



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN.

---

**“Comparación del efecto antibacterial de dos extractos de  
*Echinacea purpurea* en bacterias aisladas de exudados  
cervicovaginales.”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

EULOPA PALESTINA JUAN CARLOS.

ASESOR:

Dr. JOSE ANTONIO LICEA VEGA

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

U. N. A. M.  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



ATN: L.A. ARACELI HERREJÓN FERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de Estudios Superiores Cuautitlán.  
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Comparación del efecto antibacterial de dos extractos de Echinacea purpurea en bacterias aisladas de exudados cervicovaginales

Que presenta el pasante: Juan Carlos Eulopa Palestina  
Con número de cuenta: 303330857 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Antonio Licea Vega	<i>José Antonio Licea Vega</i>
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	<i>Buitrón</i>
SECRETARIO	M. en C. Lidia Rangel Trujano	<i>Lidia Rangel Trujano</i>
1er. SUPLENTE	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	<i>Brígida del Carmen Camacho Enriquez</i>
2do. SUPLENTE	QFB. Dulce María Ruvalcaba Síl	<i>Dulce María Ruvalcaba Síl</i>

NOTA: los síndicales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

## **Reconocimientos.**

Primero que nada quiero agradecer a Dios por brindarme el mejor de los regalos, el cual es la vida, por darme la mejor de la sabiduría y razonamiento para poder sacar a delante mis estudios durante este largo tiempo.

Le agradezco por darme el segundo regalo máspreciado en mi vida, la cual es mi hermosa familia por que sin ellos esto no hubiera sido realidad.

Quiero darles las gracias a mis padres por darme el tercer regalo en mi vida que son los estudios y más que eso la educación que me dieron durante este tiempo, de enseñarme a ser respetuoso con las personas y nunca ofender a nadie.

Le quiero decir a mi mamá Lucia Palestina Rodríguez en esta tesis que es la mejor por darme el cuarto regalo en mi vida que es el sincero cariño que nos tiene a toda la familia Eulopa que se preocupa por todos nosotros sin tener que hacerlo, por darme todos los conocimientos que ella tenía, por todas las develadas que sufrimos juntos para poder entregar todas mis tareas desde la primaria hasta la universidad, te agradezco por hacer de mi una mejor persona por saber cuándo decir si y cuando no, porque por eso soy lo que soy en este momento porque aunque me haya enojado por no dejarme salir muchas veces a la calle con mis amigos, porque tu sabias que al final iba a ser para bien y ahora en estos momentos los veo reflejados, quiero que sepas que eres la mejor madre de todo el mundo.

Te quiero agradecer mucho papá Enrique Eulopa Vidal por darme el quinto regalo en mi vida, el de la lealtad al trabajo que en todo momento debo asistir a este aunque vaya malo o borracho, gracias por todas las desveladas que pasaste frió, sueño, cansancio pero todo lo hacías para que nuestra familia tuviera todo lo que nos diste, gracias por todas las desveladas que permaneciste junto a mi por mis trabajos escolares, por las mil veces que no te compraste lo que querías nada mas por darnos mejor a nosotros lo que queríamos, quiero que sepas que eres el mejor padre que me pudo haber dado la vida que estoy muy orgulloso de ti y gracias por permanecer en todo momento junto a nosotros que no te derrumbaste en ese mal episodio de nuestra vida que por el contrario nos alentabas a seguir para ser mejores en la vida.

A ti hermano Luis Enrique Eulopa Palestina quiero darte las gracias por ser el mejor de los hermanos que a pesar de todas las peleas que tuvimos supimos salir adelante y que no nos separamos nunca que por el contrario nos hicimos los mejores hermanos, te agradezco y te deseo lo mejor para tu vida y tu carrera.

Gracias tío Oscar Armando Palestina por todo lo que ha hecho por toda la familia pero especialmente le agradezco mucho por el apoyo que le dio a mi familia y a mí, por todos aquellos consejos, por vestirme y regalarme zapatos cada que se lo pedía, gracias por todo el apoyo económico, y por siempre recibirnos en su casa.

Quiero agradecer profundamente a todos mis tíos por estar cerca de mí y por todas las cervezas que me tome con cada uno de ustedes y por cada una de ellas fue una experiencia diferente para mí, como mi tío Juan Eulopa Vidal, Luis Eulopa Vidal, Genaro Eulopa Vidal, mi tío Charro, José Hurtado, Oscar Santiago, Genaro Palestina y a mi tío Raymundo. Gracias.

Quiero agradecer a mi abuelo Fidel Palestina por enseñarme a trabajar y nunca rendirme si no por el contrario, cuanto más pesado es el trabajo más ganas hay que ponerle, por todos los mil y un consejos que me dio para afrontar la vida y mis estudios.

Por último quiero agradecer a todos mis primos por todos los momentos felices que pasamos juntos y por cada una de las borracheras que nos pusimos hasta entre semana, y que aun así tenía que presentar exámenes al otro día, gracias Chino, Juancho, Toño, José, Ángel, Guayo, Güero, Bombón, Lalo, Pepe toño, Ricardo.

Esta tesis está llena de agradecimientos porque cada una de las personas de la Familia Eulopa y Palestina puso su granito para que yo llegara hasta este momento que marcara mi vida y la de todos los integrantes de mi familia. A todos y cada uno de ustedes les doy las GRACIAS.

## GRACIAS PAPA Y MAMA

ÍNDICE.	Paginas.
1.-Titulo.....	1
2.-Resumen.....	8
3.-Objetivo General.....	10
3.1.-Objetivos Particulares.....	10
4.- Hipótesis.....	10
5.-Introducción.....	11
5.1.- <i>Echinacea purpurea</i> .....	11
5.1.1.-Generalidades.....	11
5.1.2.-Propiedades y Composición.....	12
5.1.3.-Funcionamiento.....	12
5.2.- <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	13
5.2.1.-Características Generales.....	13
5.2.2.-Aislamiento e Identificación.....	13
5.2.3.-Patogenicidad.....	14
5.2.4.-Cuadro clínico.....	14
5.3.- <i>Escherichia coli</i> .....	15
5.3.1.-Generalidades.....	15
5.3.2.-Identificación.....	15
5.3.3.-Clasificación.....	15
5.3.4.- <i>Escherichia coli entero patogénica</i> .....	15
5.3.5.- <i>Escherichia coli entero toxigénica</i> .....	16
5.3.6.- <i>Escherichia coli entero invasiva</i> .....	16
5.3.7.- <i>Escherichia coli entero hemorrágica</i> .....	16
5.3.8.- <i>Escherichia coli entero adhesiva</i> .....	17
5.3.9.- <i>Escherichia coli de adhesión difusa</i> .....	17
5.3.10.-Patogenia.....	17
5.3.11.-Virulencia.....	17
5.3.12.-Infecciones urinarias.....	18
5.3.13.-Tratamiento.....	18
5.4.- <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	18
5.4.1.-Generalidades.....	18
5.4.2.-Identificación.....	18
5.5.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
5.5.1.-Generalidades.....	19
5.5.2.-Agente etiológico.....	20
5.5.3.-Aspectos clínicos.....	21
5.5.4.-Patogenia.....	22
5.5.5.-Tratamiento.....	22
5.6.- <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	22
5.6.1.-Generalidades.....	22
5.6.2.-Identificación.....	23
5.6.3.-Virulencia.....	23
5.6.4.-Cuadro clínico.....	24
5.6.5.-Diagnostico.....	24
5.6.6.-Tratamiento antibiótico.....	24

5.7.- <i>Proteus mirabilis</i> .....	25
5.7.1.-Generalidades.....	25
5.7.2.-Identificación.....	25
5.8.- <i>Cándida albicans</i> .....	25
5.8.1.-Generalidades.....	25
5.8.2.-Identificación.....	26
6.-Diagrama de Flujo General.....	30
6.1.-Preparación para el extracto de <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	31
6.2.- Preparación para el extracto de <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	32
6.3.-Filtración por membrana.....	33
6.4.-Secado en estufa.....	34
6.5.-Recolección de muestras.....	35
6.6.-Preparación de la micro placa.....	36
7.-Metodología.....	37
8.-Resultados.....	39
8.1.- <i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	40
8.2.- <i>Staphylococcus aureus</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	41
8.3.- <i>Staphylococcus epidermidis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	42
8.4.- <i>Cándida albicans</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	43
8.5.- <i>Proteus mirabilis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	44
8.6.- <i>Escherichia coli</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	45
8.7.- <i>Gardnerella vaginalis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz.....	46
8.8.- <i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	47
8.9.- <i>Staphylococcus aureus</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	48
8.10.- <i>Staphylococcus epidermidis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	49
8.11.- <i>Candida albicans</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	50
8.12.- <i>Proteus mirabilis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	51
8.13.- <i>Escherichia coli</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	52
8.14.- <i>Gardnerella vaginalis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta.....	53
8.15.-Comparación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	54
8.16.- Comparación de <i>Staphylococcus aureus</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	55
8.17.- Comparación de <i>Staphylococcus epidermidis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	56
8.18.- Comparación de <i>Candida albicans</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	57
8.19.- Comparación de <i>Proteus mirabilis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	58
8.20.- Comparación de <i>Escherichia coli</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	59
8.21.- Comparación de <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Echinacea purpurea</i> .....	60
8.22.-Bacteriostático o bactericida.....	63
9.-Análisis de resultados.....	64
10.-Conclusiones.....	68
11.-Material y equipo.....	27
12.-Apendice.....	69
13.-Bibliografía.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS.

1.- <i>Echinacea purpurea</i> aérea.....	11
2.-Método general de análisis para la identificación de bacterias en cervicovagina ...	30
3.-Preparación del extracto raíz mediante la maceración.....	31
4.-Preparación del extracto planta mediante la maceración.....	32
5.-Filtración del extracto por vacío mediante una membrana de 0.45 µm.....	33
6.-Obtención de los cristales estériles.....	34
7.-Recolección, aislamiento e identificación de las cepas trabajadas.....	35
8.-Preparación de la microplaca con la ayuda de una micropipeta.....	36
9.- <i>Echinacea purpurea</i> raíz ante <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	40
10.- <i>Staphylococcus aureus</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz .....	41
11. - <i>Staphylococcus epidermidis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz .....	42
12.- <i>Candida albicans</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz .....	43
13.- <i>Proteus mirabilis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz .....	44
14.- <i>Escherichia coli</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz .....	45
15.- <i>Gardnerella vaginalis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> raíz .....	46
16.- <i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta .....	47
17.- <i>Staphylococcus aureus</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta .....	48
18.- <i>Staphylococcus epidermidis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta .....	49
19.- <i>Candida albicans</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta .....	50
20.- <i>Proteus mirabilis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta .....	51
21.- <i>Escherichia coli</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta .....	52
22.- <i>Gardnerella vaginalis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> planta .....	53
23.-Comparación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> ..	54
24.- Comparación de <i>Staphylococcus aureus</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	55
25.- Comparación de <i>Staphylococcus epidermidis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	56
26.- Comparación de <i>Candida albicans</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	57
27.- Comparación de <i>Proteus mirabilis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	58
28.- Comparación de <i>Escherichia coli</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	59
29.- Comparación de <i>Gardnerella vaginalis</i> vs <i>Echinacea purpurea</i> .....	60
30.-Efecto bacteriostático o bactericida en planta.....	61
30.-Efecto bacteriostático o bactericida en raíz.....	62



## **2.- RESUMEN.**

Las infecciones de tracto genital afectan a las mujeres mexicanas así como a las mujeres de todo el mundo, y las presentan por lo menos una vez en la vida; teniendo diferentes episodios a lo largo de la misma, estas infecciones son producidas por diferentes agentes que inhibe el sistema inmunológico de la paciente, el Psicológico y social; debido a la incomodidad al presentar comezón, secreciones vaginales con mal olor e irritación, las cuales son causas, para separarse temporalmente de círculos sociales, afectando también a nivel fisiológico; por los tratamientos con antibióticos eliminando la flora normal, la cual está constituida principalmente por Lacto bacilos que tardan en colonizar a la vagina. Este trabajo fue elaborado pensando en cambiar el tratamiento tan agresivo y la calidad de vida de las pacientes durante la infección ya que siempre hay una descamación para renovar las células después de un ciclo infeccioso. En esta tesis se trabajo con un extracto natural inhibiendo considerablemente a más del 50 % de las bacterias, teniendo como referencia el control positivo.

Las cepas fueron aisladas 40 muestras clínicas proporcionadas por el Hospital “Juárez de México” a las que se les realizaron pruebas bioquímicas primarias y secundarias para su identificación en género y especie. Después de ser identificadas las cepas de trabajo, se colocaron en tubos de conservación; un día antes de su uso se resembraron en tubos BHI, para tener a la bacteria en fresco y con las mejores características fisiológicas y metabólicas.

Después se preparo la placa con 100 µl de S.S.F.E. y se coloca 100 µl de BHI con bacteria (la cual se igualo al 1.0 del nefelómetro de Mac Farland.) al pozo 1 y 2, a partir del pozo 2 se van haciendo diluciones dobles hasta llegar al pozo 9, los pozos 10,11 y 12 son pozos de testigos y blanco. Se deja incubar por 24 h, después se le agrega el reactivo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromida) el cual a simple vista se observa de color violeta cuando las bacterias se encuentran vivas o de color amarillo cuando se inhibieron, después de incubarla se tomaron muestras con el asa bacteriológica a toda la placa desde el primer pozo hasta los tres controles, los cuales se sembraron en agar BHI seccionada en cuadros para en cada uno sembrar un pozo y poder observar el efecto de la *Echinacea* sobre la bacteria en cuestión ya que al observar un crecimiento de la bacteria el efecto del extracto es bacteriostática y al haber una inhibición de la bacteria el efecto es bactericida.

Los resultados obtenidos con los extractos de raíz y planta arrojaron un efecto bacteriostático para *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli*, y solamente arrojó un efecto bactericida para *Gardnerella vaginalis*. Un dato importante de lo anterior es que la concentración mínima inhibitoria (CMI) que se muestra para cada microorganismo fue diferente.

### **3.- OBJETIVO GENERAL:**

Comparación del efecto inhibitorio de dos extractos de *Echinacea purpurea* en bacterias de interés médico aisladas de exudados cervicovaginales, utilizando el método de microplaca.

#### **3.1 Objetivos particulares:**

- Aislar e identificar las bacterias patógenas aisladas en muestras de exudados cervicovaginales proporcionadas por el “Hospital Juárez de México”, mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias para su posterior uso.
  
- Preparar el extracto de *Echinacea purpurea* proveniente de raíz a base de etanol al 70 % con la constante de 1g/100 ml.
  
- Preparar el extracto de *Echinacea purpurea* proveniente de la planta a base de etanol al 70 % con la constante de 1g/100 ml.
  
- Determinar el efecto antibacterial del extracto de *Echinacea purpurea* raíz y planta de diferentes concentraciones en bacterias aisladas de exudados cervicovaginales por medio de la prueba de microplaca.
  
- Determinar la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la actividad bacteriostática/bactericida del extracto de *Echinacea purpurea* en bacterias aisladas de exudados cervicovaginales.

### **4.- HIPOTESIS.**

“Si el extracto obtenido de la raíz y de planta tienen un efecto inhibitorio en bacterias patógenas podremos dar una alternativa confiable y eficaz para el tratamiento de vaginosis.”

## 5.- INTRODUCCION.

### 5.1. *Echinacea purpúrea*. (Botánico)

#### 5.1.1.- Generalidad



**Figura 1.** *Echinacea purpurea* aérea. (19).

Las hojas, flores y raíces de las diferentes especies de la planta *Echinacea* comúnmente conocida como Girasol Rojo o simplemente *Echinacea*, es una planta perteneciente a la familia *Compositae*. Se utiliza sobre todo la raíz, la cual se ha visto que es más activa si se emplea en estado fresco (12). Se usa mucho para combatir infecciones, en forma de emulsiones o té, especialmente el resfrío común y otras infecciones del tracto respiratorio superior como anginas y neumonía. Algunas personas toman *Echinacea* al primer síntoma del resfrío, para minimizar e impedir el resfrío. Otras personas toman la *Echinacea* una vez que el resfrío ha empezado, para minimizar los síntomas. Hasta el momento, los resultados de las investigaciones muestran que la *Echinacea* puede ayudar a tratar un resfrío pero no a prevenirlo. (1)

Otros usos no relacionados o asociados a infecciones son el síndrome de fatiga crónica (SFC), el reumatismo, las migrañas, la indigestión, el dolor, los mareos, las mordeduras de serpiente cascabel y el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH).(1)

Algunas veces, la gente aplica la *Echinacea* a la piel para el tratamiento de furúnculos, abscesos, heridas en la piel, úlceras, quemaduras, eczema, daño por radiación ultravioleta, herpes simple, picaduras de abeja y hemorroides.(2)

Las especies de *Echinacea* son nativas de América del Norte y fueron usadas como remedios herbales tradicionales por las tribus indígenas de la Gran Pradera. Más tarde, los colonos siguieron el ejemplo de los indígenas y también empezaron a usar la *Echinacea* con propósitos medicinales. Por un tiempo, la *Echinacea* gozó de un estatus oficial como resultado de haber estado en la lista Del Formulario Nacional desde 1916 hasta 1950. Sin embargo, el uso de la *Echinacea* dejó de ser popular en los Estados Unidos a raíz del descubrimiento de los antibióticos y la falta de evidencia científica apoyando su uso.

Actualmente las investigaciones en botánica se está interesando más en la *Echinacea*, porque algunas bacterias ya son resistentes a los antibióticos. (2)

Los productos de *Echinacea* disponibles en el comercio vienen en muchas formas incluyendo tabletas, jugo y té. (3)

Hay preocupación acerca de la calidad de ciertos productos de *Echinacea* en el mercado, son frecuentemente etiquetados erróneamente, y es posible que algunos ni siquiera contengan *Echinacea* a pesar de lo que aparece en la etiqueta. No se confunda con el término “estandarizado”. No indica necesariamente un etiquetado exacto. Además, algunos productos de uso tópico de *Echinacea* han estado contaminados con selenio, arsénico y plomo. (3)

### 5.1.2.- Propiedades y Composición

También se conoce con el subnombre de “antibiótico vegetal” (12), ya que ha revelado una clara actividad en las infecciones de tracto respiratorio como bacterianas, virales, complicaciones de tracto genital femenino como micóticas y protozoarias. La planta inhibe a la infección de diferentes maneras. contiene un antibiótico natural (*equina cosida*) de grande espectro y fortifica a los tejidos contra la invasión de microorganismos ya que la *Echinacea* contiene una sustancia (*equinacein*) que contrarresta a la enzima del microorganismo que disuelve el tejido, manteniéndolo fuera del tejido orgánico (13). También su actividad se explica por una estimulación del sistema inmunológico. Es así como la *Echinacea* activa los anticuerpos del organismo humano para combatir las infecciones con acción antibacteriana, antiparasitaria y antimicótico. Sus principios activos pueden dividirse en: derivados del Ác. Cafeico, *Equinacósida* o principio triglicósido (*E. angustifolia*); Isobutilamidas insaturadas que incluyen *Equinacina* (*E. angustifolia* y *E. Pallida*); Polisacáridos, un heteroxilano y un arabino rhamno galactano; Poliacetilenos y componentes lipofílicos (aceite esencial, que contiene: humuleno, cariofileno y su epóxido, germacreno D y metil-p-hidroxicinamato). (4)

### 5.1.3.- Funcionamiento.

Al parecer la *Echinacea* activa sustancias químicas en el cuerpo que disminuyen la inflamación y podrían disminuir los síntomas del resfrío y de la gripa. (5)

La *Echinacea* también parece contener sustancias químicas que pueden inhibir directamente las levaduras y otros tipos de hongos. (5)

Vaginosis.

La vaginosis bacteriana (VB) es la causa más común de infección vaginal (*vaginitis*).

El síntoma más común de la VB es una secreción anormal de la vagina con un desagradable olor a pescado. [1] Sin embargo, casi la mitad de las mujeres con VB no notan ningún síntoma.

Una vagina saludable contiene muchos microorganismos, uno de los más comunes es el *Lactobacilos ácido philus* (LA). La flora normal evita que otros microorganismos vaginales se reproduzcan a un nivel en donde pudiesen causar síntomas. Un microorganismo relacionado con la VB es la *Gardnerella vaginalis* (26).

Se trata de una bacteria, antes llamada *Haemophilus vaginalis* que es capaz en la mujer de producir un cuadro clínico irritativo con flujo vaginal (*vaginitis*), y en algunos casos en el hombre balanitis (inflamación en la cabeza del pene). (26)

Las primeras descripciones datan de 1953 cuando Leopoldo lo aisló de 58 mujeres con cervicitis y de dos hombres con uretritis inespecífica y la denominaron *Haemophilus vaginalis*, por aislarse inicialmente en el medio agar sangre, la asociaron con los requerimientos nutricionales de *Haemophilus*, pero más tarde se descartó y la relacionaron con otros géneros de bacilos Gram positivos como; *Corynebacterium*, *Butgribacterium* e incluso *Lactobacilos*, para luego finalmente clasificarla en el nuevo género *Gardnerella*, con una sola especie *G. vaginalis*. El nombre se dio en honor del H.L. Gardner. Este género solo tiene relación filogenética con *Bifidobacterium* y constituye un grupo taxonómico bien definido (26).

## **5.2.- *Gardnerella vaginalis*,**

Fue anunciada como la respuesta etiológica a las vaginitis inespecíficas. Una bacteria con un potencial de virulencia, que la hace capaz de inducir cuadros clínicos importantes (26).

### **5.2.1.- Características generales.**

*Gardnerella vaginalis* es un bacilo inmóvil no encapsulado, puede presentar fimbrias y es corto con una longitud entre 0.5-1.5 mm, lo que hace que parezca un cocobacilo pleomórficos, que usualmente se tiñe como Gram negativo o Gram variable. Es un organismo anaerobio, presenta hemólisis del tipo beta en agar sangre humana, es catalasa y oxidasa negativo (28).

### **5.2.2.- Aislamiento e identificación.**

Esta bacteria se aísla en Agar Cassman incubándola en anaerobiosis o una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 35°C por 48 horas. (28).

Se originan colonias translucidas u opacas de 0.3 a 0.5 mm de diámetro, puntiformes, redondas, lisas, y presentan hemólisis tipo beta. (28).

Es importante mencionar que el microorganismo es exigente y no crece en agar sangre o agar chocolate de sangre animal (28).

Tinción de Gram.

Para su identificación se realizan pruebas de Gram, la cual es Gram negativas, positiva o Gram variables y pleomórficos y se ven como cocobacilos.

En frotis teñido con Gram de secreciones vaginales frescas se observa agregados densos de bacilos Gram negativos en células epiteliales descamadas o células “pista” en frotis teñidos de secreción vaginal o la producción de secreciones vaginales alcalinas (pH mayor de 4,5) da sospecha del organismo, la prueba de KOH al 10% con un volumen igual al de la muestra expide un olor a pescado por lo que asegura la presencia de *Gardnerella vaginalis* (28).

