas en agar McConkey por sus características de color verde metálica brillante en EMB. Es oxidasa negativa e indol positivo y pueden ser presumiblemente identificadas por estas reacciones. Una completa identificación requiere otras pruebas bioquímicas adicionales las cuales pueden incluir las siguientes reacciones:

Sulfuro de hidrógeno: negativo

McConkey: colonias rojas o rosadas

EMB: verde metálico brillante

Rojo de metilo: positivo

Voges Proskauer: negativo

Citrato: negativo

Fenilalanina: negativo

Ureasa: negativo

FERMENTA:

D-Sorbitol

D-Manitol

L-Arabinosa

D-Xilosa

Maltosa

D-Manosa

E. coli es asociada con enfermedades y es capaz de infectar muchos órganos, la fuente de infección es la flora normal de E. Coli a partir de la contaminación fecal. Además que aproximadamente 25% de todas las enfermedades de transmisión urinaria (infecciones nosocomiales) son atribuidas a la E. Coli.

Otros tipos de infecciones incluyen apendicitis, peritonitis, neumonía, meningitis neonatal, entre otros.

La septicemia es asociada con el shock endotóxico debido a la liberación de lipolisacáridos de la pared celular de la célula gram negativa.

Diarrea y gastroenteritis están asociadas con serotipos de E. Coli diferentes a aquellos que se encuentran en la flora normal del tracto intestinal. Estos síndromes están basados en la existencia de factores de virulencia comunmente o frecuentemente, cuatro enfermedades han sido descritas.

1. **E.coli Enterotoxigénica (ECET).**- solamente crecen en agar sangre y producen enterotoxinas que resultan en diarrea epidémica severa. Esta es comunmente conocida como la venganza de Montezuma o Diarrea del viajero y es asociado a la ingesta de agua o alimentos contaminados.

Serogrupos específicos son asociados con gastritis severa. La producción de enterotoxina ocurre en ciertos serotipos, los cuales incluyen 06,08,015,025,063,078,0148,0159.

EPEC produce dos toxinas, una toxina termolábil (LT) y una termoestable (ST), que lideran indirectamente la pérdida de fluido. Ciertos serotipos producen LT y ST, otros solo producen LT, y otros solo producen ST. La pared intestinal es invadida, la cual resulta en inflamación y en pérdida de fluidos. La enfermedad es caracterizada por diarrea, vomito, escalofríos, fiebre, y dolor de cabeza. El período de incubación es de 1-2 días, mientras que la enfermedad dura de 5 a 10 días.

2. **E. Coli Enteroinvasiva (EIEC).**- Invade el epitelio intestinal causando infección, la enfermedad se caracteriza por fiebres, calambres y heces sanguinolentas por que contienen células rojas, neutrófilos y mucus. EIEC pueden ser asociadas con los siguientes serogrupos; 0028, 0115, 0124, 0136, 0143, 0144, 0147y 0152. La mayoría de las cepas son no motiles y lentas o no lactosa fermentadoras.
3. **E. Coli Enteropatogénica (EPEC).**- Es no invasiva, no produce toxinas, y es asociada con un numero limitado de serogrupos. Este síndrome es usualmente nosocomial y aparece en recién nacidos e infantes, causando diarrea acuosa con mucus pero sin sangre EPEC puede ser aislada en medio entérico.
4. **E. Coli Enterohemorrágica (EHEC).**- O E. coli Verotóxica (VTEC), es asociada con diarrea sanguinolenta debido a la producción de verotoxina, una citotoxina, la colitis hemorrágica es asociada con calambres intestinales, diarrea acuosa, y hemorragia intestinal. No hay aparición de fiebre y no hay células presentes en heces.

Estas complicaciones incluyen falla renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática.

Más de 50 serotipos de EHEC o VTEC existen, pero la infección es frecuentemente asociada con un serotipo en particular (0157 H7). Este serotipo particular de E. coli es la única cepa que es sorbitol negativo. Puede ser aislado en agar McConkey en el cual sorbitol puede ser sustituido por lactosa.



CIBT

E. coli ANAEROGENICA.- E. coli inactiva, se refiere a un tipo particular de E. coli que no produce gas durante fermentación. Es lactosa negativo, es no móvil.

AGAR EMB SEG. LEVINE

Para el aislamiento y diferenciación de E. coli y Enterobacter y para la identificación de Candida albicans.

