



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Escuela Nacional de Estudios
Profesionales Iztacala**

**Valoración de Medio de Transporte y/o
Selección para Microorganismos Anaerobios**

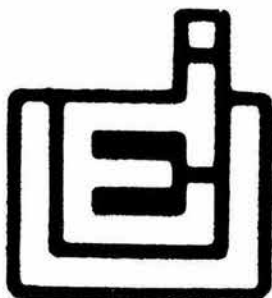
Tesis Profesional

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

Patricia González Carbajal



México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CON TODO MI AMOR

Y AGRADECIMIENTO.....

.... A TI POR HABERME PERMITIDO LA VIDA
PARA LLEGAR AL CUMPLIMIENTO DE UNA
DE MIS METAS.

.... A MIS QUERIDOS PADRES POR EL INMENSO
CARIÑO Y APOYO CON QUE HAN LLENADO TODOS
LOS MOMENTOS DE MI VIDA. ESPECIALMENTE
A TI MAMA.

.... A MI HERMANO MIGUEL ANGEL POR HABER
SIDO SIEMPRE UN EJEMPLO PARA MI
EN TODAS LAS COSAS.

CON MUCHO CARIÑO Y AGRADECIMIENTO
A LA DRA. RUTH PARRA MALDONADO,
DIRECTORA DEL PRESENTE TRABAJO
POR TODO EL APOYO Y DEDICADO ASE-
SORAMIENTO QUE SIEMPRE ME HA
BRINDADO.

A LA ENEP IZTACALA POR HABERME DADO LA
OPORTUNIDAD DE APRENDER Y DE FORMARME.

A LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
(DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA MÉDICA) POR
EL APOYO MATERIAL Y LA GUÍA QUE ME BRINDARON

AL HOSPITAL GENERAL DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL
POR HABERME PERMITIDO LA REALIZACIÓN DEL
PRESENTE TRABAJO.

I N D I C E

RESUMEN -----	I
INTRODUCCION -----	4
ANTECEDENTES HISTORICOS-----	4
GENERALIDADES -----	8
JUSTIFICACION -----	32
OBJETIVO -----	33
MATERIAL Y METODO -----	34
RESULTADOS -----	51
ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION-----	86
CONCLUSION -----	119
APENDICE -----	121
REFERENCIAS -----	125

R E S U M E N

Hasta hace relativamente pocos años (finales de los -- 60') la importancia de los anaerobios en las infecciones humanas era prácticamente desconocida a excepción de las ocasio--nadas por el típico Clostridium, debido en parte al fracaso - en los aislamientos por falta de un manejo y técnica apropiadas.

En la actualidad, gracias a los avances en cuanto a -- técnicas de colección, transporte, aislamiento, identifica---ción y quimioterapia se ha reconocido que las infecciones producidas por estos microorganismos pueden ser más frecuentes - que las producidas por aerobios o facultativos. Un campo en - el que ha ocurrido esto es el de las infecciones intraabdominales donde frecuentemente se reportan anaerobios como el agente etiológico de dichas infecciones.

Sin embargo, el éxito en el aislamiento de los anaerobios todavía se ve restringido por el problema del sobrecrecimiento de las especies facultativas ya que generalmente estas infecciones son polimicrobianas.

Dado que no existe un medio de transporte que sea es--pecífico para anaerobios que a la vez sea de fácil prepara---ción y bajo costo, se propuso valorar el medio Tioglicolato -

con carne picada (enriquecido con HM) y adicionado de antibióticos (uno con kanamicina y uno con kanamicina y neomicina), - como medio de transporte y/o selección para B. fragilis, ---- B. melaninogenicus y Peptostreptococcus sp, que son los anaerobios más frecuentemente aislados en estos casos. Los facultativos que generalmente los acompañan son E. coli, K. pneumoniae y Enterobacter sp.

Se realizaron pruebas de inhibición de los facultativos y conservación de los anaerobios, de las cepas individualmente y de mezclas entre los mismos. De las cepas de facultativos estudiadas el 82.3% presentaron una inhibición del ---- 99.2% al 100% a las 2 hrs. de prueba en el medio de transporte con kanamicina y neomicina. En el medio con kanamicina todas las cepas fueron resistentes.

La conservación de los anaerobios se ve ligeramente -- afectada por el uso de los antibióticos en el medio, para -- B. fragilis fue del 91% en promedio durante las 8 hrs. del estudio, para B. melaninogenicus (la especie más sensible) fue del 55% durante las primeras 2 hrs y posteriormente aumentó - al 60% en promedio, para Peptostreptococcus sp fue en más del 61.5% durante las 8 hrs. en el medio con kanamicina y neomicina.

Cuando se analizaron las mezclas B. fragilis y Peptos-

treptococcus sp volvieron a ser las especies que se conservaron mejor durante todo el estudio pero en especial en las primeras 2 hrs, en este tiempo la población de B. fragilis se mantuvo en un 71.1% y la de Peptostreptococcus sp en un 92.1% B. melaninogenicus volvió a mostrar sensibilidad a los antibióticos, en general se conserva durante las 8 hrs. pero su población es muy baja de las 4 a las 8 hrs. del estudio en el medio con kanamicina y neomicina. La inhibición de las especies facultativas es del 100% de las 0 a las 4 hrs. en promedio, en el mismo medio de transporte (con kanamicina y neomicina).

En general ambos medios de transporte logran una buena conservación de los anaerobios aunque se presentó cierta inhibición, pero el medio con kanamicina y neomicina mostró una mayor capacidad inhibitoria sobre los facultativos, por lo tanto, el medio tioglicolato con carne picada (enriquecido con HM) y adicionado de kanamicina y neomicina podría utilizarse para el transporte y selección de B. fragilis, B. melaninogenicus y Peptostreptococcus sp durante las 8 hrs pero especialmente en las primeras 2 hrs posteriores a su inoculación con las muestras clínicas.

I N T R O D U C C I O N

ANTECEDENTES HISTORICOS

Hace millones de años, durante el inicio de la evolución de la tierra ésta se caracterizó por poseer una atmósfera de tipo reductor. El oxígeno libre atmosférico no existía ya que se encontraba contenido en el agua, dióxido de carbono, carbonatos y sulfatos. En esta atmósfera primitiva también -- estaban presentes pequeñas cantidades de ácido clorhídrico, -- sulfuro de hidrógeno, metano, amoníaco y nitrógeno, y la capa de ozono no existía, por lo que se supone que las primeras -- formas de vida tuvieron un metabolismo anaeróbico.^{14,25}

Las características metabólicas básicas que desarrollaron como la captación de energía por transferencia de electrones y su almacenamiento en los enlaces fosfato han quedado -- firmemente impresas en el citoplasma de toda célula viviente, sin embargo sólo una modificación ha sido trascendental en la historia de la evolución biológica, el uso del oxígeno (cuando la atmósfera reductora se transformó en oxidante) como --- aceptor final de electrones en la cadena oxidativa, lo que -- permitió el paso del metabolismo anaeróbico al aeróbico.^{25,31}

El advenimiento de la vida aeróbica no significó el final del mundo anaeróbico ya que estos continuaron su florecimiento y en la actualidad están bien representados en la naturaleza y como flora saprófita en el organismo humano.^{14.}

En la antigüedad, no obstante el poco conocimiento que se tenía en cuanto a la existencia de estos microorganismos ya encontramos antecedentes sobre algunas infecciones causadas por éstos. Hipócrates (año 460 a. de C.) fue el primero en notar la alta mortalidad debida al tétanos. Xenophón (siglo IV. a. - de C.) describió la gingivitis necrotizante ulcerativa en un grupo de soldados griegos que presentaban úlceras en la boca y mal aliento. Leeuwenhoek (1680) comunicó a Thomas Gale su observación de que podían existir "animalículos" en ausencia de aire. Sin embargo Louis Pasteur es generalmente conocido por haber descubierto el fenómeno anaeróbico cuando notó que la fermentación butírica ocurría en ausencia de oxígeno y era provocada por el bacilo Vibrion butyricum, estos bacilos formadores de esporas son ahora llamados Clostridium butyricum y es la especie tipo del género¹³.

Miller (1883) describió fusobacterias en frotis de pacientes con estomatitis ulcerativa. Carle y Rattone (1881) mostraron que el material de la herida de un paciente que murió de tétanos producía una enfermedad semejante cuando se inoculaba en conejos¹³.

Levy (1891) describió abscesos conteniendo gas y pus fétido en una paciente con infección posparto, obtuvo el crecimiento de fusobacterias en cultivo puro y lo mantuvo en medio de cultivo artificial por bastante tiempo¹³.

Kitasato (1892) fue el primero en obtener a Clostridium tetani en cultivo puro. Welch y Mutall describieron a ---- Clostridium perfringens en el mismo año¹³.

Veillon (1892) demostró que el olor fétido del pus de --- tres pacientes era debido a un micrococo anaerobio. La mejor evidencia del papel de los anaerobios no formadores de esporas fue proporcionada por él mismo en Francia (1893) cuando reportó el aislamiento en cultivo puro de un micrococo anaerobio a partir de una bartolinitis¹³.

Veillon y Zuber (1897) describieron el aislamiento de bacterias anaerobias de veinticinco pacientes con superación gangrenosa o fétida, especialmente artritis purulenta, apendicitis, abscesos cerebrales, gangrena pulmonar, bartolinitis, y supuración pélvica. Más tarde (1898) describieron que de -- veintidos casos de apendicitis, en veintiun casos se aislaron bacterias generalmente acompañadas de microorganismos facultativos.

Hacia finales del siglo XIX, Van Ermengen aisló a ---- Clostridium botulinum y demostró su relación con el botulismo. Los descubrimientos de este siglo contribuyeron a dejar claramente establecida la etiología de las infecciones exógenas causadas por Clostridium tales como la gangrena gaseosa, tétanos y botulismo^{4,13,31}.

Durante los años siguientes (primera mitad del siglo - XX) la presencia de los anaerobios en los laboratorios clínicos fué prácticamente ignorada debido en parte a la relativa dificultad que se presentaba (a veces hoy todavía) para obtener cultivos puros de los mismos. Sin embargo, con el desarrollo de las nuevas técnicas de colección, aislamiento, taxonomía e identificación y la introducción de agentes antimicrobianos tales como la clindamicina, también se ha despertado un creciente interés por el estudio de estos microorganismos y por conocer el papel que juegan en el establecimiento de algunas infecciones ^{3,4,32,35}.

Esto ha llevado a muchos investigadores a reconocer -- que las bacterias anaerobias no esporuladas son el agente etiológico de una gran variedad de infecciones endógenas y que en ocasiones éstas son más frecuentes que las producidas por aerobios o facultativos, por lo cual se ha incrementado su búsqueda en el material clínico así como también se está ampliando la investigación en cuanto a encontrar procedimientos más finos para el manejo y estudio de éstos microorganismos ^{4,7,32,35}.

GENERALIDADES.

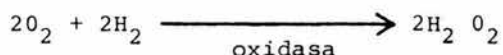
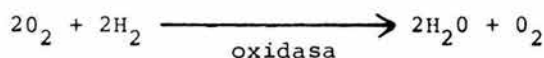
Una definición ampliamente aceptada de bacteria anaerobia la considera como aquella que requiere una tensión baja de oxígeno para su crecimiento y que no crece en un medio de cultivo sólido expuesto a una atmósfera de 10% de CO₂ en el aire (18% de oxígeno). Esta definición no toma en cuenta potenciales de oxidorreducción ni susceptibilidad a los peróxidos^{15,28}.

Los anaerobios son un grupo de bacterias heterogéneo y divergente tanto en su sensibilidad al oxígeno y a los peróxidos como en su necesidad de condiciones anaerobias ya que algunas especies crecen en presencia de una pequeña concentración de oxígeno como en el caso de Clostridium perfringens, en cambio otros representantes de este género son más delicados y exigen la ausencia total de oxígeno para su desarrollo^{28,32}.

El hecho de que las bacterias anaerobias desarrollen en presencia del oxígeno molecular derivado del agua y de los nutrientes del medio, no implica que lo incorporen como tal a las sustancias citoplámicas, ya que solamente actúa como aceptor final en la cadena oxidativa²⁵.

Durante la oxidación metabólica los nutrientes actúan

como donadores de electrones y protones los cuales son transportados directamente por las enzimas oxidasas y deshidrogenasas al oxígeno molecular y, dependiendo de las características de la oxidasa, darán lugar a la formación de agua o peróxido de hidrógeno^{8,32}.



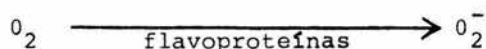
En un ambiente aeróbico (con alta concentración de oxígeno) se forma peróxido de hidrógeno, y las bacterias anaerobias que son en su mayoría sensibles al peróxido, no crecen debido a que carecen de la enzima catalasa que rompe este compuesto en agua y oxígeno:



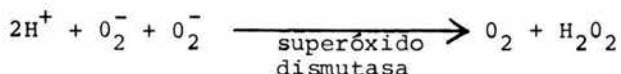
y por lo tanto el peróxido se acumula en niveles tóxicos para el desarrollo. Sin embargo no es el único factor que impide el crecimiento bacteriano por lo siguiente: no todos los anaerobios producen peróxido en cantidades detectables cuando se exponen al aire, otros anaerobios sí producen catalasa y sin embargo no crecen en condiciones anaerobias, finalmente la adición de catalasa pura al medio de cultivo no permite --

el crecimiento de los anaerobios en presencia de aire⁸.

Otro compuesto que se considera muy tóxico es el radical O_2^- (superóxido) que se produce por las flavoproteínas mediante la reducción monovalente del oxígeno molecular^{8,32} ;

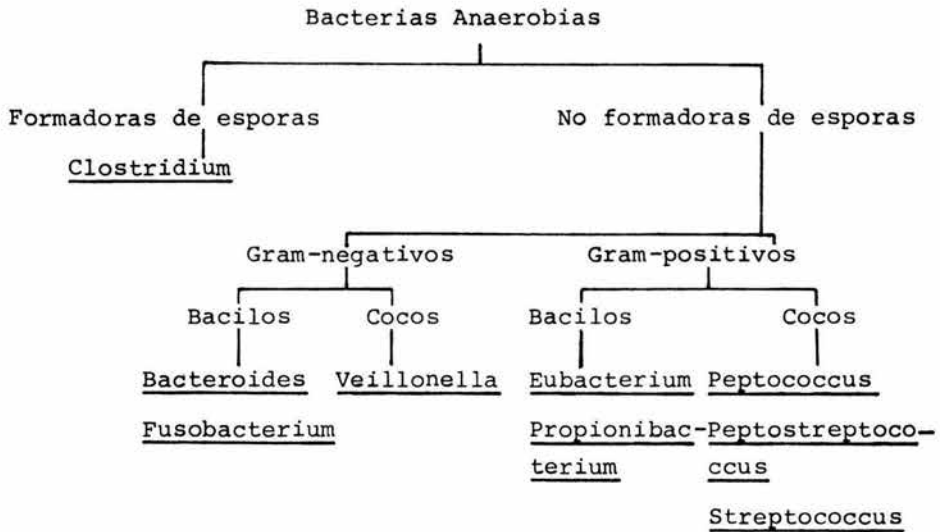


Los anaerobios producen superóxido dismutasa que reduce el radical superóxido a peróxido de hidrógeno:



y también catalasa la cual rompe este peróxido. Los anaerobios aerotolerantes no producen catalasa pero sí superóxido dismutasa a un nivel del 30% con respecto a los aerobios y son capaces de sobrevivir debido a que producen peróxido a un nivel muy bajo. Los anaerobios obligados y estrictos no producen ninguna de las dos enzimas y la acumulación de superóxido es probablemente más letal para el desarrollo que la acumulación del peróxido de hidrógeno⁸.

Entre las bacterias anaerobias hay algunas de importancia médica, entre estas se encuentran representantes de los siguientes géneros^{12,28}:



Tomada de Dowell¹², V.R. & Gilda, J. 1976. pag 3

Los anaerobios son de distribución cosmopolita, su hábitat incluye suelo, agua y como flora saprófita en la cavidad oral, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio superior y piel del hombre y animales inferiores, en este caso se encuentran conviviendo simbióticamente o beneficiando al huésped en diversas formas^{11,12,22}.

Esta flora es muy importante en la fisiología del organismo humano debido a que ayuda a mantener en equilibrio las condiciones normales del mismo. Podemos mencionar a Bacteroides fragilis asociado a Escherichia coli (en proporción 1000:1) como responsables de la biosíntesis de vitamina K en el --

intestino. También aquí son responsables de la desconjugación y deshidroxilación de los ácidos biliares, absorción de grasas, formación de bilis y regulación del metabolismo del colesterol. Además ejercen una acción antagónica que impide la colonización de estas zonas por bacterias potencialmente patógenas, ya sea por competición de nutrientes o por producción de sustancias inhibitoras^{11,14}.

Desafortunadamente algunas de estas bacterias también son capaces de producir infecciones importantes, entre ellas se encuentran^{12,15,19}:

Origen endógeno de algunos anaerobios comunes

	cavidad oral	colon	orificios genitourinarios	piel
<u>Bacteroides fragilis</u>	-	+	-	-
<u>Fusobacterium nucleatum</u>	+	-	-	-
<u>Fusobacterium necrophorum</u>	+	+	-	-
<u>Propionibacterium acnes</u>	+	+	-	+
<u>Peptostreptococcus anaerobius</u>	+	+	+	-
<u>Clostridium perfringens</u>	-	+	-	-
<u>Actinomyces israelii</u>	+	-	-	-

Tomada de Dowell¹², V.R. & Gilda, J. 1976. pag 4

Las infecciones que causan estos microorganismos son-- de tipo endógeno, es decir, se desarrollan a partir de la flora saprófita presente en el organismo. En algunas regiones la flora anaerobia sobrepasa en gran número a la flora aerobia, - por lo que representan una fuente potencial de infección cuando las condiciones fisiológicas normales del huésped se vean alteradas^{12,13,32}.

La patogénesis de estas infecciones incluye la ruptura de una barrera anatómica (ya sea por traumatismo, cirugía o - algún proceso degenerativo) y, por lo tanto, la entrada de microorganismos colonizadores de la flora normal hacia tejidos- o espacios corporales previamente estériles conduciendo fre-- cuentemente a la formación de abscesos (concentración localizada de polimorfonucleares)^{13,31,32,35}.

Estos cuadros son muy variables, van desde procesos -- localizados benignos hasta otros muy severos que se complican con septicemia y piemia. En el siguiente cuadro se muestra -- los tipos de infecciones más frecuentemente encontrados en clínica y la incidencia de bacterias anaerobias que reportan^{4,24}.

Tipo de Infección	% de Incidencia
Infecciones intraabdominales y sepsis pélvica	60 - 100
Abscesos cerebrales	60 - 89
Infecciones pleuropulmonares.	30 - 90
Infecciones dentales y sinusitis crónica	50
Bacteremia	10 - 20
Infecciones de tracto urinario	1

tomada de Koneman²⁴, E.V. y col. 1979. pag. 276

La alta incidencia de los anaerobios en las infecciones intraabdominales y sepsis pélvica no es sorprendente si consideramos que en la flora saprófita del intestino se encuentran una concentración de 10^{11} bacterias anaerobias/gr de contenido fecal en contraste con 10^8 aerobios, es decir más del 90% de las aproximadamente 400 especies que habitan el intestino son anaerobios^{14,15,31,35}.

Aquí se incluyen infecciones en hígado, vesícula biliar, páncreas, estómago, duodeno, diverticulitis, infecciones perineal y perirectales, abscesos intraperitoneal, retroperitoneal y subfrénicos^{13,14}.

En estos casos generalmente se aíslan mezclas de microorganismos (cultivos polimicrobianos) ya sea de anaerobios --

entre sí o con la participación de especies facultativas como coliformes, estreptococos y estafilococos. Bennet y col²⁶ sugieren un mecanismo sinérgico en el cual las características de crecimiento de las diferentes especies se combinan entre sí para dar la patogenicidad. Se han reconocido dos de estos mecanismos; la producción de un bajo potencial de oxidoreducción por los facultativos y, la provisión de un factor esencial de crecimiento^{5,8,14,21}.

Los anaerobios más frecuentemente recuperados de estas muestras son Bacteroides fragilis, B. melaninogenicus, Fusobacterium necrophorum, Peptostreptococcus anaerobius y otros miembros de este género, Peptococcus sp, Eubacterium lentum y Clostridium perfringens. De los facultativos más frecuentes en los aislamientos se reporta a Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter sp^{12,13,24,26}.

De los anaerobios aislados los miembros del género Bacteroides ocupan el primer lugar, siendo B. fragilis la especie de mayor incidencia. Este microorganismo se aísla actualmente del 75% o más de las infecciones intraabdominales. B. melaninogenicus es la segunda especie en importancia y las fusobacterias se aíslan con menor frecuencia. De Peptococcus y Peptostreptococcus el último género es el más frecuente^{4,7,24}.

B. fragilis a pesar de ser al anaerobio de mayor incidencia en las infecciones intraabdominales sólo representa -- el 0.5% de la flora anaerobia del colon, donde sustancialmente el peso mayor lo tienen B. distasonis, B. thetaiotamicron y B. vulgatus, esto probablemente se debe a la virulencia que le confieren los antígenos de superficie a B. fragilis.

B. fragilis es un bacilo Gram-negativo de extremos -- redondeados, coloración irregular, no esporulado e inmóvil. -- Crece a pH 7.0 y a 37°C, tolera concentraciones de oxígeno -- hasta del 3% y es catalasa negativo. Tiene necesidad obligada de vitamina B₁₂ (cianocobalamina) y su crecimiento se estimula con hemina (clorhidrato de hemo) a una concentración de -- 5 µg/ml y bilis, requiere un carbohidrato fermentable para -- su buen desarrollo. Crece en agar sangre y en medios enriquecidos con peptona y extracto de levadura. Es resistente a la penicilina, cefalosporinas y aminoglucósidos (kanamicina, neomicina y gentamicina)^{9,24,28}.

B. melaninogenicus es una especie más exigente, requiere hemina y vitamina K (menadiona), ésta a una concentración de 0.5 µg/ml para su desarrollo. La especie produce un pigmento negro característico de las colonias sobre placas de agar-sangre especialmente si la sangre está hemolizada. La mayor parte de las cepas son sensibles a la penicilina^{4,9,15,24}.

Los Peptostreptococos son bacterias Gram-positivas, --- esféricas que se presentan en pares y cadenas, son inmóviles y no esporuladas⁹. Son catalasa negativas, fermentan los azucares produciendo ácido y gas, y crecen generalmente entre -- 25 y 38°C²⁸.