### **5.2.3.- Patogenicidad.**

*Gardnerella vaginalis* se considerada como un patógeno de transmisión sexual sin embargo sus hallazgo no siempre se relaciona al factor de actividad sexual se ha encontrado en mujeres sanas sin manifestaciones clínicas, por lo que también se le considera como flora normal, que solo con la presencia de otras bacterias se manifiesta clínicamente como responsable de la vaginitis inespecífica. (29)

Su presencia en la uretra masculina o en el glande no ha sido usualmente, considerada como clínicamente significativa. (29)

*G. vaginalis* ha sido relacionada con patologías como endometritis, cistitis, aminositis, septicemia, neonatal, meningitis, vaginitis inespecífica, balanitis, entre otras (29).

### **5.2.4.-Cuadro clínico.**

Los síntomas encontrados en una vaginosis bacteriana son cuatro, de demostrar 3 criterios el diagnostico, será positivo:

- 1) Descarga vaginal “delgada” (profusa)
- 2) Un pH mayor de 4 y 5
- 3) Presencia de olor a pescado (aumenta en la actividad sexual o al agregar hidróxido de potasio al 10% en la prueba de células guía).
- 4) La demostración de “células pista” (mediante un examen microscópico) (31).

Factores de riesgo en pacientes.

- 1) Múltiples parejas sexuales
- 2) Embarazos, y visitas frecuentes al ginecólogo.
- 3) Contacto directo con secreciones infectadas (pacientes inmunosuprimidos)
- 4) El empleo de duchas vaginales, alcaliniza la vagina y si es frecuente, desencadena un trastorno de la flora vaginal normal facilitando la aparición de la vaginitis bacteriana.
- 5) Entre los factores predisponentes se encuentra el empleo de hormonas orales y antibióticos los cuales disminuyen la concentración de lactobacilos y otros miembros de la flora normal, por lo que permite la proliferación de levaduras. El

embarazo y la diabetes se acompaña de una disminución de células inmunológicas, lo que ocasiona una incidencia más elevada de vaginitis bacteriana. (30)

### **5.3.- *Escherichia coli*.**

#### **5.3.1.- Generalidades**

La *Escherichia coli* es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por *Theodore von Escherich*, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K (6).

#### **5.3.2.- Identificación.**

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es +++- (6).

#### **5.3.3.- Clasificación.**

Se distinguen seis cepas según su poder patógeno, también se les puede llamar viro tipos:

##### *5.3.3.1 Escherichia coli entero patógena.*

La bacteria tiene forma de cilindro redondeado. *Escherichia coli entero patógena* (ECEP) es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vías de desarrollo, e interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia/destrucción”. En la producción de la lesión A/E por ECEP, se observan cambios importantes en el cito esqueleto de la célula hospedadora, los cuales incluyen la acumulación de actina polimerizada formando una estructura parecida a una copa o pedestal. La adherencia inicial está relacionada con la producción de la fimbria BFP (*Bundle Forming Pilus*), la cual se requiere para la producción de diarrea por ECEP. La expresión de la fimbria BFP de *Escherichia coli entero patógena* (EPEC), codificada en el operón BFP, responde positiva o negativamente a señales ambientales que pudieran encontrarse en el hospedador y determinar la adherencia bacteriana a la superficie de las células del epitelio intestinal (7).

La regulación coordinada de estos genes involucrados en la patogénesis es una necesidad importante para la adaptación de las bacterias patógenas a los diferentes ambientes encontrados dentro del hospedador durante la infección. La expresión de los factores de



virulencia de ECEP, en respuesta a señales ambientales, podría involucrar una red compleja de interacciones entre reguladores transcripciones específicos y globales a través de un circuito regulador iniciado con la activación del operón es BPF y operon ABC, el cual podría estar detectando las señales del medio, actuando como regulador maestro BFP<sub>w</sub> y como segundo regulador al activar la expresión del operón LEE1. Debido a la potencial importancia de Per A como factor regulador para los determinantes de virulencia de EPEC, estamos interesados en el estudio de los mecanismos moleculares de la función de Per A (BfpT) como activador de su propia expresión y la del operón. Este regulador podría poseer dominios estructurales que estén involucrados en la unión a ADN, interacción con la RNA polimerasa, interacción con otras proteínas reguladoras que actúen como correguladores para inducir la expresión de los operones BFP y operon ABC. Mientras que la unión al ADN ha sido bien caracterizada en varios miembros de la activación de transcripciones por proteínas de esta familia es menos comprendida. Varios de los miembros de esta familia activan factores de virulencia en patógenos bacterianos y por ende son posibles blancos de agentes antibacterianos CHPG (7).

#### 5.3.3.2.- *Escherichia coli entero toxígena. (ECET)*

Se parece mucho a *V. cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se ven afectados (7).

#### 5.3.3.3.-*Escherichia coli entero invasiva. (ECEI)*

Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arteriosclerosis. Es una de las *E. coli* que causa más daño debido a la invasión que produce en el epitelio intestinal (8).

#### 5.3.3.4.-*Escherichia coli entero hemorrágica. (ECEH)*

La convención internacional de nomenclatura de patógenos ha recomendado el uso de STEC (*Shiga Toxina Escherichia coli*) para este grupo, debido a que estas bacterias producen una toxina citotóxica para células Vero de cultivo de similar estructura a la toxina producida por *Shigella* y *Senteriae*. Las STEC producen toxinas vero que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome urémico hemolítico (lo anterior más infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocitopenia trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central). Esta cepa no fermenta el sorbitol y posee un fago, donde se encuentran codificadas las toxinas vero, también llamadas "Toxinas Shiga", no posee una fimbria formadora de mechones, en vez de esto posee una fimbria polar larga que usa para adherencia (9).

#### 5.3.3.5.- *Escherichia coli* entero agregativa. (ECEA)

Los estudios realizados sobre la capacidad adherente de la *Escherichia coli* a células hetero haploides (HEp-2) muestran que, además de la adherencia localizada, existen otros dos mecanismos: uno llamado difuso, que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular, y otro agregativo, que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación.<sup>130-132</sup> <sup>(10)</sup>.

Estudios recientes han definido algunas características de estas cepas, como es el fenómeno de la auto agregación, que está determinado por un plásmido de 55 a 65  $\mu$ Dalton, que codifica para una fimbria de adherencia, un lipopolisacárido uniforme y una nueva entero toxina termoestable (TE) denominada toxina enteroagregativa estable (TEAE).<sup>133</sup> Se han detectado algunas cepas que elaboran una segunda toxina termolábil antigénicamente relacionada con la hemolisina de *Escherichia coli*, la cual puede causar necrosis de las micro vellosidades, acortamiento de las vellosidades intestinales e infiltración mononuclear de la submucosa <sup>(10)</sup>.

La capacidad de las cepas de *Escherichia coli* entero agregativa (ECEA<sub>agg</sub>) para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiera explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas. Se han aislado cepas de ECEA<sub>agg</sub> en niños con diarrea con sangre, aunque en la actualidad se desconoce si existen diferentes cepas agregativas relacionadas con diarreas persistentes u otras en relación con diarrea con sangre <sup>(10)</sup>.

#### 5.3.3.6.- *Escherichia coli* adherencia difusa.

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos <sup>(10)</sup>.

### 5.3.4.- Patogenia

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía <sup>(10)</sup>.

### 5.3.5.- Virulencia

La *Escherichia coli* rica está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado

generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 °C <sup>(10)</sup>.

### **5.3.6.- Infecciones urinarias.**

Son más comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm, o bien 1 a 2 pulgadas) en comparación con los hombres (unos 20 cm, o unas 8 pulgadas). Entre los ancianos, las infecciones urinarias tienden a ser de la misma proporción entre hombres y mujeres. Debido a que la bacteria invariablemente entra al tracto urinario por la uretra (una infección ascendente), los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata, y en muchos casos el evento iniciante de la infección es desconocido. Aunque las infecciones ascendentes son las causantes de infecciones del tracto urinario bajo y cistitis, no es necesariamente ésta la causa de infecciones superiores como la pielonefritis, que puede tener origen hematógeno <sup>(11)</sup>.

### **5.3.7.- Tratamiento**

El uso de antibióticos es poco eficaz y casi no se prescribe. Para la diarrea se sugiere el consumo de abundante líquido y evitar la deshidratación. Cuando una persona presenta diarrea no debe ir a trabajar o asistir a lugares públicos para evitar el contagio masivo. Sin embargo en algunas patologías como la pielonefritis hay que considerar el uso de alguna cefalosporina endovenosa <sup>(11)</sup>.

## **5.4.- *Pseudomonas fluorescens*.**

### **5.4.1.- Generalidades**

Significa 'falsa unidad', del griego: ψευδο = falso y monas del latín: monas, p. griego: μονάς/μονάδα = una sola unidad). La palabra se utilizó antes en la historia de la microbiología para referirse a los gérmenes. El nombre de 'fluorescens' se refiere a la secreción de un pigmento fluorescente soluble llamado pioverdina (anteriormente llamado fluoresceína) <sup>(12)</sup>.

### **5.4.2.- Identificación**

*Pseudomonas fluorescens* es un bacilo Gram-negativo, recto o ligeramente curvado pero no en forma de *Vibrio cholera*, es saprófito, (todo lo que ingiere pasa a través de la pared de su citoplasma). Se puede encontrar en suelo y agua. <sup>(12)</sup>

Es incapaz de formar esporas y crece aeróbicamente. La temperatura óptima para su funcionamiento es de 25 a 30 °C, aunque puede crecer desde los 5 hasta los 42 °C aproximadamente. No crece bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 4.5$ ) y necesita preferentemente pH neutro. Tiene movimiento activo en líquido por sus flagelos polares (más de 1). Su

pigmento fluorescente (fluoresceína) la hace reaccionar frente a la luz ultravioleta, aunque recién cultivada o después de varios cultivos de laboratorio, puede ser que no reaccione. (12)

Las *Pseudomonas* pueden crecer en un medio mineral con iones de amonio o nitrato y un solo compuesto orgánico que funciona como única fuente de carbono y energía. La ganancia energética es obtenida por respiración aeróbica, no por fermentación y su crecimiento es rápido. (12)

Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta. (12)

Una de las características de la *Pseudomonas fluorescens* es su alta capacidad de solubilización del fósforo y la realizan por dos vías: la primera es la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glucósido) que actúan sobre el pH del suelo favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato a la solución del suelo. La otra vía de acción es a través de las fosfatasa que son enzimas hidrolasas (Mono esterasas y Diesterasas Fosfóricas) que actúan sobre las uniones ésteres liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica a la solución del suelo. Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfato para ser absorbido por las raíces de las plantas (12).

Otro aspecto destacable es la posibilidad de que las *Pseudomonas fluorescens* posean la virtud de producir sustancias estimuladoras del crecimiento, ya que las *Pseudomonas* en general pertenecen a un grupo llamado “estimuladores del crecimiento vegetal (MECV)” que poseen la propiedad de producir estas sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de las semillas, acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, inducir la iniciación radicular y aumentar la formación de raíces y pelos radiculares. Las principales sustancias estimuladoras producidas son de tipo hormonal como auxinas, giberelinas y citoquininas, pero también producen sustancias de otro tipo como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento. Estos efectos se dan siempre que sea adecuada la concentración de organismos en el sistema radicular y en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica (13).

Por último, una propiedad complementaria de la *Pseudomonas fluorescens* es la de producir ciertas sustancias -antibióticos y sideróforos que actúan limitando el crecimiento y desarrollo de los patógenos fúngicos que pueden afectar al cultivo (13).

## **5.5.- *Staphylococcus aureus*.**

### **5.5.1.- Generalidades**

Son cocos Gram positivos, de 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, catalasa positiva, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares (término derivado del griego staphylé: racimo de uvas, Ogston, 1883). Son inmóviles,

facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula <sup>(14)</sup>.

### 5.5.2.- Agente etiológico

El género *Staphylococcus* está ubicado junto a los géneros *Micrococos*, *Planococcus* y *Stomatococcus* en la Fila. *Micrococcaceae*. *Staphylococcus aureus*, especie coagulasa positiva, es un reconocido patógeno humano, siendo agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial <sup>(14)</sup>.

*S. aureus*, tiene una amplia gama de determinantes de virulencia, que abarca componentes de pared celular y una gran variedad de exoproteínas que contribuyen en su habilidad para colonizar y causar enfermedad en mamíferos.

Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta) nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colágenasas. La principal función de estas proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano <sup>(14)</sup>.

Algunas cepas producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen:

- 1) Toxina -1 del shock tóxico estafilocócico (TSST-1)
- 2) Toxina exfoliativa (ETA y ETB)
- 3) Leucocidina
- 4) Enterotoxinas
- 5) Estafilocócicas (SE): SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH Y SEI.

Son proteínas inmunológicamente diferentes, con pesos moleculares que oscilan entre 28.000 y 35.000 Dalton.

Cada una de estas toxinas es conocida por sus potentes efectos en células del sistema inmune, pero muchas de ellas también tienen otros efectos biológicos, siendo reconocidas como súper antígenos pirogénicos (PTSAg) <sup>(15)</sup>.

Cada una de estas exotoxinas exhibe al menos tres propiedades biológicas:

- a) Pirogenidad,
- b) Súper antigenicidad, que se refiere a la habilidad de estas exotoxinas de estimular la proliferación de linfocitos T sin tener en cuenta la especificidad antigénica de estas células.

- c) Aumento de sensibilidad a la acción de endotoxina en modelos experimentales en conejo.

Algunas de ellas presentan propiedades adicionales. Por ejemplo las enterotoxinas de las que nos referiremos a partir de ahora son potentes agentes eméticos en tanto los otros integrantes no lo son y por esta razón están históricamente relacionadas con un cuadro bien definido que es la intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*.

Las enterotoxinas son producidas en la fase exponencial del desarrollo y los genes que las codifican se encuentran en plásmidos, bacteriófagos o elementos genéticos heterólogos, referidos como islotes de patogenicidad <sup>(15)</sup>.

Su expresión es controlada por al menos tres sistemas reguladores globales denominados:

1. Gen regulador accesorio (*agr*)
2. Gen accesorio regulador estafilocócico (*sar*)
3. Sistema represor por catabólicos.

Cada enterotoxina es traducida en un precursor proteínico conteniendo una secuencia señal amino terminal, que es clavada durante la exportación desde la célula. La enterotoxina (*SE*) madura es una pequeña molécula poli peptídica no glicosilada, moderadamente estable a inactivación química, proteólisis y desnaturalización por ebullición <sup>(12)</sup>.

### **5.5.3.- Aspectos clínicos**

La contaminación de alimentos por *S. aureus*, está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por un cuadro caracterizado por vómitos (76% de casos) y diarrea (77% de casos). El período de incubación de 1-6 horas orienta a la sospecha de enfermedad producida por ingestión de una o más enterotoxinas preformadas en el alimento que ha sido contaminado con cepas de *S. aureus* productor de la misma <sup>(12)</sup>.

Son raramente observados signos de toxicidad sistémica, tales como fiebre e hipotensión. En general, es un cuadro auto limitado que típicamente se resuelve en 24-48 horas desde el inicio <sup>(12)</sup>.

No está claro si se desarrolla en humanos inmunidad a largo plazo, pero anticuerpos frente a una *SE* no necesariamente confieren inmunidad frente a la intoxicación por *S. aureus*, ya que existe múltiples *SE* capaces de producir enfermedad. En algunos casos, anticuerpos producidos frente a una *SE* confieren protección cruzada contra otra *SE*, ya que algunas comparten epítomos <sup>(12)</sup>.

#### **5.5.4.- Patogenia**

El sitio blanco de acción de las enterotoxinas que origina el reflejo emético está localizado en la víscera abdominal, donde existen receptores celulares para *SE*. Debido a que estos receptores no han sido identificados hay incertidumbres con respecto a los eventos tempranos en la patogenia de la intoxicación por *S. aureus*. (34)

La hipótesis más sustentada argumenta que los vómitos ocurren en respuesta a la inflamación inducida por las enterotoxinas. Los síntomas están altamente correlacionados con la producción de un gran número de mediadores de la inflamación, incluyendo prostaglandina E2, leucotrieno B4, y ácido 5- hidroxicicos a tetraenoico. No está claro si estos mediadores son generados directa o indirectamente en respuesta a las *SE*. (34)

En última instancia, la respuesta emética a las *SE* es dependiente de la activación del centro del vómito en el tronco encefálico, el cual es estimulado por impulsos transmitidos desde el vago y nervios simpáticos (34).

#### **5.5.5.- Tratamiento**

Como para la mayoría de enfermedades transmitidas por alimentos auto limitadas, las medidas de sostén son la base del tratamiento. No está indicado tratamiento con antimicrobianos (34).

### **5.6.- *Staphylococcus epidermidis*.**

#### **5.6.1.- Generalidades.**

Los estafilococos coagulosa negativo son las bacterias más comúnmente aisladas en los laboratorios microbiológicos (34). Entre ellos el *S. epidermidis*, que se caracteriza por ser coagulasa negativa y novobiocina sensible, fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante (34) y es considerado el agente causal de diferentes entidades clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, en oftalmítis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama) (18).

Otra característica importante de esta bacteria es la susceptibilidad antimicrobiana que presenta, ya que el *S. epidermidis* ha desarrollado resistencia a la Meticilina en forma paralela al desarrollo de resistencia del *S. aureus*, pero mostrando tasas mucho más elevadas que esta última, y que ha ido incrementándose de manera importante en los últimos 20 años. Mientras que a inicio de los 80's se indicaban tasas de resistencia a la Meticilina del 20%, en 1999 estas llegaron al 80%. Esta es la razón por la cual en la

actualidad se considera que la Vancomicina es el tratamiento de elección para las infecciones causadas por esta bacteria (16).

Se presenta el caso de un paciente que desarrolló bacteremia por *S. epidermidis* asociado a un absceso de partes blandas en el post operatorio, el cual respondió favorablemente al tratamiento con Vancomicina (16).

### **5.6.2.- Identificación**

*Staphylococcus epidermidis* es una especie bacteriana del género *Staphylococcus*, consistente en cocos Gram-positivos arreglados en grupos. Es catalasa-positiva, termonucleasa-negativo aunque a veces varia, coagulosa-negativa; y se presenta frecuentemente en la piel de humanos y de animales y en membranas mucosas. Es sensible al antibiótico novobiocina; un concepto que lo distingue de otros organismos comunes que son coagulosa negativa (19).

### **5.6.3.- Virulencia**

El organismo produce capas de limo, que forma una bio película hidrofóbicas. Esta película es un adhesivo de biopolímeros hidrofóbicas de las prótesis, la creación de enfermedades como la endocarditis. El gen icaADBC se ha encontrado en el código tanto para la cápsula de polisacárido y la adhesina de polisacáridos intracelulares utilizados en la formación del biofilm. La biopelícula de *S. epidermidis* se compone de grupos de células que están incrustados en el fondo limo extracelular que es de hasta 160 micrómetros de espesor, superior a 50 células, esta misma es una barrera de difusión a los antibióticos y la defensa del huésped. (19)

Otro factor de virulencia potencial que actualmente se está investigando es la unión del fibrinógeno de *S. epidermidis*. El gen completo, denominado FBE, se encontró que consisten en un marco de lectura abierto de 3276 nucleótidos que codifican una proteína, llamada FBE, con un peso molecular deducido de aproximadamente de 119 kDa. Los implantes de biomateriales son inmediatamente cubiertos por lo que circulan los componentes del plasma, como el fibrinógeno, la promoción de la adherencia de las células huésped. Una complicación que puede surgir es cuando las bacterias contaminantes se adhieren a los mismos componentes en las superficies de biomateriales, lo que lleva a la infección. (19).

Si bien existe mucha investigación sobre los factores de *S. epidermidis* 'virulencia, se ha hecho poco para entender su modo de acción (19).



#### 5.6.4.- Cuadro clínico

*S. epidermidis* es la causa más frecuente de infecciones en cuerpos extraños implantados (catéteres intravasculares, catéter de la diálisis peritoneal ambulatoria continuada (DPAC), derivaciones ventrículo-peritoneales, endoprótesis, prótesis valvulares cardiacas y prótesis articulares, marcapasos, entre otros.). Las cepas que provocan infecciones asociadas a cuerpos extraños, suelen proceder de la flora endógena del paciente. Sin embargo, también se producen infecciones nosocomiales exógenas. En cuanto a la patogenicidad, se sabe que las cepas de *S. epidermidis* poseen la capacidad de adherirse a polímeros y de generar biopelícula que surgen de la multiplicación y formación de una capa mucosa (glucocalix) del patógeno. Este proceso se ve reforzado en presencia de proteínas de la matriz (p. ej. fibrinógeno, fibronectina) que cubren los cuerpos extraños en el organismo. Las biopelícula son focos infecciosos a partir de los cuales las bacterias entran en el torrente circulatorio y pueden causar una sepsis (16).

#### 5.6.5.- Diagnóstico

La actual directriz del MiQ (estándar de calidad en el diagnóstico microbiológico de infecciones de la Deutsche Gesellschaft für Hygiene and Mikrobiologie [Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología]) establece que la determinación de bacterias de la flora cutánea normal, como *S. epidermidis*, en un único hemocultivo hace el diagnóstico dudoso. Por otra parte se reconoce que *S. epidermidis* puede provocar graves infecciones, especialmente en pacientes inmunodeprimidos y hematológico-oncológicos. Teniendo en cuenta el antibiograma, es importante la determinación de cepas resistentes a la oxaciclina (Meticilina) (SEMR), ya que estas cepas no pueden ser tratadas con antibióticos beta-lactámicos. En la actualidad, la proporción de SEMR entre todas las cepas de *S. epidermidis* en Alemania es de alrededor de un 70 % (20).

#### 5.6.6.- Tratamiento antibiótico

En general, el tratamiento se establece según el antibiograma. Sin embargo, si existe la sospecha de una endocarditis protésica por *S. epidermidis*, el tratamiento primario debe efectuarse con un glucopéptido como vancomicina en combinación con rifampicina y/o un aminoglucósido, debido a la elevada proporción de SEMR (21).

Las infecciones asociadas a cuerpos extraños a menudo evolucionan a formas crónicas, porque las bacterias presentes en la profundidad de las biopelícula se encuentran, en gran parte, protegidas frente al efecto de los antibióticos, así como del sistema inmunológico. En general, es necesario eliminar el material extraño infectado. Una tromboflebitis sobre catéteres venosos infectados por *S. epidermidis* siempre debe tratarse con antibióticos (p. ej., Cefazolina o Cefuroxima). Un problema importante son las infecciones por accesos venosos permanentes (entre otros, Hickman, Porth-a-cath). Las infecciones causadas por la

colocación de una vía permanente pueden tratarse mediante la instilación de antibióticos en el sistema.

En el tratamiento dirigido de las infecciones por SEMR los medicamentos de elección son los glucopéptidos. De forma alternativa, se puede administrar un tratamiento con linezolidos o quinuprisina / dalfoprisina. Debido al rápido desarrollo de resistencias, la rifampicina sólo puede utilizarse en combinación con otro antibiótico eficaz contra SEMR (21).

## **5.7.- *Proteus mirabilis*.**

### **5.7.1.- Generalidades**

*Proteus* se encuentran más comúnmente en el tracto intestinal humano como parte de la flora normal intestinal, junto con *Escherichia coli* es el residente predominante. *Proteus* también se encuentra en múltiples hábitats del medio ambiente, incluidas las instalaciones de cuidado a largo plazo y los hospitales. En los hospitales, no es raro que los bacilos Gram negativos colonicen la piel y la mucosa bucal de los pacientes y personal del hospital. Sin embargo, las especies de *Proteus* no son la causa más común de infecciones nosocomiales (32).