FORMA DE ACTUACIÓN

Los colorantes contenidos en su fórmula inhiben a muchos gérmenes gram positivos de acompañamiento. Según Weld (1952,1953) y Vogel y Moses (1957), el agar EMB seg. Levine adicionado con clorhidrato de clorotetraciclina, que inhibe a toda flora de acompañamiento, es utilizable para la identificación de Candida albicans a partir de materiales clínicos de investigación.

El agar EMB seg. Levine puede ser utilizado para la demostración de Estafilococos coagulasa positivos, que crecen formando colonias incoloras características en formas de punto de alfiler y que presentan buena concordancia con el ensayo de coagulasa (Menalosa y Col 1960)

COMPOSICION (g/l)

Peptona 10.0; hidrogeno fosfato dipotásico 2.0; Lactosa 10.0 ; Eosina amarillenta 0.4; azul de metileno 0.065; agar agar 13.5.

PREPARACION

Disolver 36 g/l, esterilizar en autoclave (15 min a 121° C) y verter en placas

Las placas con medio de cultivo son claras y de color rojo pardusco. PH: 7.0 ±0.2

Para el cultivo de candida añadir, después del autoclavado, 100mmg/l de clorhidrato de clorotetraciclina, y mezclar homogéneamente.

EMPLEO E INTERPRETACION

Este método de cultivo se siembra finamente, por el método de extensión. Incubación: 1-2 días a 37° C

Para el cultivo primario de candida, las placas complementadas con clorotetraciclina se incuban en una atmósfera con 10% de CO₂.

Colonias	Microorganismos
De 2-3 mm de diámetro con brillo metálico verdoso a la luz reflejada, con centro oscuro hasta negro en luz transmitida.	Escherichia coli

De 4-6 mm de diámetro, centro pardo grisáceo en luz transmitida sin brillo metálico.	Enterobacter
Transparentes de color ámbar.	Salmonella y Shigella
Colonias incoloras en punta de alfiler.	Estafilococos coagulasa positivos
En forma de telaraña o plumosas.	Candida albicans
Semejantes a las de levaduras, redondas, lisas.	Otras especies de candida, a veces también Moceada.



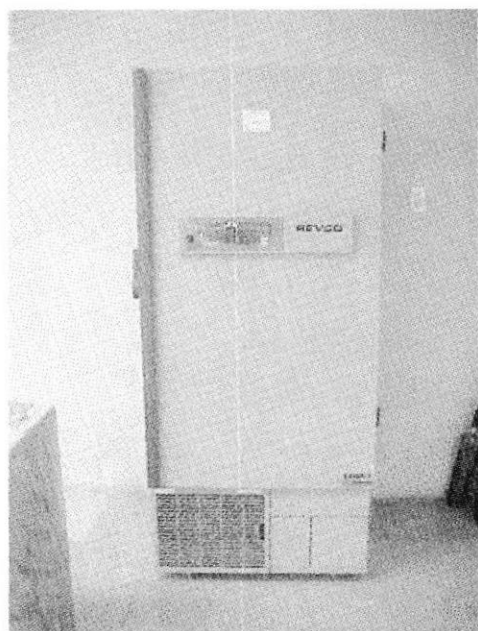
LABORATORIO DE INMUNOQUIMICA



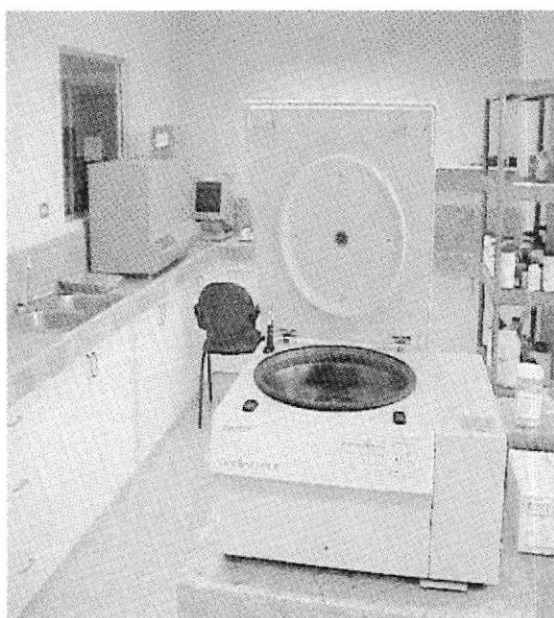
ESPECTROFOTOMETRO



CONGELADOR -80°C



CENTRÍFUGA



EQUIPO DE CROMATOGRAFIA