Los facultativos Escherichia coli, Klebsiella penumoniae y Enterobacter sp pertenecen a la familia Enterobacteriaceae que incluye bacterias de la flora normal así como especies patógenas. La familia se caracteriza por estar formada -- de bacilos Gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, móviles e inmóviles que crecen bien en medios comunes de laboratorio, fermentan la glucosa con formación -- de ácido y gas y son oxidasa negativos²⁸.

El crecimiento de las especies facultativas juega un -- papel predisponente en el desarrollo de la infección debido -- a que son capaces de metabolizar el oxígeno presente en el -- microambiente y de esta manera disminuir el potencial redox. Este factor es muy importante ya que se ha observado que cuando su valor es lo suficientemente electronegativo el crecimiento de los anaerobios es óptimo (e incluso puede tolerarse cierta concentración de oxígeno)^{13,32}.

Cualquier factor que altere la circulación sanguínea -- (padecimiento vascular, necrosis tisular, edema, etc) tam--

bién afecta el potencial redox (Eh). El valor de este potencial en determinado sitio del organismo está en parte relacionado con el Eh de la sangre, y éste es dependiente de la saturación de oxígeno en la hemoglobina y el disuelto en el suero. El Eh de los tejidos normales varía entre +126 y +246 mv dependiendo del suministro de sangre. La mayoría de los anaerobios obligados requieren un Eh de -100 a -250 mv, y los estrictos hasta de -400 mv para crecer, es decir, en condiciones normales el crecimiento de estos microorganismos es inhibido por un alto potencial redox^{8,13,17,32}.

Sin embargo cuando se ha establecido un proceso infeccioso el potencial redox de los tejidos afectados y abscesos puede descender a niveles tan bajos como -250mv y permitir así, la multiplicación de los patógenos anaerobios^{8,35}.

En la siguiente tabla se encuentran algunos de los valores del potencial redox que más comúnmente se manejan en bacteriología de anaerobios.

Escala de valores de Eh significativos (mv)

Potencial del electrodo de oxígeno	+810
<u>Cl. perfringens</u> (UGL)	+250
Sangre venenosa humana	+180
<u>B. vulgatus</u> (UGL)	+140
Medio aeróbico	+30
Azul de metileno (forma leuco)pH 7.0	+11
	0.0
Resazurina (forma leuco) pH 7.0	-42
Rango de los medios PRAS	-150 a -170
Valor promedio en abscesos.	-250
Tracto intestinal	-300
<u>Cl. tetani</u> , <u>Cl. botulinum</u> (cultivo puro)	-410
Potencial del electrodo de hidrógeno	-420.7
UGL. Límite superior de crecimiento	
Tomada de Committee on Continuing Education ⁸CDC. 1980	

Se ha observado que la mortalidad debida a estas infecciones es alta, por consiguiente es importante identificar -- tempranamente los signos clínicos que sugieren una infección -- por anaerobios como son; descargas con olor fétido, tejido -- necrótico o gangrenoso, presencia de gas, coloración oscura de los exudados conteniendo sangre, tromboflebitis séptica, - infecciones relacionadas con el uso de aminoglucósidos, absorción séptica o posterior a cirugía gastrointestinal¹³.

Para el clínico estos signos son: ausencia de desarrollo en los medios de cultivo rutinarios, morfotipo característico en la tinsión de Gram, crecimiento en el fondo del tubo-

con medio líquido o en la profundidad del agar con olor fétido y gas, crecimiento anaeróbico en medios que contengan 75 - a 100 μ g/ml de kanamicina, neomicina o paromicina y coloración negra de los exudados en placas de gelosa sangre¹³.

El éxito en la recuperación de los anaerobios y el establecimiento de un diagnóstico preciso depende de factores esenciales como son la selección, la toma y el transporte de la muestra.^{14,15,20}

La selección del sitio para la toma debe ser representativa del proceso patológico. Dado que se pretende recuperar microorganismos anaerobios como posibles agentes etiológicos de una infección, y éstos son abundantes en la flora normal, es necesario hacer una previa asepsia meticulosa de la zona con jabón quirúrgico, alcohol etílico y tintura de yodo y tratando de evitar al máximo la contaminación de la muestra con las zonas adyacentes (piel o mucosas), de no ser así será prácticamente imposible diferenciar al patógeno del simbiote en una muestra contaminada. Las muestras que normal o transitoriamente contienen anaerobios como flora normal (esputo, orina, contenido gástrico o intestinal, etc) no son adecuadas para estos estudios^{8,13,15,24}.

En algunos casos lo ideal sería que el médico recibiera un entrenamiento previo por parte del clínico en lo que res--

pecta al sitio, así como la técnica de colección apropiada, - además de que el laboratorio debe contar con personal clínico con experiencia en el manejo de los anaerobios¹⁵.

La técnica preferida para la colección de muestras de estas infecciones es la aspiración con aguja y jeringa estériles debido a que protegen el material del contacto con el aire y también es menos probable la contaminación con las áreas contiguas. El aire contenido en la jeringa se expele totalmente, la aguja se inserta adecuadamente en el sitio de la infección y se realiza la aspiración. Si el sitio muestreado produce poco material se puede usar una jeringa que contenga medio prereducido estéril para evitar que el poco material se quede dentro de la pared de la jeringa.^{12,13,15,24}.

Con esta técnica se puede obtener material de heridas superficiales, drenaje de heridas profundas, fluidos de cavidades y abscesos. La biopsia de tejidos en cavidades o heridas también representa un excelente material por su capacidad para preservar la viabilidad de los microorganismos. El uso - del hisopo no es recomendable para la toma de muestras^{8,13,15}.

El período más crítico de todo el proceso es el tiempo que transcurre desde que la muestra es tomada del paciente -- hasta que es inoculada en los medios de primoaislamiento en - el laboratorio ya que durante este tiempo los anaerobios se -

pueden ver expuestos a factores que afectan su viabilidad como son la exposición al oxígeno molecular, alto potencial redox, pH extremos, carencia de humedad y temperatura baja^{4,-8,13,15}.

Idealmente el procesamiento de la muestra debería ser de inmediato o en su defecto dentro de los primeros treinta minutos subsiguientes a la toma, en este caso el material puede ser transportado en la misma jeringa previa eliminación -- de todo el aire y sellando la aguja con un tapón de goma de butilo. Debido a que la estructura porosa del plástico permite el intercambio gradual de gases, la muestra no debe permanecer en ella por más tiempo^{13,15}.

En la práctica dentro de los hospitales generalmente se requiere un tiempo más prolongado para la conservación de la muestra por lo que es necesario utilizar un medio de transporte. Los medios de transporte están diseñados para proporcionar un rango de pH adecuado, un ambiente húmedo, cierta -- concentración de nutrientes para la conservación de los microorganismos y no poseen carbohidratos por lo que el contenido microbiológico original se mantiene en un estado de latencia -- hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio^{2,4,6}.

Además de estas características los medios de transporte para anaerobios deben proporcionar una atmósfera de CO₂ --

libre de oxígeno. Aún cuando dentro de los anaerobios patógenos se encuentran especies que toleran cierta concentración de oxígeno (como B. fragilis) existen otras muy sensibles a este factor, por lo que es necesario que la atmósfera del medio de transporte sea lo suficientemente reductora para conservar la viabilidad de la mayoría de los anaerobios que puedan estar presentes en la muestra^{8,15,32}.

El rango de pH del medio de transporte debe ser estable ya que los valores del potencial redox son pH-dependiente y un decremento en una unidad de pH cambia el Eh en +57.5mv por lo cual un sistema entre más ácido se torna tiende a transformarse en más oxidante. Los agentes reductores en el medio son activos donadores de electrones que funcionan por oxidación liberando sus cargas y transfiriéndolas a receptores que en ese caso son reducidos. La cisteína, el ácido clorhídrico y el tioglicolato de sodio son buenos agentes reductores^{8,13}.

Para confirmar el potencial redox presente en el medio de transporte es necesario utilizar indicadores sensibles al mismo. Estos son compuestos con estructura ciclica que cuando detectan electrones disponibles en el medio para la captura producen el fenómeno de resonancia entre sus átomos la cual es responsable del color, por lo tanto, en el estado reducido el medio es incoloro y cuando está oxidado exhibe color^{8,15}.

El azul de metileno es incoloro a un Eh de +11 mv y es azul en el estado oxidado. La resazurina es incolora a un Eh de -42 mv y es rosa cuando el medio está oxidado, esta capacidad para virar de color se ve afectada por la exposición prolongada a la luz por lo que hay que proteger el medio de transporte en la obscuridad^{15, 32}.

Estas son las principales características que deberfa-reunir un medio de transporte para anaerobios ya que se ha -- observado que las condiciones de transporte (generalmente más descuidadas) pueden ser más importantes que las condiciones - de cultivo, es decir, si la muestra ha sido adecuadamente pro- tejida de manera que la exposición al oxígeno haya sido míni- ma, las posibilidades de aislamiento son muy buenas¹³.

Sin embargo en la mayoría de los laboratorios se usan- medios de transporte que no son específicos para mantener la- viabilidad de los anaerobios como son el de Stuart, el Cary-- Blair y el Amies. Otros sistemas que también se utilizan para el transporte son el minjarro, tubos al vacío con solución -- salina e hisopos en tubos al vacío^{1, 2, 4}.

De éstos el medio modificado de Stuart es el más fre-- cuentemente utilizado, es un agar semisólido que originalmen- te fue diseñado para el transporte de muestras que incluyeran microorganismos aerobios y anaerobios. En un estudio realiza-

do en Australia para saber que medios utilizaban para el -- transporte de muestras con probables anaerobios, de 54 labo^u ratorios investigados, solamente 3 recibían sus muestras en sistemas específicos (Anaerobic Vacutainer, Port-a-Cul), 36 las recibían en el medio modificado de Stuart, 6 en tubo se^u co, 4 en jeringa y los restantes en otros medios menos apro^u piados. Sin embargo, se ha demostrado que este medio falla en la conservación de la viabilidad de la mayoría de los -- anaerobios^{1,4}.

Yrios y col³³ realizaron un estudio comparativo para evaluar la viabilidad de los aerobios y anaerobios en tres sistemas de transporte; tubo estéril, tubo con atmósfera de CO₂ y el medio modificado de Stuart, a cada uno se le intro^u dujo un hisopo previamente inoculado. Ellos encontraron -- que la viabilidad de los aerobios (P. aeruginosa) y facultativos (S. aureus) no se ve afectada en ninguna caso. De -- los anaerobios B. fragilis, B. melaninogenicus, F. necropho^u rum y P. anaerobius, solo el primero sobrevive en el tubo - con CO₂ por 24 hrs. El medio modificado de Stuart mantiene la viabilidad de todas las cepas por un máximo de 2 hrs.

Dado que la recuperación de los anaerobios es tan ba^u ja en estos sistemas, Hoffman y col²⁰ realizaron un estudio para determinar si la fracción de bacterias que se retienen en el hisopo o en el medio era de valor significativo en re

lación con la baja recuperación que se obtiene. Utilizaron un tubo seco aeróbico, el medio modificado de Stuart y un agar anaeróbico, ellos encontraron que la recuperación en general es baja, en el tubo aeróbico fue de 44%, en el medio de Stuart de 33% y en el agar anaeróbico fue de 23%, se concluyó que en el medio de Stuart la fricción entre el hisopo y el medio no contribuye significativamente a la recuperación baja de bacterias.

En otro estudio Helstad y col¹⁸ utilizaron un tubo al vacío, un hisopo en medio modificado Cary-Blair y un hisopo en un tubo al vacío, para evaluar su habilidad en la recuperación de los anaerobios. De 75 cepas probadas, a las 48 hrs. se recuperaron 73 (97%) en el tubo al vacío, 69 (93%) en el Cary Blair y 64 (85%) en el hisopo en tubo, sin embargo, el crecimiento de los facultativos, especialmente E. coli, dificultó el aislamiento de los anaerobios.

Este es un factor importante ya que el rápido crecimiento de las especies facultativas puede agotar la capacidad reductora del medio de transporte por lo cual se ha aconsejado que se mantenga a temperatura ambiente (no incubar) y procesar en el laboratorio lo más pronto posible^{4, 34}. La refrigeración ha sido propuesta para evitar el sobrecrecimiento de los facultativos sin embargo, también se menciona que tiene un efecto perjudicial sobre la supervi-

vencia de B. fragilis y Cl. perfringens principalmente⁸. En un estudio reciente Justesen y col²³ encontraron que la supervivencia de los anaerobios patógenos, entre ellos B. fragilis, B. melaninogenicus, P. anaerobius y Cl. ramosum en el medio modificado de Stuart mantenido a 4°C por 24 hrs. - no se ve afectada en comparación con la recuperación obtenida

Los tubos y frascos para el transporte de muestras - que están disponibles comercialmente contienen una atmósfera de CO₂ y N₂ libre de oxígeno, tienen como indicador de - anaerobiosis resazurina y un doble tapón; de goma de butilo y de rosca que impiden la entrada de aire al momento de la inoculación, sin embargo no brindan la suficiente humedad para mantener la viabilidad de los anaerobios. El uso del minijarro como medio de transporte es menos frecuente¹, 12,15.

Entre los sistemas de transporte específicos para - anaerobios se encuentran los Port-a-Cul que consisten en botellas herméticamente cerradas para muestras líquidas y tubos con tapón de rosca para hisopos. Estos contienen suficiente humedad, substancias reductoras y amortiguadores de pH, por lo que ofrecen un mejor ambiente para la conservación de las bacterias anaerobias que los sistemas anteriores^{1,2}.

Mena y col ²⁹ evaluaron este sistema y encontraron que brindaba mejor protección para las bacterias anaerobias, tanto para muestras de fluidos como para las tomadas con hisopo de algodón aun cuando fueran almacenadas en refrigeración por 24 hrs.

Si el transporte de la muestra ha sido adecuado el primoaislamiento de los anaerobios será exitoso . Para esto es necesario un medio no selectivo como el agar sangre (5% de sangre desfibrinada de borrego y conejo) recomendado por el CDC*. Este medio puede ser suplementado con extracto de levadura (5%), vitamina K₁ (10 µg/ml) y hemina (5 µg/ml) para favorecer el desarrollo de las especies exigentes tales como B. melaninogenicus ^{4.15,24.}

El medio selectivo es esencial para la recuperación de los anaerobios patógenos de mayor incidencia en las infecciones intraabdominales (miembros del grupo B. fragilis) Se ha recomendado el uso de un agar sangre hemolizada suplementado y contenido kanamicina o neomicina (100 µg/ml), vancomicina (75 µg/ml) o gentamicina (25 µg/ml) para inhibir el desarrollo de las especies facultativas más frecuentes en estas infecciones (E. coli, K. pneumoniae y Enterobacter sp) y a las cuales las bacterias anaerobias son resistentes ^{2,16,24,27.}

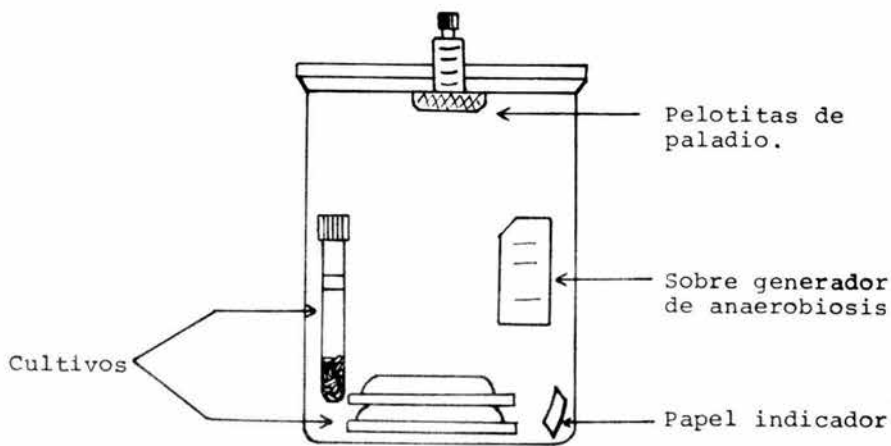
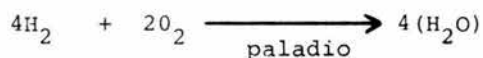
* CDC Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, Ga. USA.

Un medio líquido de enriquecimiento es indispensable para la recuperación de los anaerobios que pueden estar presentes en una baja concentración en la muestra, así como -- también sirve de referencia por si el sistema anaeróbico falla. Entre estos está el medio Tioglicolato fluido con resazurina y una pequeña concentración de agar (0.075%) los que crean una atmósfera reductora que debe ser adecuadamente mantenida con un sello en la superficie del medio (aceite mineral), lo cual permite el desarrollo de los anaerobios estrictos ^{15,24,30}.

El medio carne picada posee importantes factores nutricionales y sustancias reductoras derivadas del tejido -- muscular como el glutatión que le permiten mantener la viabilidad de los microorganismos presentes en las muestras -- clínicas así como de las cepas por largos períodos de tiempo, se ha mencionado que es particularmente útil para iniciar el crecimiento de inóculos pequeños. Debido a su actividad reductora el medio puede ser envasado en tubos sellados herméticamente de manera que queden libres de oxígeno -- y usarse muy bien como medio de transporte y cultivo para -- muchos de los anaerobios estrictos sin tener que recurrir -- a otros métodos anaeróbicos. Ambos medios de enriquecimiento, Tioglicolato y Carne picada deben ser suplementados con hemina (5 μ g/ml) y vitamina K₁ (0.1 μ g/ml) ^{2,6,24,30}.

El siguiente factor importante en el cultivo y aislamiento de los anaerobios es el empleo de una atmósfera anaeróbica adecuada para la incubación de los cultivos. Existen tres sistemas que han demostrado ser bastante eficientes en este aspecto y son: la cámara anaeróbica con guantes, la jarra anaeróbica y los medios PRAS^{8,21,24}.

La jarra anaeróbica es de los sistemas más utilizados, consiste en una jarra que lleva un sobre con ácido cítrico, bicarbonato de sodio y borhidruro de sodio al que se le añaden 10 ml de agua y genera CO₂ e H₂. En el interior de la tapa lleva una canastilla con peilotitas de aluminio cubiertas de paladio, que sirven como catalizador para la reacción que consume el O₂ del ambiente.



Jarra Anaeróbica.

Como indicador lleva una tira de papel impregnada en azul de metileno la que tarda aproximadamente 2 hrs. en tornarse incolora indicando que se ha establecido la anaerobiosis. El potencial redox más bajo (aproximadamente -300 mv) se alcanza después de 10 a 12 hrs.^{8,15,24}.

La introducción de los medios PRAS es uno de los mayores avances en la bacteriología de anaerobios y fueron adaptados para uso clínico por Moore y col en el Instituto P-olitécnico de Virginia. Son medios prereducidos anaeróbicamente esterilizados donde se ha creado una atmósfera reductora conteniendo CO₂ y N₂ libre de oxígeno, y los hay de dos tipos; uno donde la muestra es introducida con cánula y CO₂ y N₂ libre de oxígeno y otro que contiene un hisopo anaeróbicamente preparado. Su principal ventaja es que cada tubo constituye una cámara anaeróbica eficiente donde el Eh es menor de -150 mv.^{1,10,21}.

Los tubos PRAS y los Port-a-Cul son de los sistemas más adecuados que existen para el transporte de muestras que contienen anerobios, sin embargo, son sistemas muy sofisticados que tienen la desventaja de ser costosos y de requerir equipo y adiestramiento técnico especializado para su manejo por lo cual su uso es muy limitado y no es posible que se establezcan como procedimiento de rutina en los laboratorios.^{1,8,29}.

JUSTIFICACION

Finalmente, dada la alta incidencia que presentan - las bacterias anerobias en la mayoría de las infecciones - intraabdominales y la importancia crucial del empleo de -- una buena técnica de colección y transporte para su recupe ración, es necesario que se amplie la investigación en cuan to al manejo de nuevos medios de transporte que aseguren - la conservación de los microorganismos anaerobios más fre- cuentes en este tipo de infecciones y de ser posible inhi- ban el desarrollo de las especies facultativas que general mente los acompañan.

OBJETIVO

"Valorar un medio que contuviera Caldo tioglicolico enriquecido (con hemina y menadiona), Carne picada y adicionado de kanamicina, como medio de transporte y/o selección para B. fragilis, B. melaninogenicus y Peptostreptococcus-sp".

M A T E R I A L Y M E T O D O

Biológico.

Bacteroides fragilis (cepario ENCB IPN)

Bacteroides melaninogenicus (cepario ENCB IPN)

Peptostreptococcus sp (cepario ENCB IPN)

Escherichia coli cepas 1,2,3,4,8,96a,96b,107a,107b

Klebsiella pneumoniae cepas 40,46,119,121 y 701

Enterobacter sp cepas 14,30,75,97 y 140

(Las tres especies facultativas fueron aisladas
de pacientes del Hosp. Gral. de CNM)

1.- Preparación del medio de transporte y/o selección

Fórmula:

Caldo tioglicolato con glucosa

e indicador	2.89	gr
Carne picada	8.33	gr
Kanamicina	0.01	gr
Neomicina	0.014	gr
Hemina	0.5	mg
Menadiona	0.05	mg
Agua destilada	1000.00	ml

- a). Se rehidrató el medio Carne picada* en una parte de agua destilada y se dejó remojar por 15 -

* Las fórmulas de todos los medios están en el apéndice.

minutos. Posteriormente se decantó el líquido -- restante y la carne picada se envasó en tubos de 16x150 mm con tapón de rosca hasta alcanzar 3 cm. de altura, aproximadamente.

- b) Se rehidrató el medio Tioglicolato con el resto - del agua destilada y se calentó a ebullición. Se añadieron 12 ml de éste medio a los tubos que con tenían la carne picada y se dejó hervir por 15 mi nutos en baño María, agitando para sedimentar la carne cada vez que ésta se suspendía en la parte- superior del tubo.
- c) Aún calientes los tubos de medio de transporte se añadió 1 ml de aceite mineral y se ajustó el ta- pón de rosca. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- d) Una vez cubierto el período de esterilización se- esperó a que la presión del autoclave bajara por- sí sola para poder abrirla y sacar los tubos de - medio de transporte, de lo contrario si se hace- bajar la presión expulsando el vapor de agua, la carne se suspende a lo largo del medio y éstos tu bos no pueden usarse.

Enriquecimiento

- e) Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente, entonces se añadió a cada uno 0.2 ml de la solución de trabajo de hemina-menadiona con pipeta Pasteur a través del sello de aceite mineral, y se homogenizó ligeramente con la mano.