*Proteus mirabilis* causa el 90% de las infecciones se puede considerar una infección adquirida en la comunidad (32).

### **5.7.2.- Identificación**

*Proteus mirabilis* es una bacteria Gram-negativa, facultativamente anaeróbico, muestra aglutinación, motilidad, y actividad ureasa, una muestra de orina alcalina es un posible signo de este microorganismo (32).

Esta bacteria puede diagnosticarse en el laboratorio debido a su característica de motilidad agrupada, e inhabilidad para metabolizar lactosa en el medio agar Mc Conkey y un distintivo olor (32).

## **5.8.- *Candida albicans*.**

### **5.8.1 Generalidades**

*Candida albicans* se alimenta a partir de los restos de la digestión cuando nuestro organismo está sano se encuentra bajo el control de las bacterias simbióticas y del sistema inmunológico manteniendo un equilibrio estable en nuestro organismo. (29)

Las infecciones severas pueden producir inflamación, enrojecimiento, y algunos otros síntomas. Las infecciones de *Candida* son difíciles de luchar, tener un sistema inmunológico fuerte es primordial para poder luchar contra la *Candida*. (29)

Las infecciones asociadas a *Candida* pueden causar vaginitis. Esto produce quemazón de los genitales externos e internos y a menudo un flujo blanquecino que puede ser espeso, dejar de utilizar antibióticos, porque, tienden a lisar a todas las bacterias simbióticas que viven con nosotros y la *Candida* se vuelve más virulento y se desarrollarán infecciones recurrentes. (29)

### **5.8.2.- Identificación.**

*Candida albicans* es una levadura, un organismo unicelular que se reproduce por gemación. Es un organismo dimorfo, es decir, que cuando prolifera, puede cambiar tanto su anatomía como su fisiología, entre las formas de levadura y hongo. (29)

Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en una función relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación. (29)

## MATERIAL Y EQUIPO.

- Cajas Petri de vidrio y plástico PYREX
- Asas bacteriológicas SIN MARCA
- Palillos de madera
- Porta objetos
- Mecheros Bunsen
- Probetas de 50, 100, 250 y 500 ml. PIREX No.3022
- Matraces Erlenmeyer de 100, 250 y 500 ml. PYREX México. No. 4985
- Vasos de p.p. de 250 y 500 ml. PYREX. No. 1000
- Pipetas graduadas de 0.1, 1, 2, 5 y 10 ml. PYREX. No. 7085
- Propipéta. SIN MARCA
- Micropipétas de 100  $\mu$ l. Lab MATE<sup>+</sup> HC
- Puntas para micropipeta de color amarillo
- Tubos de ensaye de 100x5 con tapón de rosca. PYREX. No. 9825
- Gradillas. Sin marca
- Pinzas metálicas
- Tubo estándar de Mac Farlán al 0.5
- Viales ámbar de 5, 10 y 50 ml
- Embudos de plástico. (Para volúmenes grandes)
- Hisopos estériles
- Agitadores magnéticos
- Papel filtro
- Papel para film
- Termómetro. Brannan
- Filtro millipore c/ membrana (0.45 y 0.2  $\mu$ m). Lot. No. F9MN24555

- Microplácas c/ 96 pozos fondo plano. SARSTEDT Made in USA
- Marcador indeleble
- Balanza granataría
- Autoclave de tipo vertical. Gelcaps<sup>R</sup>
- Estufa bacteriológica. Riossa
- Microscopio óptico
- Refrigerador. HUSSMANN
- Parrilla c/ agitador. SYBRON/ THERMOLIN
- Elisómetro

## REACTIVOS

- |   |   |
|---|---|
| - Agua destilada  | - Reactivos para prueba. De catalasa (peróxido de hidrogeno al 30 %)  |
| - SSFE 0.9%   |   |
| - Reactivos para tinción de Gram  | - Reactivo para prueba. De oxidasa. (Solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina o reactivo de Kovacs |
| -Agua destilada esteril   |   |
| -SI Cristal violeta   |   |
| -Lugol  | MATERIAL BIÓLOGICO (Aisladas de cultivos del Hospital Juárez)   |
| -Alcohol/cetona   | - Cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>  |
| -Safranina  | - Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>  |
| - Aceite de inmersión   | - Cepa de <i>Staphylococcus epidermidis</i>   |
| - Reactivo para MTT. Sigma  | - Cepa de <i>Candida albicans</i>   |
| - Etanol  | - Cepa de <i>Proteus mirabilis</i>  |
| - DMSO. Sigma   | - Cepa de <i>Escherichia coli</i>   |
| - Reactivos para prueba. De reducción de Nitratos (acido sulfanilico y alfa-naftol) | - Cepa de <i>Gardnerella vaginalis</i>  |
|   | - Extracto seco de <i>Echinacea purpurea</i>  |

- Sangre de carnero

#### MEDIOS DE CULTIVO

-Agar Sangre

- Agar Cassman

- Agar Mac Conkey

- Agar Sales Manitol

- Agar Cetrimida

- Agar SDA

- Agar Nickerson

- Cromo agar

-Agar base sangre

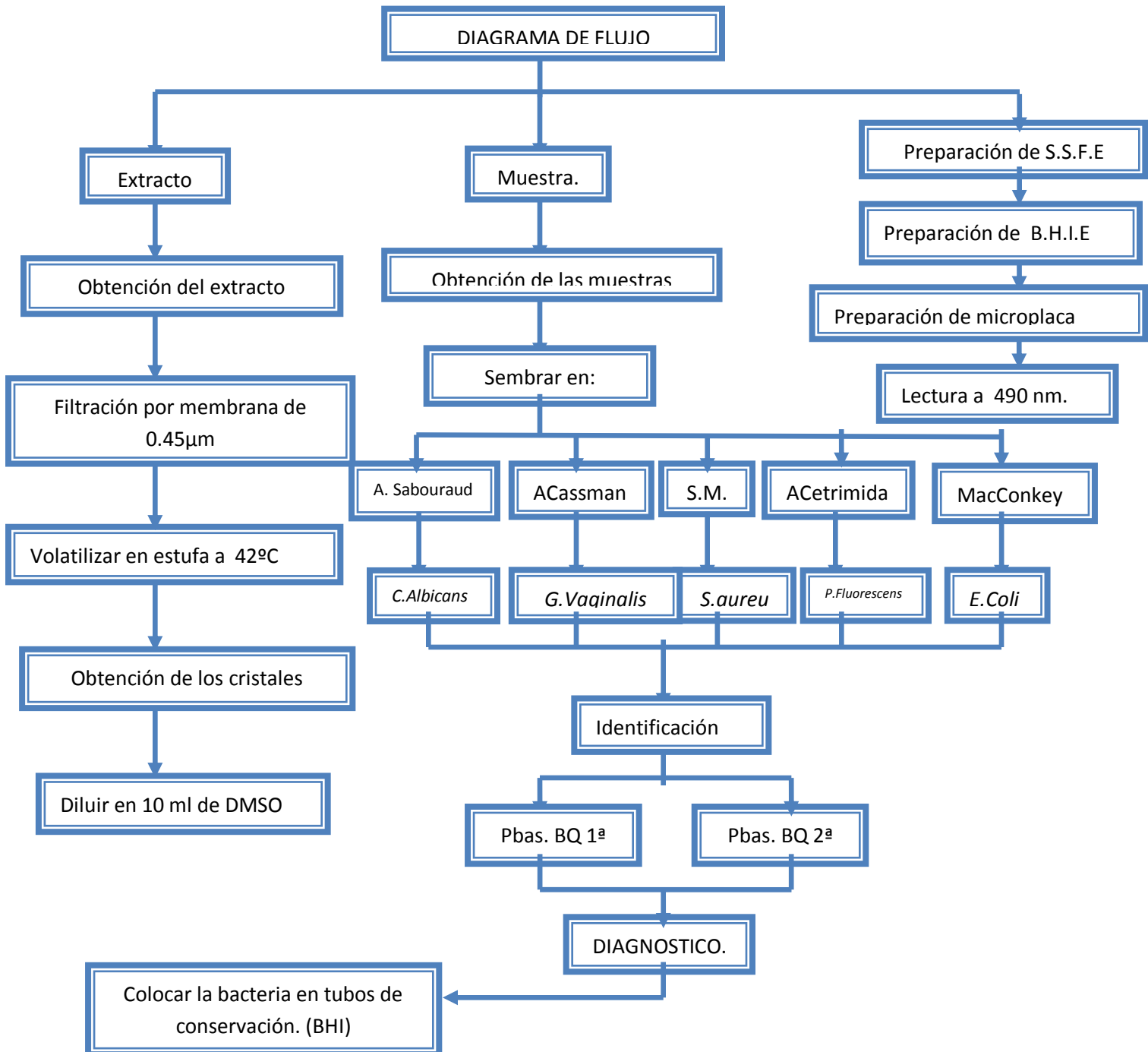
- Caldo Urea

- Agar BHI

- Caldo BHI Sencillo y doble  
concentración

- Agar Mueller Hilton

## 6.- DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL



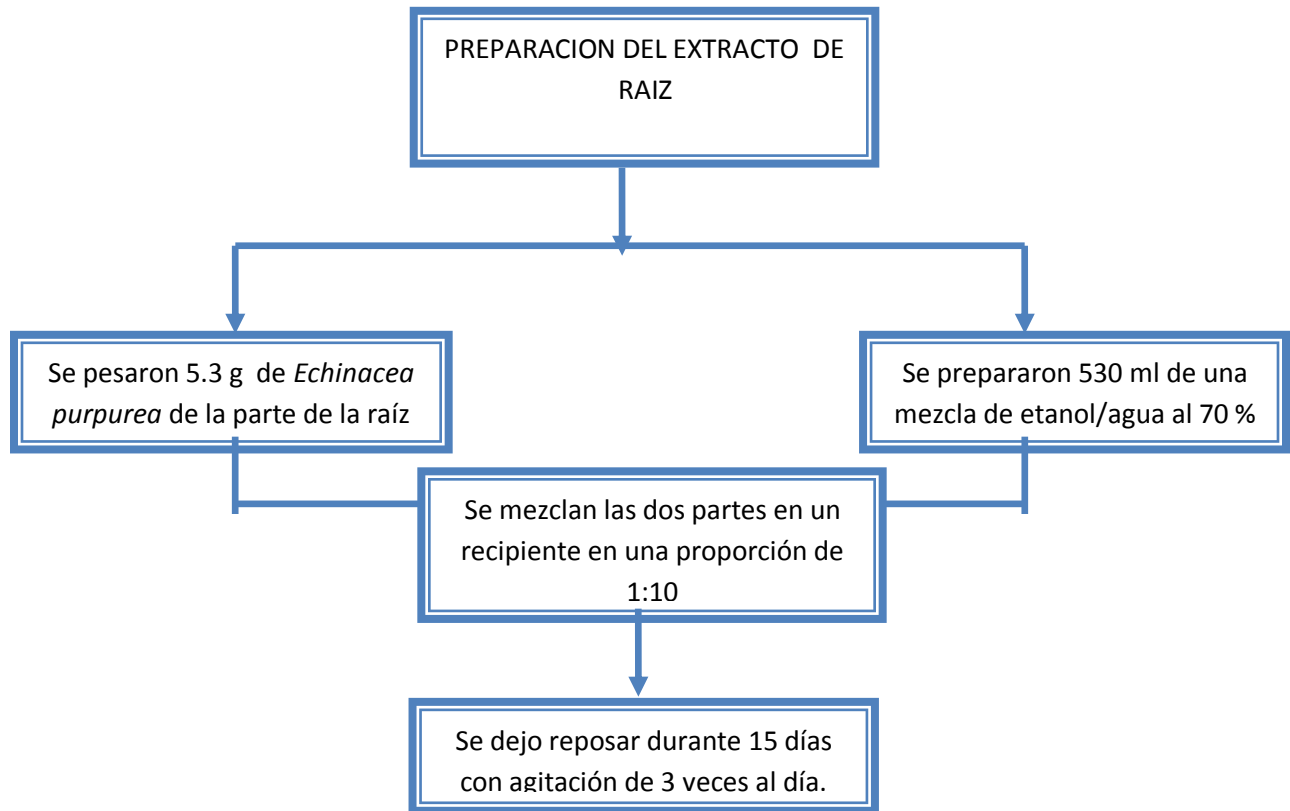
-S.S.F.E. Solución salina fisiológica estéril

-B.H.I.E. Agar infusión cerebro corazón

Preparación del extracto raíz

**Figura 2.-** Método general de análisis para la identificación de bacterias en cervicovaginal

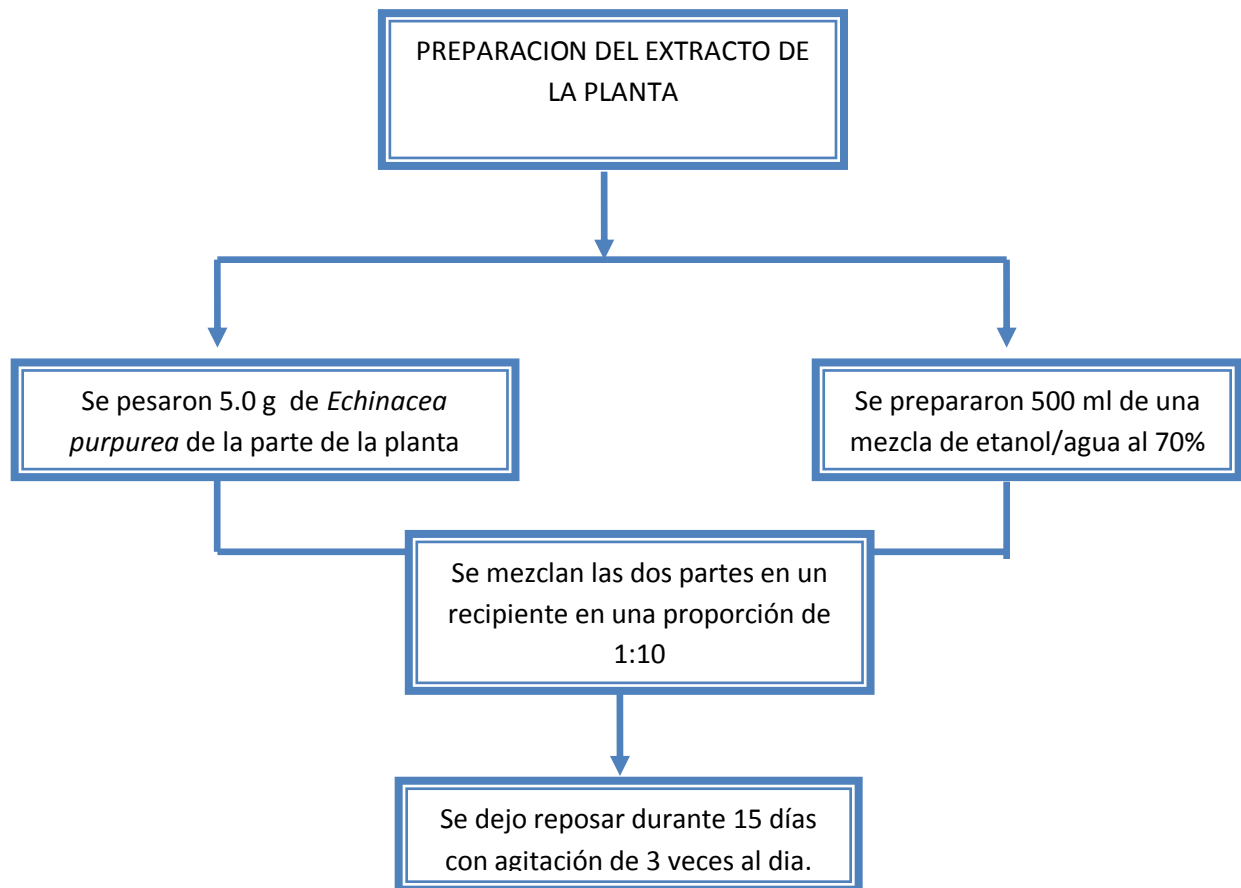
### 6.1.- Preparación par el extracto de *Echinacea purpurea* raíz



**Figura 3.-** Preparación del extracto raíz mediante la maceración.

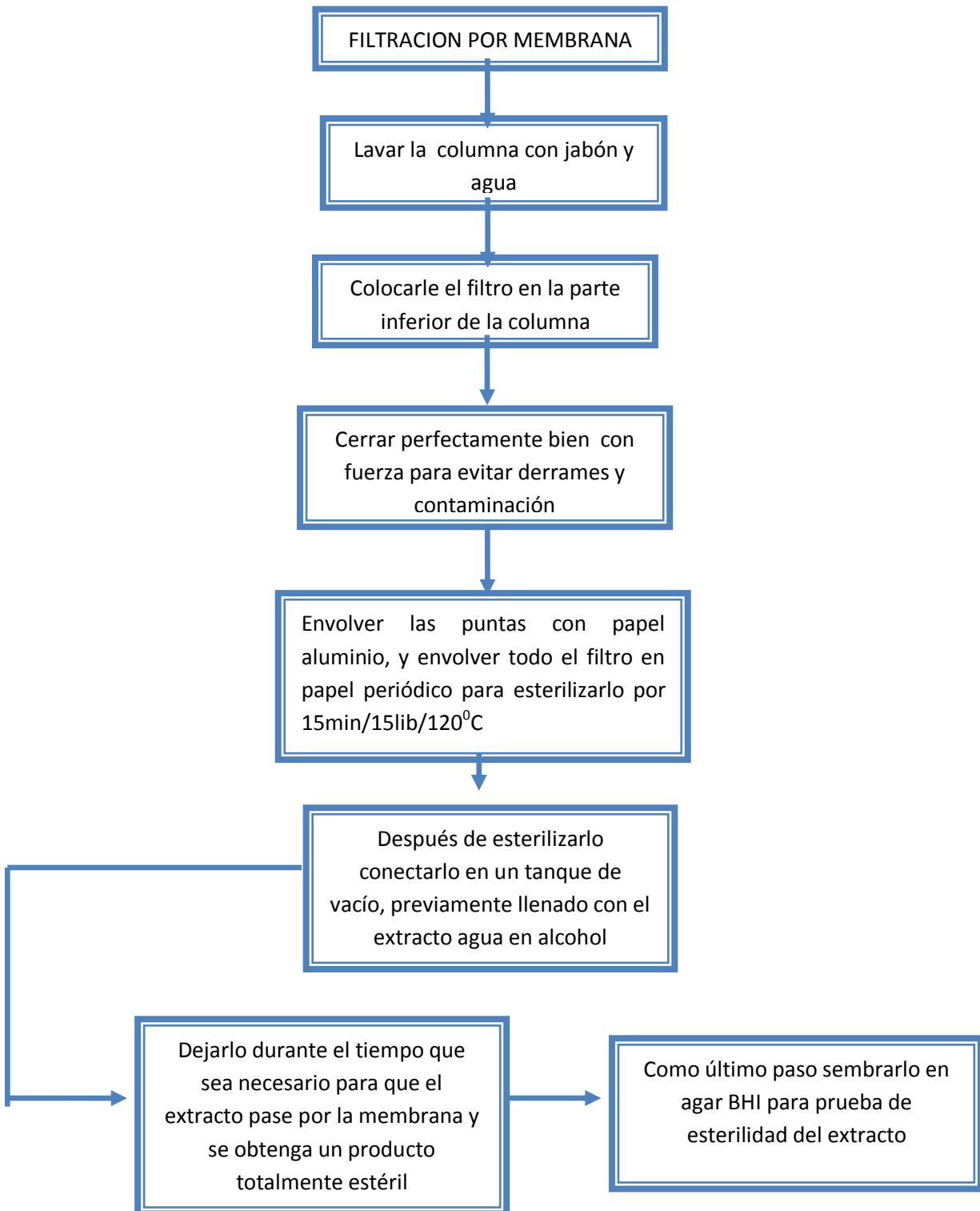


## 6.2.- Preparación del extracto de la planta



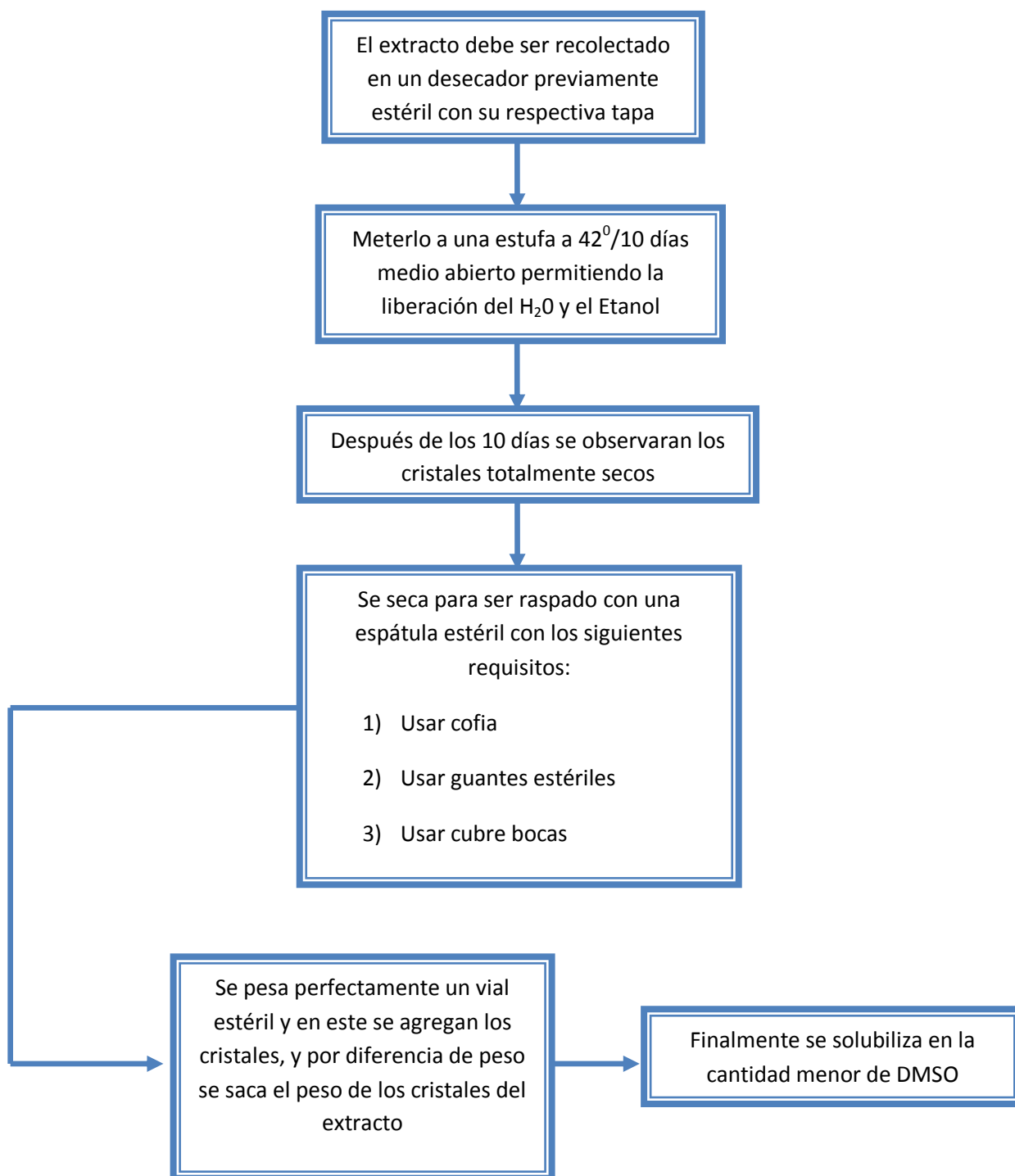
**Figura 4.-** Preparación del extracto planta mediante la maceración.