Adición de antibióticos

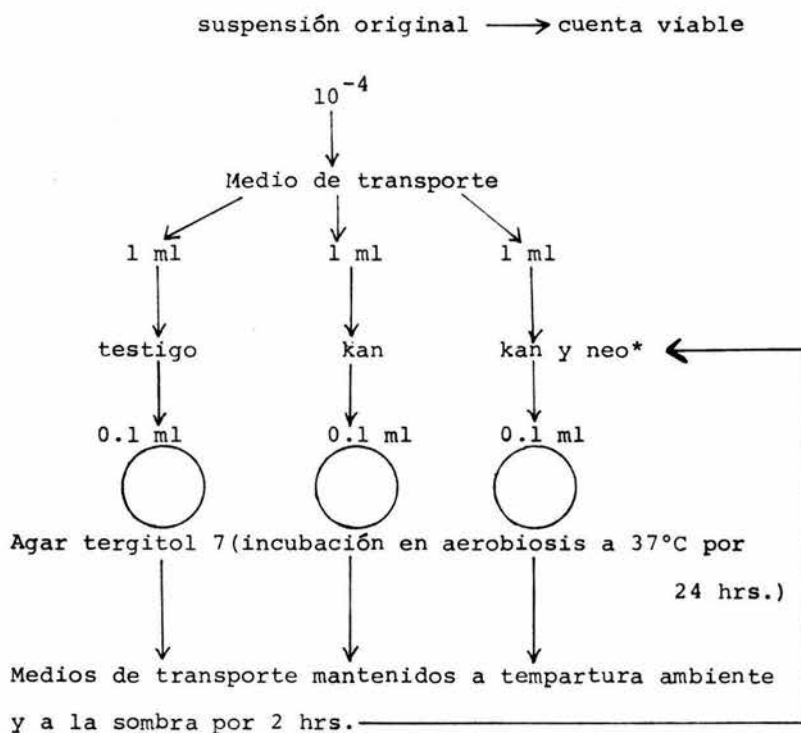
- f) Se preparó una solución en agua destilada disolviendo sulfato de kanamicina en polvo (15 mg/ml) y se esterilizó por filtración (millipore 0.22 μ m).
- g) Se adicionó 0.1 ml de esta solución a los tubos de medio de transporte con pipeta Pasteur a través del sello de aceite mineral y se homogenizó ligeramente con la mano.
- h) Se preparó otra solución acuosa mezclando sulfato de kanamicina (15 mg/ml) y sulfato de neomicina en polvo (21 mg/ml), y se esterilizó por filtración.
- i) Se adicionó 0.1 ml de esta solución en la misma forma a los tubos de medio de transporte co---

rrespondientes.

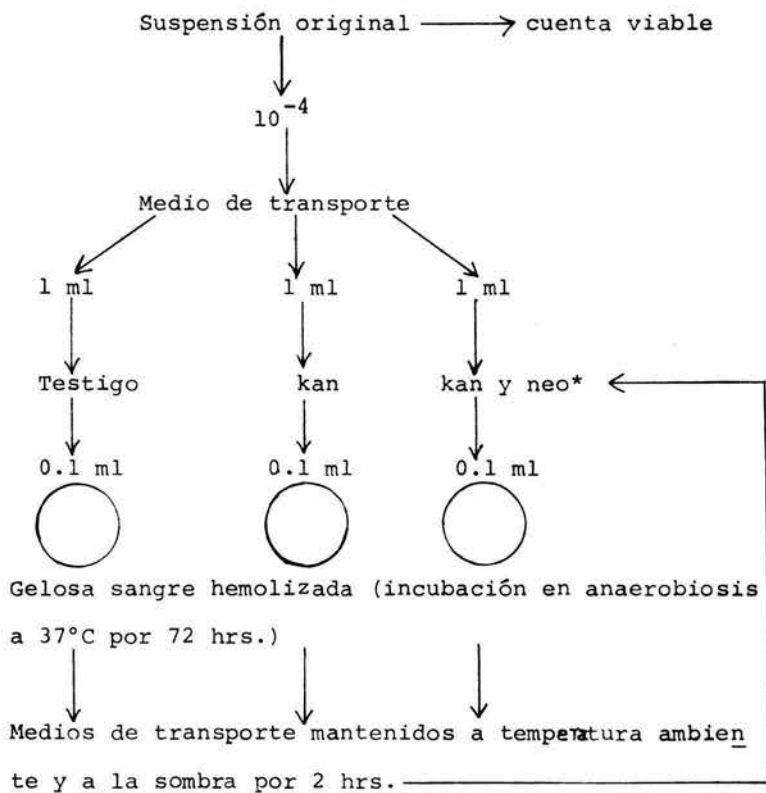
- j) Ya preparados los tubos de medio de transporte - testigo (sin antibióticos), con kanamicina (100 μ g/ml) y con kanamicina y neomicina (100 μ g/ml- de cada uno) se fijó el tapón de rosca con mas--quintape y se mantuvieron a temperatura ambiente y a la sombra hasta su uso (nunca se almacenaron- por más de dos semanas).

D I A G R A M A D E F L U J O

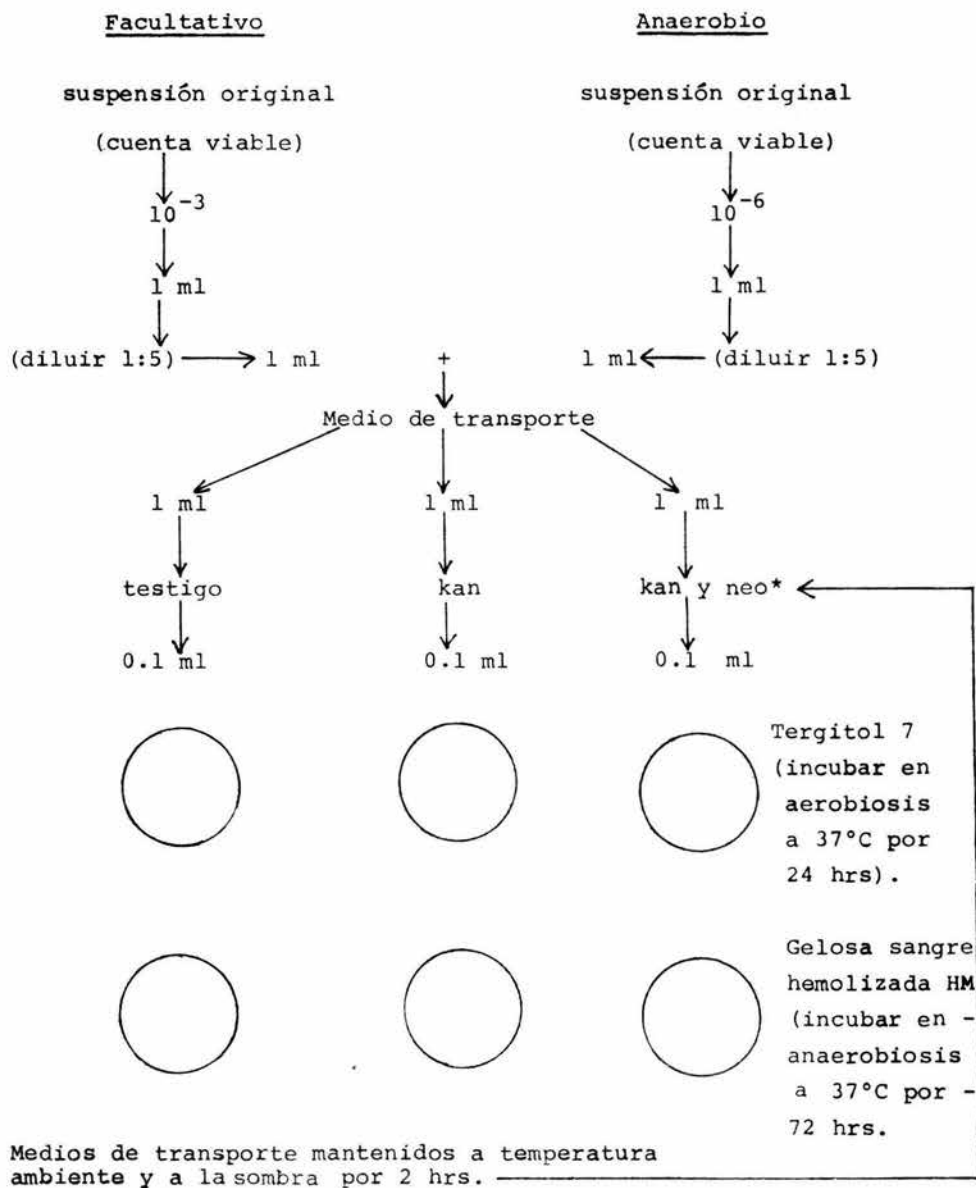
2.- Determinación del tiempo de inhibición de anaerobios - facultativos



3.- Determinación del tiempo de conservación de anaerobios



4.- Recuperación de Anaerobios de mezclas.



Medios de transporte mantenidos a temperatura ambiente y a la sombra por 2 hrs.

* (Los muestreos se realizaron a las 0,2,4,6,8 y 24 hrs).

2.- Determinación del tiempo de inhibición de anaerobios facultativos.

1.- Prueba de inhibición en Caldo soya tripticasa.

- a) A partir de un cultivo de 2 hrs. en Caldo - soya tripticasa de las cepas a probar:

Escherichia coli (10 cepas)

Klebsiella pneumoniae (5 cepas)

Enterobacter sp (5 cepas)

Se preparó una suspensión bacteriana (el procedimiento descrito es por cepa) en solución salina al 85% ajustando su turbidez a la del tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (éste tubo se preparó haciendo una dilución 1:1 del tubo No. 1 del nefelómetro).

- b) Con esta suspensión original se hicieron diluciones decimales 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .
- c) De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomaron alícuotas de 1 ml y se inocularon en tubos que contenían 10 ml de Caldo soya tripticasa de prueba:

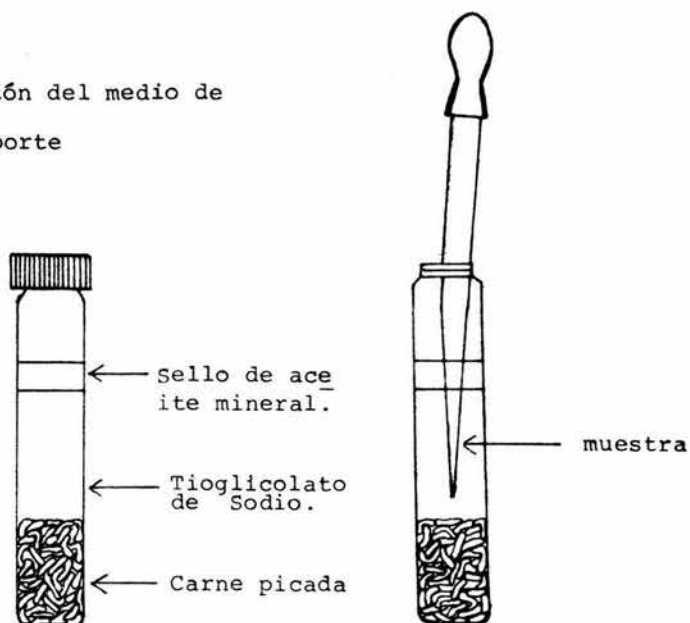
- Testigo (sin antibióticos)
- con kanamicina (100 μ g/ml)
- con kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno).

- d). Inmediatamente después, de cada uno de estos tu bos se tomó una alícuota de 0.1 ml y se sembró en placas de Agar tergitol 7 extendiendo el inó culo con varilla de vidrio acodada. Estos cul tivos se registraron como los correspondientes al tiempo 0 (cero) del experimento y se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 24 hrs.
- e) Posteriormente éstos tubos se mantuvieron a tem peratura ambiente y a la sombra hasta el siguien te muestreo.
- f) El mismo procedimiento se repitió a las 1,2,3,-
4,5,6,7,8, y 24 hrs.
- g) Los resultados se evaluaron por cuenta viable y, en base a estos se determinó el intervalo de -- tiempo entre los muestreos para la prueba de in hibición en el medio de transporte.

II.- Prueba de inhibición en el medio de transporte.

- a) Se repite el procedimiento del inciso a y b del punto anterior (I).
- b) De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomó una alícuota de 0.1 ml y se sembró en placas de Tergitol 7 extendiendo el inóculo con la misma técnica.
- c) De la dilución 10^{-4} se tomó una alícuota de 1 ml, y se inoculó con pipeta Pasteur a aproximadamente 1 cm de altura sobre la superficie de la carne picada de los tubos de medio de transporte de prueba:
- medio testigo (sin antibióticos)
 - medio con kanamicina (100 μ g/ml)
 - medio con kanamicina más neomicina 100 μ g/ml - de cada uno).
- d) De los tubos ya inoculados con la muestra se tomó una alícuota de 0.1 ml con pipeta graduada desechable y se sembró en placas de tergitol 7 extendiendo el inóculo con varilla de vidrio acodada.

Inoculación del medio de
transporte



- e) Todos los cultivos se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 24 hrs . quedando registrados como los correspondientes al tiempo 0 del experimento.
- f) Los tubos de medio de transporte de prueba se mantuvieron a temperatura ambiente y a la sombra hasta el siguiente muestreo.
- g) El mismo procedimiento se repitió a las 2,4,6,8 y 24 hors. del experimento.

h) Los resultados se evaluaron por cuenta viable.

3.- Determinación del tiempo de conservación de anaerobios

a) De un cultivo puro de las cepas a probar:

Bacteroides fragilis

Bacteroides melaninogenicus

Peptostreptococcus sp

Se hizo una resiembra (el procedimiento descrito es por cepa) en placas de gelosa sangre hemolizada HM recientemente preparadas y se incubaron en jarra anaeróbica a 37°C durante 72 hrs. (o más - si era necesario).

b) De estos cultivos se tomó con el asa de siembra las colonias necesarias para preparar una suspensión bacteriana en solución salina al 0.85% que tuviera una turbidez semejante a la del tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.

c) De esta suspensión original se hicieron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .

d) De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomó una-

alícuota de 0.1 ml y se sembró en placas de gelo sa sangre hemolizada HM extendiendo el inóculo - con la misma técnica.

- e) De la dilución 10^{-4} se tomó una alícuota de 1 ml y se inoculó con pipeta Pasteur en la zona ya se ñalada en el experimento anterior de los tubos - de medio de transporte de prueba:

- Medio testigo (sin antibióticos)
- medio con kanamicina (100 μ g/ml)
- medio con kanamicina más neomicina (100 μ g/ml de cada uno).

- f) Inmediatamente después, de los tubos ya inoculados con la cepa se tomó una alícuota de 0.1 ml y se sembró en el mismo medio para anaerobios. Es tos cultivos correspondían al tiempo 0 del experimento y se incubaron en jarra anaeróbica a 37°C durante 72 hrs.

- g) A los tubos de medio de transporte se les ajustó el tapón de rosca y se mantuvieron a temperatura ambiente y a la sombra hasta el siguiente muestreo.

h) El mismo procedimiento se repitió a las 2,4,6,8 y 24 hrs. del experimento.

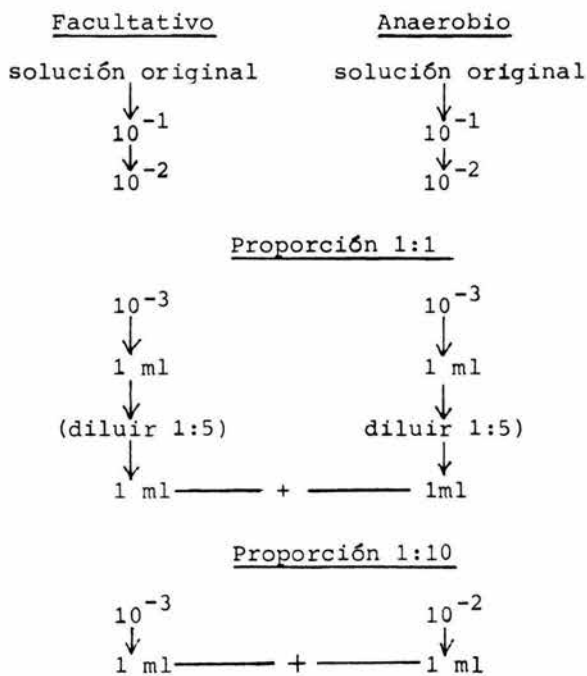
i) Los resultados se evaluaron por cuenta viable.

4.- Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas (de anaerobios entre sí y de anaerobios con facultativos)

Se realizaron las siguientes mezclas:

Anaerobio	y	Anaerobio
<u>B. Fragilis</u>		<u>Peptostreptococcus</u> sp
Anaerobio	y	Facultativo
<u>B. fragilis</u>		<u>E. coli</u> (cepas 4 y 8) <u>K. pneumoniae</u> (cepa 46) <u>Enterobacter</u> sp (cepa 30)
<u>B. melaninogenicus</u>		<u>E. coli</u> (cepa 1) <u>K. pneumoniae</u> (cepa 119) <u>Enterobacter</u> sp (cepa 75)
<u>Peptostreptococcus</u> sp		<u>E. coli</u> (cepa 2)

- a) Para realizar las mezclas se utilizaron cultivos de facultativos y anaerobios con las características - que se indicaron en los puntos 2.1 a) y 3.a).
- b) Se preparó una suspensión bacteriana por cepa en solución salina al 0.85% y se calibró con el tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland.
- c) Usando estos tubos como originales se siguió el procedimiento que se indica en el diagrama para obtener las mezclas de microorganismos en diferentes -- proporciones:



- d) Con las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} de cada cepa de anaerobios y facultativos se sembró para realizar cuenta viable y se incubó como se hizo en los experimentos 2 y 3 cuando se estudiaron las cepas individualmente.
- e) Las mezclas de anaerobios entre sí y de anaerobios con facultativos en sus diferentes proporciones se llevaron a cabo de acuerdo al diagrama del inciso c.
- f) De cada uno de estos tubos :
- proporción 1 (facultativo) : 1 (anaerobio)
 - proporción 1 (facultativo) : 10 (anaerobio)
- de cada pareja de microorganismos estudiada, se tomó una alícuota de 1 ml y se inculó en los tres medios de prueba (testigo, con kanamicina y con kanamicina más neomicina) con pipeta Pasteur en la zona señalada.
- g) Inmediatamente después de inocular los tubos de medio de prueba se tomó una alícuota de 0.1 ml de cada uno con pipeta graduada desechable de la zona donde se depositó el inóculo y se sembró por duplicado es decir, en gelosa sangre hemolizada y en agar tergitol 7 extendiendo al inóculo con la misma técnica.

- h) Estos cultivo se registraron como los correspon--
dientes al tiempo 0 (inicial) del experimento. Las-
placas de gelosa sangre se incubaron en jarra anae-
róbica a 37°C por 72 hrs (0 más si era necesario)-
y las de tergitol 7 en aerobiosis (en incubadora)
a 37°C durante 24 hrs.
- i) Se ajustó el tapón de rosca de los tubos de prueba-
y se mantuvieron a temperatura ambiente y a la som-
bra hasta el siguiente muestreo.
- j) El mismo procedimiento se repitió a las 2,4,6,8 y -
24 hrs del experimento.
- k) Las placas se evaluaron en base a morfología coloni-
al, tinsión de Gram y pigmentación (en el caso de -
B. melaninogenicus).

R E S U L T A D O S

2.- Determinación del tiempo de inhibición de anaerobios facultativos

I.- Prueba de inhibición en Caldo soya tripticasa

Esta fue la primera prueba de inhibición que se realizó en Caldo soya tripticasa con 100 μ g/ml de kanamicina tomando muestras de los tubos de prueba cada hora.

Se probaron 10 cepas de E. coli (1, 2, 3, 4, 8, 51, -- 96a, 96b, 107a y 107b), 5 cepas de K. pneumoniae (40, 46, 119, 121 y 701) y 5 cepas de Enterobacter sp (14, 30, 75, 97 y -- 140) y se obtuvieron los siguientes resultados:

Las poblaciones de los facultativos se inhibieron totalmente en los siguientes tiempos del experimento:

Escherichia coli (tabla 1)

- cepas 96a y 107a a la 1^{ra} hr.
- cepas 1, 3, 8 y 51 a las 2 hrs.
- cepas 2 y 107b a las 3 hrs
- cepas 4 y 96a mostraron resistencia al antibiótico - durante todo el experimento.

Klebsiella pneumoniae (tabla 2)

- cepa 121 a la 1^{ra} hr.

- cepas 40 y 46 a las 3 hrs.
- cepas 119 y 701 fueron resistentes

Enterobacter sp (tabla 3)

cepas 14, 30, 75 y 140 a la 1^{ra} hr.

- cepa 97 fue resistente

Las 5 cepas que fueron resistentes al empleo de la kanamicina se probaron en el mismo medio pero adicionado de neomicina (100 μ g/ml) y la resistencia de las cepas desapareció (tabla 4).

II.- Prueba de inhibición en el medio de transporte

Esta prueba se realizó en el medio de transporte con kanamicina (100 μ g/ml) y con kanamicina y neomicina (concentración final de 100 μ g/ml para cada uno), tomando muestras de los tubos de prueba cada 2 hrs. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Medio de transporte testigo

El desarrollo de los facultativos en este medio se hizo incontable a partir de las 4 hrs del experimento para 14 de las 20 cepas estudiadas: E. coli cepas 1, 2, 3, 4, 5, 8, 51 y 107b (tabla 5), K. pneumoniae cepas 40 y 46 (tabla 6) y-

Enterobacter sp cepas 14, 30, 75, 97 y 140 (tabla 7).

Medio de transporte con kanamicina

Todas las cepas de E. coli mostraron resistencia al antibiótico (no hubo disminución de la población) excepto porque se observó un ligero decremento de la población de las cepas 1, 3, 4, 8 y 107a a las 2 hrs del estudio pero para el siguiente muestreo se recuperó. A partir de las 4 hrs. el desarrollo de algunas cepas (la 2) se hace incontable y posteriormente la mayoría de ellas se comportan en la misma forma (tabla 5).

El desarrollo de K. pneumoniae cepas 46, 119, 121 y -- 701 aumenta progresivamente con respecto al tiempo o (inicial) pero no llega a ser incontable en ningún caso durante el estudio. El desarrollo de la cepa 40 se hace incontable desde las 6 hrs. del experimento (tabla 6). La población de Enterobacter sp cepas 30, 97 y 140 muestra un desarrollo incontable a las 4 hrs. de prueba. Las cepas 14 y 75 se desarrollan progresivamente pero nunca llegan a ser incontables (tabla 7).

Medio de transporte con kanamicina y neomicina

En este medio se observó una disminución importante --

de la población. La inhibición total se registró en los siguientes tiempos:

E. coli (tabla 5)

- cepas 8 y 51 a las 0 hrs.
- cepas 1, 2, 3, 4 a las 2 hrs.
- cepa 96b a las 4 hrs.
- cepa 96a y 107a a las 6 hrs.
- cepa 107b fue resistente.

K. pneumoniae (tabla 6)

- cepas 119, 121 y 701 a las 0 hrs.
- cepas 46 a las 2 hrs.
- cepa 40 fue resistente

Enterobacter sp (tabla 7)

- cepas 14, 30 y 97 a las 2 hrs.
- cepa 75 a las 4 hrs.
- cepa 140 fue resistente

2.- Determinación del tiempo de inhibición de anaerobios facultativos

I.- Inhibición en Caldo Soya Tripticasa con kanamicina

Escherichia coli

Tabla 1

Cepa	1		2		3		4		8	
T	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan
0	19.1*	11.1	8.9	13.4	26.3	7.0	12.3	11.4	24.0	21.6
1	37.0	21.2	31.9	9.1	35.3	21.2	51.0	49.6	88.6	38.6
2	98.6	0	105	12.0	115	0	225	200	350	0
3	inc	0	554	0	inc	0	inc	91.0	inc	0
4	inc	0	inc	0	inc	0	inc	50.3	inc	0
5	inc	0	inc	0	inc	0	inc	75.8	inc	0
6	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0
7	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0
8	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0
24	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0	inc	0

T tiempo (horas)

tes medio testigo (sin antibiótico)

kan medio con kanamicina (100 μ g/ml)

* $\times 10^6$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

todos los valores de la tabla

incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

Escherichia coli

Cepa	5l		96a		96b		107a		107b	
	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan
0	26.0*	18.5	115.5	100	105	78.0	31.9	15.7	30.5	38.4
1	56.0	4.1	359	80.3	207	0	48.2	0	inc	20.0
2	98.0	0	inc	67.5	inc	0	149.5	0	inc	13.9
3	900	0	inc	38.1	inc	0	inc	0	inc	0
4	inc	0	inc	15.3	inc	0	inc	0	inc	0
5	inc	0	inc	20.8	inc	0	inc	1.2	inc	0
6	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	0	inc	0
7	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	0	inc	0
8	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	0	inc	0
24	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	0	inc	0

T tiempo (horas)

tes medio testigo

kan medio con kanamicina (100 μ g/ml)

* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de la tabla)

inc incontable (más de 1000 colonias)

Klebsiella pneumoniae

Tabla 2

Cepa	40		46		119		121		701	
T	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan
0	35.6*	32.1	8.5	19.3	26.3	35.1	26.5	24.6	26.6	40
1	48.9	73.0	81.3	5.0	72.6	64.0	76.3	0	69.3	58.3
2	inc	4.9	140	1.2	275	38.1	inc	0	inc	24.7
3	inc	0	inc	0	inc	57.2	inc	0	inc	30.8
4	inc	0	inc	0	inc	186	inc	0	inc	13.4
5	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	57.7
6	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	inc
7	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	inc
8	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0	inc	inc
24	inc	0	inc	inc	inc	inc	inc	0	inc	inc

T tiempo (horas)

tes medio testigo

kan medio con kanamicina (100 μ g/ml)* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tabla)

inc incontable (más de 1000 colonias)

Enterobacter sp

Tabla 3

Cepa	14		30		75		97		140	
T	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan	tes	kan
0	66.6*	10.6	94	6	32.9	9.6	74.3	87.3	63.3	11
1	165	0	206	0	12.9	0	350	61.8	190	0
2	790	0	inc	0	13.2	0	inc	89.2	590	0
3	inc	0	inc	0	39.2	0	inc	160.8	inc	0
4	inc	0	inc	0	102	0	inc	inc	inc	0
5	inc	0	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0
6	inc	0	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0
7	inc	0	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0
8	inc	0	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	0
24	inc	0	inc	0	inc	inc	inc	inc	inc	0

T tiempo (en horas)

tes medio testigo

kan medio con kanamicina (100 μ g/ml)

* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de la tabla)

inc desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

1.- Inhibición en Caldo soya tripticasa con kanamicina
más neomicina

Tabla 4

E. coli

Cepa		4		96a	
T	tes	kan y neo	tes	kan y neo	
0	15.8*	14.1	118.1	101	
1	64.0	3.5	285.0	0.0	
2	186	0.1	incon	0.0	
3	incon	0.9	incon	0.0	
4	incon	0.0	incon	0.0	
5	incon	0.0	incon	0.0	
6	incon	0.0	incon	0.0	
7	incon	0.0	incon	0.0	
8	incon	0.0	incon	0.0	
24	incon	incon	incon	0.0	

K. pneumoniae

Cepa		119		701	
T	tes	kan y neo	tes	kan y neo	
0	38.1*	29.8	37.3	41.2	
1	57.9	0.0	112	29.2	
2	285	0.0	incon	0.9	
3	incon	0.0	incon	0.0	
4	incon	0.0	incon	0.0	
5	incon	0.0	incon	0.0	
6	incon	0.0	incon	0.0	
7	incon	0.0	incon	0.0	
8	incon	0.0	incon	0.0	
24	incon	0.0	incon	incon	

Enterobacter sp

Cepa		97	
T	tes	kan y neo	
0	85.6*	79.1	
1	203	0.0	
2	incon	0.0	
3	incon	0.0	
4	incon	0.0	
5	incon	0.0	
6	incon	0.0	
7	incon	0.0	
8	incon	0.0	
24	incon	0.0	

T tiempo en horas
 * $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)
 tes medio testigo (sin antibióticos)
 kan y neo medio con kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

II.- Inhibición en el medio de transporte y/o selección

Escherichia coli

Tabla 5

Cepa		1	2	3	4	8
C. viable		15.6 *	5.4	8.3	8.1	11.0
T 0	testigo	1.1 *	3.0	3.9	1.5	2.3
	kan	5.3	3.6	2.0	1.0	2.0
	kan y neo	5.0	2.9	0.1	0.3	0
2	testigo	19.1	18.7	8.8	10.0	11.0
	kan	3.2	17.1	0	0.8	0.4
	kan y neo	0.0	0.1	0	0	0
4	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	15.2	incon	28.0	18.0	4.0
	kan y neo	0.0	0.2	0	0.1	0.2
6	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	7.6	incon	incon	24.0	40.0
	kan y neo	0	0.2	1.0	0	1.0
8	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	8.9	incon	incon	40.0	incon
	kan y neo	0	0.3	1.1	0.1	0.7
24	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	incon	incon	incon	incon	incon
	kan y neo	incon	incon	incon	incon	incon

C. viable cuenta bacteriana del tubo original
que se uso para hacer las diluciones

T tiempo en horas

* $\times 10^6$ UFC (todos los valores)

kan kanamicina (100 μ g/ml)

kan y neo kanamicina más neomicina (100 μ g/ml -
de cada una)

incon incontable (más de 1000 colonias)

Inhibición en el medio de transporte y/o selección

Escherichia coli

cont. Tabla 5

Cepa		51	96a	96b	107a	107b
C. viable		10.8*	9.8	4.7	21.3	9.7
T 0	testigo	5.3	5.0	2.8	10.0	3.5
	kan	0.2	5.6	0.2	10.5	4.3
	kan y neo	0.0	2.0	0.5	9.8	3.8
2	testigo	6.5	6.9	6.6	50.0	15.0
	kan	4.0	30.0	1.3	6.2	13.0
	kan y neo	0	11.2	1.2	4.2	15.0
4	testigo	incon	4.0	14.0	40.0	incon
	kan	0.4	4.6	5.2	30.0	30.0
	kan y neo	0	7.0	0.2	3.5	15.6
6	testigo	incon	incon	54.0	incon	incon
	kan	4.7	incon	0.2	incon	incon
	kan y neo	0.1	0.5	0.2	0.4	incon
8	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	32.0	incon	0.5	incon	incon
	kan y neo	0.2	0.4	0.4	0.5	incon
24	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	incon	incon	incon	incon	incon
	kan y neo	incon	incon	incon	incon	incon

Inhibición en el medio de transporte y/o selección

Klebsiella pneumoniae

Tabla 6

Cepa		40	46	119	121	701
	C. viable	19.8 *	10.2	17.3	7.5	1.6
T 0	testigo	20.0 *	7.5	4.5	1.5	1.3
	kan	4.1	1.0	0.1	0.1	0
	kan y neo	3.1	0.4	0	0	0
2	testigo	35.0	19.8	5.2	4.0	1.5
	kan	20.3	6.3	0.2	0.1	0.1
	kan y neo	4.5	0	0	0	0.1
4	tesgiho	incon	incon	20.0	14.9	20.0
	kan	48.7	12.6	1.3	0	2.0
	kan y neo	5.0	0.1	0	0	0
6	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	incon	2.1	14.1	34.1	7.5
	kan y neo	4.7	0.4	3.0	3.1	1.5
8	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	incon	4.9	29.7	48.9	50.2
	kan y neo	4.9	0.4	2.5	1.7	0.7
24	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	incon	incon	incon	incon	incon
	kan y neo	incon	incon	incon	incon	incon

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
T tiempo en horas
kan kanamicina (100 μ g/ml)
kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)
incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

Inhibición en el medio de transporte y/o selección

Enterobacter sp

Tabla 7

Cepa		14	30	75	97	140
C. viable		6*	6.6	36.6	9.3	6.6
T	testigo	0.5*	1.8	10.0	3.0	2.3
	kan	0	1.8	0.8	3.1	1.5
	kan y neo	0	0.1	0.2	0	2.5
0	testigo	7.0	31.5	7.0	10.0	4.8
	kan	0	20.0	1.1	4.0	4.0
	kan y neo	0	0	0.2	0	4.0
2	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	13.0	incon	2.0	3.0	incon
	kan y neo	0.3	0	0.1	0	incon
4	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	3.5	incon	3.0	25.0	incon
	kan y neo	0	1.1	0.1	0.8	incon
6	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	47.8	incon	9.3	incon	incon
	kan y neo	0	0.1	0.2	0.7	incon
8	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	incon	incon	incon	incon	incon
	kan y neo	incon	incon	incon	incon	incon
24	testigo	incon	incon	incon	incon	incon
	kan	incon	incon	incon	incon	incon
	kan y neo	incon	incon	incon	incon	incon

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
T tiempo en horas
kan kanamicina (100 μ g/ml)
kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)
incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

3.- Determinación del tiempo de conservación de anaerobios

La prueba de conservación o supervivencia de los anaerobios se realizó en los 3 medios de prueba; testigo, con kanamicina y con kanamicina y neomicina. Los muestreos se realizaron cada 2 hrs y se hicieron 2 experimentos por cada especie de anaerobio.

B. fragilis

Al tiempo 0 (inicial) de los dos experimentos pudo observarse cierta inhibición de la población en el medio con -- kanamicina y, especialmente en el medio con kanamicina y neomicina. En el experimento 1 la cuenta viable del medio testigo fue de 2.0×10^6 UFC, en el medio con kanamicina fue de 2.0×10^6 UFC y en el medio con kanamicina y neomicina fue de 1.9×10^6 UFC. En el experimento 2 la cuenta viable fue de 2.5×10^6 UFC en el medio testigo, de 2.4×10^6 UFC en el medio con kanamicina y de 2.0×10^6 UFC en el medio con ambos antibióticos (tabla 8). El comportamiento de la especie en ambos experimentos fue muy semejante.

A las 2 hrs del estudio la población se volvió a ver disminuida en los medios de prueba. En presencia de kanamicina la cuenta fue de 1.9×10^6 UFC (con respecto al 2.0×10^6 UFC del testigo) en el exp. 1 y de 1.0×10^6 UFC (con respecto al -

1.4 x10⁶UFC del testigo] en el exp. 2, cuando se utilizaron - ambos antibióticos la disminución de la población fue ligeramente mayor. Para las 4 hrs la población del medio con kanamicina se incrementó y en el medio con ambos antibióticos se conservó como en el muestreo anterior.

A partir de las 6 hrs se observó una mayor recuperación de las poblaciones y para las 8 hrs las cuentas bacterianas fueron muy altas en presencia kanamicina (en el exp. 2 sobrepasó la cuenta testigo), en el medio con ambos antibióti--cos la población también se vió recuperada sin embargo, la -- cuenta siguió siendo ligeramente menor que en el medio con kanamicina. A las 24 hrs las poblaciones fueron incontables en los tres medios de prueba (tabla 8).

B. melaninogenicus

Al tiempo 0 la cuenta viable del medio testigo fue de 3.7 x10⁶ UFC, del medio con kanamicina fue de 1.6 x10⁶UFC y - del medio con ambos antibióticos fue de 1.5 x10⁶UFC en el exp. 1 y, resultados similares se obtuvieron en el exp. 2 (tabla - 9). A las 2 hrs del estudio se registraron resultados muy semejantes a los anteriores en los 2 experimentos, es decir, -- las poblaciones en los medios con antibióticos se mantuvieron bajas con respecto al medio testigo, especialmente en el me--dio con ambos antibióticos.

A partir de las 4 hrs la población se vió incrementada en los medios con antibióticos y la cuenta viable de estos se acercó más al valor de la cuenta testigo. A las 6 hrs. la población es más alta (3.1×10^6 UFC en el medio con kanamicina y 2.6×10^6 UFC en presencia de ambos antibióticos con respecto al 3.8×10^6 UFC del testigo en el exp. 1). A las 8 hrs. las poblaciones se conservan en general en las mismas proporciones (4.0×10^6 UFC en el testigo, 3.8×10^6 UFC en presencia de kanamicina y 3.0×10^6 UFC en presencia de los dos antibióticos en el exp. 2). A las 24 hrs las poblaciones en los tres medios de prueba fueron incontables (tabla 9).

Poptostreptococcus sp

La población de esta especie se vió disminuida en los medios con antibióticos en ambos experimentos al inicio del estudio (la cuenta del medio testigo fue de 3.9×10^6 UFC, la del medio con kanamicina fue de 3.0×10^6 UFC y la del medio con ambos antibióticos fue de 3.0×10^6 UFC en el exp. 1).

A las 2 hrs del estudio las poblaciones en los tres medios de prueba se incrementaron en ambos experimentos (4.0×10^6 UFC en el testigo, 4.1×10^6 UFC en presencia de kanamicina y 3.9×10^6 UFC en presencia de ambos antibióticos en el exp. 1).

A las 4 hrs el desarrollo fue incontable en los tres -
medios de prueba en el exp. 2 y a las 6 hrs ocurrió lo mismo
en el exp. 1. Todas las poblaciones permanecieron inconta- -
bles a las 8 hrs y también a las 24 hrs de prueba (tabla 10).

3.- Determinación del tiempo de conservación de anaerobios

Bacteroides fragilis

Tabla 8

		Experimento 1	2
C. viable		4.3*	7.7*
T 0	testigo	2.0	2.5
	kan	2.0	2.4
	kan y neo	1.9	2.0
2	testigo	2.0	1.4
	kan	1.9	1.0
	kan y neo	1.8	1.0
4	testigo	2.1	1.0
	kan	1.8	1.3
	kan y neo	1.7	1.2
6	testigo	1.9	1.3
	kan	2.0	1.7
	kan y neo	1.8	1.0
8	testigo	1.9	1.5
	kan	1.8	1.8
	kan y neo	1.6	1.1
24	testigo	incon	incon
	kan	incon	incon
	kan y neo	incon	incon

C. viable cuenta bacteriana del tubo original
 T tiempo en horas
 * x10⁶UFC (todos los valores)
 kan kanamicina (100 µg/ml)
 kan y neo kanamicina y neomicina (100µg/ml de cada uno)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

Bacteroides melaninogenicus

Tabla 9

Experimento 1

2

C. viable		6.3*	4.1*
T 0	testigo	3.7	3.9
	kan	1.6	2.8
	kan y neo	1.5	2.7
2	testigo	4.0	4.0
	kan	1.9	2.8
	kan y neo	1.7	2.8
4	testigo	4.5	3.0
	kan	3.0	2.5
	kan y neo	2.4	2.6
6	testigo	3.8	3.8
	kan	3.1	2.3
	kan y neo	2.6	2.4
8	testigo	4.0	4.0
	kan	3.8	3.2
	kan y neo	3.0	2.9
24	testigo	incon	incon
	kan	incon	incon
	kan y neo	incon	incon

C. viable cuenta bacteriana del tubo original
 T tiempo en horas
 * $\times 10^6$ UFC (todos los valores)
 kan kanamicina (100 μ g/ml)
 kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

Experimento 1

2

C. vialbe		6.7*	13.6*
T 0	testigo	3.9	4.1
	kan	3.0	2.6
	kan y neo	3.0	2.4
2	testigo	4.0	10.0
	kan	4.1	4.5
	kan y neo	3.9	7.7
4	testigo	6.8	incon
	kan	7.1	incon
	kan y neo	6.5	incon
6	testigo	incon	incon
	kan	incon	incon
	kan y neo	incon	incon
8	testigo	incon	incon
	kan	incon	incon
	kan y neo	incon	incon
24	testigo	incon	incon
	kan	incon	incon
	kan y neo	incon	incon

C. viable cuenta bacteriana del tubo original
 T tiempo en horas
 * $\times 10^6$ UFC (todos los valores de la tabla)
 kan kanamicina (100 μ g/ml)
 kan y neo kanamicina más neomicina (100 μ g/ml de cada
 una)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

4.- Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas (de anaerobios entre sí y de anaerobios con facultativos).

Se realizaron diferentes mezclas de microorganismos -- anaerobios entre sí y de anaerobios con facultativos en el -- medio de transporte testigo y con antibióticos. Los muestreos de los medios se hicieron cada 2 hrs.

De cada pareja de microorganismos se realizaron pruebas en diferentes proporciones siendo los anaerobios los que variaron en concentración, las proporciones fueron 1:1 y 1:10. Se obtuvieron los siguientes resultados:

B. fragilis y las especies facultativas

De esta mezcla se realizaron 4 experimentos.

- B. fragilis y E. coli cepa 4
- " y E. coli cepa 8
- " y K. pneumoniae cepa 46
- " y Enterobacter sp cepa 30

En todos los experimentos pudo observarse que la población del anaerobio se vió parcialmente inhibida en los medios de transporte con antibióticos, siendo la inhibición de las bacterias ligeramente mayor cuando se usaron los dos antibióticos (kanamicina más neomicina). Este fenómeno se presentó desde el tiempo 0 (inicial) y así se conservó en promedio du-

rante las 8 hrs que duró el estudio, en las dos proporciones - que se manejaron (tablas 11,12,13 y 14). Por ejemplo, cuando - se probó la mezcla entre B. fragilis y E. coli cepa 4 la pobla- ción del anaerobio al tiempo 0 fue de 2.3×10^6 UFC en el medio testigo, de 1.5×10^6 UFC en el medio con kanamicina y de 1.4×10^6 UFC en el medio con kanamicina y neomicina, a las 4 hrs. - del estudio la población fue de 8×10^6 UFC en el testigo, de -- 5.8×10^6 UFC en presencia de Kanamicina y de 5.8×10^6 UFC en - presencia de ambos antibióticos. A las 8 hrs. las poblaciones- en los medios testigo y con kanamicina fueron incontables y en el medio con ambos antibióticos fue de 10.5×10^6 UFC, para las 24 hrs del estudio todas las poblaciones fueron incontables. - La inhibición de la población del facultativo en este caso se presentó de las 2 a las 6 hrs. en el medio con kanamicina y -- neomicina (tabla 11).

Cuando se probaron las mezclas entre B. fragilis y K.-- pneumoniae y, B. fragilis y Enterobacter sp las poblaciones -- del anaerobio también se vieron parcialmente inhibidas desde - el tiempo 0 hasta las 8 hrs. (en promedio) del estudio en -- las dos medios con antibióticos (tabla 13 y 14).

La inhibición de la población de los facultativos en - cada una de las mezclas probadas en los medios con antibióti-- cos se presentó en las siguientes horas:

Medio con kanamicina

- E. coli cepa 4 solo a las 6 hrs.
- E. coli cepa 8 solo a las 4 hrs.
- K. pneumoniae cepa 46 solo a las 0 hrs.
- Enterobacter sp cepa 30 resistente

Medio con kanamicina y neomicina

- E. coli cepa 4 de las 2 a las 6 hrs.
- E. coli cepa 8 de las 2 a las 4 hrs.
- K. pneumoniae cepa 46 de las 0 a las 2 hrs.
- Enterobacter sp cepa 30 de las 0 a las 2 hrs.

B. melaninogenicus y las especies facultativas.

De esta mezcla se realizaron 3 experimentos:

- B. melaninogenicus y E. coli cepa 1
- " y K. pneumoniae cepa 119
- " y Enterobacter sp cepa 75

La población del anaerobio también se vió parcialmente-inhibida en los medios con antibióticos en los 3 experimentos. La disminución de la población se observó después de las --- 2 hrs. y así se mantuvo durante el resto del tiempo del estudio especialmente cuando se usó kanamicina y neomicina en el medio de transporte (tablas 15,16 y 17).

Por ejemplo, cuando se probó la mezcla entre B. melanogenicus y K. pneumoniae cepa 119, la población del anaerobio al tiempo 0 fue de 2.8×10^6 UFC en el medio testigo, de 2.2×10^6 UFC en el medio con kanamicina y de 1.6×10^6 UFC en el medio con ambos antibióticos. A las 2 hrs la cuenta fue de 3.8×10^6 UFC en el testigo, de 3.0×10^6 UFC en presencia de -- kanamicina y de 2.0×10^6 UFC en presencia de ambos antibióticos. A las 8 hrs. del estudio la cuenta del testigo fue de -- 20×10^6 UFC, en el medio con kanamicina fue de 12×10^6 UFC y cuando se usaron ambos antibióticos fue de 15×10^6 UFC. A las 24 hrs. la población de los tres medios fue incontable (tabla 16).

La inhibición de la población de los facultativos en cada una de las mezclas en los medios con antibióticos se presentó en las siguientes horas:

Medio con kanamicina

- E. coli cepa 1 de las 2 a las 8 hrs.
- K. pneumoniae cepa 119 de las 0 a las 2 hrs.
- Enterobacter sp cepa 75 resistente

Medio con kanamicina y neomicina

- E. coli cepa 1 de las 2 a las 8 hrs.
- K. pneumoniae cepa 119 de las 0 a las 6 hrs.

- Enterobacter sp cepa 75 resistente

Peptostreptococcus sp y E. coli.

La única prueba fue realizada con la cepa 2 de E. coli. Se puede observar que se presentó una disminución de la población del anaerobio en los medios con antibióticos desde el tiempo 0, en este momento la población del testigo fue de 5.1×10^6 UFC, la del medio con kanamicina fue de 2.9×10^6 UFC y la del medio con ambos antibióticos fue de 4.3×10^6 UFC, este comportamiento se mantuvo a lo largo del estudio. A las 8 hrs. - la cuenta del testigo fue de 45.9×10^6 UFC, en presencia de kanamicina fue de 40×10^6 UFC y cuando se usaron los dos antibióticos fue de 30×10^6 UFC. A las 24 horas la población fue incontable en todos los medios de prueba.