### 6.3.- Filtración por membrana



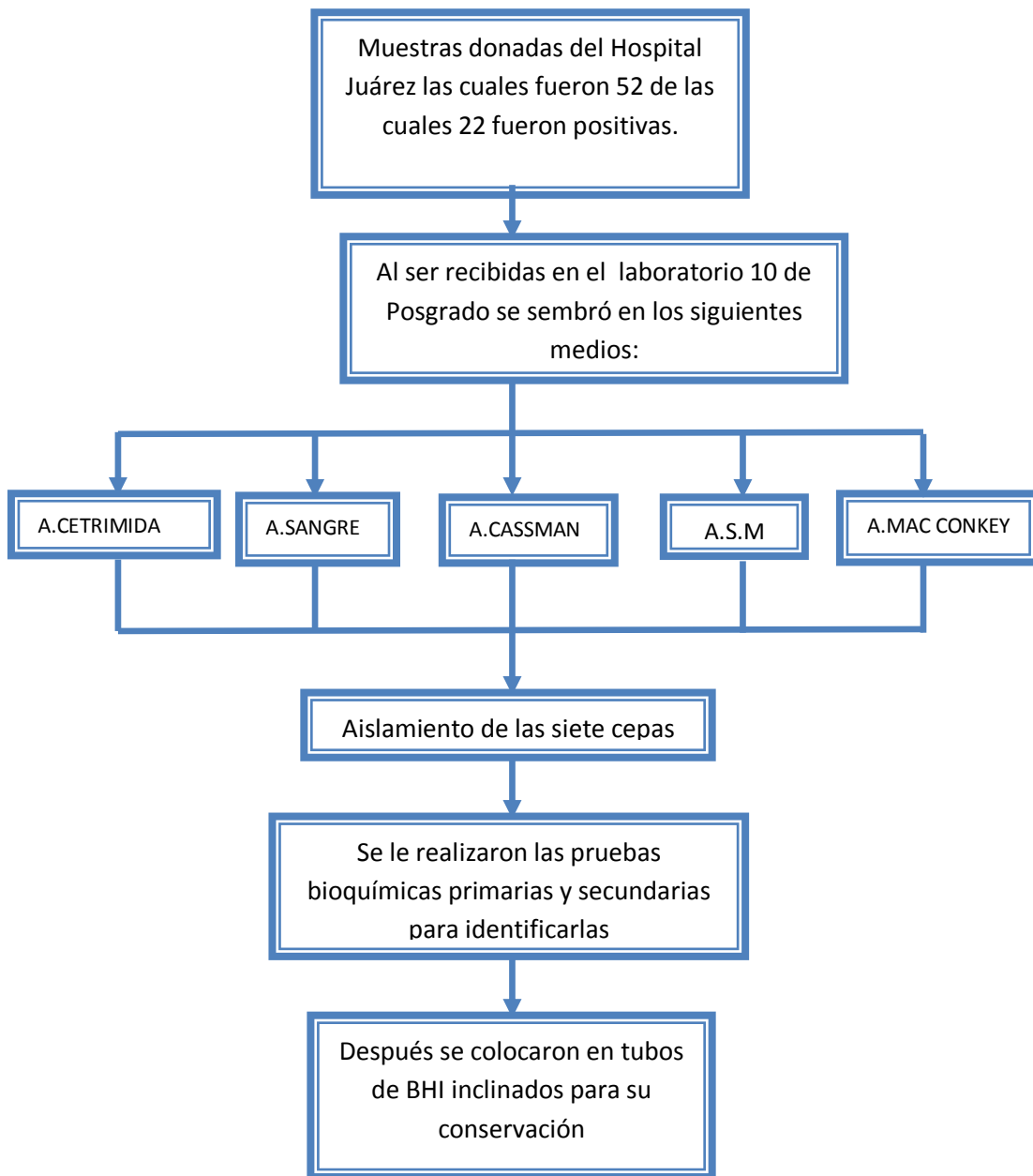
**Figura 5.-** Filtración del extracto por vacío mediante una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$

#### 6.4.-Secado en estufa.



**Figura 6.- Obtención de los cristales estériles**

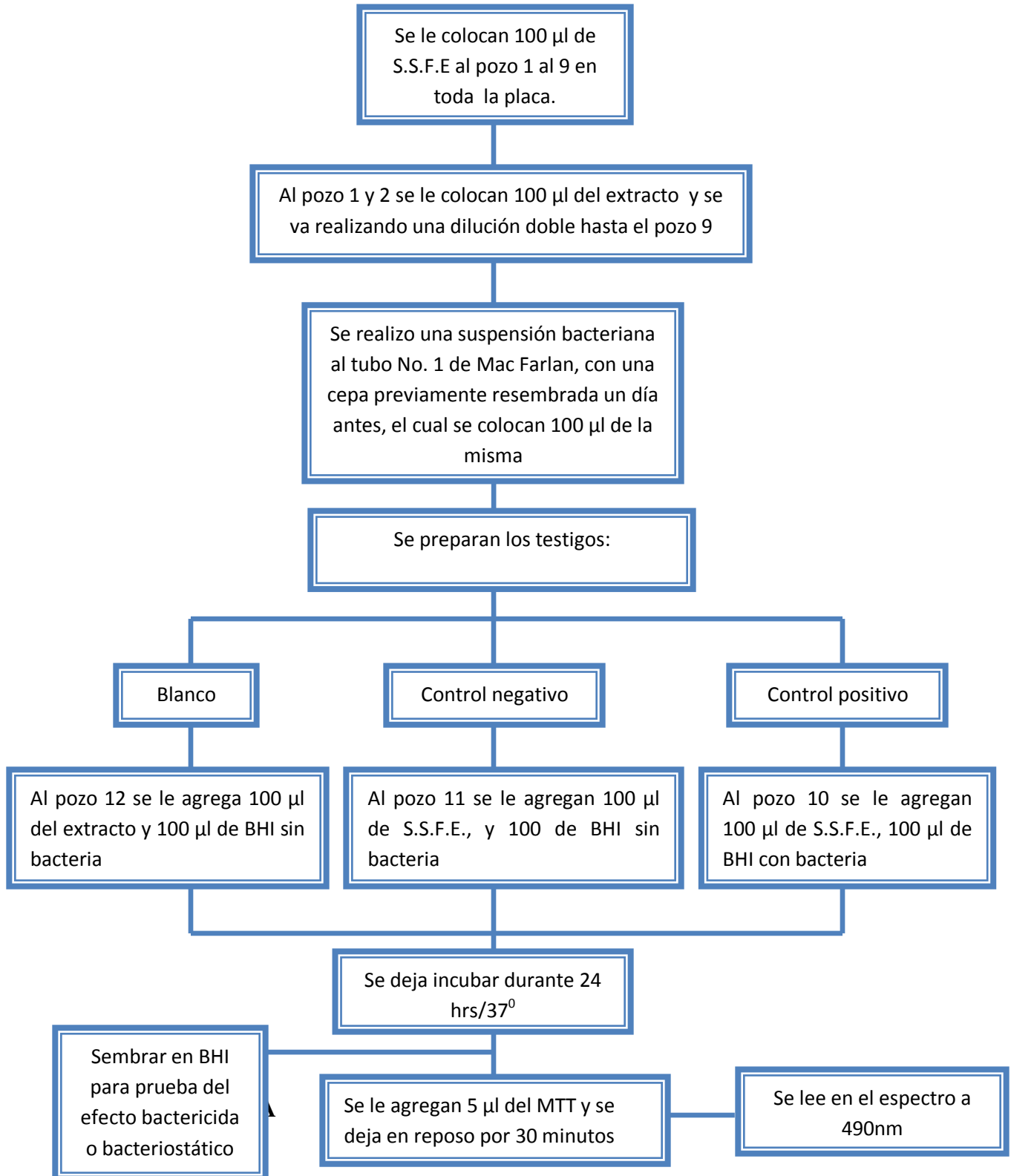
## 6.5.-Recolección de muestras



**Figura 7.- Recolección, aislamiento e identificación de las cepas trabajadas**

## 6.6.-Preparación de la microplaca

Figura 8.- Preparación de la microplaca con la ayuda de una micropipeta



## OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE *ECHINACEA PURPUREA*-RAIZ Y PLANTA ESTERILES.

Se pesaron 5.3 gr de *Echinacea purpurea*-raíz y se le agregó a 530 ml de etanol al 70 %, se dejó reposar con agitación constante durante 15 días. Inmediatamente se lavo el filtro con jabón y agua corriente y se enjuago con agua destilada, después se le coloco la membrana de Millipore de 44 mm de diámetro y 0.45 micras, por último se metió a esterilizar el filtro (véase apéndice).

La prefiltración se realizó con papel filtro, en el cual se vertió todo el extracto para retirar las partes más grandes de la planta, después se conecto la bomba de vacío hacia el barril de aluminio por el lado corto, en seguida se lleno el barril de aluminio con el extracto etanólico y se procedió a conectar el filtro por la parte superior del mismo, se dejó trabajando el sistema durante 30 minutos (véase apéndice) el cual nos genera un extracto etanolico estéril, el cual fue recibido en un cristalizador de vidrio previamente estéril.

Inmediatamente después de que obtuvimos todo nuestro extracto etanolico estéril se tomó una azada del mismo y se procedió a sembrarlo en un agar de BHI con la técnica Americana por dilución (véase apéndice), en seguida y colocándole el pedazo de papel aluminio estéril en la parte superior del cristalizador para evitar una posible contaminación se transfiere cuidadosamente hacia la estufa (previamente limpia con Soluvet y temperatura de 42°C véase apéndice). Con el propósito de obtener un extracto seco que se llevo a cabo en un lapso de 10 días.

## OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO ESTERIL.

Se saco el desecador de la estufa totalmente cerrado para evitar una posible contaminación, previamente se limpio la mesa de trabajo con Soluvet, se conectaron y se encendieron dos mecheros con una distancia aproximadamente de 30 centímetros uno del otro, para obtener el extracto seco estéril me sometí a procedimientos de esterilidad, coloqué el cristalizador sobre la mesa de trabajo y se abrió solamente de una esquina , manteniendo la otra parte cerrada, con una espátula estéril se prosiguió a rasparlo tratando de retirar todos los cristales pegados sobre el vidrio del cristalizador, colocarlos dentro de un vial estéril (véase apéndice) previamente pesado para posteriormente por diferencia de peso saber con certeza la cantidad de cristales que obtuvimos.

Por último se le coloco 10 ml de DMSO a los 3,8 g. de cristales y por lo tanto tenemos una concentración de 3800 µg/100 µl.

## AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROVENIENTES DE EXUDADOS CERVICOVAGINALES.

Se proporcionaron 20 muestras las cuales se tomaron a 20 pacientes diferentes con diagnóstico de cervicovaginitis, las muestras fueron tomadas del cérvix y transportadas en medios de Stuart al llegar al laboratorio se sembraron en A.S, S.M, Agar Cetrimida, Agar Cassman , Agar Nickerson y Agar Mac Conkey, los mismos medios se metieron a la estufa durante 24 horas/32<sup>0</sup>C con excepción del agar Cassman el cual fue metido a anaerobiosis, después de un lapso de 24 horas fueron sacadas para observar si hubo crecimiento en cada uno de los medios, luego de identificarlas por algunas características de crecimiento se le realizaron las pruebas bioquímicas primarias y se resembraron en el agar diferencial para su aislamiento se dejaron incubar a 32°C/24 horas, pasado este tiempo se le realizaron las pruebas bioquímicas secundarias para su identificación.

Ya que estaban identificadas se metieron en tubos de conservación elaborados con BHI en tubo inclinado y de este modo poder tener las cepas disponibles en cualquier momento.

#### PREPARACION DE LAS DILUCIONES EN MICROPLACAS PARA *ECHINACEA PURPUREA*-RAÍZ Y PLANTA.

Las cepas ya identificadas y puras se resiembra en agar diferencial y se metían a la estufa a 32°C/24 hrs. Después se prepara la microplaca con las siguientes constantes se le colocaban 100 microlitros de S.S.F.E del pozo dos al pozo nueve, después se le colocan 100 microlitros del extracto con una concentración de 3600 µg/100 µl al pozo uno y dos, del pozo 2 se mezcla perfectamente bien con la micropipeta y se pasaron 100 microlitros hacia el pozo 3 y así sucesivamente hasta el pozo 9 para poder tener diluciones dobles y por lo tanto llegar a una concentración pequeña en el noveno pozo.

Después se prepara la suspensión bacteriana, la cual se igualo al 1.0 del Nefelómetro de Mac Farland en un tubo de BHI caldo a doble concentración (véase apéndice) y se le agrego 100 microlitros de las bacterias a cada uno de los pozos, desde el primer pozo hasta el noveno pozo, el pozo 10 se prepara como un control positivo, el pozo 11 como un control negativo y el pozo 12 como un blanco.

Para preparar el testigo positivo se le colocan 100 microlitros de S.S.F.E y 100 microlitros de las bacterias igualadas al Nefelometro 1 de Mac Farland.

Para el pozo negativo se le colocaron 100 microlitros de S.S.F.E y 100 de BHI a doble concentración sin bacterias.

Por último se preparo el pozo blanco el cual lleva 100 microlitros de BHI a doble concentración y 100 microlitros del extracto al 100% de la concentración. Después se pusieron a incubar a 32°C/24 hrs.

Método de MTT (Prueba Cuantitativa)

El método del MTT (Método Colorimétrico de Mosmann), está basado en la conversión del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromida; azul de tiazolil), color amarillo a cristales de formazan color violeta, producto de las enzimas deshidrogenadas mitocondriales en células viables, en donde la concentración de dicho producto puede ser medida espectrofotométricamente y es proporcional al número de células viables (33), para conocer la CMI se procedió de la siguiente forma:

A la placa anterior después de la incubación se le adicionaron 5  $\mu$ l de MTT a cada pozo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente de 37° C, por último se tomaron las observancias a 490 nm en el lector de ELISA.

## **8.-Resultados**

Después de realizar la metodología paso a paso se obtuvieron los siguientes resultados, primeramente se obtuvieron los resultados al aislar e identificar cada una de las cepas obtenidas de los exudados cervicovaginales proporcionados por el instituto del Hospital Juárez.

Después se obtuvieron los resultados de la dilución del extracto en microplaca y por último nos arrojó resultados las placas de BHI para determinar si es bacteriostático o bactericida.



### 8.1.-Resultados de *Pseudomonas fluorescens*

*Echinacea purpurea*-raíz  
*Pseudomonas fluorescens*

Tabla 1.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Pseudomonas fluorescens*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3600	0.174	12.46
1800	0.432	30.94
900	0.653	46.77
450	0.821	58.81
225	0.921	65.97
112.5	0.982	70.34
56.25	1.148	82.23
28.125	1.280	91.69
14.06	1.364	97.70
Testigo positivo	1.396	100
Testigo negativo	0.195	13.96
Blanco	1.300	93.12

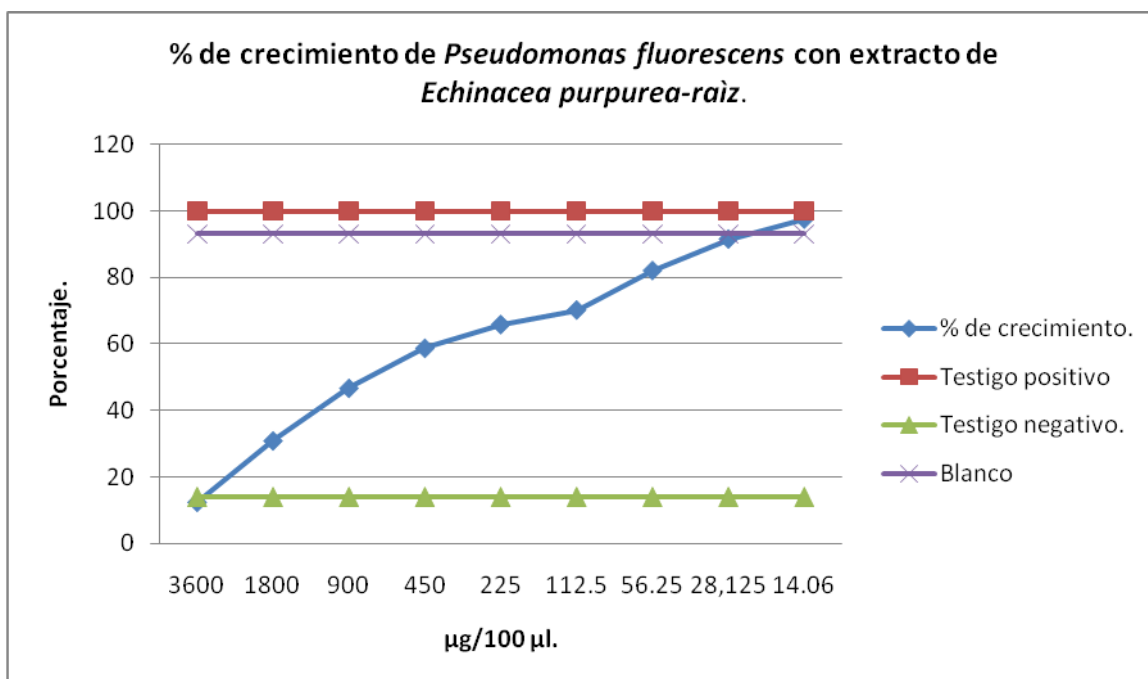


Figura 9.- Comportamiento de la inhibición de *Pseudomonas fluorescens* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-raíz.

## 8.2 Resultados de *Staphylococcus aureus*

*Echinacea purpurea* raíz  
*Staphylococcus aureus*

Tabla 2.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Staphylococcus aureus*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3600	0.001	0.066
1800	0.04	2.645
900	0.051	3.373
450	0.093	6.150
225	0.132	8.730
112.5	1.393	92.129
56.25	1.395	92.261
28.125	1.413	93.452
14.06	1.420	93.915
Testigo positivo	1.512	100
Testigo negativo	0.174	11.507
Blanco	1.064	70.37

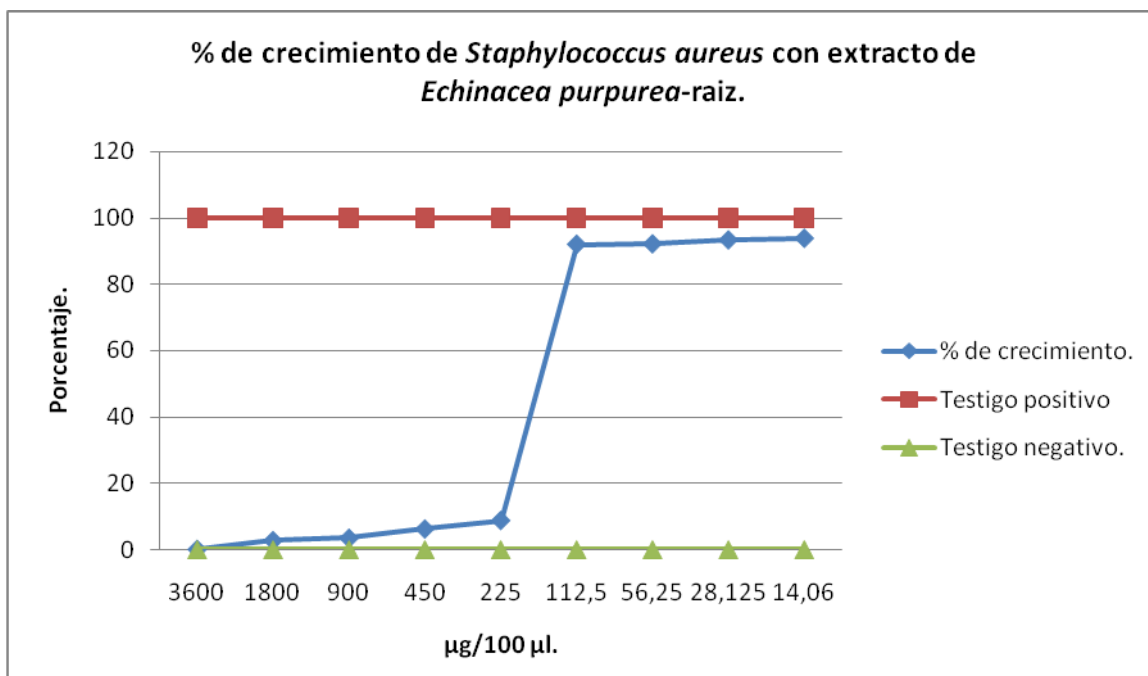


Figura 10.- Comportamiento de la inhibición de *Staphylococcus aureus* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-raíz

### 8.3.- Resultados de *Staphylococcus epidermidis*

*Echinacea purpurea* raíz  
*Staphylococcus epidermidis*

Tabla 3.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Staphylococcus epidermidis*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3600	0.143	11.996
1800	0.215	18.036
900	0.642	53.859
450	1.235	103.607
225	1.382	115.939
112.5	1.927	161.661
56.25	1.151	96.560
28.125	1.166	97.818
14.06	1.104	92.617
Testigo positivo.	1.192	100
Testigo negativo.	0.178	14.932
Blanco.	1.522	127.684

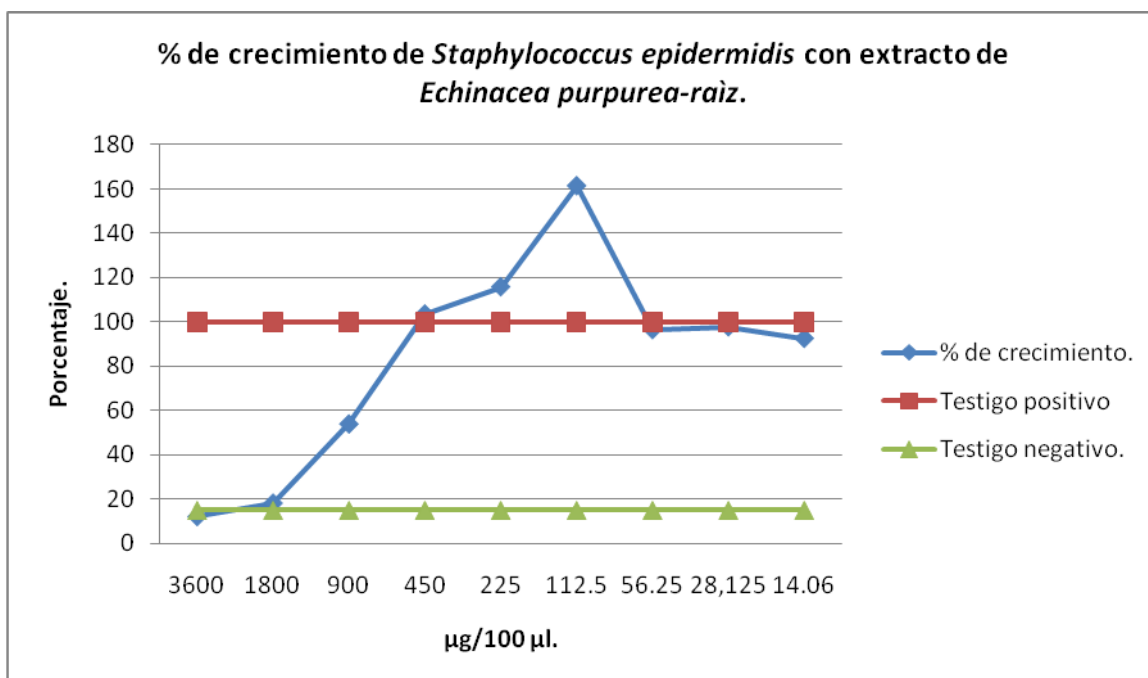


Figura 11.- Comportamiento de la inhibición de *Staphylococcus epidermidis* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-raíz