La inhibición de E. coli se presentó de las 2 a las 6 hrs. en el medio con kanamicina y neomicina, la cepa fue resistente en el medio con kanamicina (tabla 19).

B. fragilis y Peptostreptococcus sp

Cuando se mezclaron los anaerobios se observó que ambas poblaciones se vieron parcialmente inhibidas en los medios con antibióticos desde el tiempo 0 del estudio, en este momento -- la población de B. fragilis en el medio testigo fue de 20×10^6 UFC, en el medio con Kanamicina fue de 20×10^6 UFC.

y en el medio con ambos antibióticos fue de 16×10^6 UFC, la población de Peptostreptococcus sp en el testigo fue de 30×10^6 UFC, en presencia de kanamicina fue de 19×10^6 UFC y en presencia de ambos antibióticos fue de 18×10^6 UFC. A las 2 hrs. las poblaciones comenzaron a incrementarse en los 3 medios de prueba y así continuaron hasta las 6 hrs.

A las 8 hrs. la población de B. fragilis en el testigo fue incontable, en presencia de kanamicina fue de 101×10^6 UFC y en presencia de ambos antibióticos fue de 109×10^6 UFC, resultados similares se obtuvieron para la población de los cocos. A las 24 hrs. ambas poblaciones fueron incontables en todos los medios de prueba (tabla 19).

4.- Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. fragilis y E. coli (cepa 4)

Tabla 11

B. fragilis

C. viable 27.3*

Propor- ción	Medio	tiempo 0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo	2.3*	3.8	8.0	5.4	incon	incon
	kan	1.5	3.4	5.8	3.4	incon	incon
	kan y neo	1.4	4.8	5.8	3.0	10.5	incon
1:10 (f:a)	testigo	18.0	21.0	21.2	incon	incon	incon
	kan	20.0	20.3	20.0	29.4	incon	incon
	kan y neo	32.0	20.1	13.2	20.8	25.0	incon

E. coli

C. viable 2.3*

Propor- ción	Medio	tiempo 0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo	0.7*	4.7	11.7	incon	incon	incon
	kan	0.3	1.9	1.0	0	0.2	incon
	kan y neo	0.2	0	0.1	0	0.1	0
1:10 (f:a)	Testigo	2.2	4.3	10.6	incon	incon	incon
	kan	1.5	1.2	0.5	0	0	0
	kan y neo	1.6	0	0	0	0	0

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
 tiempo en horas
 * $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)
 kan kanamicina (100 μ g/ml)
 Kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)
 (f:a) (facultativo: anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. fragilis y E. coli (cepa 8)

Tabla 12

B. fragilis

C. viable 12.5*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
		1:1	testigo	3.0*	5.0	5.0	5.0	10.0
(f:a)	kan	3.0	3.0	2.0	3.0	8.0	incon	
	kan y neo	3.5	2.9	2.5	2.5	6.0	incon	
1:10	testigo	10.5	12.5	8.5	7.0	incon	incon	
	kan	10.0	10.0	10.5	10.0	20.0	incon	
	kan y neo	10.0	15.0	12.0	10.5	20.0	incon	

E. coli

C. viable 5.3*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
		1:1	testigo	0.7*	3.4	20.0	incon	incon
(f:a)	kan	0.6	0.1	0	8.8	incon	incon	
	kan y neo	0.1	0	0	0.2	13.0	incon	
1:10	testigo	0.5	1.2	14.0	incon	incon	incon	
	kan	0.1	0.5	0.6	4.9	14.4	incon	
	kan y neo	0.2	0	0.1	0.3	3.0	74.3	

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
tiempo en horas

* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)

kan kanamicina (100 μ g/ml)

kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)

incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

(f:a) (facultativo : anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. fragilis y K. pneumoniae (cepa 46)

Tabla 13

B. fragilis

C. viable 11.5*

Propor- ción	Medio	tiempo					
		0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo	10.0*	14.0	19.0	incon	incon	incon
	kan	6.0	9.0	13.0	13.0	incon	incon
	Kan y neo	6.2	9.0	9.8	13.0	incon	incon
1:10 (f:a)	testigo	9.0	15.0	incon	incon	incon	incon
	kan	5.8	9.0	10.0	9.0	10.0	incon
	kan y neo	10.0	15.0	12.1	10.0	9.0	incon

K. pneumoniae

C. viable 2.5*

Propor- ción	Medio	tiempo					
		0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo	0.6*	5.0	16.0	incon	incon	incon
	kan	0	0.4	0.2	2.3	4.6	incon
	kan y neo	0	0	0.1	0.4	0.1	incon
1:10 (f:a)	testigo	1.9	14.5	incon	incon	incon	incon
	kan	0.2	0.2	2.1	4.3	0.1	incon
	kan y neo	0	0.1	0	0.3	0	0

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
tiempo en horas

* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)

kan kanamicina (100 μ g/ml)

kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)

incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

(f:a) (facultativo: anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. fragilis y Enterobacter sp (cepa 30)

Tabla 14

B. fragilis

C. viable 11.2*

Propor- ción	Medio	tiempo					
		0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo	1.5*	2.5	3.0	5.0	8.0	incon
	kan	1.5	1.2	2.0	4.0	8.7	incon
	kan y neo	1.0	1.0	2.1	4.0	8.1	incon
1:10 (f:a)	testigo	10.0	10.0	9.0	8.0	18.8	incon
	kan	11.0	16.0	3.0	3.0	4.8	incon
	kan y neo	7.5	17.0	7.0	7.0	7.3	incon

Enterobacter sp

C. viable 12.5*

Propor- ción	Medio	tiempo					
		0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo	1.5*	10.5	40.0	incon	incon	incon
	kan	3.7	7.5	30.0	incon	incon	incon
	kan y neo	0	0	0.7	11.5	20.0	108
1:10 (f:a)	testigo	2.5	10.0	45.0	incon	incon	incon
	kan	1.6	10.5	38.0	incon	incon	incon
	kan y neo	0	0	0.5	6.0	incon	incon

C. viable

cuenta bacteriana de la suspensión original
en horas

tiempo

* $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)

kan

kanamicina (100 μ g/ml)

kan y neo

kanamicina y neomicina (100 μ g/ ml de cada uno)

incon

desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

(f:a)

(facultativo:anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. melaninogenicus y E. coli (cepa 1)

Tabla 15

B. melaninogenicus

C. viable 6.8*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
1:1 (F:a)	testigo		2.2*	10.2	incon	incon	incon	incon
	kan		1,8	5,8	4,0	5,1	incon	incon
	kan y neo		1,5	5,3	4,5	5,8	incon	incon
1:10 (f:a)	testigo		6.0	10,2	incon	incon	incon	incon
	kan		4.8	5,9	incon	incon	incon	incon
	kan y neo		8.5	6.8	incon	incon	incon	incon

E. coli

C. viable 4.3*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo		3.8*	5,9	15.0	incon	incon	incon
	kan		0.3	0	0	0	0	0
	kan y neo		0.2	0	0	0	0	0
1:10 (f:a)	testigo		8.0	20.3	30.0	incon	incon	incon
	kan		0	0	0	0	0	0
	kan y neo		0	0	0	0	0	0

C. viable
tiempo

cuenta bacteriana de la suspensión original
en horas

*
Kan
kan y neo
incon
(f:a)

$\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)
kanamicina (100 μ g/ml)
kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
desarrollo incontable (más de 1000 colonias)
(facultativo:anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. melaninogenicus y K. pneumoniae (cepa 119)

Tabla 16

B. melaninogenicus

C. viable 20.6*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
		testigo	2.8*	3.8	19.0	15.0	20.0	incon
1:1 (f:a)	kan	2.2	3.0	7.0	8.0	12.0	incon	
	kan y neo	1.6	2.0	8.0	10.0	15.0	incon	
1:10 (f:a)	testigo	14.0	12.0	20.1	20.0	21.0	incon	
	kan	20.0	11.0	17.0	15.0	15.0	incon	
	kan y neo	12.0	20.0	9.0	5.2	6.0	incon	

K. pneumoniae

C. viable 4.3*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
		testigo	0.8*	1.7	7.0	incon	incon	incon
1:1 (f:a)	kan	0	0	0	0.6	4.1	incon	
	kan y neo	0	0	0	0	0.3	0	
1:10 (f:a)	testigo	5.5	6.1	8.0	incon	incon	incon	
	kan	0	0	0	0.8	1.0	incon	
	kan y neo	0	0	0	0	0.7	incon	

C. viable
tiempo

cuenta bacteriana de la suspensión original
en horas

*

$\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)

kan

Kanamicina (100 μ g/ml)

kan y neo

kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)

incon

desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

(f:a)

(facultativo:anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. melaninogenicus y Enterobacter sp (cepa 75)

Tabla 17

B. melaninogenicus

C. viable 17.6*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
		testigo	0.7*	0.8	3.3	incon	incon	incon
1:1	kan	0.6	0.5	1.2	19.0	25.0	incon	
(f:a)	kan y neo	0.6	0.5	1.2	16.0	18.0	incon	
1:10	testigo	4.7	7.7	incon	20.0	incon	incon	
	kan	1.9	3.3	5.7	30.1	29.5	incon	
	(f:a)	1.8	3.0	3.0	19.8	20.0	incon	

Enterobacter sp

C. viable 14.3*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
		testigo	3.7*	6.0	16.7	incon	incon	incon
1:1	kan	1.4	5.0	8.3	incon	incon	incon	
(f:a)	kan y neo	0.7	2.6	7.1	20.0	21.3	incon	
1:10	testigo	2.0	10.4	incon	incon	incon	incon	
	kan	1.2	4.7	18.5	incon	incon	incon	
	(f:a)	1.5	1.7	20.8	20.0	20.4	incon	

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
 tiempo en horas
 * $\times 10^6$ (todos los valores de las tablas)
 kan kanamicina (100 μ g/ml)
 kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)
 (f:a) (facultativo:anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

Peptostreptococcus sp y E. coli (cepa 2)

Tabla 18

Peptostreptococcus sp

C. viable 7.5*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo		5.1*	5.5	22.2	40.3	45.9	incon
	kan		2.9	5.4	20.5	32.9	40.0	incon
	kan y neo		4.3	6.3	18.7	28.0	30.0	incon
1:10 (f:a)	testigo		incon	incon	incon	incon	incon	incon
	kan		incon	38.0	incon	43.1	incon	incon
	kan y neo		25.0	25.0	incon	18.0	incon	incon

E. coli

C. viable 5.3*

Propor- ción	Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
1:1 (f:a)	testigo		1.0*	11.0	22.0	incon	incon	incon
	kan		0.7	1.0	0.3	0.6	1.4	incon
	kan y neo		0.2	0	0	0	0.1	0
1:10 (f:a)	testigo		2.9	8.5	12.5	incon	incon	incon
	kan		1.4	2.8	0.4	10.0	0.8	incon
	kan y neo		1.0	0	0	0	0	0

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
 tiempo en horas
 * $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)
 kan kanamicina (100 μ g/ml)
 kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)
 (f:a) (facultativo:anaerobio)

Recuperación de bacterias anaerobias de mezclas

B. fragilis y Peptostreptococcus sp

Tabla 19

B. fragilis

C. viable 50.1*

Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
testigo		20*	25	20	incon	incon	incon
kan		20	19	21	85	101	incon
kan y neo		16	27	28	98	109	incon

Peptostreptococcus sp

C. viable 68.6*

Medio	tiempo	0	2	4	6	8	24
testigo		30*	43	81	incon	incon	incon
kan		19	42	71	95	140	incon
kan y neo		18	26	57	102	130	incon

C. viable cuenta bacteriana de la suspensión original
 tiempo en horas
 * x10⁶ UFC (todos los valores de las tablas)
 kan kanamicina (100 µg/ml)
 kan y neo kanamicina y neomicina (100 µg/ml de cada uno)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

Para determinar el tiempo que tardaba en presentarse -- el efecto inhibitorio de la kanamicina sobre las especies facultativas E. coli, K. pneumoniae y Enterobacter sp se realizó primeramente una prueba de sensibilidad al antibiótico ---- usando como medio base Caldo soya triptica y tomando muestras de los tubos cada hora.

La kanamicina al igual que otros aminoglucósidos (neomicina, gentamicina, vancomicina) es un agente bactericida muy potente contra los facultativos presentes en el colon y se recomienda --- usarse a una concentración final de 100 μ g/ml en la preparación de los medios selectivos para anaerobios.⁷

Sin embargo se observó que de las 20 cepas de facultativos estudiadas, 5 cepas mostraron resistencia al antibiótico (E. coli cepa 4 y 96a, k. pneumoniae cepa 119 y 701 y Enterobacter sp cepa 97). Algunos autores recomiendan el empleo de la combinación de dos antibióticos (aminoglucósidos) para reforzar y obtener un mejor efecto inhibitorio^{15,24}. Cuando se usaron kanamicina y neomicina (a una concentración final de -- 100 μ g/ml de cada uno) la resistencia de dichas cepas desapareció.

De esta prueba también se obtuvo que el tiempo de inhibición promedio de los facultativos variaba entre la 1ra. y -- 3ra hora por lo que se determinó que los muestreos de los expe

rimentos posteriores en el medio de transporte se harían cada-
2 horas.

En la prueba de inhibición ya en el medio a valorar se-
obtuvieron resultados semejantes a los anteriores. De las 10 -
cepas de E. coli probadas, 5 cepas (1,3,4,8 y 51) mostraron -
una inhibición total a las 2 hrs del experimento (tabla 20). -
Como se observa en la gráfica 1 de la cepa 4 (representativa -
de este comportamiento) el desarrollo de la población es acele-
rado en el tubo testigo (sin antibióticos) ya que de una ---
población de 1.5×10^6 UFC al tiempo 0 (inicial) llega a 10×10^6 UFC a las 2 hrs del estudio y se hace incontable a partir-
del siguiente muestreo. Al tiempo 0 en presencia de kanamicina
la población se ve disminuida a un 66% con respecto al testigo
y en presencia de ambos antibióticos ésta baja a un 20%. A las
4 hrs. del estudio en el medio con kanamicina únicamente, la -
población sensible generalmente se recupera y posteriormente -
se hace incontable, sin embargo cuando se usan kanamicina y --
neomicina la población se inhibe totalmente o llega a ser muy-
baja y así permanece por el resto del tiempo del experimento.-
Este comportamiento se observó en promedio en 7 de las 9 cepas
sensibles de E. coli.

La inhibición de K. pneumoniae en el medio de transpor-
te con ambos antibióticos se presentó desde el tiempo 0 del --
estudio (en 3 de las 4 cepas sensibles) y se puede observar --

en la gráfica 2 de la cepa 119 (de comportamiento típico). Para Enterobacter sp la inhibición en este medio se persentó a las 2 hrs. del experimento (en 3 de las 4 cepas sensibles) y-- generalmente así se conserva hasta las 8 hrs. del mismo, como se puede observar en la gráfica 3 de la cepa 30 (típica).

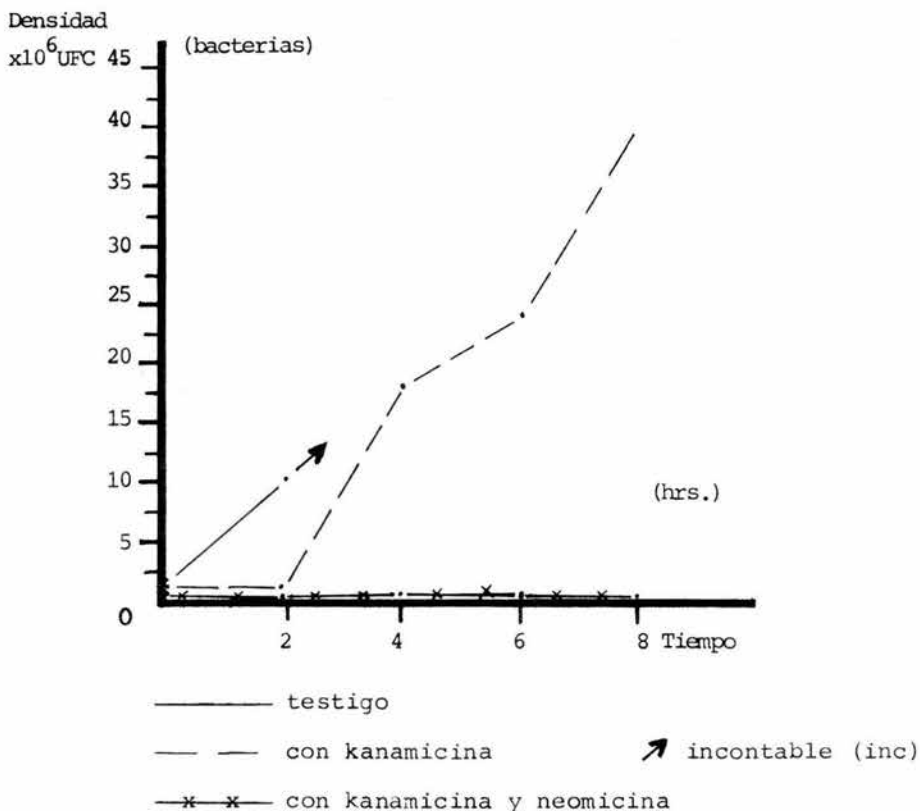
Como se puede observar en las gráficas 1, 2 y³,y en la tabla 22, las 3 especies de bacterias facultativas mostraron un comportamiento similar y satisfactorio al empleo de los antibióticos, especialmente cuando se combinan la kanamicina y la neomicina, es decir, cuando se utilizó solo kanamicina la población nunca alcanzó una inhibición total ya que solo se -- mantiene baja durante las primeras 4 hrs. y después se recupera, en cambio cuando se utilizaron ambos antibióticos el efecto inhibitorio fue más potente sobre la población y se logra la inhibición que se requiere en el medio de transporte para cuando se inoculen muestras clínicas.

De todas las cepas de facultativos estudiadas (20), el 85% (17) fueron sensibles al efecto de los antibióticos en --- el medio de transporte con kanamicina y neomicina y, de estas el 82.3% se vieron inhibidas de un 99.2 a un 100% durante las primeras 2 hrs. de prueba y por lo general se conservó esta -- respuesta hasta las 8 hrs. (tabla 20). En el medio con kanamicina todas las cepas fueron resistentes.

En algunos casos entre las horas intermedias del estudio se registró la presencia de bacterias en los medios con -- antibióticos, esto es debido a que los aminoglucósidos presentan el fenómeno de resistencia bacteriana tipo estreptomycin que consiste en que una cepa que ha sido sensible se torna --- bruscamente resistente en cualquier momento¹⁶. Cuando se presentó este fenómeno en los medios de transporte se obtuvieron valores muy bajos en comparación con el desarrollo incontable de los medios testigo. Probablemente también debido a esto en algunos casos dichos medios presentaron un desarrollo incontable a las 24 hrs. de prueba, sin embargo este siempre fue menor que el del medio testigo.

Densidad VS tiempo de inhibición de E. coli (cepa 4) en el medio de transporte.

Tiempo	0	2	4	6	8
Testigo	1.5	10.0	inc	inc	inc
Kan	1.0	0.8	18.0	24.0	40.0
Kan y neo	0.3	0	0.1	0	0.1

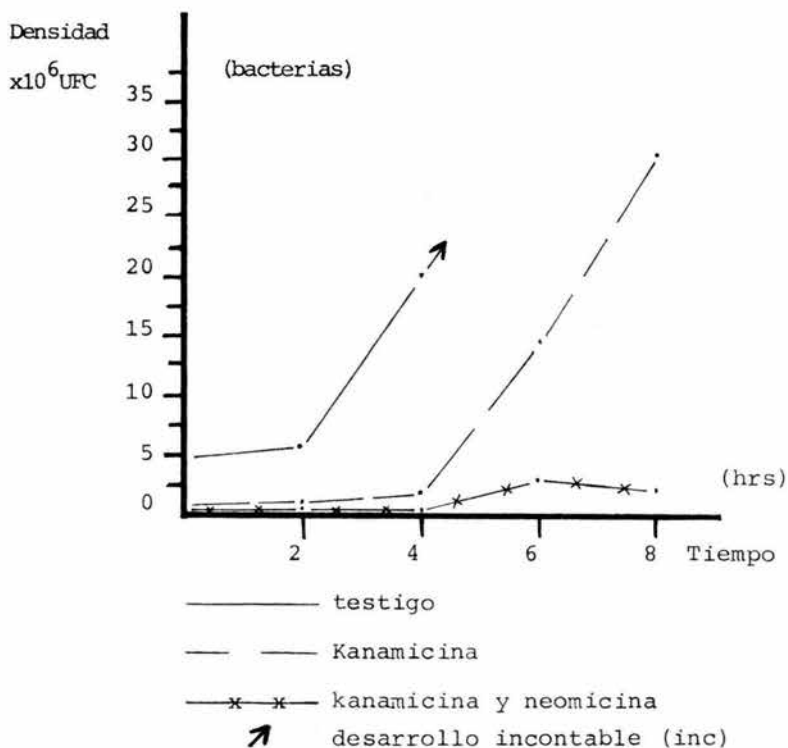


Gráfica 1

La población de E. coli se hace incontable a partir de las 4 hrs en el medio testigo, al mismo tiempo - en presencia de kanamicina la población que había estado inhibida comienza su desarrollo. La inhibición en el medio con kanamicina y neomicina se presenta desde el tiempo 0 y se conserva durante todo el experimento.

Densidad VS tiempo de inhibición de K. pneumoniae (cepa 119) en el medio de transporte.

TIEMPO	0	2	4	6	8
Testigo	4.5	5.2	20.0	inc	inc
Kan	0.1	2.2	1.3	14.1	29.7
Kan y neo	0	0	0	3.0	2.5

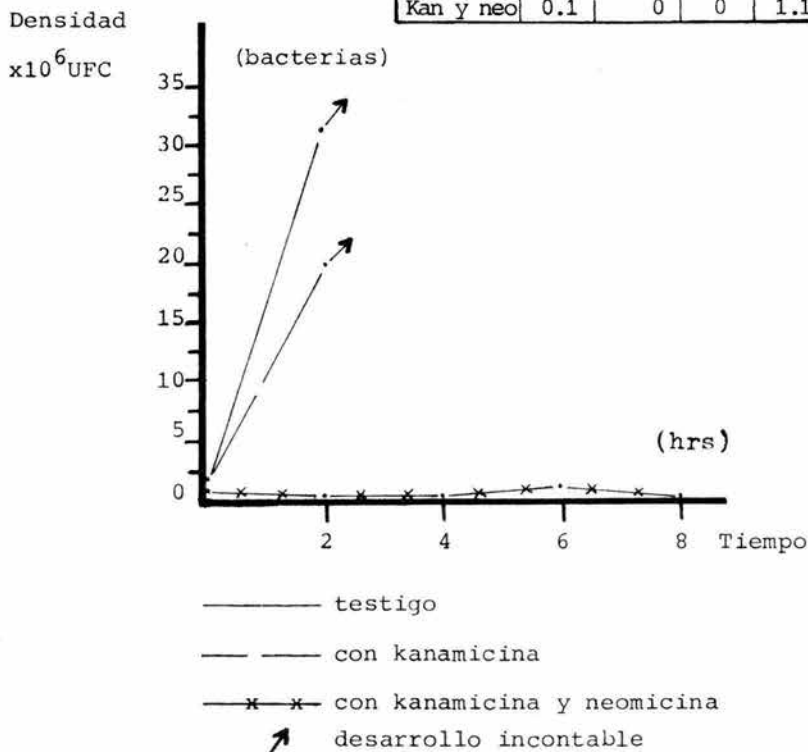


Gráfica 2

La población de K. pneumoniae se hace incontable desde las 2 hrs en el medio testigo, en presencia de kanamicina se ve inhibida hasta las 4 hrs y posteriormente se recupera. Cuando se emplea kanamicina y neomicina la inhibición se presenta desde el tiempo 0 pero, hay un ligero desarrollo a las 6 hrs del estudio y finalmente vuelve a --decrecer.

Densidad VS tiempo de inhibición de Enterobacter sp (cepa 30) en el medio de transporte.

Tiempo	0	2	4	6	8
Testigo	1.8	31.5	inc	inc	inc
Kan	1.8	20.0	inc	inc	inc
Kan y neo	0.1	0	0	1.1	0.1



Gráfica 3

La población de Enterobacter sp se hace incontable después de las 2 hrs en el medio testigo, en el medio con kanamicina no hay inhibición y la población se hace incontable después de las ---- 2 hrs. En presencia de kanamicina y neomicina se da una inhibición casi total durante todo el experimento.

% de conservación de la población de
facultativos en el medio de transporte

Tabla 20

Escherichia coli

Cepa	Medio	Tiempo 0	2	8
1	kan	100	16.8	(8.9)
	k y n	100	0	0
2	kan	100	91.5	incon
	k y n	96.7	0.6	(0.3)
3	kan	51.3	0	incon
	k y n	2.6	0	(1.1)
4	kan	66.6	8.0	(40)
	k y n	20.0	0	(0.1)
8	kan	87.0	3.7	incon
	k y n	0	0	(0.7)
51	kan	3.8	61.6	(32)
	k y n	0	0	(0.2)
96b	kan	7.1	19.6	(0.5)
	k y n	17.8	18.1	(0.4)

tiempo en horas
kan kanamicina
k y n kanamicina y neomicina
() valor $\times 10^6$ (no es posible obtener porcentajes)

Klebsiella pneumoniae

Cepa	Medio	Tiempo 0	2	8
46	kan	13.4	31.8	(4.9)
	k y n	5.4	0	(0.4)
119	kan	2.3	3.8	(29.7)
	k y n	0	0	(2.5)
121	kan	6.7	2.5	(48.9)
	k y n	0	0	(1.7)
701	kan	0	6.6	(50.2)
	k y n	0	6.6	(0.7)

Enterobacter sp

Cepa	Medio	Tiempo 0	2	8
14	kan	0	0	(47.8)
	k y n	0	0	0
30	kan	100	63.4	incon
	k y n	5.6	0	(0.1)
75	kan	8.0	15.7	(9.3)
	k y n	2.0	2.8	(0.2)
97	kan	96.7	40	incon
	k y n	0	0	(0.7)

tiempo en horas
kan kanamicina

k y n kanamicina y neomicina
() valor $\times 10^6$ UFC (no es posible obtener porcentajes).

De la prueba de conservación de los anaerobios en el medio de transporte se realizaron 2 experimentos y de sus valores se obtuvo un promedio para analizar su comportamiento (tabla 21).

La conservación de B. fragilis muestra cierta inhibición en el medio testigo y con antibióticos (gráfica 4). --- B. fragilis es la especie que se reporta como menos exigente en cuanto a condiciones anaerobias (crece bien a una concentración de 3% de oxígeno del ambiente) y por lo tanto de más fácil manejo y aislamiento, de todas las especies de Bacteroides ^{7,15}. Sin embargo fue la única especie cuya población se vio ligeramente inhibida en el medio testigo desde las 2 y -- hasta las 4 hrs. del estudio, probablemente debido a la manipulación de las bacterias durante la preparación e inocula--- ción de las suspensiones. Posteriormente la población se recu peró.

Las bacterias anaerobias se reportan como resistentes al empleo de los aminoglucósidos y por lo tanto son empleados como agentes selectivos en los medios para aislamiento de --- anaerobios en el Laboratorio de Referencia del CDC⁺. La especie B. fragilis es reportada como resistente a 1000 g/ml de kanamicina, sin embargo, en los medios de transporte con anti bióticos que se probaron se presenta cierta inhibición de-- su población al inicio del experimento. Cuando se usó sólo --

CDC⁺ Centro de Control de Enfermedades. Atlanta, Ga. USA.

kanamicina la población bajó a un 82,3% (tabla 22) con respecto al testigo apenas a las 2 hrs del estudio, ésta fue la baja más importante que se registró durante todo el tiempo ya que para las 4 hrs. se recuperó dicha población, conservándose en más del 90% hasta el final del experimento. En el medio con kanamicina y neomicina la población se ve ligeramente más afectada que con el uso de kanamicina solamente, se puede observar (gráfica 4) que a partir de las 2 hrs. se presenta --- cierta inhibición de la población la cual permanece hasta las 6 hrs. del estudio, ésta inhibición nunca fue menor del 82.3% y ya para el final del estudio se había recuperado (tabla 22). El desarrollo en los 3 medios de prueba es incontable para -- las 24 hrs.

La conservación de B. fragilis la especie de mayor -- importancia para recuperar en el medio de transporte por su -- alta incidencia en las muestras clínicas, es óptima en los me-- dios con antibióticos, en el medio con kanamicina la pobla--- ción se mantiene por arriba del 94.1% en promedio durante --- todo el experimento, y en el medio con kanamicina y neomicina se conserva por arriba del 91% en promedio (tabla 22).

B. melaninogenicus se reporta como una especie más exi-- gente en cuanto a requerimientos nutritivos pero resistente -- en cuanto al empleo de los aminoglucósidos, sin embargo fue -- la especie que mostró mayor sensibilidad a los antibioticos.

Como se puede observar (gráfica 5) se presenta una inhibición importante de la población en los medios con kanamicina y con kanamicina y neomicina desde el tiempo inicial --- (tiempo 0) del experimento, esto es probablemente la reacción inmediata de la parte sensible de la población cuando se ve expuesta a los antibióticos. En este momento en presencia de kanamicina la población disminuye a un 57.8% con respecto al testigo y en presencia de los dos antibióticos baja a un 55% (tabla 22), es decir el efecto inhibitorio de ambos antibióticos es ligeramente mayor desde el tiempo inicial y esta diferencia se presentó en todos los muestreos.

A las 2 hrs. la población se mantiene inhibida casi en las mismas proporciones, pero lo importante es que no se --- registró un decremento mayor. La mejor conservación de esta especie se presenta después de las 2 hrs debido a que las poblaciones comienzan a incrementarse progresivamente en ambos medios (gráfica 5) y para las 8 hrs. de prueba el medio con kanamicina conserva un 87% de la población y el que contiene ambos antibióticos conserva un 72.5% (tabla 22).

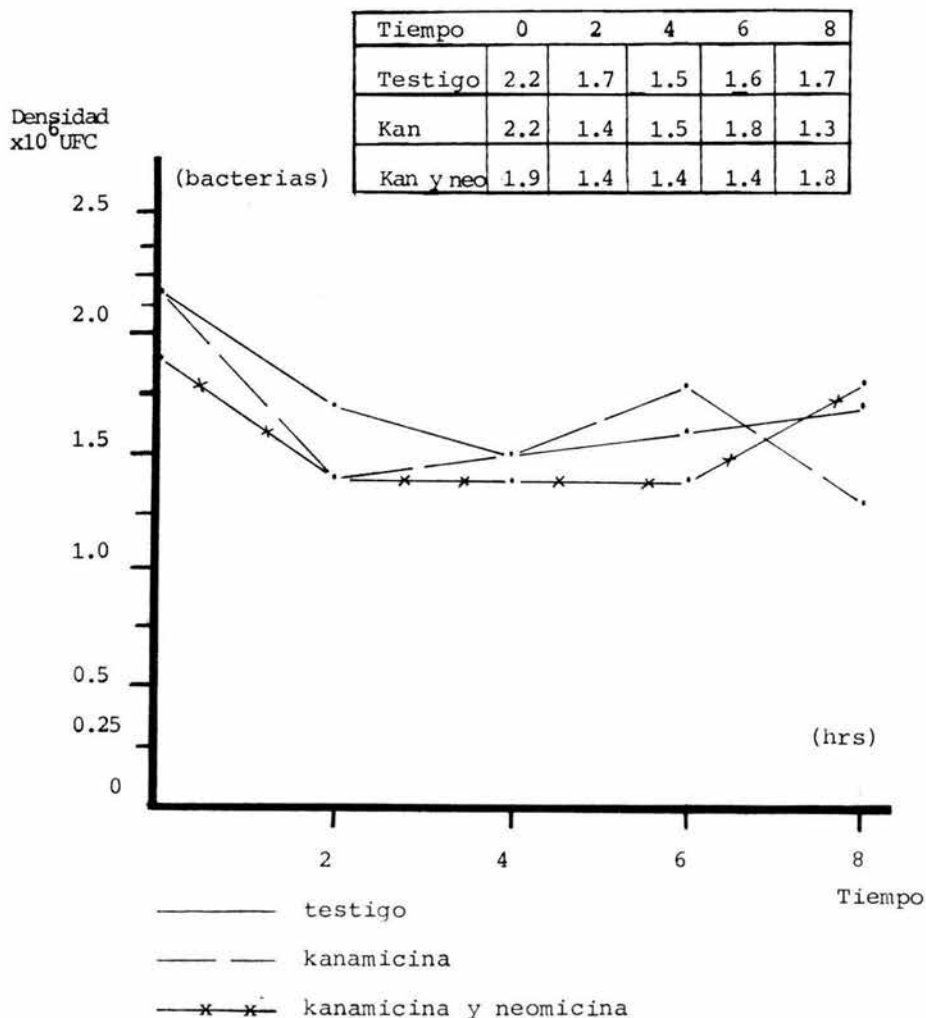
La población de Peptostreptococcus sp que se registra al inicio del experimento en el medio testigo se desarrolla con gran rapidez y para las 4 hrs era ya incontable, a diferencia de las otras 2 especies de anaerobios que sí mostraron decremento en sus poblaciones en el medio testigo (gráfica 6)

Aunque Peptostreptococcus sp se considera como un anaerobio - estricto tal parece que soportó muy bien las condiciones de - manejo en el laboratorio, esto puede ser debido a que los cocos anaerobios pueden mostrar sorprendentemente propiedades microaerofílicas ¹³,

Esta especie también fue de las menos afectadas (junto con B. fragilis) por la adición de los antibióticos en el medio de transporte. El único decremento que sufrió la población fue al inicio del estudio cuando se registró solo un --- 70% de la misma en el medio con kanamicina y un 67.5% en el - medio con kanamicina y neomicina. A las 2 hrs las poblaciones en los medios de prueba se han incrementado bastante (gráfica 6) y para las 4 hrs mostraron un desarrollo incontable (tabla 22).

Como se puede observar la conservación de Peptostreptococcus sp en el medio de transporte a valorar es satisfactoria durante las 8 hrs de prueba.

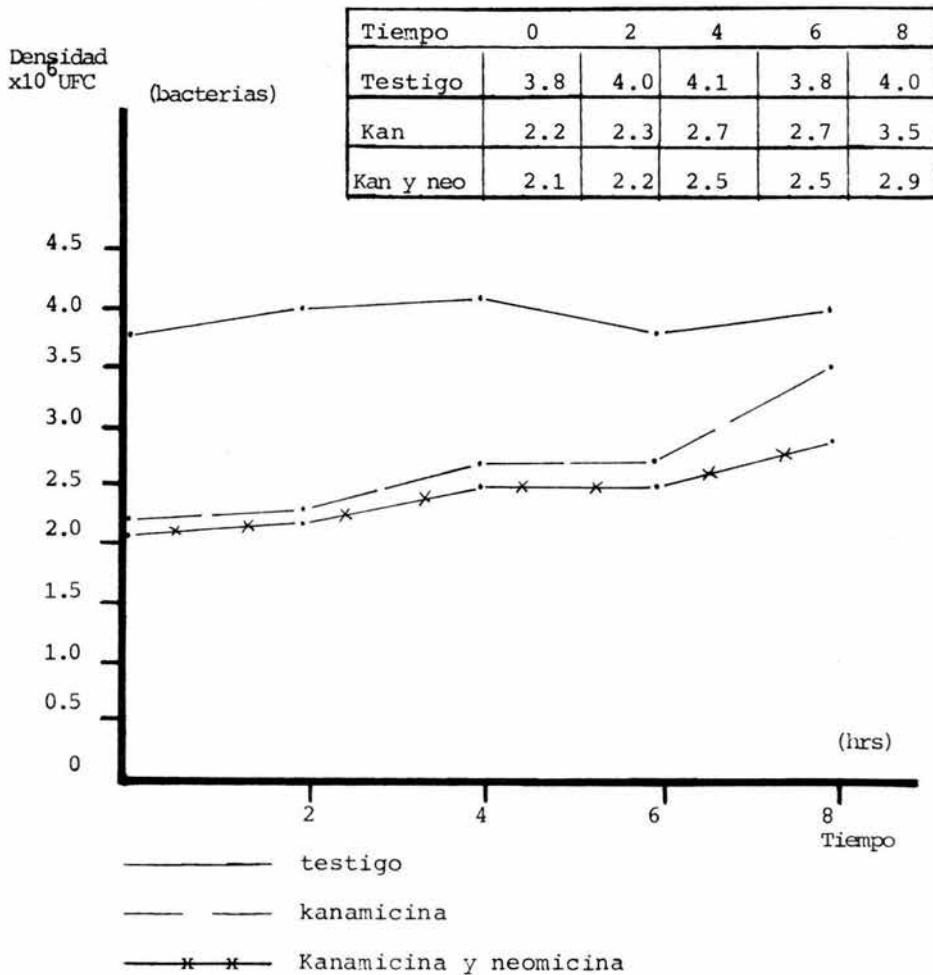
Densidad VS tiempo de conservación de B. fragilis en el medio de transporte.



Gráfica 4

La población de B. fragilis en el testigo decrece del tiempo 0 y hasta las 4 hrs, posteriormente se incrementa. En presencia de kanamicina también hay decremento de la población a las 2 hrs pero desaparece para las 4 hrs. En presencia de los dos antibióticos la inhibición de la población es ligeramente mayor.

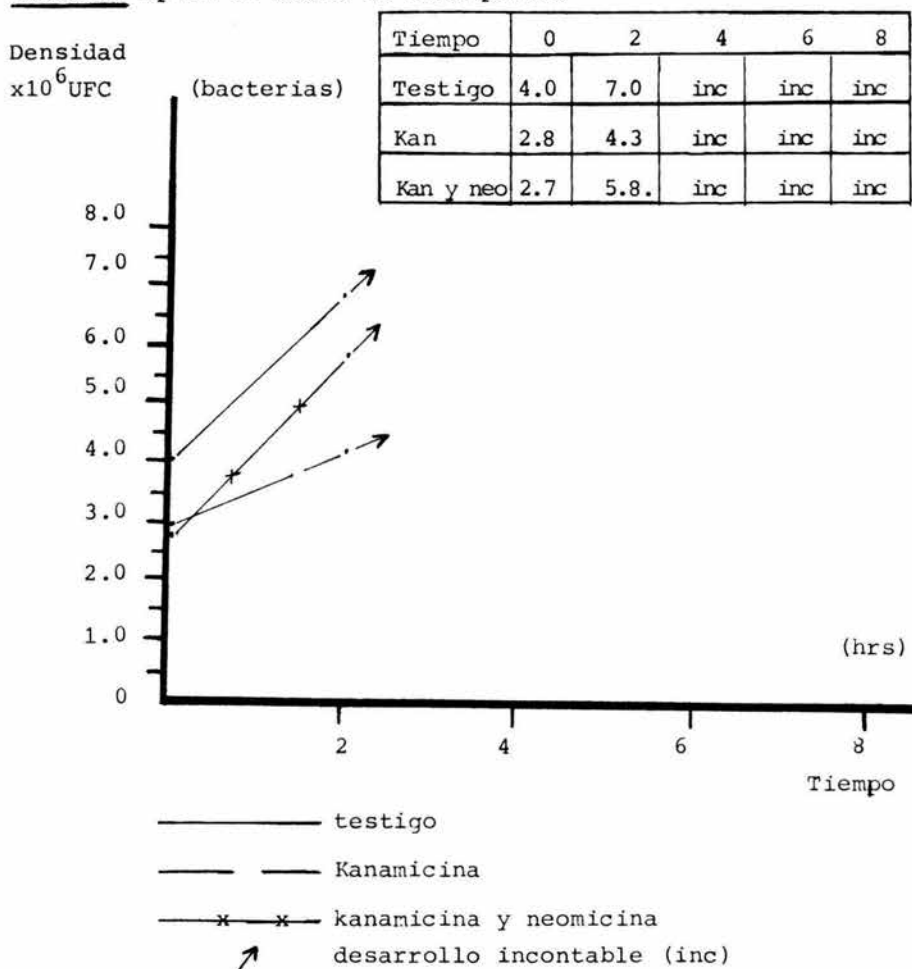
Densidad VS Tiempo de conservación de B. melaninogenicus en el medio de transporte.



Gráfica 5

La población de B. melaninogenicus en el medio testigo permanece casi constante las 8 hrs de prueba. En presencia de kanamicina la población se ve muy disminuida de las 0 a las 2 hrs, posteriormente se incrementa. En presencia de ambos antibióticos la inhibición de la población es ligeramente mayor que en el medio anterior pero se recupera al final del estudio.

Densidad (UFC) VS Tiempo de conservación (hrs) de Peptostreptococcus sp en el medio de transporte.



Gráfica 6 La población de Peptostreptococcus sp en el medio testigo se hace incontable después de las 2 hrs.- Las poblaciones en los medios con kanamicina y -- con kanamicina y neomicina presentan cierta inhibición al tiempo 0 pero se recuperan para las -- 2 hrs y posteriormente se hacen incontables, conservándose así hasta las 8 hrs.

Tiempo de conservación (promedio) de anaerobios en el medio de transporte

B. fragilis

Tabla 21

Tiempo	0	2	4	6	8	24
Medio:						
testigo	2.2*	1.7	1.5	1.6	1.7	incon
kan	2.2	1.4	1.5	1.8	1.3	incon
kan y neo	1.9	1.4	1.4	1.4	1.8	incon

B. melaninogenicus

Tiempo	0	2	4	6	8	24
Medio:						
testigo	3.8*	4.0	4.1	3.8	4.0	incon
kan	2.2	2.3	2.7	2.7	3.5	incon
kan y neo	2.1	2.2	2.5	2.5	2.9	incon

Peptostreptococcus sp

Tiempo	0	2	4	6	8	24
Medio:						
testigo	4.0*	7.0	incon	incon	incon	incon
kan	2.8	4.3	incon	incon	incon	incon
kan y neo	2.7	5.8	incon	incon	incon	incon

Tiempo en hrs
 * $\times 10^6$ UFC (todos los valores de las tablas)
 kan kanamicina (100 μ g/ml)
 kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
 incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

% de conservación de la población de anaerobios en el medio de transporte

Tabla 22

B. fragilis

Tiempo	0	2	4	6	8	24
Medio						
kan	100%	82.3	93.3	112.5	76.4	incon
kan y neo	86.3	82.3	93.3	87.5	105.8	incon

B. melaninogenicus

Tiempo	0	2	4	6	8	24
Medio						
kan	57.8%	57.5	65.8	71.0	87.5	incon
kan y neo	55.2%	55.0	60.9	65.7	72.5	incon

Peptostreptococcus sp

Tiempo	0	2	4	6	8	24
Medio						
kan	70.0%	61.4	incon	incon	incon	incon
kan y neo	67.5	82.8	incon	incon	incon	incon

Tiempo en hrs
kan kanamicina (100 μ g/ml)
kan y neo kanamicina y neomicina (100 μ g/ml de cada uno)
incon desarrollo incontable (más de 1000 colonias)

Al analizar los resultados obtenidos al mezclar a los anaerobios y facultativos se puede observar que en general se reproduce el fenómeno que ya se había registrado antes al estudiar las especies individualmente es decir, los medios con antibióticos tuvieron cierto efecto inhibitor sobre los anaerobios que deberían ser resistentes. El efecto inhibitor de estos medios sobre los facultativos fue tan satisfactorio como ya se había observado, especialmente en el medio con kanamicina y neomicina.

Cuando se mezcló a B. fragilis con las especies facultativas en proporción 1:1 pudo observarse un comportamiento semejante en 3 de los 4 experimentos que se realizaron. La gráfica 7 de la mezcla entre B. fragilis y E. coli cepa 4 es representativa de este comportamiento. Puede observarse que los medios con antibióticos inhiben parcialmente a la población del anaerobio especialmente después de las 2 hrs del estudio y por lo general se conserva así hasta el final del experimento. La inhibición es ligeramente mayor en el medio -- con ambos antibióticos sin embargo, en la mayoría de los casos no existe una gran diferencia. En algunas ocasiones la población del anaerobio en el medio con antibióticos sobrepasa a la presente en el medio con kanamicina únicamente, en -- otras ocasiones hay un aumento o disminución brusco de la población a una hora en la que no se esperaría esta respuesta -- tal como ocurre también con los facultativos, esto es probable que se deba al efecto de los mismos antibióticos (por el

fenómeno de resistencia tipo estreptomycin que presentan) - sobre los microorganismos sensibles de la población.

En general en los experimentos realizados con B. fragilis la población se conserva desde el tiempo 0 hasta las 8 hrs del estudio por arriba del 50% y en algunos casos hasta un 100% en ambos medios de transporte de prueba (tabla 23), sin embargo la conservación es máxima de las 0 a las 2 hrs -- del estudio en dichos medios (tabla 26).