#### 8.4.-Resultados de *Candida albicans*

*Echinacea purpurea* raíz  
*Candida albicans*

Tabla 4.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Cándida albicans*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3600	0.012	0.864
1800	0.027	1.945
900	0.067	4.827
450	0.094	6.772
225	0.15	10.80
112.5	0.246	17.723
56.25	0.271	19.524
28.125	0.324	23.342
14.06	0.356	25.648
Testigo positivo.	1.388	100
Testigo negativo.	0.182	13.112
Blanco.	1.554	111.959

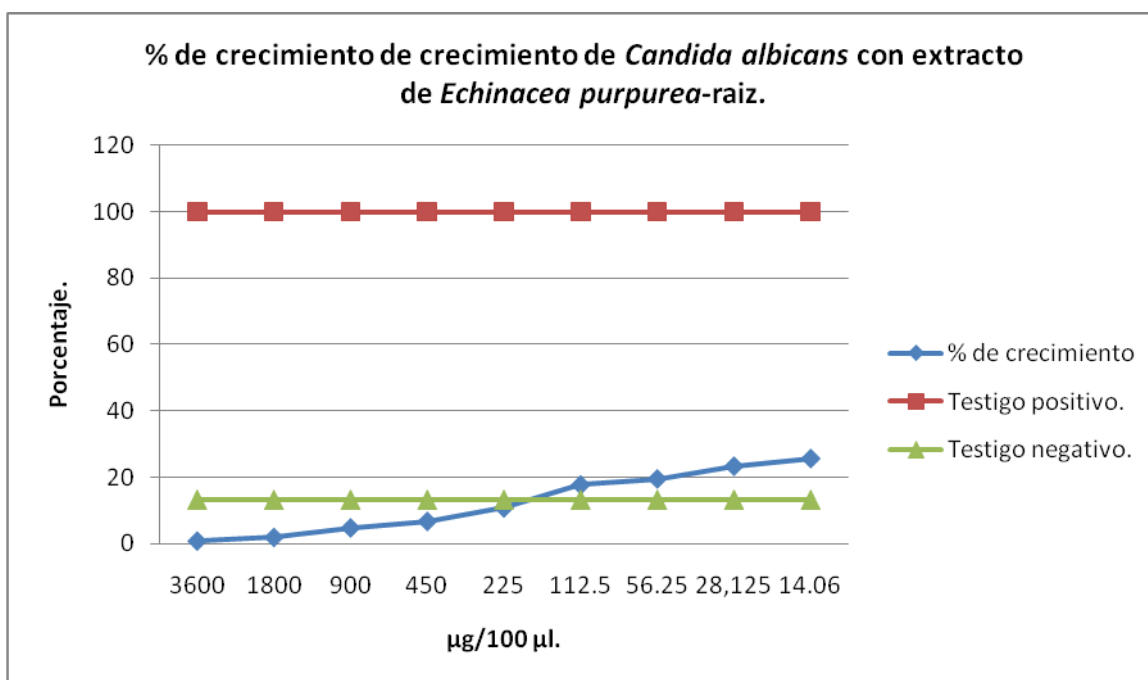


Figura 12.- Comportamiento de la inhibición de *Candida albicans* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-raíz.

## 8.5.- Resultados de *Proteus mirabilis*

*Echinacea purpurea* raíz  
*Proteus mirabilis*

Tabla 5.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Proteus mirabilis*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3600	0.145	5.238
1800	1.083	39.125
900	1.207	43.605
450	1.215	43.894
225	2.262	81.719
112.5	2.378	85.910
56.25	2.399	86.669
28.125	2.527	91.293
14.06	2.735	98.80
Testigo positivo.	2.788	100
Testigo negativo.	0.173	6.25
Blanco.	1.607	58.056

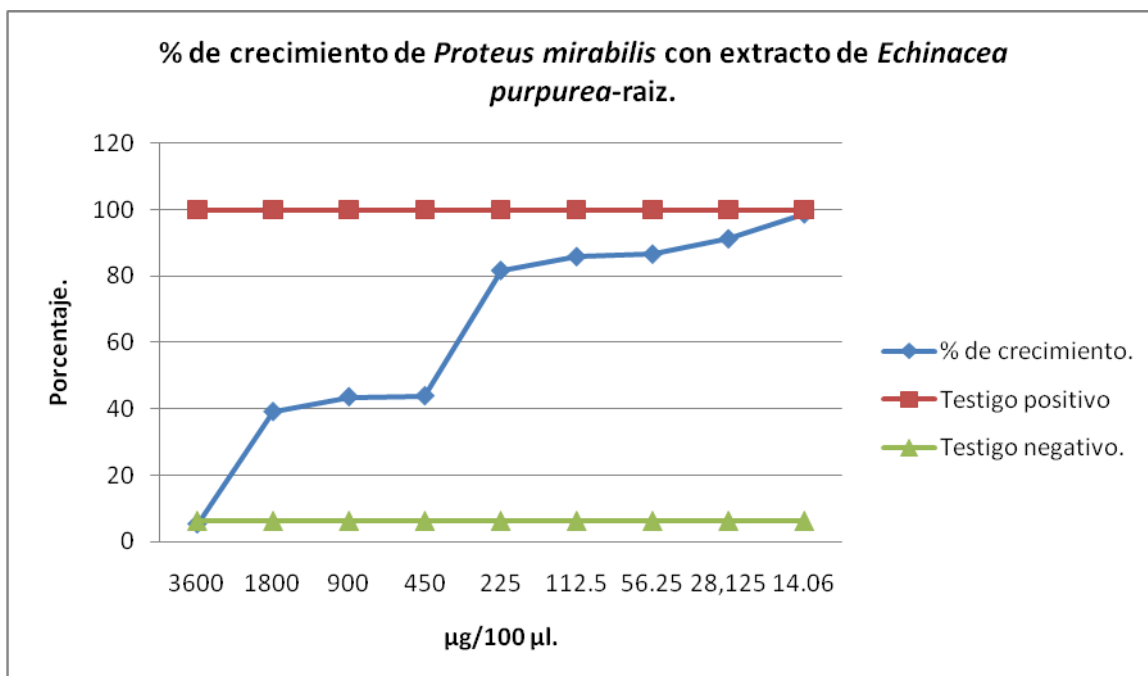


Figura 13.- Comportamiento de la inhibición de *Proteus mirabilis* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-raíz.

## 8.6.-Resultados de *Escherichia coli*

*Echinacea purpurea* raíz  
*Escherichia coli*

Tabla 6.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Escherichia coli*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3600	0.136	10.542
1800	0.208	16.124
900	0.226	17.193
450	0.266	20.620
225	0.395	30.620
112.5	0.429	33.255
56.25	1.382	107.131
28.125	1.383	107.209
14.06	1.445	112.015
Testigo positivo.	1.290	100
Testigo negativo.	0.172	13.333
Blanco.	1.530	118.604

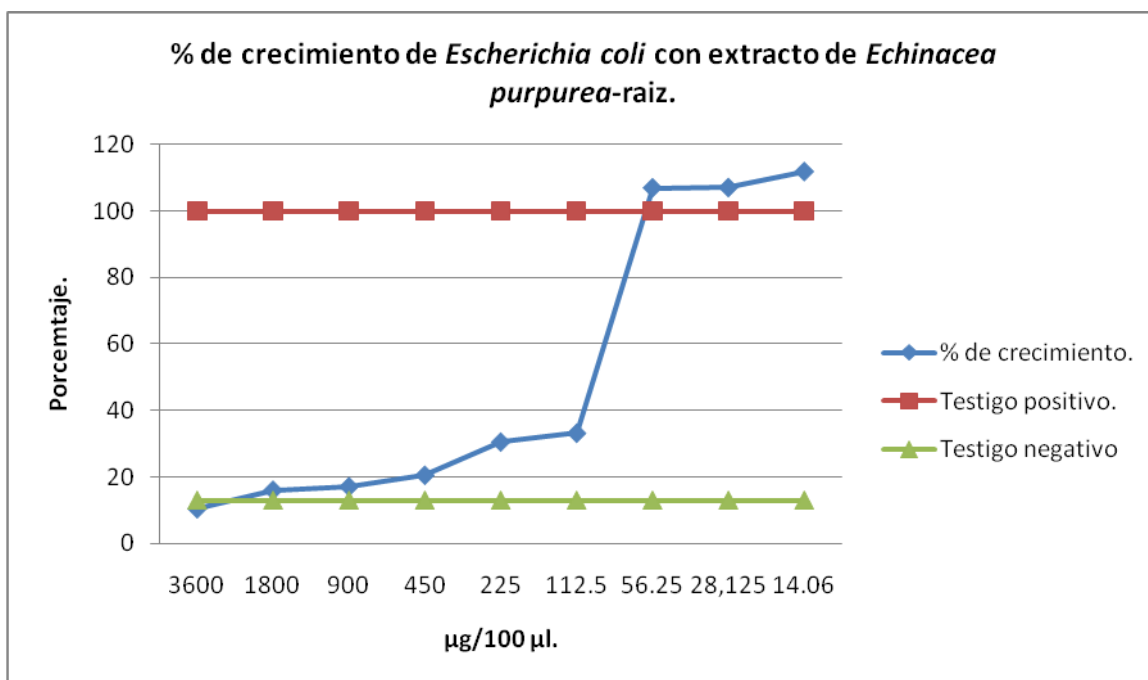


Figura 14.- Comportamiento de la inhibición de *Escherichia coli* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-raíz.

## 8.7.-Resultados de *Gardnerella vaginalis*

*Echinacea purpurea* raíz  
*Gardnerella vaginalis*

Tabla 7.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Gardnerella vaginalis*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3600	0.037	5.339
1800	0.042	6.060
900	0.070	10.101
450	0.092	13.275
225	0.104	15.007
112.5	0.138	19.91
56.25	0.179	25.829
28.125	0.198	28.571
14.06	0.251	36.219
Testigo positivo.	0.693	100
Testigo negativo.	0.162	23.376
Blanco.	1.555	224.386

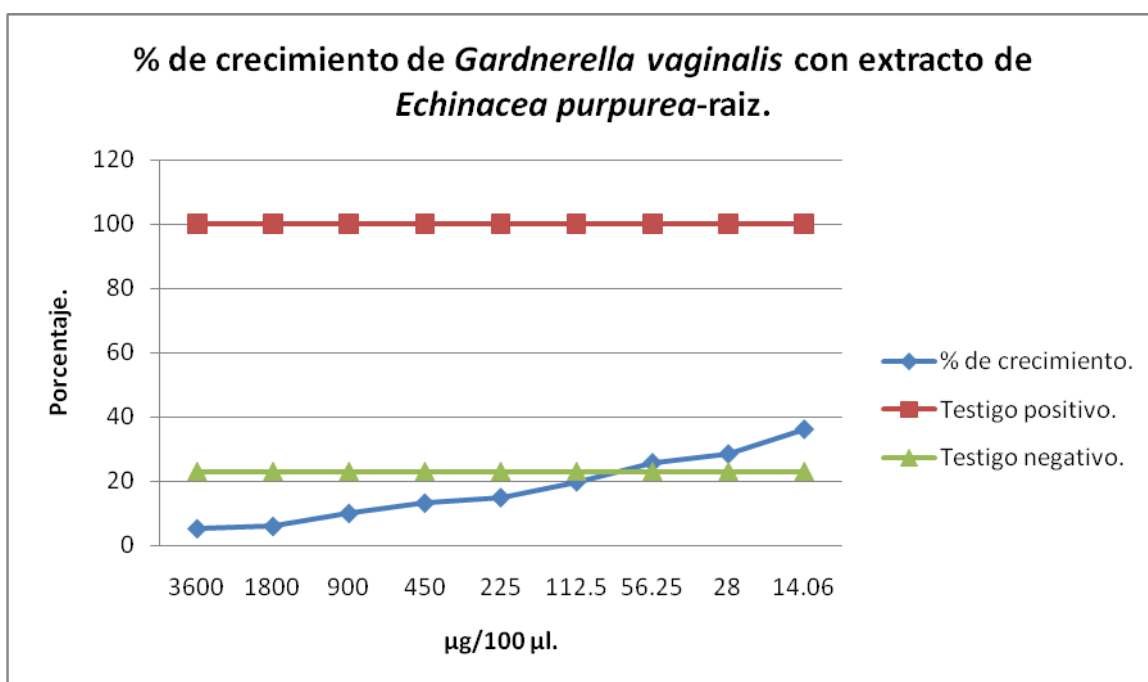


Figura 15.- Comportamiento de la inhibición de *Gardnerella vaginalis* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-raíz.

## 8.8.- Resultados de *Pseudomonas fluorescens*

*Echinacea purpurea* planta  
*Pseudomonas fluorescens*

Tabla 8.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* planta enfrentada con *Pseudomonas fluorescens*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3800	0.08	4.113
1900	0.649	33.367
950	0.711	36.555
475	0.725	37.275
237.5	0.808	41.542
118.75	0.937	48.174
59.375	1.287	66.169
29.687	1.342	68.997
14.84	1.517	77.994
Testigo positivo.	1.945	100
Testigo negativo.	0.197	10.128
Blanco.	0.394	20.257

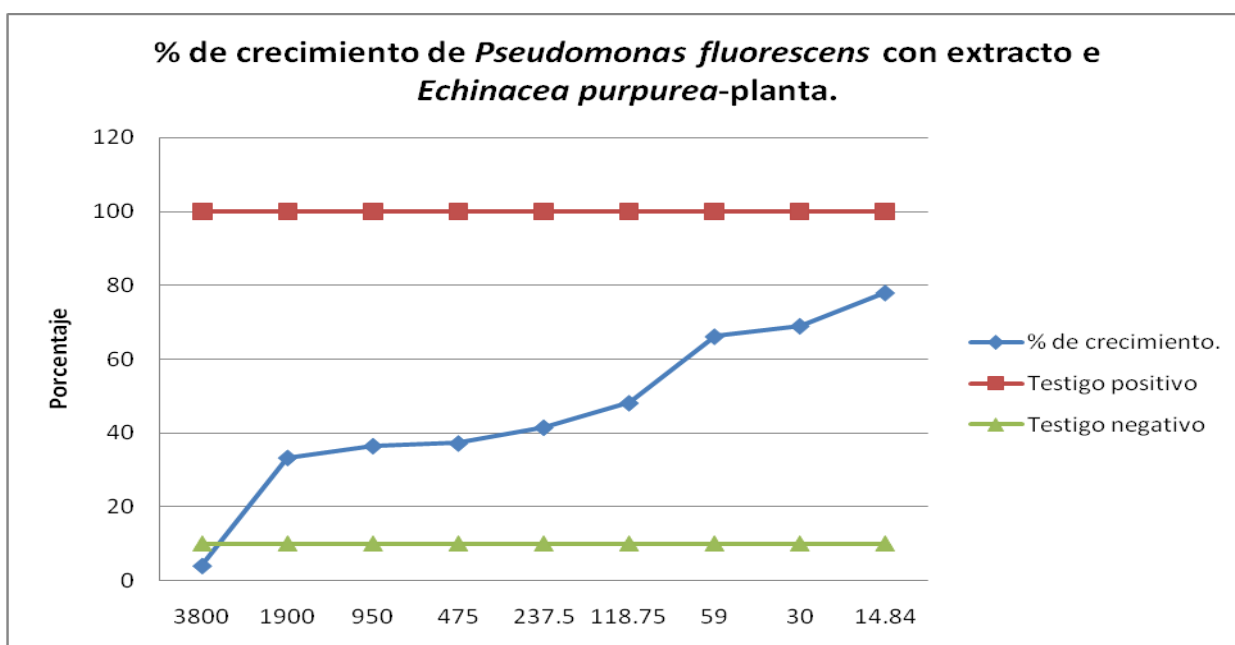


Figura 16.- Comportamiento de la inhibición de *Pseudomonas fluorescens* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-planta.



### 8.9.- Resultados de *Staphylococcus aureus*

*Echinacea purpurea* planta  
*Staphylococcus aureus*

Tabla 9.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Staphylococcus aureus*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3800	0.627	62.7
1900	0.636	63.6
950	0.701	70.1
475	0.721	72.1
237.5	0.737	73.7
118.75	0.772	77.2
59.375	0.805	80.5
29.687	0.812	81.2
14.84	0.919	91.9
Testigo positivo.	1.000	100
Testigo negativo.	0.182	18.2
Blanco.	0.398	39.8

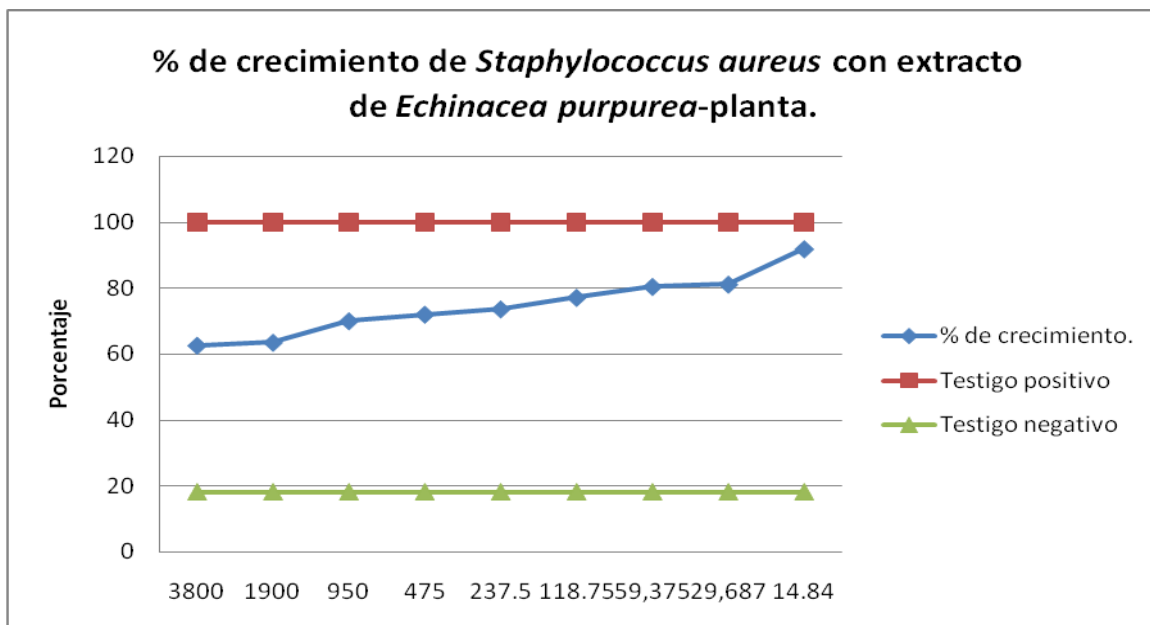


Figura 17.- Comportamiento de la inhibición de *Staphylococcus aureus* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-planta

### 8.10.- Resultados de *Staphylococcus epidermidis*

*Echinacea purpurea* planta  
*Staphylococcus epidermidis*

Tabla 9.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Staphylococcus epidermidis*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3800	0.749	61.544
1900	0.760	62.448
950	0.769	63.188
475	0.771	63.352
237.5	0.778	63.927
118.75	0.826	67.87
59.375	0.862	70.829
29.687	0.939	77.156
14.84	0.966	79.375
Testigo positivo.	1.217	100
Testigo negativo.	0.185	15.201
Blanco.	0.387	31.799

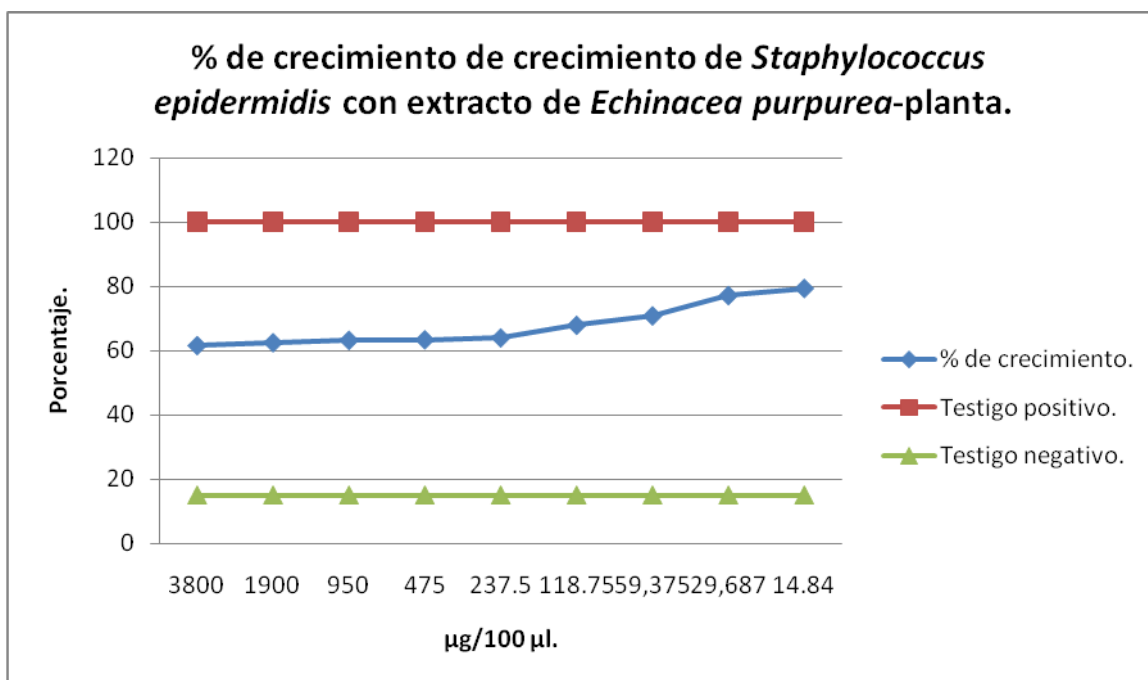


Figura 18.- Comportamiento de la inhibición de *Staphylococcus epidermidis* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-planta.

### 8.11.-Resultados de *Candida albicans*

*Echinacea purpurea* planta  
*Candida albicans*

Tabla 11.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Candida albicans*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3800	0.237	17.286
1900	1.062	77.461
950	1.188	86.652
475	1.209	88.183
237.5	1.230	89.715
118.75	1.473	107.439
59.375	1.535	111.962
29.687	1.572	114.660
14.84	1.619	118.088
Testigo positivo.	1.371	100
Testigo negativo.	0.176	12.837
Blanco.	0.370	26.987

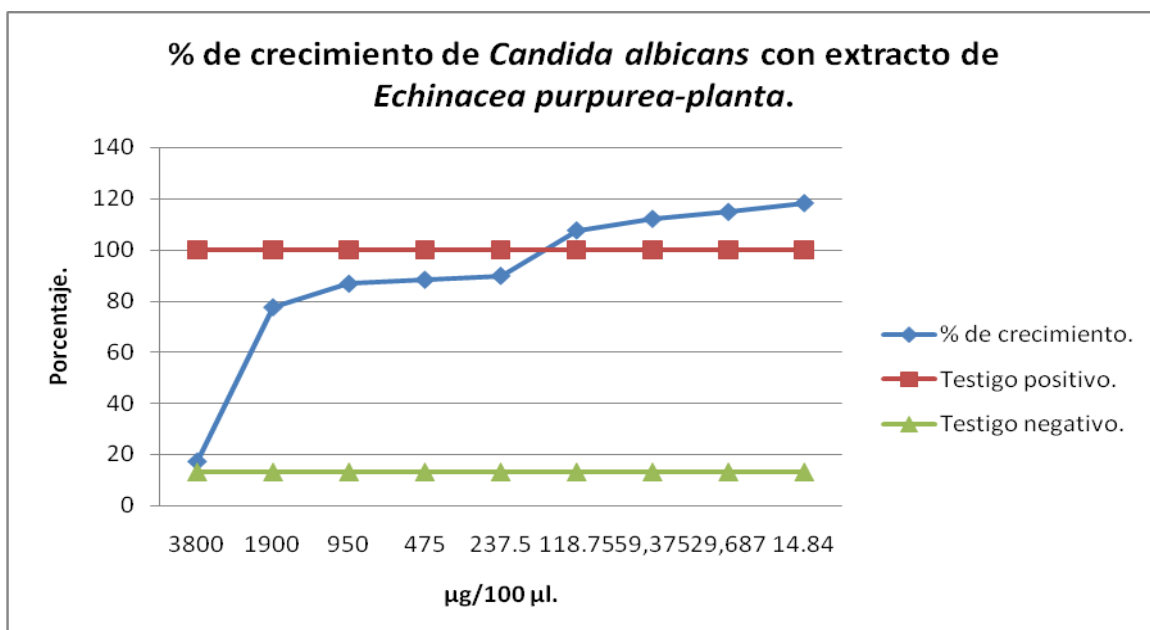


Figura 19.- Comportamiento de la inhibición de *Candida albicans* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-planta

## 8.12.- Resultados de *Proteus mirabilis*

*Echinacea purpurea* planta  
*Proteus mirabilis*

Tabla 12.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Proteus mirabilis*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3800	0.756	31.684
1900	1.236	51.802
950	1.275	53.436
475	1.324	55.490
237.5	1.968	82.481
118.75	1.987	83.277
59.375	1.994	83.570
29.687	2.018	84.576
14.84	2.063	86.462
Testigo positivo.	2.386	100
Testigo negativo.	0.170	7.124
Blanco.	0.381	15.968

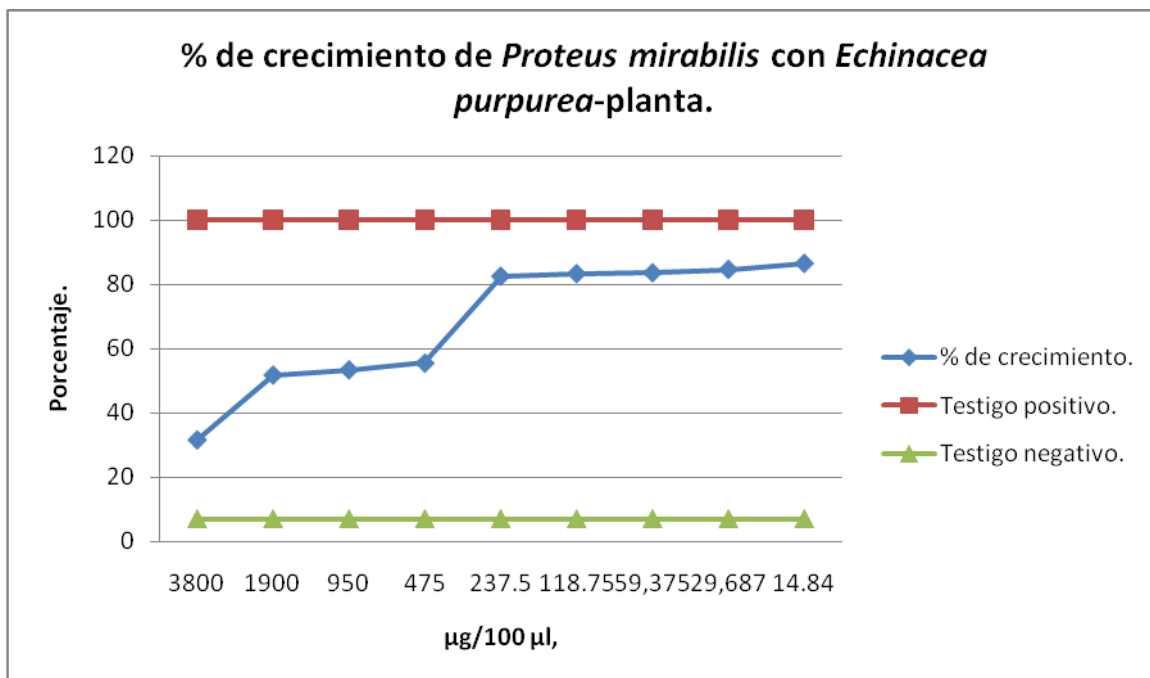


Figura 20.- Comportamiento de la inhibición de *Proteus mirabilis* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-planta.

### 8.13.-Resultados de *Escherichia coli*.

*Echinacea purpurea* planta  
*Escherichia coli*.

Tabla 13.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Escherichia coli*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3800	0.442	32.571
1900	0.558	41.120
950	0.666	49.078
475	0.761	56.079
237.5	0.846	62.343
118.75	0.994	73.249
59.375	1.014	74.723
29.687	1.052	77.523
14.84	1.063	78.334
Testigo positivo.	1.357	100
Testigo negativo.	0.173	12.748
Blanco	0.380	28.002

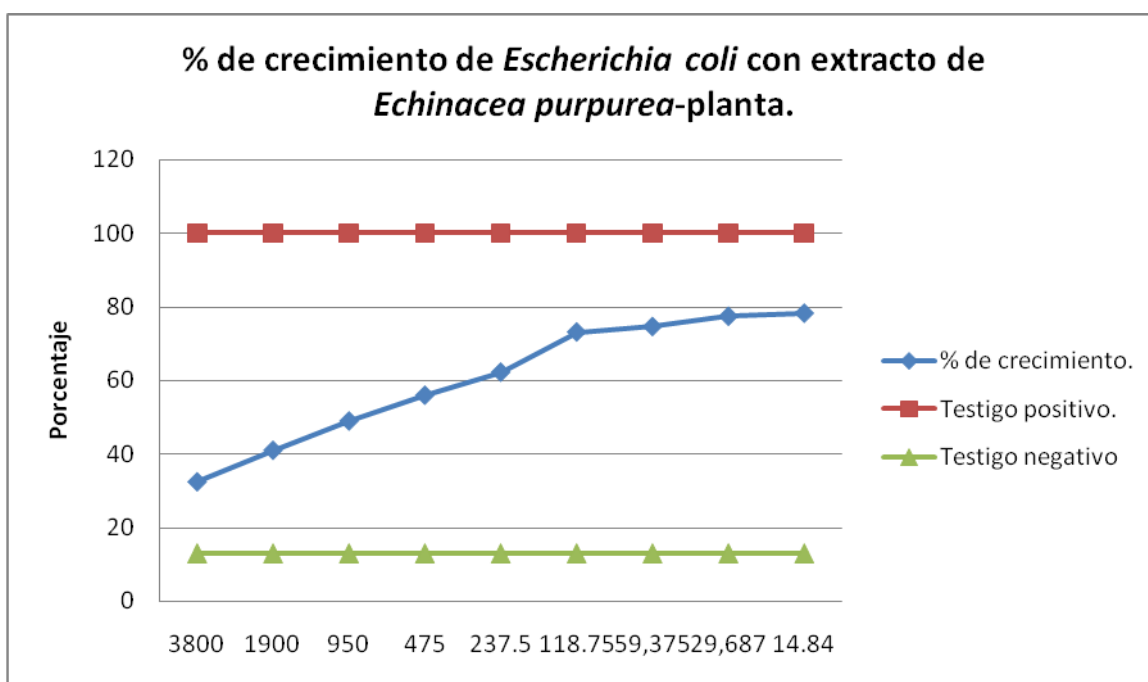


Figura 21.- Comportamiento de la inhibición de *Escherichia coli* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-planta.

### 8.14.- Resultados de *Gardnerella vaginalis*.

*Echinacea purpurea* planta.  
*Gardnerella vaginalis*.

Tabla 14.- Resultados de la lectura en absorbancia de cada concentración y referido en porcentaje de crecimiento e inhibición de *Echinacea purpurea* raíz enfrentada con *Gardnerella vaginalis*.

Concentración	Lectura	% de crecimiento.
3800	0.161	35.777
1900	0.180	40.0
950	0.183	40.666
475	0.189	42.0
237.5	0.191	42.444
118.75	0.197	43.777
59.375	0.228	50.666
29.687	0.265	58.888
14.84	0.361	80.222
Testigo positivo.	0.450	100
Testigo negativo.	0.205	45.555
Blanco	0.417	92.666

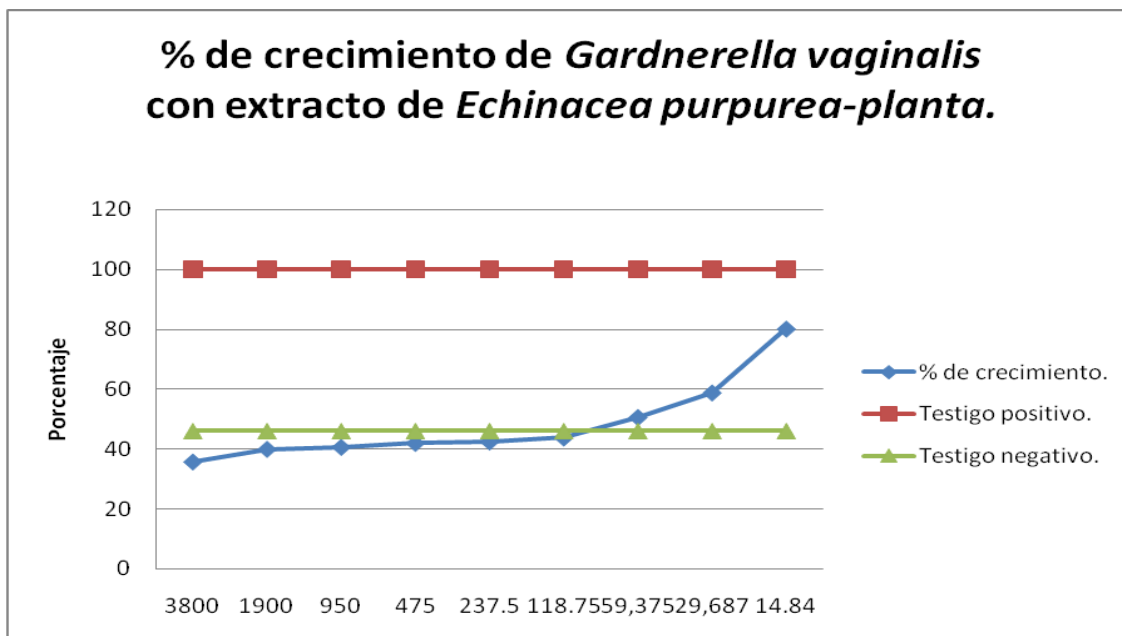


Figura 22.- Comportamiento de la inhibición de *Gardnerella vaginalis* en presencia del extracto de *Echinacea purpurea*-planta.

### 8.15.-*Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta.

Tabla 15.-Comparación de actividad antibacterial de *Pseudomonas fluorescens* con los dos extractos de *Echinacea purpurea*-raíz y *Echinacea purpurea* planta.

Concentración	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -raíz.	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -planta.
3600	12.46	4.113
1800	30.94	33.367
900	46.77	36.555
450	58.81	37.275
225	65.97	41.542
112.5	70.34	48.174
56.25	82.23	66.169
28.125	91.69	68.997
14.06	97.70	77.994
Testigo positivo	100	100
Testigo negativo	13.96	10.128
Blanco	93.12	20.257

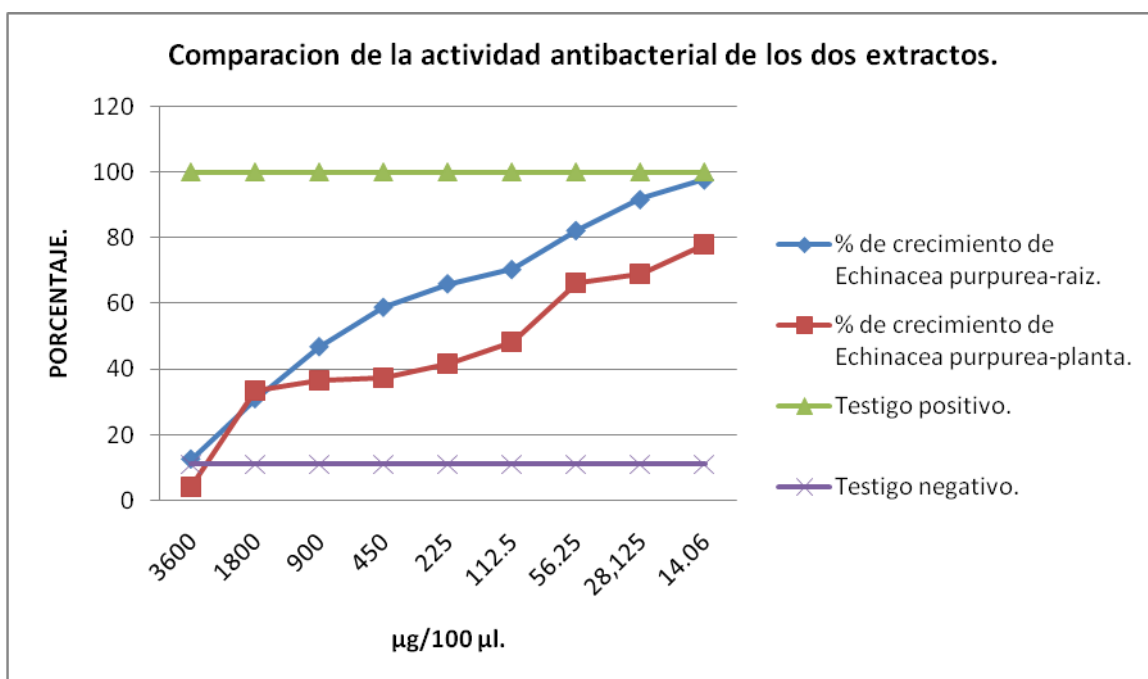


Figura 23.- Comparación de *Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta enfrentados ante *Pseudomonas fluorescens*.

### 8.16.-*Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta.

Tabla 16.-Comparación de actividad antibacterial de *Staphylococcus aureus* con los dos extractos de *Echinacea purpurea*-raíz y *Echinacea purpurea* planta.

Concentración	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -raíz.	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -planta.
3600	0.066	62.7
1800	2.645	63.6
900	3.373	70.1
450	6.150	72.1
225	8.730	73.7
112.5	92.129	77.2
56.25	92.261	80.5
28.125	93.452	81.2
14.06	93.915	91.9
Testigo positivo	100	100
Testigo negativo	11.507	18.2
Blanco	70.37	39.8

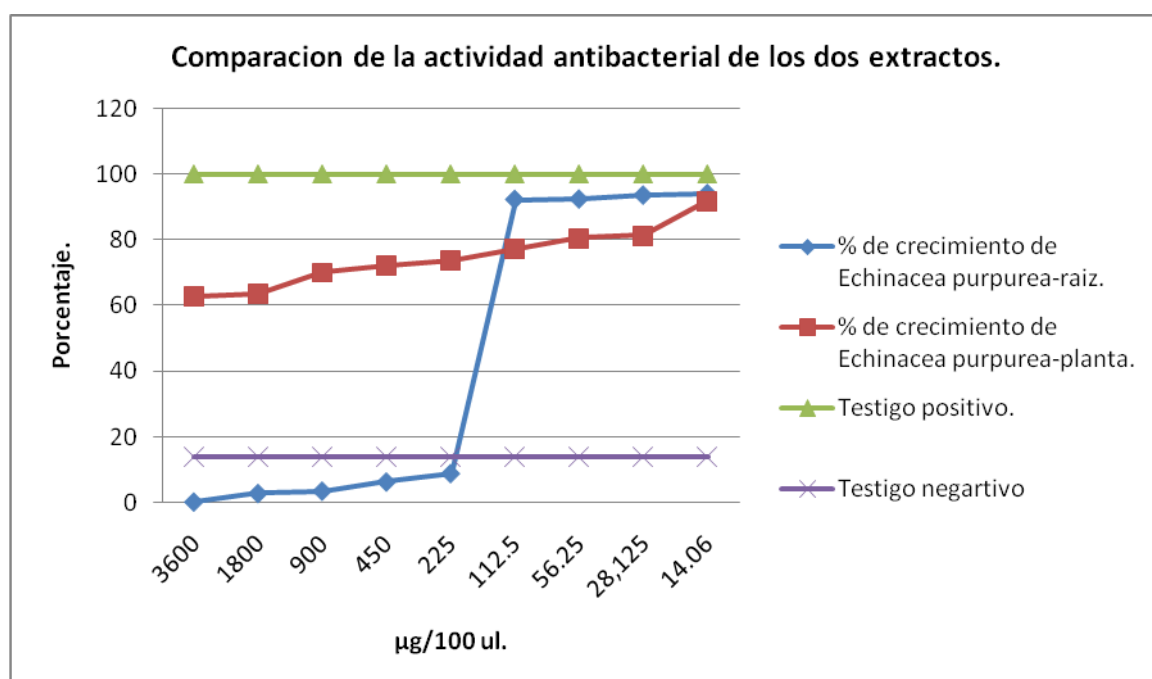


Figura 24.- Comparación de *Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta enfrentados ante *Staphylococcus aureus*.



### 8.17.-*Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta.

Tabla 17.-Comparación de actividad antibacterial de *Staphylococcus epidermidis* con los dos extractos de *Echinacea purpurea*-raíz y *Echinacea purpurea* planta.

Concentración	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -raíz.	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -planta.
3600	11.996	61.544
1800	18.036	62.448
900	53.859	63.188
450	103.607	63.352
225	115.939	63.927
112.5	161.661	67.87
56.25	96.560	70.829
28.125	97.818	77.156
14.06	92.617	79.375
Testigo positivo.	100	100
Testigo negativo.	14.932	15.201
Blanco.	127.684	31.799

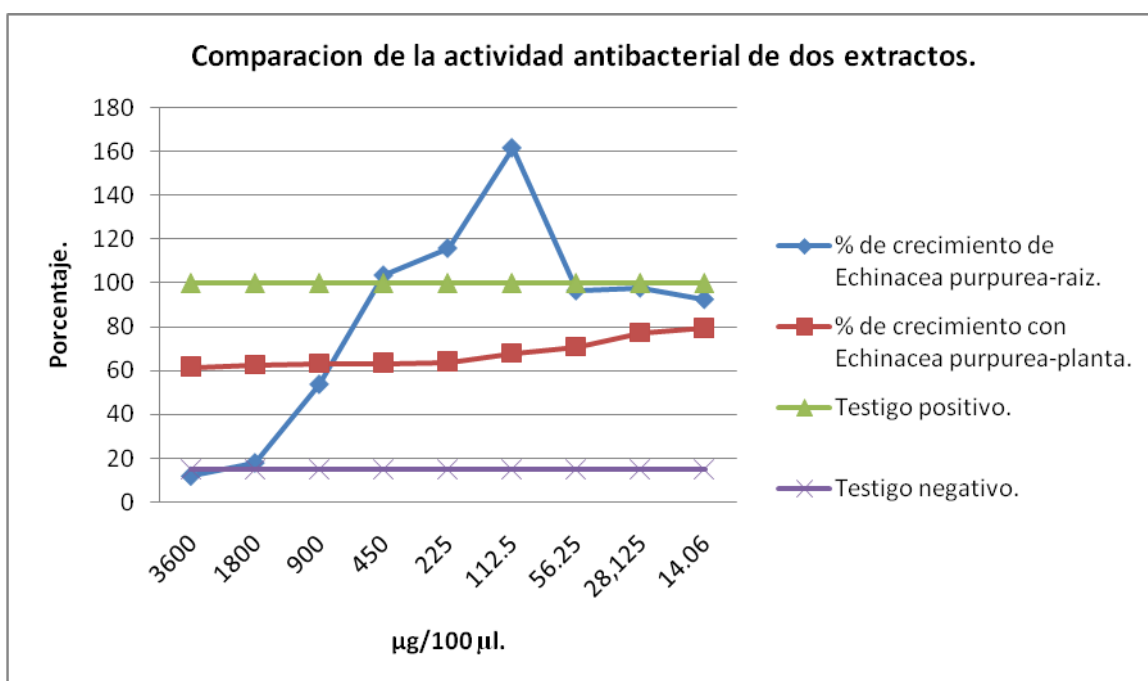


Figura 25.- Comparación de *Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta enfrentados ante *Staphylococcus epidermidis*.

### 8.18.-*Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta.

Tabla 18.- Comparación de actividad antibacterial de *Candida albicans* con los dos extractos de *Echinacea purpurea*-raíz y *Echinacea purpurea* planta.