En cuanto a su capacidad de inhibición sobre las especies facultativas también se obtuvieron resultados satisfactorios en los 4 experimentos realizados con B. fragilis. Puede observarse en la misma gráfica 7 (de comportamiento promedio) que la población de E. coli se vió totalmente inhibida desde las 2 hrs y así se mantuvo hasta las 6 hrs de prueba en el medio con kanamicina y neomicina, mientras que en el medio con kanamicina únicamente la población se mantuvo alta hasta las 4 hrs, después a las 6 hrs se vió totalmente inhibida y para las 8 hrs se volvió a presentar desarrollo.

En este experimento así como en los otros realizados con B. fragilis pudo detectarse el mayor poder inhibidor del medio con kanamicina y neomicina sobre la población de los -- facultativos en comparación con el medio que solo contiene kanamicina es decir, en el medio con ambos antibióticos la inhi

bición de la población es por lo general del 100% y abarca un intervalo de tiempo entre las 0 y las 4 hrs mientras que en el segundo medio la inhibición solo se presenta a una hora de terminada y en otras ocasiones hay resistencia del facultativo (tabla 26).

Es cuando se analiza la capacidad de inhibición sobre los facultativos, que se valora la ventaja que representa el uso del medio con kanamicina y neomicina para el transporte y selección de B. fragilis ya que logra conservar su población durante las 8 hrs pero en especial durante las primeras 4 hrs, y además ejerce una inhibición total de las especies facultativas entre las 0 y las 2 hrs de prueba en promedio -- (tabla 26).

Cuando se probó la mezcla entre B. melaninogenicus y los facultativos se encontró que es la especie anaerobia más sensible a la presencia de los antibióticos en el medio de transporte, esto ya se había observado anteriormente y ahora se repitió en los experimentos realizados.

Como se puede observar en la gráfica 8 de la mezcla entre B. melaninogenicus y K. pneumoniae cepa 119 la población del anaerobio se conserva satisfactoriamente durante las 2 primeras horas de prueba en los medios con antibióticos ya que, a partir de las 4 hrs, la población comienza a -

disminuir en ambos medios con respecto a la población del tes tigo y así se mantiene hasta las 6 hrs, finalmente a las 8 -- hrs la población se ha recuperado.

Este comportamiento se presentó también en los otros- 2 experimentos que se realizaron con B. melaninogenicus, es - decir, se obtiene una conservación de más del 50% de la pobla- ción durante las 2 primeras horas y posteriormente entre las- 4 y las 6 hrs esta se ve muy disminuida llegando en ocasiones a conservarse solo el 36.3% (cuando se probó en mezcla con -- Enterobacter sp). En 2 de los 3 experimentos la población se ve recuperada a las 8 hrs (tabla 24).

Con respecto a la inhibición de las especies faculta- tivas, K. pneumoniae cepa 119 (gráfica 8) se vió inhibida to- talmente desde las 0 a las 6 hrs en el medio con kanamicina - y neomicina, mientras que en el medio con kanamicina la inhi- bición se presentó de las 0 a las 2 hrs. Cuando se probó la- mezcla con E. coli cepa 1, la inhibición se presentó de las 2 a las 8 hrs en ambos medios y cuando se probó con Enterobac- ter sp cepa 75 esta fue resistente en los 2 medios de trans-- porte (tabla 26).

Es de notar que esta especie cuando se estudió indivi- dualmente mostró mayor sensibilidad a los antibióticos las 2- primeras horas de prueba (sin embargo la población se conser-

vió en más del 50% en este intervalo). Cuando se probó esta -- especie ahora en mezcla con los facultativos el período de ma yor conservación fue precisamente este intervalo de tiempo. Tomando en cuenta que esta especie al igual que las otras especies de anaerobios por lo general se encuentran en mezcla - o acompañadas de especies facultativas en las muestras clínicas, es considerable que el medio de transporte se maneje en el intervalo de tiempo en el que la conservación de B. melani nogenicus es mayor y la inhibición del facultativo es máxima - cuando se encuentran en asociación, en este caso, el tiempo - adecuado para usar el medio de transporte serían las 2 prime - ras horas.

Cuando se probó la conservación de Peptostreptococcus - sp individualmente en el medio de transporte con antibióticos pudo observarse que fue la especie menos sensible al efecto - de los mismos. Ahora que se estudió en mezcla con E. coli - se observaron los mismos resultados. La gráfica 9 muestra -- como el desarrollo de su población en los medios con kanamici - na y con kanamicina y neomicina aunque fue parcialmente menor que la del medio testigo, se conservó cercana a ella durante todo el experimento.

La población del anaerobio se conservó por arriba de - un 84% en promedio en ambos medios de transporte durante las - primeras 4 hrs de prueba, posteriormente se vió ligeramente -

disminuida pero siguió conservandose bien (más del 65%) hasta el final del estudio (tabla 25). La inhibición de E. coli se presentó de las 2 a las 6 hrs y fue del 100% en el medio con ambos antibióticos, en el medio con kanamicina únicamente la cepa fue resistente durante las 8 hrs de prueba (tabla 26). Por lo tanto el intervalo de tiempo más adecuado para la conservación y aislamiento de esta especie sería de las 2 a las 6 hrs en el medio con los dos antibióticos.

La prueba realizada con las mezclas en la proporción 1:10 (facultativo:anaerobio) se hizo considerando que en las muestras clínicas probablemente se encuentre una mayor concentración de microorganismos anaerobios sobre los facultativos por lo siguiente: en condiciones normales en la flora saprófita del intestino humano se encuentra una concentración de 1000:1 anaerobios con respecto a los facultativos, por lo tanto si ocurre una lesión del mismo y su contenido invade los tejidos vecinos normalmente estériles, es posible que en la muestra proveniente de este sitio predominen en concentración los microorganismos anaerobios.

Al hacer este estudio se encontraron resultados semejantes a los obtenidos de la proporción 1:1. Como puede observarse (tabla 28) la conservación de B. fragilis vuelve a mantenerse en promedio durante las 8 hrs del estudio en ambos medios de transporte en 3 de los 4 experimentos realizados. -

Cuando se probó a B. fragilis y Enterobacter sp (cepa 30) la población del anaerobio se conservó sólo hasta las 2 hrs de prueba y posteriormente se vió muy disminuida. En cuanto a la inhibición de los facultativos el medio con kanamicina y neomicina fue el único que logró la inhibición de todas las especies facultativas entre las 0 y las 2 hrs en promedio.

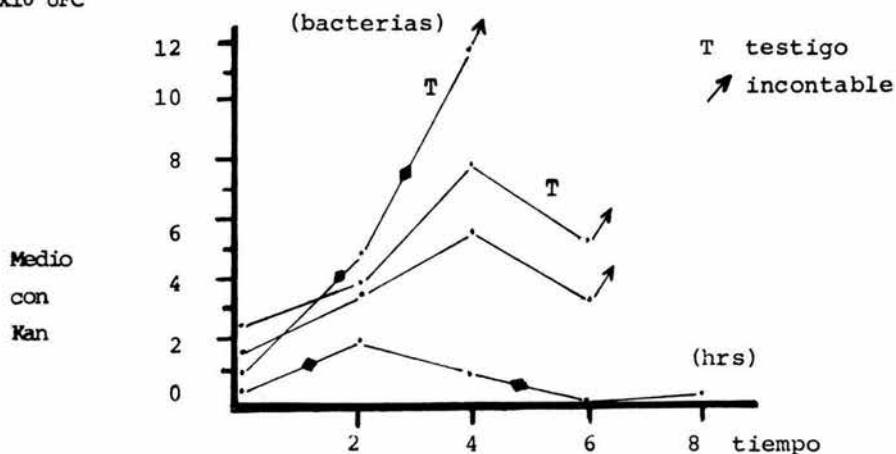
En cuanto a la conservación de B. melaninogenicus, esta fue satisfactoria hasta las 4 hrs de prueba en ambos medios con antibióticos (en 2 de los 3 experimentos). La inhibición de los facultativos fue óptima en los dos medios de transporte de las 0 a las 6 hrs, sólo la cepa de Enterobacter sp {75} fue resistente (tabla 28).

La conservación de Peptostreptococcus sp se logró durante las 8 hrs de prueba y la inhibición de E. coli (cepa 2) sólo se obtuvo en el medio con kanamicina y neomicina de las 2 a las 8 hrs (tabla 28).

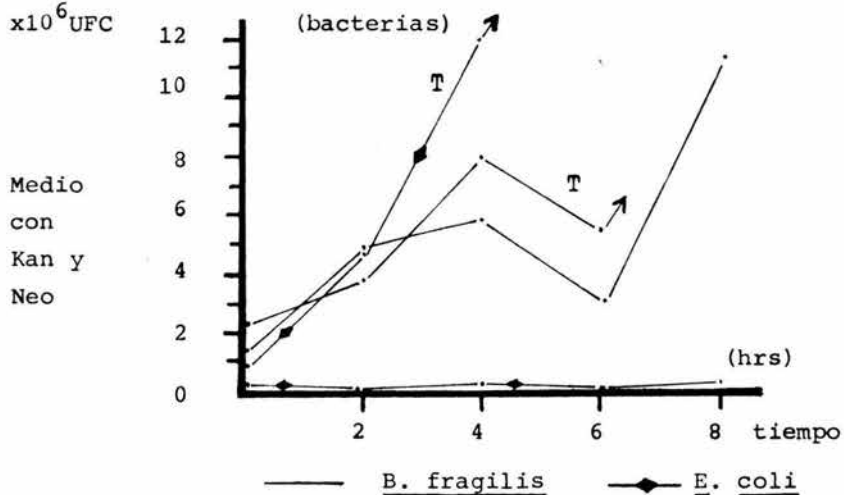
Cuando se mezclaron entre sí los anaerobios B. fragilis y Peptostreptococcus sp pudo observarse que las poblaciones de ambas especies se conservan por arriba del 60% en los dos medios con antibióticos hasta las 4 hrs de prueba, posteriormente las poblaciones se incrementan lentamente en comparación con el desarrollo incontable que alcanzó en el medio testigo, pero siguieron conservándose óptimamente hasta las 8 hrs de estudio (tabla 29). A las 24 hrs todas las poblaciones fueron incontables.

Densidad VS Conservación de B. fragilis y E. coli (cepa 4) - en el medio de transporte.

$\times 10^6$ UFC



$\times 10^6$ UFC



Gráfica 7 La población de B. fragilis se conserva mejor hasta las 4 hrs de prueba en los dos medios con antibióticos. La inhibición de la población de E. coli es mayor en el medio con kanamicina y neomicina durante las 8 hrs de prueba.

% de Conservación de B. fragilis y las especies
facultativas en el medio de transporte

(1:1)

Tabla 23

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	62.5%	89.4	72.5	62.9	incon
	kan y neo	60.8	+ 100	72.5	55.5	(10.5)
<u>E. coli</u> (cepa 4)	kan	42.8	40.4	6.36	0	(0.2)
	kan y neo	28.5	0	0.6	0	(0.1)

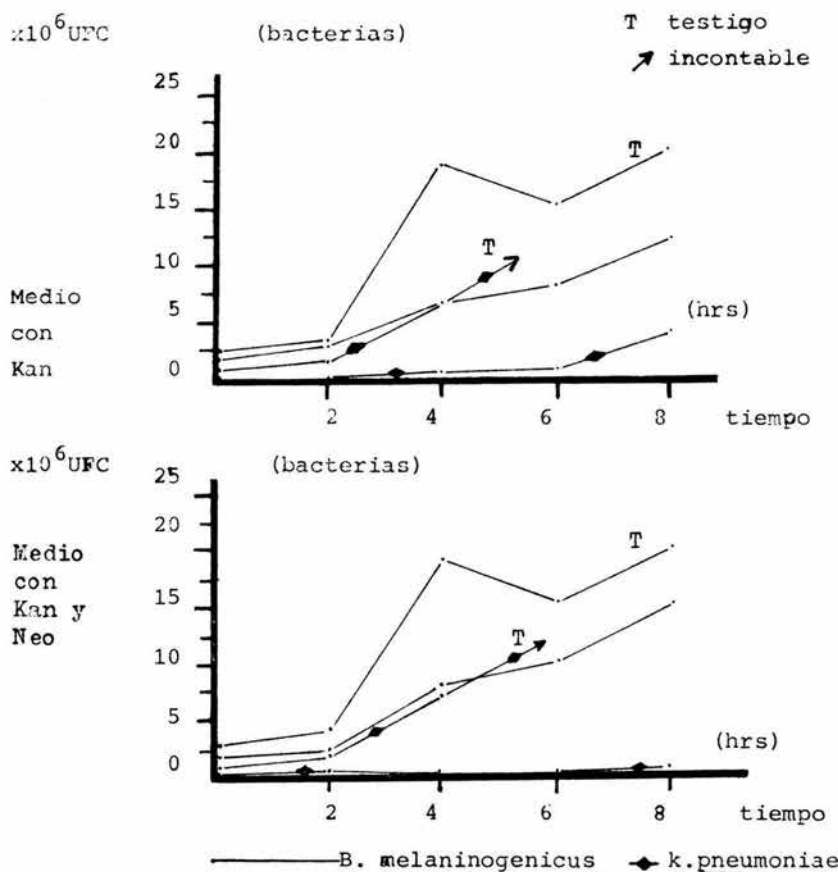
Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	100%	60.0	40.0	60.0	80.0
	kan y neo	+100	58.0	50.0	50.0	60.0
<u>E. coli</u> (cepa 8)	kan	85.7	2.9	0	(8.8)	incon
	kan y neo	14.2	0	0	(0.2)	(13)

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	60.0%	64.2	68.4	(13)	incon
	kan y neo	62.0	64.2	51.5	(13)	incon
<u>K. pneumoniae</u> (cepa 46)	kan	0	8.0	1.2	(2.3)	(4.6)
	kan y neo	0	0	0.6	(0.4)	(0.1)

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	100%	48.0	66.6	80.0	87.5
	kan y neo	66.6	40.0	70.0	80.0	+100
<u>Enterobacter</u> sp (cepa 30)	kan	+100	71.4	75.0	incon	incon
	kan y neo	0	0	1.7	(11.5)	(20)

tiempo en horas
kan medio con kanamicina
kan y neo medio con kanamicina y neomicina
incon desarrollo incontable
() valores $\times 10^6$ UFC porque no es posible obtener porcen-
taje
+ más del 100%

Densidad VS Conservación de B. melaninogenicus y K. pneumoniae (cepa 119) en el medio de transporte.



Gráfica 8 La población de B. melaninogenicus se conserva mejor hasta las 2 hrs de prueba, posteriormente disminuye en los medios con antibióticos con respecto al testigo. La inhibición de K. pneumoniae es casi total durante las 8 hrs en el medio con kanamicina y neomicina.

% de Conservación de B. melaninogenicus y las especies facultativas en el medio de transporte

(1:1)

Tabla 24

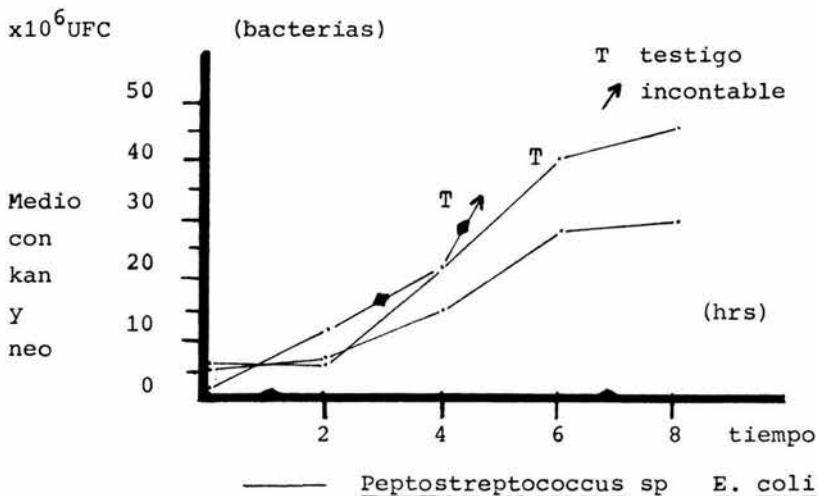
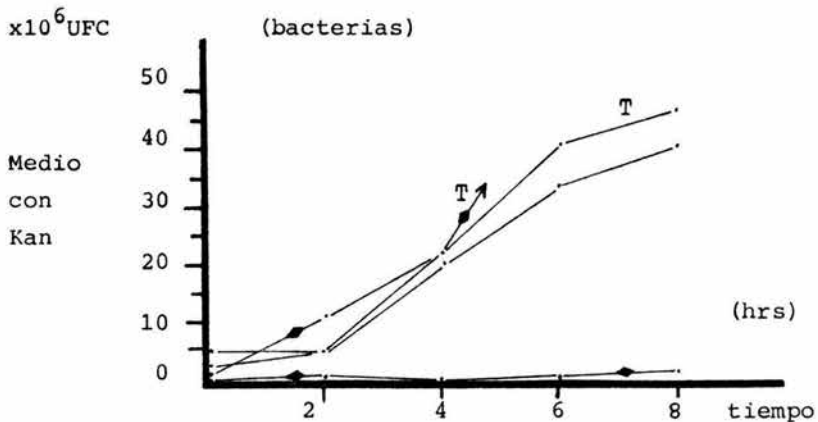
Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. melaninogenicus</u>	kan	81.8%	56.8	(4.0)	(5.1)	incon
	kan y neo	68.1	51.9	(4.5)	(5.8)	incon
<u>E. coli</u> (cepa 1)	kan	7.8	0	0	0	0
	kan y neo	5.2	0	0	0	0

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. melaninogenicus</u>	kan	78.5%	78.9	36.8	53.3	60.0
	kan y neo	57.1	52.6	42.1	66.6	75.0
<u>K. pneumoniae</u> (cepa 119)	kan	0	0	0	(0.6)	(4.1)
	kan y neo	0	0	0	0	(0.3)

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. melaninogenicus</u>	kan	85.7%	62.5	36.3	(19)	(25)
	kan y neo	85.7	62.5	36.3	(16)	(18)
<u>Enterobacter</u> sp (cepa 75)	kan	37.8	83.3	49.7	incon	incon
	kan y neo	18.9	43.3	42.5	(20)	(21.3)

tiempo en horas
kan medio con kanamicina
kan y neo medio con kanamicina y neomicina
incon desarrollo incontable
() valores $\times 10^6$ UFC porque no es posible obtener porcentajes.

Densidad VS Conservación de Peptostreptococcus sp y E. coli (cepa 2) en el medio de transporte.



Gráfica 9

La población de Peptostreptococcus sp se conserva cercana a la del testigo durante las primeras 4 hrs, posteriormente se ve parcialmente inhibida en los medios con antibióticos. La inhibición de E. coli es casi total durante las 8 hrs en el medio con kanamicina y neomicina.

% de Conservación de Peptostreptococcus sp
y E. coli en el medio de transporte

(1:1)

Tabla 25

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>Peptostrep-</u> <u>tococcus</u> sp	kan	56.8%	98.1	92.3	81.6	87.1
	kan y neo	84.3	+100	84.2	69.4	65.3
<u>E. coli</u> (cepa 2)	kan	70	9.1	1.3	(0.6)	(1.4)
	kan y neo	20	0	0	0	(0.1)

tiempo horas

kan medio con kanamicina

kan y neo medio con Kanamicina y neomicina.

incon desarrollo incontable

() valores $\times 10^6$ UFC porque no es posible obtener -
porcentaje

+ más del 100%

Rango de mayor conser
vación del anaerobio

Rango de mayor inhibición
del facultativo

(1:1)

Tabla 26

<u>B. fragilis</u>	Especie	Medio con	
		kanamicina	kanamicina y neomicina
<u>B. f</u> 0 a las 4 hrs	<u>E. coli</u> (4)	solo a las 6 hrs	2 a las 6 hrs
<u>B. f</u> 0 a las 2 hrs	<u>E. coli</u> (8)	solo a las 4 hrs	2 a las 4 hrs
<u>B. f</u> 0 a las 4 hrs	<u>K. pneumoniae</u> (46)	solo a las 0 hrs	0 a las 2 hrs
<u>B. f</u> 4 a las 8 hrs	<u>Enterobacter</u> sp (30)	resistente	0 a las 2 hrs

<u>B. melaninogenicus</u>	Especie	Medio con	
		kanamicina	kanamicina y neomicina
<u>B. m</u> 0 a las 2 hrs	<u>E. coli</u> (1)	2 a las 8 hrs	2 a las 8 hrs
<u>B. m</u> 0 a las 2 hrs	<u>K. pneumoniae</u> (119)	0 a las 2 hrs	0 a las 6 hrs
<u>B. m</u> 0 a las 2 hrs	<u>Enterobacter</u> sp (75)	resistente	resistente

<u>Peptostreptococcus</u> SP	Especie	Medio con	
		kanamicina	kanamicina y neomicina
<u>P. sp</u> 0 a las 4 hrs	<u>E. coli</u> (2)	resistente	2 a las 6 hrs

Nota.- el rango de conservación del anaerobio es promedio en los dos medios de transporte, con kanamicina y con kanamicina y neomicina.

% de Conservación de B. fragilis y las especies facultativas en el medio de transporte

(1:1)

Tabla 27

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	+100	96.6	94.3	(29.4)	incon
	kan y neo	+100	95.7	62.2	(20.8)	(25.0)
<u>E. coli</u> (cepa 4)	kan	68.1	27.9	4.7	0	0
	kan y neo	72.7	0	0	0	0

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	95.2	80.0	+100	+100	(20)
	kan y neo	95.2	+100	+100	+100	(20)
<u>E. coli</u> (cepa 8)	kan	20.0	41.6	4.2	(4.9)	(14.4)
	kan y neo	40.0	0	0.7	(0.3)	3.0)

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	64.4	60.0	(10.0)	(9.0)	(10.0)
	kan y neo	+100	100	(12.1)	(10.0)	(9.0)
<u>K. pneumoniae</u> (cepa 46)	kan	10.5	1.3	(2.1)	(4.3)	(0.1)
	kan y neo	0	0.6	0	(0.3)	0

Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. fragilis</u>	kan	+100	+100	33.3	37.5	25.5
	kan y neo	75	+100	77.7	87.5	38.8
<u>Enterobacter</u> sp (cepa 30)	kan	64	+100	84.1	incon	incon
	kan y neo	0	0	1.1	(6.0)	incon

tiempo en horas
 kan medio con kanamicina
 kan y neo medio con kanamicina y neomicina
 incon desarrollo incontable
 () x10⁶UFC porque no es posible obtener porcentajes
 + más del 100%

% de Conservación de B. melaninogenicus y las especies facultativas en el medio de transporte

		(1:10)				
Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. melaninogenicus</u>	kan	80	57.8	incon	incon	incon
	kan y neo	+100	66.6	incon	incon	incon
<u>E. coli</u> (cepa 1)	kan	0	0	0	0	0
	kan y neo	0	0	0	0	0
Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. melaninogenicus</u>	kan	+100	91.6	84.5	75	71.4
	kan y neo	85.7	+100	44.7	26	28.5
<u>K. pneumoniae</u> (cepa 119)	kan	0	0	0	(0.8)	(1.0)
	kan y neo	0	0	0	0	(0.7)
Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>B. melaninogenicus</u>	kan	40.4	42.8	(5.7)	+100	(29.5)
	kan y neo	40.4	38.9	(3.0)	99	(20.0)
<u>Enterobacter</u> sp (cepa 75)	kan	60	45.1	(18.5)	incon	incon
	kan y neo	75	16.3	(20.8)	(20.0)	(20.4)

% de Conservación de Peptostreptococcus sp y E. coli en el medio de transporte

		(1:10)				
Mezcla	tiempo	0	2	4	6	8
<u>Peptostrep-</u> <u>tococcus</u> sp	kan	incon	(38.0)	incon	(43.1)	incon
	kan y neo	(25.0)	(25.0)	incon	(18.0)	incon
<u>E. coli</u> (cepa 2)	kan	48.2	32.9	3.2	(10.0)	(0.8)
	kan y neo	34.4	0	0	0	0

Rango de mayor conser-
vación del anaerobio

Rango de mayor inhibición
del facultativo

(1:10)

Tabla 28

<u>B. fragilis</u>		Especie	Medio con	
			kanamicina	kanamicina y neomicina
<u>B. f</u>	0 a las 8 hrs	<u>E. coli</u> (4)	6 a las 8 hrs	2 a las 8 hrs
<u>B. f</u>	0 a las 8 hrs	<u>E. coli</u> (8)	resistente	solo a las 2 hrs
<u>B. f</u>	0 a las 8 hrs	<u>K. pneumo- niae</u> (46)	resistente	0 a las 4 hrs
<u>B. f</u>	0 a las 2 hrs	<u>Enterobac- ter sp</u> (30)	resistente	0 a las 2 hrs

<u>B. melaninogenicus</u>		Especie	Medio con	
			kanamicina	kanamicina y neomicina
<u>B. m</u>	0 a las 8 hrs	<u>E. coli</u> (4)	0 a las	0 a las 8 hrs
<u>B. m</u>	0 a las 4 hrs	<u>K. pneumo- niae</u> (119)	0 a las 4 hrs	0 a las 6 hrs
<u>B. m</u>	6 a las 8 hrs	<u>Enterobac- ter sp</u> (75)	resistente	resistente

<u>Peptostreptococcus sp</u>		Especie	Medio con	
			kanamicina	kanamicina y neomicina
<u>P. sp</u>	0 a las 8 hrs	<u>E. coli</u> (2)	resistente	0 a las 8 hrs

Nota.- el rango de conservación del anaerobio es promedio en los dos medios con antibióticos.

% de Conservación de B. fragilis y Peptostreptococcus
sp en el medio de transporte

Tabla 29

B. fragilis

Medio	tiempo	0	2	4	6	8
kan		100%	76	+100	(85)	(101)
kan y neo		80	+100	+100	(98)	(109)

Peptostreptococcus sp

Medio	tiempo	0	2	4	6	8
kan		63.3%	97.6	87.6	(95)	(140)
kan y neo		60.0	60.4	70.3	(102)	(130)

tiempo tiempo en horas

kan medio con kanamicina

kan y neo medio con kanamicina y neomicina

() valores $\times 10^6$ UFC porque no es posible obtener porcentajes

+ más del 100%

En general podemos decir que nuestros resultados son - satisfactorios debido a que se logra recuperar a la mayor parte de la población de B. fragilis y Peptostreptococcus sp durante las 8 hrs de prueba, y la de B. melaninogenicus durante las primeras 2 hrs.

En la mayoría de los estudios de recuperación de anaerobios se hacen evaluaciones a las 0, 2, 24, 48 y en ocasiones hasta las 72 hrs de conservación de las muestras o las cepas en los métodos de transporte ^{18, 20, 27, 33}. El presente estudio incluyó un rango de las 0 a las 8 hrs y se realizó una evaluación posterior a las 24 hrs, tomando en cuenta que el medio valorado sería utilizado para la inoculación de muestras obtenidas de las cirugías de urgencia nocturnas y con este periodo de tiempo sería suficiente para cubrir las necesidades.

Cuando Hoffman y col²⁰ realizaron su estudio de recuperación de anaerobios de importancia clínica (entre ellos B. fragilis, B. melaninogenicus, F. necrophorum y Peptostreptococcus sp) utilizaron cultivos de cepas de referencia y los métodos de transporte que evaluaron fueron un tubo aeróbico seco, un agar anaeróbico y el medio modificado de Stuart, de ello obtuvo que el porcentaje de recuperación más alto se presentó en el tubo aeróbico seco y fue del 44%. Esto demuestra lo inadecuado que son estos métodos de transporte para la

conservación de los anaerobios y sin embargo son de uso generalizado en los laboratorios.

Yrios y col³³ incluyeron un método más a los anteriores un tubo libre de O₂ con atmósfera de CO₂ y fue el que le dio mejores resultados ya que obtuvo la recuperación de la mayoría de los anaerobios hasta las 24 hrs (incluyendo a B. fragilis, B. melaninogenicus y Peptostreptococcus sp), sin embargo a las 48 hrs sólo B. fragilis siguió conservándose. En la bibliografía se reporta a la especie B. fragilis (que incluye 6 subespecies) como el anaerobio menos exigente en cuanto a su necesidad de condiciones anaerobias y por lo tanto a su manejo ya que presenta cierta tolerancia al oxígeno atmosférico - 9, 15, 24. En el estudio de Yrios y col, así como en nuestro estudio fue una especie relativamente fácil de manejar y recuperar. En el medio de transporte propuesto, es decir en el medio Tioglicolato con carne picada la conservación de la especie es óptima durante todo el período de estudio (8 hrs), - esto es muy importante por ser la especie de mayor importancia clínica debido a su incidencia en los aislamientos así -- como por el efecto patogénico que provoca (generalmente formación de abscesos en la cavidad peritoneal).

Yrios también encontró que B. melaninogenicus es uno de los anaerobios patógenos más delicados para conservar en los medios de transporte, él encontró que ésta especie fue --

viable solo hasta las 24 hrs de estudio y nosotros encontramos que se recupera durante las 8 hrs de transporte, pero su población es baja (en el medio testigo que idealmente no debería tener ningún efecto inhibitor ya que no contiene antibióticos), no obstante que se empleó hemina y menadiona en el medio de transporte, los cuales son requerimientos esenciales para su buen desarrollo ^{15, 24}.

Helstad y col¹⁸ realizaron su estudio de recuperación de anaerobios utilizando muestras clínicas de diferentes orígenes, las cuales fueron transportadas en tubos al vacío; uno inoculado con jeringa y otro con hisopo, y el medio Cary - Blair, de esto obtuvieron que el mayor número de aislamientos fueron anaerobios (61%) y de ellas la especie predominante fue B. fragilis, de los 3 métodos el más eficiente en la recuperación fue el tubo al vacío inoculado con jeringa a las 48 hrs.

Sin embargo reporta el problema del sobrecrecimiento de las especies facultativas (principalmente E. coli, K. pneumoniae y Citrobacter sp) lo cual dificulta el aislamiento de los anaerobios y muchas veces lo impide. Con el propósito de evitar este problema al medio Tioglicolato se le añadió kanamicina y luego kanamicina y neomicina como agentes selectivos contra las especies facultativas que se usaron en las mezclas (E. coli, K. pneumoniae y Enterobacter sp) y se obtu-

vieron resultados satisfactorios lográndose una inhibición casi del 100% durante las 8 hrs de prueba en el Tioglicolato -- con kanamicina y neomicina.

Esto es muy importante considerando que el crecimiento de los facultativos en las muestras clínicas es muy acelerado precisamente por desarrollarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias (además de que traen consigo restos celulares y líquidos corporales que les sirven de alimento), y si el medio no tiene una buena capacidad de inhibición es muy probable el desarrollo de estas especies ¹⁵.

Aún cuando en el presente estudio se obtuvo una buena recuperación de las 3 especies anaerobias, se presentó cierta baja de la población en los medios de transporte con antibióticos en comparación con el medio testigo (especialmente para B. melaninogenicus). El medio propuesto por Lyznick y col ²⁷ es un agar selectivo para el aislamiento de B. fragilis al que añadió gentamicina para inhibir el desarrollo de los facultativos, y obtuvo buenos resultados en cuanto al aislamiento de la especie pero, encontró que el desarrollo es más lento y dió colonias más pequeñas en comparación con los resultados obtenidos en los medios no selectivos. Aún cuando en la bibliografía se reporta a los anaerobios como resistentes a altas concentraciones de aminoglucósidos ^{8, 16, 21}, tal vez dependa de la sensibilidad de la cepa con la cual se trabaje,

o dependa de otros factores del medio de transporte lo que de termina estos resultados.

El medio Tioglicolato brinda un ambiente reductor adecuado para conservar la viabilidad de los anaerobios de importancia clínica ^{24, 30}, probablemente debido a que es un buen agente reductor que mantiene el potencial redox (Eh) en aproximadamente -42 mv en comparación con el Eh del medio aeróbico que es de aprox. +30 mv y para mantenerlo protegido del óxigeno del ambiente se sellaron los tubos del medio con una capa de aceite mineral. Además para comprobar su estado la fórmula del medio contiene resazurina la cual torna al medio de un color rosa cuando ésta oxidado y entonces estos tubos deben desecharse.

La recuperación de los anerobios obtenida en el medio Tioglicolato fue buena y podría usarse con cierta ventaja sobre los métodos de transporte comunes e incluso sobre los medios sofisticados (Port-a-Cul, tubos Roll) que aunque son específicos para anaerobios no se usan en la práctica por su costo y por el entrenamiento técnico que requieren.

Se recomienda que el medio Tioglicolato sea inoculado directamente con la jeringa con la que se tome la muestra ya que el uso del hisopo puede disminuir el porcentaje de recuperación de los posibles anaerobios como observó Helstad ¹⁸ en

su estudio, además es posible la contaminación de la muestra con las áreas vecinas al sitio de la toma. El medio también deberá mantenerse a temperatura ambiente y a la sombra hasta su llegada al laboratorio.

Finalmente, a pesar de que el medio Tioglicolato con antibióticos demostró una buena capacidad de inhibición sobre los facultativos, ya mencionamos que en ocasiones hay presencia de bacterias facultativas viables durante el intervalo de inhibición (por el tipo de resistencia que propician los aminoglucósidos), por lo cual sugerimos incluir en los medios de primoisolamiento un medio anaeróbico selectivo, así como un ambiente de incubación anaeróbico adecuado (jarra anaeróbica) para aumentar la probabilidad de aislamiento de los anaerobios.

C O N C L U S I O N

La población de B. fragilis, B. melaninogenicus y ---
Peptostreptococcus sp se conservá óptimamente durante las pri-
meras 2 hrs de prueba en los medios de transporte con antibió-
ticos.

La inhibición de los facultativos E. coli, K. pneumoni-
ae y Enterobacter sp resulta más completa entre las 0 y las-
4 hrs de prueba en el medio de transporte con kanamicina y --
neomicina.

En base a esto podemos decir que el medio cumplió su -
función como medio de transporte por conservar a los microor-
ganismos anaerobios, así como de selección por su capacidad -
de inhibición sobre las especies facultativas presentes en --
las mezclas, esto es muy satisfactorio debido a que el medio-
valorado está diseñado para la inoculación de muestras clíni-
cas de infecciones intraabdominales en las cuales casi siem--
pre existen mezclas de estas especies.

Lo anterior nos alienta a pensar en que el medio Tio--
glicolato con carne picada (enriquecido) adicionado de kanami-
cina y neomicina puede funcionar como medio de transporte y-
selección para B. fragilis, B. melaninogenicus y Peptostrepto-
coccus sp, siempre que el medio inoculado sea reseñado den-
tro de las primeras 2 hrs posteriores a su inoculación y, se-
incluya un medio anaeróbico selectivo para su primoaislamien-

to.

Sin embargo, una conclusión final solo podrá hacerse - en base a los resultados obtenidos con el empleo de muestras-clínicas inoculadas y recuperadas bajo estas condiciones.

A P E N D I C E

1.- Base de agar sangre (Bioxon)

Infusión de músculo cardíaco	375.0	gr
Peptona proteosa	10.0	gr
NaCl	5.0	gr
Agar	15.0	gr
Agua destilada	1000.0	ml

Se calienta a ebullición y se esterila a 121°C durante --
15 minutos.

2.- Caldo soya tripticasa (Difco)

Tripticasa peptona	15.0	gr
Fitona peptona	5.0	gr
NaCl	5.0	gr
Agua destilada	1000.0	ml

Se calienta a ebullición y se esteriliza a 121°C durante--
15 minutos.

3.- Caldo tioglicolato con glucosa e indicador (Difco)

Bacto-casitona	15.0	gr
Bacto-extracto de levadura	5.0	gr
Bacto-dextrosa	5.5	gr
NaCl	2.5	gr
L-cistenía (Difco)	0.5	gr
Tioglicolato de sodio	0.5	gr

Bacto-agar	0.75 gr
Resazurina certificada	0.001 gr
Agua destilada	1000.0 ml

4.- Carne picada (Difco)

Corazón de res	454.0 gr
NaCl	5.0 gr
Agua destilada	1000.0 ml

5.- Gelosa sangre hemolizada HM (enriquecida)

- a) Se prepara la base de agar sangre como se indicó en el punto 1
- b) Se enfría a 48°C y se añade 5% de sangre de carnero-estéril defribrinada y hemolizada
- c) Se añade 1 ml de solución de trabajo de hemina-menadiona por cada 100 ml de medio.
- d) Se homogeniza y se vacía en placas de Petri estériles.
- e) Las placas se guardan en bolsas de plástico opacas y se mantienen a 4°C hasta su uso.

6.- Sistema anaeróbico Gas-Pack

- a) Colocar los cultivos dentro de la jarra e introducir el indicador de oxidorreducción.

- b) Colocar las pelotitas de catalizador (activado a 160-170°C en horno durante 2 hrs) dentro de la canastilla que esta en la tapa
- c) Colocar dentro de la jarra el sobre generador de hidrógeno, hacerle un orificio en un ángulo e introducir 10 ml de agua de la llave
- d) Cerrar perfectamente la jarra e incubar

7.- Solución de hemina-menadiona (HM)

Solución madre de hemina:

Disolver 50 mg de hemina en 1 ml de NaOH IN. Añadir -- 100 ml de agua destilada. Esterilizador a 121°C por 15 minutos.

Solución madre de menadiona:

Menadiona 100 mg

Alcohol etílico (95°) 20 ml

Esterilizar por filtración (millipore 0.22 μ m)

Solución de trabajo:

Añadir 1 ml de solución estéril de menadiona a 100 ml de solución estéril de hemina. Guardar en frasco oscuro y en refrigeración (4°C) durante 6 meses como máximo. Se emplea 1 ml por cada 100 ml de medio.

8.- Tergitol 7 (Difco)

Peptona especial	5.0 gr
Extracto de levadura	3.0 gr
Lactosa	10.0 gr
Sodio heptadecilsulfato	0.1 gr
Tergitol 7	
Azul de bromotimol	0.025 gr
Agar-agar	12.0 gr

a) Se calienta a ebullición y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

b) Se enfría a 45°C y se distribuye en placas de Petri-estériles.

REFERENCIAS

- 1.- Alfa, M. & A. Lee. 1982. A Transport Method for Swab Specimens Submitted for Aerobic and Anaerobic Bacteriology J - Clin Pathol 35(5):555-60

- 2.- Allen, S.D. & J.A. Siders. 1980 Procedures for the Isolation and Characterization of Anaerobic Bacteria. In: Manual Clinical Microbiology. E.H Lennette, A. Ballows, H. Haster, Jr & J. Trunat. 3^a ed Am Soc Microbiol. Washington, D. C. USA. pags. 30-35

- 3.- Allen, S.D. 1984, Current Relevance of Anaerobic Bacteriology. Clinical Microbiology Newsletter. (in press)

- 4.- Baily, W.R. & E.G. Scott. 1970 . Diagnostic Microbiology - 3^a ed. Ed. C.B. Mosby Co. Saint Louis, USA. pags. 25-30

- 5.- Baird, M.R. 1973. Postoperative Infections from Bacteroides. Am Surg. August. pags. 459-64

- 6.- Bioxon. Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico. -- Bioxon de México, S.A. Promotora Mexicana de Comercio Exterior, S.A. de C.V. pags. 22-8

- 7.- Bodily, H.L. et al. 1970 Diagnostic Procedures for Bacterial, Micotic and Parasitic Infections . 5^a ed. ed. Am Public Health Association, Inc. pags 494-505.

- 8.- Carlsson, J.G., et al. 1980 . Fundamentals of Anaerobic -
Bacteriology as Related to the Clinical Laboratory. Comi-
tte on Continuing Education Board of Education and Trai--
ning of the American Society for Microbiology, Atlanta, -
Ga. pags. 18-22

- 9.- Cowan, S.T. & J.S.Steel.1979. Manual para Identificación-
de Bacterias de Importancia Médica. 2^a ed. Compañía Editor
ial Continental, S.A. México. pags. 118-21.

- 10.- Chan,E.C.S., J deVries & R.F. Harvey.1978. Preparation -
of Prereduced Anaerobically Sterilized Media and Their -
Use in Cultivation of Anaerobic Bacteria. J Clin Micro--
biol. 8(2): 123-26

- 11.- Davis, B.D. et al.1978, Tratado de Microbiología. 2^a ed.
Salvat Editores,S.A. pags. 976-79

- 12.- Dowell, V.R. & Gilda,J.1980 Anaerobic Bacteriology in the
Clinical Laboratory, U.S.D. of Health and Human Service-
PHS. CDC. Atlanta, Ga. pags. 4-11

- 13.- Finegold, M.S. 1977. Anaerobic Bacteria in Human Disea-
se Academic Press New York. Sn. Fco. London pags. 1-8

- 14.- Finegold, M.S. Rosenblatt, J.E., Sutter V.L. & H.R. Attebery. 1976. SCOPE Monograph on Aerobic Infections. 3^a ed.- Ed. The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, pags 6-8
- 15.- Finegold, S.M.: Shepherd, W.E. and E.H. Spaulding. 1979 - Practical Anaerobic Bacteriology. Ed. Shepherd, W.E. -- Royal Island Hospital, Kamloops, British Columbia, Canada. CUMITHECH V. pags. 1-14
- 16.- Garrod, P.L. Lambert, H & Francis D'Grady. 1973. Antibiotic and Chemotherapy. 4^a ed. Ed. Curchill Livingtone. --- Great Britain. pags. 280-82.
- 17.- Harper, H.A. 1976. Manual de Química Fisiológica. 5^a ed. - Ed. El Manual Moderno. México, D.F. pags. 232-34
- 18.- Helstad, A.G., J.L. Kimball & D.C. Maki. 1977. Recovery on -- Anaerobic, Facultative and Aerobic Bacteria from Clinical Specimens in three Anaerobic Transport Systems. J. -- Clin Microbiol. 5(6):564-69.
- 19.- Hernández, M.J.T. 1977. Frecuencia de Aislamiento de Microorganismos Anaerobios en Diversos Procesos Infecciosos - Tesis profesional. ENCB. IPN, México, D.F. pags. 71-74
- 20.- Hoffmann, S., A.M. Jensen & T. Justesen. 1983. The Recovery

of Anaerobic Bacteria from Swabs in three Transport Systems. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (B).Feb; 91 - (1):23-6

- 21.- Holdeman, L.V., Cato, E.P. & W.E.C. Moore. 1977. Anaerobic - Laboratory Manual. 4^a. ed. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University, pags 1-13
- 22.- Jawetz, E., J.L. Melnick & Edward, A.A. 1977 Manual de Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno, S.A. México D.F. pags. 330-32.
- 23.- Justesen, T., A.M. Jensen & S. Hoffmann. 1983. The Survival of Anaerobic Bacteria at 4°C and 22°C on Swabs in Three Transport Systems. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand - Sec. B. 91:17-22.
- 24.- Knomeman, E.W., S.D. Allen., V.R. Dowell & H.M. Sommers. -- 1979. Diagnostic Microbiology. Ed. Lippincott Company. - USA pags 275-282.
- 25.- Lehninger, A.L. 1977. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. -- Barcelona. pags. 813-815.
- 26.- Lorber, B. & Swenson, R.M. 1975. The Bacteriology of Intra-abdominal Infections. Surgical Clinics of North American

55 (6) pags. 1349-54

- 27.- Lyznicki, J.M., E.L. Busch & D.J. Blazevic. 1982. Medium for Selective Isolation and Presumptive Identification of the Bacteroides fragilis Group. J. Clin Microbiol. 15(1): 123-29
- 28.- Academia de Profesores de Bacteriología Médica. 1983 Manual de Laboratorio de Bacteriología Médica. 4^a ed. E.N. C.B. IPN. México, D.F. pags. 258-62
- 29.- Mena, E., F.S. Thompson, A.Y. Armfield, V.R. Dowell Jr & D.J. Reinhardt. 1978 Evaluation of Port-a-Cul Transport System for Protection of Anaerobic Bacteria. J. Clin Microbiol 8(1):28-35.
- 30.- Rohde, P.A. 1968. BBL Manual of Products and Laboratory Procedures. 5^a Ed. Division of Becton, Dickinson Co. --- Cocheysville, Maryland, EUA, pags 2-6
- 31.- Smith, L. 1975. The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Ed. -- Charles C. Thomas Publisher. USA. pags 348-58.
- 32.- Youmans, G.P. Patterson, P.Y. & Herbert, M.S. 1975. The Biological and Clinical Basis of Infectious Diseases. Ed. - W.B. Saunders Company. USA. pags. 96-99

- 33.- Yrios, J.W., E Balish, A. Helstad, C. Field & S. Inhorn. -
1975. Survival of Anaerobic and Aerobic Bacteria on Cotton Swabs in three Transport Systems. J. Clin Microbiol
1(2):196-200
- 34.- Zaldivar, M.M. 1983. Efecto de las Condiciones de almacenamiento sobre los Medios de Cultivo utilizados en el Aislamiento de Bacteroides fragilis. Tesis profesional E.N. C.B. IPN. México, D.F. pags. 38-39
- 35.- Zaleznik, D.F. & Kasper, D.L. 1982. The Role of Anaerobic Bacteria in Abscess Formation. Ann Rev. Med. 33:217-229