Concentración	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -raíz..	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -planta.
3600	0.864	17.286
1800	1.945	77.461
900	4.827	86.652
450	6.772	88.183
225	10.80	89.715
112.5	17.723	107.439
56.25	19.524	111.962
28.125	23.342	114.660
14.06	25.648	118.088
Testigo positivo.	100	100
Testigo negativo.	13.112	12.837
Blanco.	111.959	26.987

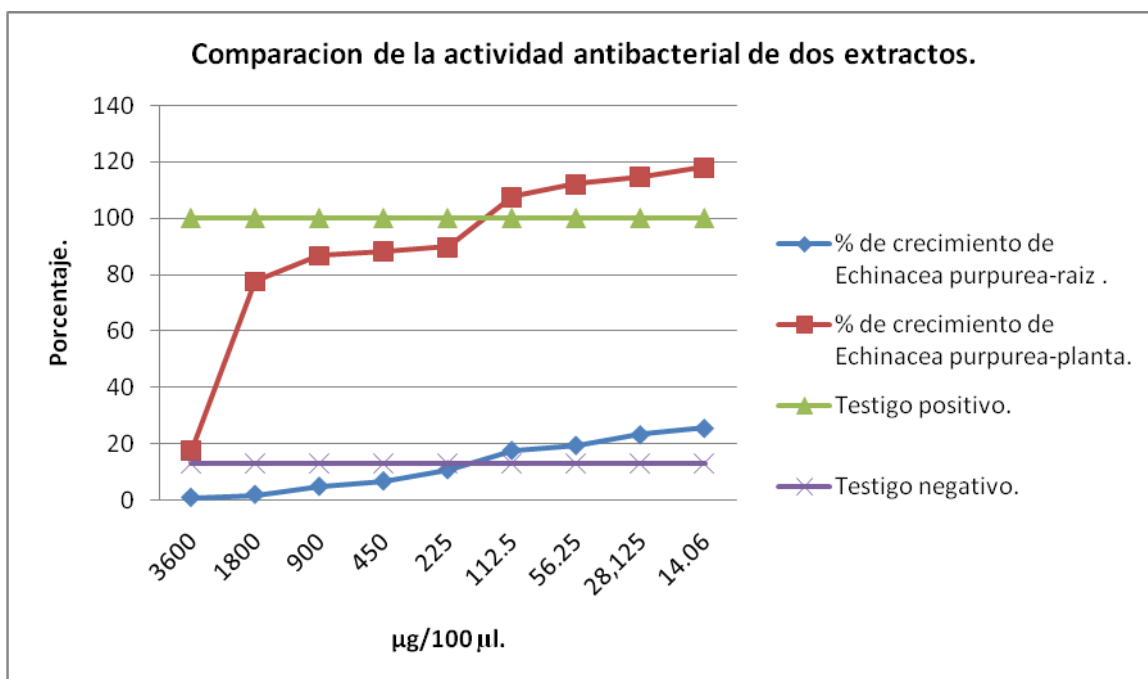


Figura 26.- Comparación de *Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta enfrentados ante *Cándida albicans*.

### 8.19.-*Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta.

Tabla 19.- Comparación de actividad antibacterial de *Proteus mirabilis* con los dos extractos de *Echinacea purpurea*-raíz y *Echinacea purpurea* planta.

Concentración	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -raíz.	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -planta.
3600	5.238	31.684
1800	39.125	51.802
900	43.605	53.436
450	43.894	55.490
225	81.719	82.481
112.5	85.910	83.277
56.25	86.669	83.570
28.125	91.293	84.576
14.06	98.80	86.462
Testigo Positivo.	100	100
Testigo Negativo.	6.25	7.124
Blanco.	58.056	15.968

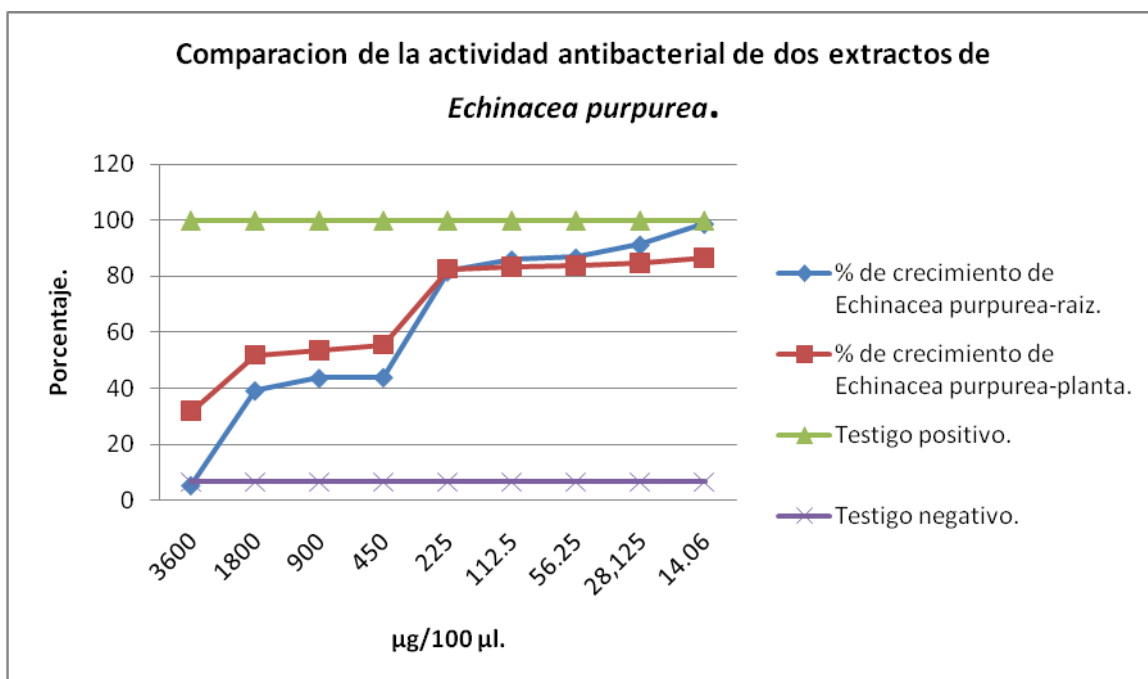


Figura 27.- Comparación de *Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta enfrentados ante *Proteus mirabilis*.

### 8.20.-*Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta.

Tabla 20.- Comparación de actividad antibacterial de *Escherichia coli* con los dos extractos de *Echinacea purpurea*-raíz y *Echinacea purpurea* planta.

Concentración	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -raíz.	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -planta.
3600	10.542	35.777
1800	16.124	40.0
900	17.193	40.666
450	20.620	42.0
225	30.620	42.444
112.5	33.255	43.777
56.25	107.131	50.666
28.125	107.209	58.888
14.06	112.015	80.222
Testigo positivo.	100	100
Testigo negativo.	13.333	45.555
Blanco.	118.604	92.666

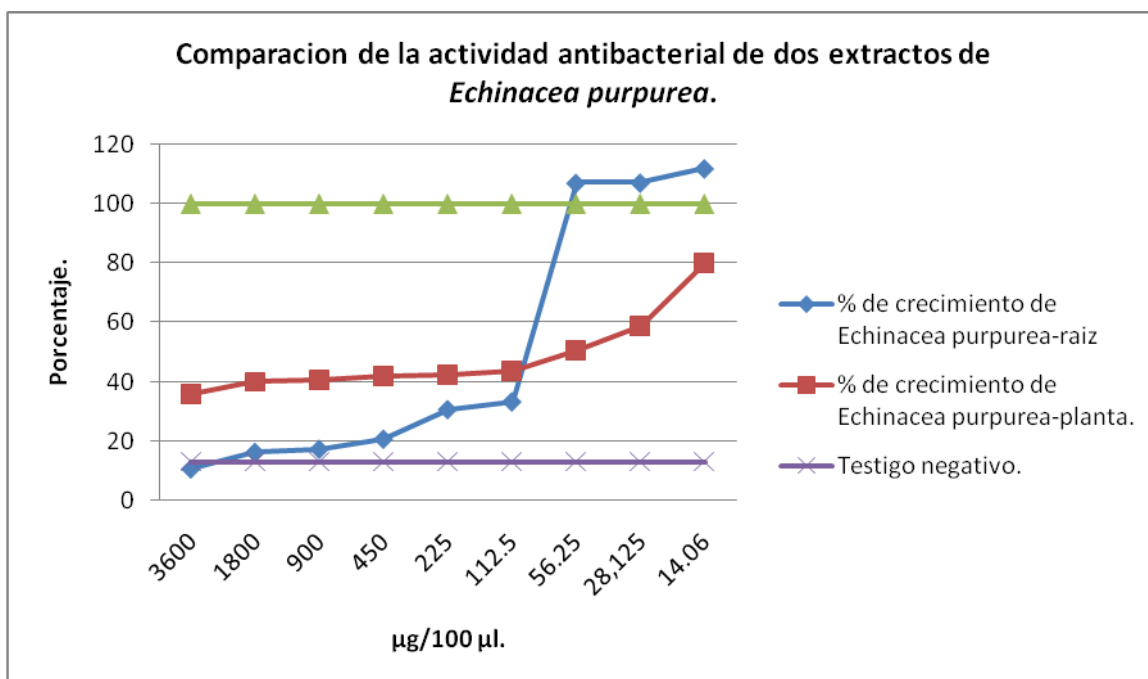


Figura 28.- Comparación de *Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta enfrentados ante *Escherichia coli*.

### 8.21.-*Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta.

Tabla 21.-Comparación de actividad antibacterial de *Gardnerella vaginalis* con los dos extractos de *Echinacea purpurea*-raíz y *Echinacea purpurea* planta.

Concentración	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -raíz.	% de crecimiento de <i>Echinacea purpurea</i> -planta.
3600	5.339	35.777
1800	6.060	40.0
900	10.101	40.666
450	13.275	42.0
225	15.007	42.444
112.5	19.91	43.777
56.25	25.829	50.666
28.125	28.571	58.888
14.06	36.219	80.222
Testigo positivo.	100	100
Testigo negativo.	23.376	45.555
Blanco.	224.386	92.666

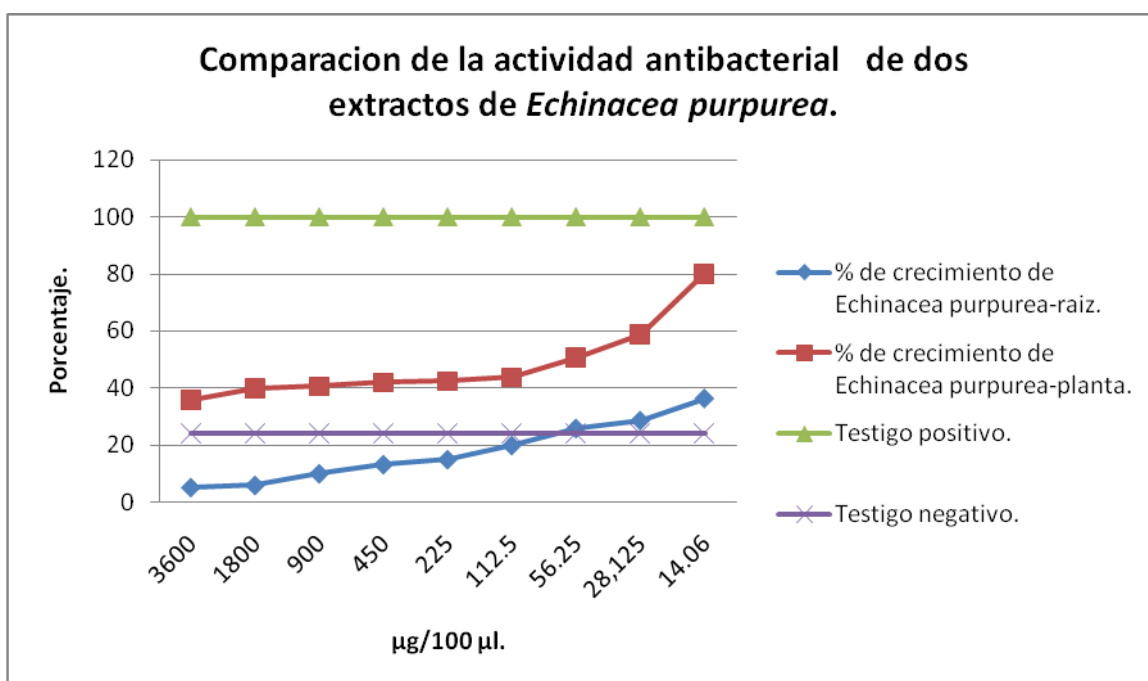


Figura 29.- Comparación de *Echinacea purpurea* raíz VS *Echinacea purpurea* planta enfrentados ante *Gardnerella vaginalis*.

***Echinacea purpurea* planta.**

Con MTT.

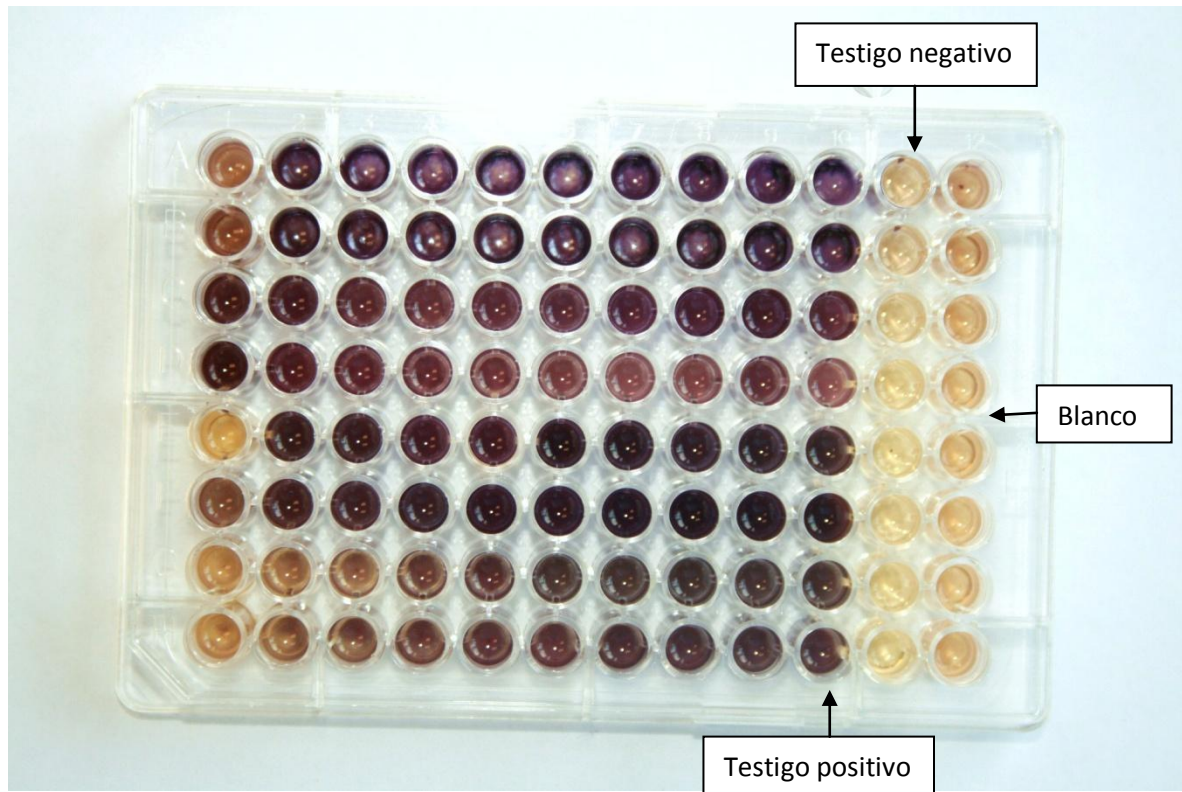


Figura 30.-Placa revelada con MTT de *Echinacea purpurea* planta

- A-B: *Pseudomonas fluorescens*
- C: *Staphylococcus aureus*
- D: *Staphylococcus epidermidis*
- E: *Cándida albicans*
- F: *Proteus mirabilis*
- G: *Escherichia coli*

*Echinacea purpurea* raíz.

Con MTT.

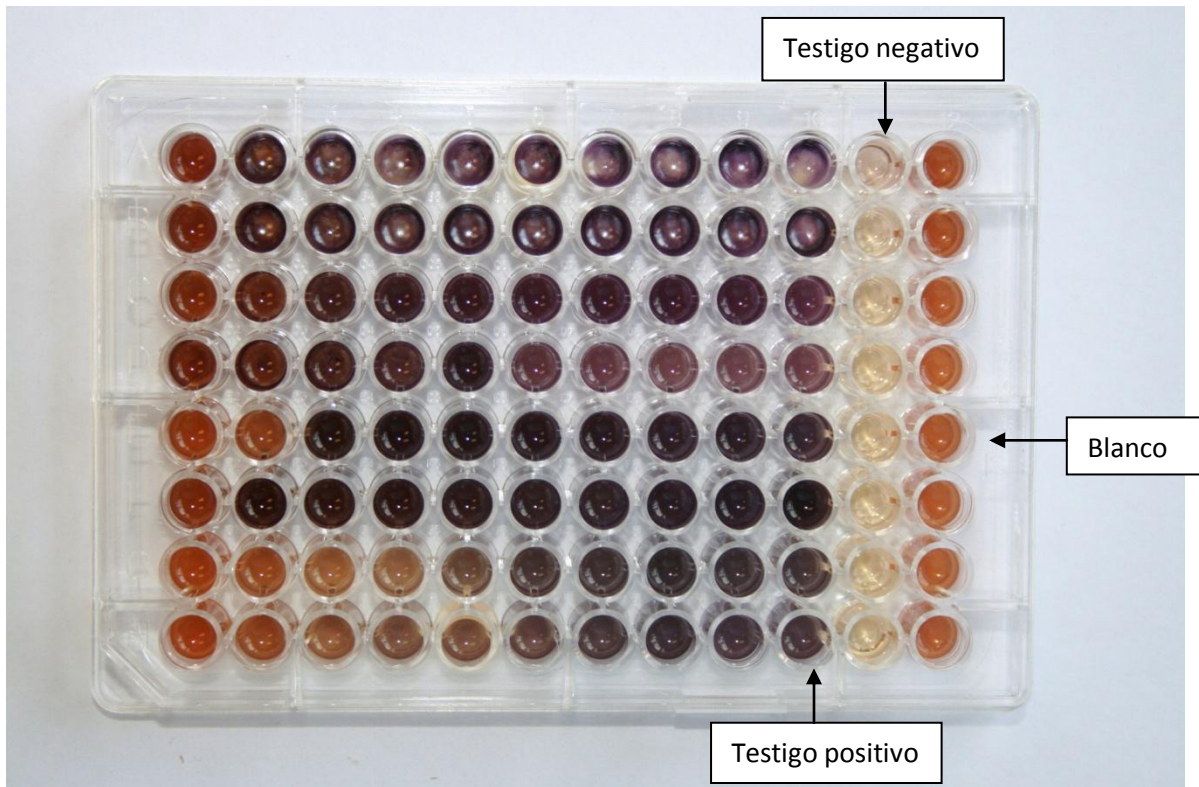


Figura 31.- Placa revelada con MTT de *Echinacea purpurea* raíz.

- A-B: *Pseudomonas fluorescens*
- C: *Staphylococcus aureus*
- D: *Staphylococcus epidermidis*
- E: *Cándida albicans*
- F: *Proteus mirabilis*
- G: *Escherichia coli*

## 8.22.-Resultados (Bacteriostático y Bactericida)

*Echinacea purpurea* raíz.

Bacteria. \ Pozos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas fluorescens.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Candida albicans.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Gardnerella vaginalis.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10.- Testigo positivo.

11.- Testigo negativo.

12.- Blanco.

(+).- Crecimiento.

(-).- Inhibición.

*Echinacea purpurea* planta.

Bacteria. \ Pozos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas fluorescens.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Candida albicans.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Gardnerella vaginalis.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10.- Testigos positivo.

11.- Testigo negativo.

12.- Blanco.

(+).- Crecimiento.

(-).- Inhibición.



## 9.-ANALISIS DE RESULTADOS

En la gráfica 1 se puede observar que la *Echinacea purpurea* raíz si tuvo un efecto inhibitorio al ponerlo en contacto con *Pseudomonas Fluorescens* ya que en el pozo 1 podemos observar que solamente creció un 12.46 % de esta manera se puede decir que se inhibió en un 87.54 % pero el efecto que tubo sobre la *Pseudomonas fluorescens* solamente fue bacteriostático ya que en la prueba de placa en BHI desde el pozo hubo un crecimiento, menos en el blanco y en el control positivo. Al observar la gráfica podemos decir que hubo un crecimiento ascendente y a la concentración de 112.5 µg/100 µl se observa una meseta o una constante de crecimiento y en el siguiente pozo sigue la creciente. El control positivo para *Pseudomonas fluorescens* nos arrojó un porcentaje de crecimiento de 13.96 % por lo que todos los resultados excepto el pozo uno o a la concentración de 3600 µg/100 µl se encuentran por arriba de este resultado y por debajo del control positivo por lo que podemos decir que los resultados de los pozos problemas se encuentran el ascendencia y se encuentra en el rango favorable.

En la tabla de *Staphylococcus aureus* se observa que desde el primer pozo hasta el pozo 5 hay un crecimiento de forma ascendente lo cual nos dice que a una concentración de 3600 µg/100 µl inhibe a 99.944 % de crecimiento y a una concentración de 225 µg/100 µl inhibe un 92.37 % de crecimiento por lo que podemos decir que desde una concentración de 3600 µg/100 µl -225 µg/100 µl la *Echinacea purpurea* raíz inhibe un 90.0 % de crecimiento por lo que se asegura que la MIC (concentración mínima inhibitoria) es de 225 µg/100 µl, debido a que a partir de esta concentración hay un crecimiento importante en cada uno de los pozos, a partir del pozo 6 o a la concentración de 112.5 µg/100 µl el porcentaje de crecimiento es de 92.12 % y en los siguientes 3 pozos es constante por lo que se observa casi una línea recta. El testigo negativo nos arrojó un resultado de 11.5 % de crecimiento y todos los datos experimentales se encuentran por arriba de este y por debajo del testigo positivo y el blanco en cada uno de estos extractos es alto debido a que el color del mismo era fuerte y opaco.

Para la tabla de *Staphylococcus epidermidis* se observa que hay un aumento de crecimiento desde el primer pozo hasta el pozo 6 o en la concentración de 112.5 µg/100 µl, observa claramente que la *Echinacea purpurea* raíz inhibe el crecimiento de la bacteria en cuestión, basado también en la prueba de placa de BHI la cual me arrojó que la *Echinacea purpurea* raíz actúa como bacteriostático por que en cada uno de los pozos hubo crecimiento excepto en el blanco y en el testigo negativo, esto interpretamos como anteriormente lo menciono, para el pozo 7 al 9 vuelve a disminuir su concentración, en el pozo que tiene una concentración de 112.5 µg/100 µl tenemos un porcentaje de inhibición de 161.66 µg/100 µl por lo que este es el punto más alto y que podemos decir que en este pozo la *Echinacea purpurea* raíz no le hizo nada a la bacteria en cuestión, para el pozo que tiene una concentración de 56.25 µg/100 µl hay un porcentaje de inhibición de 3.5 % con respecto al control positivo y de este pozo hacia el numero 9 sigue disminuyendo el porcentaje de

crecimiento. La MIC se encuentra en la concentración de 1800 µg/100 µl debido a que después de este aumenta el porcentaje de crecimiento más de 50 %.

Para la bacteria *Cándida albicans* la *Echinacea purpurea* raíz actúa favorablemente ya que inhibe su crecimiento perfectamente, el porcentaje de crecimiento se encuentra por debajo del control negativo y también por debajo del control positivo, para la concentración de 3600 µg/100 µl el porcentaje de inhibición es de 99.24 %, y para la concentración más baja la cual es de 14.06 µg/100 µl, el porcentaje de inhibición es de 75.36 %, por lo que podemos decir que la MIC es de 14.06 µg/100 µl. Para la prueba de placa en BHI arrojo que la *Echinacea purpurea* raíz para la bacteria en cuestión es bacteriostático.

En la gráfica de *Proteus mirabilis* se observa una curva en forma creciente, la misma se encuentra por arriba del control negativo y por debajo del testigo positivo de esta forma podemos decir que es una curva ideal, para la concentración de 3600 µg/100 µl encontramos un porcentaje de inhibición de 95.8 % por lo que se observa claramente que inhibe a esta bacteria hasta el pozo número 4 con una concentración de 450 µg/100 µl ya que en este pozo tenemos un porcentaje de crecimiento de 43.9 % y también lo podemos corroborar por la imagen de la placa con MTT, para el pozo 5 se observa un incremento considerable ya que aumentó un 40 % de crecimiento, los siguientes pozos siguieron aumentando hasta llegar casi a un 100 % de crecimiento por lo que puedo decir que a 14.06 µg/100 µl la *Echinacea purpurea* raíz no tiene ningún efecto hacia *Proteus mirabilis*.

En esta grafica se muestra el comportamiento de la *Echinacea purpurea* raíz con *Escherichia coli* la cual nos muestra que a una concentración arriba de 112.5 µg/100 µl no tiene ninguna actividad ya que se encuentra por arriba del control positivo o que se encuentra por arriba del 100 % de crecimiento. Para una concentración de 3600 µg/100 µl se muestra que hay una actividad inhibitoria del 89.5%, la actividad que mostro la *Echinacea purpurea* sobre *E. coli* es ascendente debido a que al disminuir la concentración de la *Echinacea purpurea* aumenta el crecimiento de *E. coli*, considerando que a 56.25 µg/100 µl ya no hay actividad inhibitoria. La MIC para esta bacteria es de 112.5 µg/100 µl y la actividad observada en la placa de BHI es bacteriostática ya que en todos los pozos sembrados crecieron con excepción del control negativo y el blanco, con la prueba de MTT podemos demostrar que el pozo número 6 es donde se encuentra la concentración mínima inhibitoria.

Los resultados obtenidos de *Echinacea purpurea* enfrentada a *Gardnerella vaginales* fueron los más favorables ya que esta actúa como bactericida por lo que podemos decir y comprobar con la técnica en placa de BHI donde no hubo crecimiento de ningún tipo ya que la *Echinacea purpurea* es bactericida o lo que es lo mismo que actúa sobre la bacteria lisándola y por lo tanto no hay crecimiento sobre un agar y bajo condiciones favorables para su crecimiento. Con respecto a los resultados podemos observar que de la concentración de 3600 µg/100 µl hasta 112.5 µg/100 µl se encuentran por debajo del

testigo positivo ya que no hubo un crecimiento considerable y solamente se puede referir estos resultados a los cuerpos de la bacteria ya que el elisometro lee turbidez y color el cual esta descrito en esta prueba por lo que a una concentración de 14.06 µg/100 µl hay un porcentaje de inhibición por arriba del 60 % de esta forma podemos decir que la MIC de esta bacteria en cuestión es de 14.06 µg/100 µl, ya que vuelvo a reiterar que en la placa de BHI no hubo ningún crecimiento de ningún tipo.

Los resultados arrojados por la *Echinacea purpurea* planta son buenos ya que nos está dando una clara línea ascendente en la cual podemos observar en la concentración de 3600 µg/100 µl una clara inhibición de la *Pseudomonas fluorescens* la cual es del 93.9 %, por lo cual podemos asegurar que esta es la concentración idónea la cual impide el crecimiento a la bacteria y por lo tanto la mata por intoxicación, esta concentración puede ser muy útil para la elaboración de óvulos vaginales, porque la siguiente dilución doble tiene un salto muy escabroso ya que de un 93.9 % pasamos a un 76.4 % por lo cual también es buena pero por supuesto es mejor la anterior, a partir de esta concentración el porcentaje de crecimiento sigue en aumento pero no considerable, lo cual podemos asegurar que hasta la concentración de 118.74 µg/100 µl es considerada buena para ser utilizada y por lo tanto también esta concentración es la concentración mínima inhibitoria MIC, a partir de esta el porcentaje de crecimiento sigue en aumento hasta llegar a un 77.9 % por lo que podemos decir que el extracto sigue inhibiendo pero a porcentajes de inhibición muy pequeñas. La prueba en placa de BHI nos dice que la *Echinacea purpurea* planta actúa con un efecto bacteriostático debido a que crecieron en todos los pozos pero en concentraciones pequeñas exceptuando el pozo control negativo y el blanco.

Los datos obtenidos de *Echinacea purpurea* planta enfrentada ante *Staphylococcus aureus* no son favorables debido a que a una concentración alta, la cual es de 3600 µg/100 µl da un porcentaje de inhibición muy bajo por lo que podemos decir que la respuesta es inversamente proporcional, el porcentaje de inhibición a 3600 µg/100 µl es de 47.3 % por lo que ni siquiera inhibe un 50 %, en las siguientes diluciones dobles el porcentaje sigue aumentando pero no considerablemente por lo que podemos decir que sobre esta bacteria si tiene un efecto inhibitorio pero en baja concentración.

Para la concentración de 14.84 µg/100 µl hay un porcentaje de crecimiento del 92.9 % por lo que a esta concentración no es muy buena para una forma farmacéutica.

Los resultados tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Staphylococcus epidermidis* son similares por lo que a una concentración de 3600 µg/100 µl arrojó un porcentaje de crecimiento del 61.54 % por lo que puedo referir que la concentración mínima inhibitoria es de 3600 µg/100 µl, también en la prueba de BHI en placa me dio que la *Echinacea purpurea* planta es bacteriostático. Los resultados incrementan por lo que a concentraciones más altas podemos tener resultados de crecimiento más bajos.

Los resultados arrojados para la *Echinacea purpurea* planta enfrentada contra *Cándida albicans* son buenos ya que a la concentración más alta nos dio un porcentaje de inhibición muy bueno ya que este es de 82,8 % y a la siguiente concentración que es de 1900 µg/100 µl da un salto muy importante ya que me dio un resultado de porcentaje de inhibición del 32.6 % por este motivo la concentración mínima inhibitoria es de 3600 µg/100 µl por lo que se dé muestra que solo estuvo en el primer pozo. Para el pozo 6 en adelante rebaso el control positivo y dado a esto sugiero que a partir de la concentración de 118.75 µg/100 µl en adelante ayuda a *Cándida albicans* a crecer, esto se puede comprobar debido a que a la concentración de 14.84 µg/100 µl tiene un porcentaje del 118.08 % esto está referido con respecto al control positivo en cual tiene las características necesarias para que esta levadura crezca.

La *Echinacea purpurea* planta enfrentada ante *Proteus mirabilis* tiene un efecto bacteriostático debido a los resultados obtenidos en la prueba de BHI ya que en todos los pozos hubo crecimiento excepto el control negativo y el blanco de esta forma podemos considerar los resultados como buenos ya que los datos se encuentran entre los dos controles, el control negativo se encuentra por debajo y el control positivo se encuentra por arriba, a la concentración de 3600 µg/100 µl hay un porcentaje de inhibición del 68.4 % .

Los resultados obtenidos del enfrentamiento de *Echinacea purpurea* planta con *Escherichia coli* son buenos debido a que en las tres primeras diluciones dobles podemos observar una inhibición mayor al 50 % de esta forma se puede demostrar que la *Echinacea purpurea* planta es buena para *E. coli*, a partir de la cuarta dilución doble se encuentra por arriba del 50 % de crecimiento y los siguientes resultados van incrementando lo cual nos dice que a mayor concentración menor efecto inhibitorio, de esta manera puedo decir que la concentración mínima inhibitoria es de 950 µg/100 µl. La prueba de placa en BHI me dice que la *Echinacea purpurea* actúa como bacteriostática para esta bacteria de modo que la *Echinacea purpurea* actúa con una toxicidad sobre la bacteria. También al observar la gráfica podemos observar que hay una meseta la cual nos dice que a partir de la concentración de 118.75 µg/100 µl en adelante la *Echinacea purpurea* va a tener un porcentaje de inhibición constante y algo bueno que podemos observar es que la *Echinacea purpurea* planta a bajas concentraciones sigue inhibiendo por ejemplo en la ultimo dilución doble que es de 14.84 µg/100 µl tenemos un porcentaje de inhibición del 21.3 %.

Para *Gardnerella vaginalis* es la única bacteria la cual nos arrojó resultados de tipo bactericida el cual nos indica que la *Echinacea purpurea* planta mata en su totalidad a *Gardnerella vaginalis*, y por supuesto la concentración mínima inhibitoria es de 14.84 µg/100 µl ya que es la última concentración con la que se trabajó en este experimento, las absorbencias obtenidas se debe al color y a los cuerpos bacterianos ya que el elisometro se fundamenta en leer color y turbidez.

Como podemos observar en las graficas de comparación de los extractos la mejor sin duda es la *Echinacea purpurea* raíz ya que esta actúa de mejor manera a altas concentraciones y por lo mismo a concentraciones bajas por lo que es mejor frente a las siete cepas trabajadas.

## 10.- CONCLUSIONES

Se logro aislar e identificar las siete cepas provenientes de exudados cervicovaginales, proporcionadas por el Hospital “Juárez de México”, las cuales son *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*.

Se prepararon, purificaron y esterilizaron los extractos de *Echinacea purpurea* raíz y planta, mediante una base etanólica.

Se determino la concentración mínima inhibitoria de las bacterias frente a *Echinacea purpurea* raíz y planta por cada una de las cepas aisladas mediante la lectura del elisometro.

Se determino mediante pruebas que la *Echinacea purpurea* raíz inhibe de mejor manera que la *Echinacea purpurea* planta ya que esta a concentraciones más bajas esta sigue teniendo una actividad antibacterial y para cada una de las cepas su CMI fue diferente, más que para la *Gardnerella vaginalis* es la misma concentración ya que a la concentración de 14.06 µg/µl inhibió un 100 % según la prueba en placa es bactericida.

Se puede elaborar una forma farmacéutica realizándole pruebas especificas para la misma ya que la concentración más idónea para la *Echinacea purpurea* raíz es de 900 µg/100 µl de manera que a esta concentración actúa sobre todas las bacterias las cuales son *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Cándida albicans*, *Proteus mirabilis* y *Gardnerella vaginalis*.

Para realizar una forma farmacéutica de la *Echinacea purpurea* planta se necesita una concentración más alta de 1800 µg/100 µl, ya que esta tiene una actividad antibacterial menor, realizándole pruebas de toxicidad a un grupo de mujeres para saber si no hay reacciones a dicha concentración.

## 11.-APENDICE

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y TECNICAS UTILIZADAS.

#### GRAM:

1. Se hace un frotis de la bacteria en estudio y se deja secar al aire libre.
2. Se fijan las bacterias al portaobjeto, pasándolo a través de la flama del mechero.
3. Se cubre la superficie con solución Cristal violeta por un minuto y se lava con agua corriente.
4. Cubrir con solución de yodo durante un minuto y se lava.
5. Se cubre la superficie con alcohol-cetona (50:50) hasta que no desprenda más color violeta.
6. Se vuelve a lavar y se cubre con safranina durante un minuto, posteriormente se lava otra vez más.
7. Dejar secar y observar el frotis al microscopio (2).

#### CATALASA.

1. Colocar unas gotas de  $H_2O_2$  sobre un portaobjeto.
2. Tomar una azada de bacterias y mezclarlas con las gotas de  $H_2O_2$ .
3. Observar si hay producción de burbujas. Si las hay, la prueba es positiva (3).

#### OXIDASA.

##### Método indirecto sobre papel

1. Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri.
2. Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel.
3. Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.
4. La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

##### SSF 0.85 % estéril.

1. Preparar la cantidad necesaria, teniendo en cuenta que por cada 100 ml de solución se agregan 850 mg de NaCl.
2. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromida): Azul de tiazolil [5 mg/ml]

1. Pesar 250 mg de reactivo (MTT)
2. Llevar a un volumen de 50 ml de RPMI-1640 sin rojo de fenol
3. Filtrar la solución con membrana millipore de 0.22  $\mu\text{m}$
4. Conservar para su uso en frasco ámbar a temperatura de 4 °C

## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

### AGAR BHI.

(Bioxon de México, S.A. de C.V.)

1. Disolver 37 gr de material deshidratado en 1 l. de agua destilada.
2. Clarificar con mechero hasta el hervor.
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión de vapor durante 15 min.
4. Distribuir en cajas Petri o tubos estériles.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente y refrigerar.

### CALDO BHI.

(Bioxon de México, S.A. de C.V.)

1. Disolver 37 gr de material deshidratado en 1 l. de agua destilada.
2. Clarificar con mechero hasta el hervor.
3. Distribuir en tubos.
4. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión de vapor durante 15 min.

NOTA: Para obtener el caldo BHI a doble concentración sólo se necesita agregar el doble de material deshidratado en el mismo volumen de agua.

### AGAR SANGRE.

Medio para propósitos generales, para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos.

Con la adición de sangre, el medio es útil tanto para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis.

También, este medio de cultivo, puede utilizarse como media base para preparar el medio agar chocolate.

#### Fundamento.

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

El agregado de sangre al medio de cultivo, en concentración final de 5-10 %, aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano, y permite detectar hemólisis.

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de músculo de corazón	375.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH final: $7.3 \pm 0.2$	

#### Instrucciones

Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto. Esterilizar 20 minutos a 121°C. Enfriar a 45-50°C agregar sangre desfibrinada al 5%. Homogeneizar y distribuir en placas.

Preparación de la placa de Agar Sangre: añadir en forma aséptica un 5% de sangre estéril desfibrinada a temperatura ambiente, el agar debe estar a 45°C.

#### Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

#### AGAR CASSMAN.

(Marcas)

1. Disolver 34 g de material deshidratado en 1 l. de agua destilada.
2. Clarificar con un mechero hasta el hervor.
3. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión de vapor durante 15 min.
4. Enfriar a una temperatura de 37°C.
5. Verter en cajas Petri estériles.
6. Dejar enfriar a temperatura ambiente y refrigerar.



## AGAR SALES MANITOL.

(M.C.D. LAB. S.A. DE C.V.)

El Agar Sal y Manitol es utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de muestras clínicas y diversos materiales <sup>(33)</sup>.

El Agar Sal y Manitol fue formulado por Chapman para obtener el aislamiento de estafilococos, inhibiendo el crecimiento de otras bacterias al utilizar una alta concentración de sal. Al adicionar cloruro de sodio al 7.5 % al Agar Rojo de Fenol y Manitol, observó un abundante crecimiento de cepas patógenas de estafilococos (coagulasa positivo) que formaban colonias y halos amarillos a diferencia de las cepas no patógenas que dan colonias pequeñas de color rojo y sin cambio en el color del medio.

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.

Digerido Péptico de Tejido Animal 5.0 Cloruro de Sodio 75.0

Digerido Pancreático de Caseína 5.0 D-Manitol 10.0

Extracto de Carne 1.0 Rojo de Fenol 0.025

Agar Bacteriológico 15.0 pH  $7.4 \pm 0.2$

Método:

Suspender 111 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Procedimiento:

1. Inocular las placas por el método de estría.
2. Incubar las placas a  $35 \pm 2^\circ$  C durante 24 a 48 horas y observar el desarrollo <sup>(34)</sup>.

## AGAR MAC CONKEY.

(M.C.D. LAB. S.A. DE C.V.)

El Agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial recomendado para el cultivo y aislamiento de microorganismos Gram negativos a partir de muestras clínicas, de alimentos, agua, productos lácteos y productos farmacéuticos. En este medio se aíslan y diferencian bacilos entéricos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de la lactosa.

El Agar MacConkey en su fórmula original fue utilizado para diferenciar cepas de *Salmonella typhosa* de otros miembros del grupo coliforme. La fórmula fue modificada para mejorar el crecimiento de cepas de *Salmonella* y *Shigella* y con ello también se

mejoraron las reacciones diferenciales entre los microorganismos patógenos entéricos y el grupo coliforme <sup>(35)</sup>.

El Agar MacConkey 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. Las colonias que no fermentan la lactosa (como las de *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. dysenteriae*) permanecen incoloras.

Digerido Pancreático de Gelatina 17.0 Sales Biliares 1.5  
Digerido Péptico de Tejido Animal 1.5 Cloruro de Sodio 5.0  
Digerido Pancreático de Caseína 1.5 Cristal Violeta 0.001  
Lactosa 10.0 Agar Bacteriológico 13.5  
Rojo Neutro 0.03 pH 7.1 ± 0.2

Método:

Suspender 50 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Procedimiento:

Inocular las placas por estría o con hisopo, asegurándose de que con cualquiera de los dos métodos se tengan colonias aisladas. Incubar las placas a 35 ± 0.2°C durante 18 a 24 h. Si no hay desarrollo a las 24 h, reincubar las placas por 24 horas más.

Los microorganismos lactosa positiva dan colonias de color rosa con o sin zona de precipitado alrededor.

Los microorganismos lactosa negativos dan colonias incoloras o de color muy claro <sup>(35)</sup>.

#### F) PREPARACIÓN DE MATERIAL DE CRISTALERIA Y PLASTICO ESTERIL.

- 1) Lavar con jabón y enjuagar con agua corriente.
- 2) Enjuagar por segunda vez con agua destilada.
- 3) Dejar escurrir y envolverlos en papel periódico o papel aluminio.
- 4) Solamente de ser necesario cubrir las puntas o boquillas.
- 5) Meter a la autoclave por 15 min/15 lib/121°C.
- 6) Dejar enfriar y en ese momento se pueden ocupar.

## 12.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Mullins RJ. Echinacea-associated anaphylaxis. *Med J Aust* 1998; 168:170-1.
- 2) Mullins RJ. Allergic reactions to Echinacea. *J Allergy Clin Immunology* 2000; 104:S340-341 (Abstract 1003).
- 3) Brinkeborn RM, Shah DV, Defending FH. Echinacea force and other Echinacea fresh plant preparations in the treatment of the common cold. A randomized, placebo controlled double-blind clinical trial. *Phytomedicine* 1999; 6:1-6.
- 4) Mengs U, Clare CB, Poiley JA. Toxicity of Echinacea purpurea. Acute, subacute and genotoxicity studies. *Arzneimittel for schung* 1991; 41:1076-81.
- 5) Awang DVC, Kindack DG. Echinacea. *Can Pharma J* 1991; 124:512-6.
- 6) "Escherichia coli O157:H7". CDC Division of Bacterial and Mycoticys Diseases. Retrieved 2011-04-19.
- 7) Vogt RL, Dippold L (2005). "Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002". *Public Health Rep.* 120 (2): 174–8.
- 8) Bentley R, Meganathan R (1 September 1982). "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria". *Microbiology. Rev.* 46 (3): 241–80.
- 9) Hudault S, Guignot J, Servin AL (July 2001). "Escherichia coli strains colonizing the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection". *Gut* 49 (1): 47–55.
- 10) Rahn, K.; S.A. Renwick, R.P. Johnson, J.B. Wilson, R.C. Clarke, D. Alves, S.A. McEwen, H. Lior, J. Spika (April 1998). "Follow-up study of vero cytotoxicigenic Escherichia coli infection in dairy farm families". *Journal of Infectious Disease* 177 (4): 1139–1140. Doi: 10.1086/517394. PMID 9535003.
- 11) Trevena, W.B.; G.A Willshaw, T. Cheasty, G. Domingue, C. Wray (December 1999). "Transmission of Vero cytotoxic producing Escherichia coli O157 infection from farm animals to humans in Cornwall and west Devon". *Community Disease and Public Health* 2 (4): 263–268.
- 12) Manual of Clinical Microbiology. Murray, P. 1995 6th edition.
- 13) Principles and Practice of Infectious Diseases. Mendel, Douglas, Bennett. 1995. 4th edition.
- 14) Dings M, Orwin P, Schlievert P. 2000. Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clínica microbiology Reviews*, vol 13; 16-34

- 15) Weinstein M, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997; 9:582-602.
- 16) Von Eiffel C, Proctor RA, Peters G. Coagulase-negative staphylococci: pathogens have major role in nosocomial infections. *Postgrad Med* 2001; 110: 63-76.
- 17) Archer G. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. Churchill Livingstone 2000, 2092.
- 18) Del Álamo L, Cerda RF, Tosan I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn Microbiology and Infect Dis* 1999; 34:185-91.
- 19) Garrett DO, Jochimsen E, Murfitt K, Hill B, McAllister S, Nelson P, Spera RV, Sall RK, Tenover FC, Johnston J, Zimmer B, Jarvis WR. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Control Hosp Epidemiology* 1999; 20:167-70.
- 20) Marini EC, Barell C, Martínez R, Costa AL. Identification and medical importance of coagulase-negative staphylococci species. *Sao Paulo Med J* 1999; 117: 4.
- 21) Finkelstein R, Fusan R, Oren I, Kassis I, Hashman N. Clinical and epidemiologic significance of coagulase-negative staphylococci bacteremia in a tertiary care university Israeli hospital. *Is J Infecting Control* 2002; 30: 21-5?
- 22) Lord CF, Gephardt MC, Tom ford WW, Mankind HJ. Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment. *J Bone Joint Surge Am* 1988; 70(3):369-76
- 23) <http://www.tlahui.com/plante7.html>.
- 24) Michael Castleman, "Hierbas Curativas" Editorial Diana, Febrero 1998. 207-212.
- 25) Galería de imágenes Teotitlan del Valle, Oaxaca, [www.flickr.com](http://www.flickr.com)
- 26) Hernández F. *Gardnerella vaginalis mobiluncus* en la etiología de la vaginosis bacteriana. *Rev. Costarricense Ciencias Médicas* 1998; 19: 57-61.
- 27) Hansen EA. *Gardnerella*. *Rev. Ginecol* 2005; 25: 99.
- 28) Espinosa I, Lorenzo M, Betancourt A, Riverón Y, Romero M. Caracterización
- 29) Bioquímica y antigénica de diferentes aislamientos de *Gardnerella vaginalis*.
- 30) *Rev Cubana Invest Biomed* 2005; 24:22-7.

- 31) Taylor F. Vaginal flora morphotypic profiles and assessment of bacterial
- 32) Vaginosis in women at risk for HIV infection. *Infect Dis Obstet Gynecology*
- 33) 2004; 12: 121-6.
- 34) Adina JIB, Okwoli N, Agbai R, Unaeze N. Prevalence of *Gardnerella vaginalis*
- 35) In Pregnant Nigerian Women. *Afr J Reprod Health* 2001; 5: 50-5.
- 36) Espinosa I, Álvarez E, Amaral C. Obtención de un conjugado late inmunoglobulina para el diagnóstico de *Gardnerella vaginalis*. *Rev. Cubana*
- 37) *Med Trop* 2000; 52: 10-5.
- 38) Jarosik GP, Beth LC. Identification of a Human Lactoferrin-Binding Protein
- 39) In *Gardnerella vaginalis*. *Infect Immune* 2000; 68: 3443-7.
- 40) Belas, R. (1996b) *Proteus mirabilis* swarmer cell differentiation and urinary tract infection. In *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. Mobley, H., and Warren, J. (Eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 271–298.
- 41) Chapman, G.H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.* 50:201
- 42) Kloos, W.E., and T.L. Bannerman. 1995. 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C., Tenover, and R.H. Tenover (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- 43) Mac Conkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in feces. *J. Hyg.* 5:333-379