

Lej 13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO Y DIFERENCIAL
PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCIONES
GASTROINTESTINALES BACTERIANAS

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
NORMA GUERRA GARCIA

México, D. F.

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

CONTENIDO

	página
1. Introducción	1
1.1 Clasificación	3
1.2 Morfología	7
1.3 Fisiología y Metabolismo	7
1.4 Antígenos Bacterianos	9
1.5 Patogenicidad	12
1.6 Métodos Generales de Rutina	17
1.7 Identificación	19
2. Fundamentación	21
3. Planteamiento del Problema	23
4. Objetivos	24
5. Hipótesis de Trabajo	25
6. Material y Método	26
7. Metodología	29
8. Resultados	41
9. Análisis de Resultados	50
10. Conclusiones	54
11. Bibliografía	55

1. Introducción .

Las infecciones gastrointestinales son conocidas como una de las entidades patológicas de mayor incidencia en el ser humano, independientemente de la edad del sujeto aunque es preciso acentuar, que en los países subdesarrollados es causa de importante muerte infantil. México no es la excepción y una de las primeras causas de consulta y hospitalización es la gastroenteritis, que además, ejerce su mayor impacto entre los niños menores de 5 años. (22,4)

En México los problemas gastrointestinales ocupan los primeros lugares como causa de morbilidad. (4) Se considera que la mayor parte de estos padecimientos es de origen infeccioso, particularmente en la edad pediátrica donde los procesos bacterianos ocupan un lugar importante. Los agentes causales son múltiples y cada día se descubren nuevos agentes involucrados; sin embargo, Salmonella sp, Shigella sp y los serotipos de Escherichia coli considerados enteropatógenos, continúan siendo la causa más frecuente en nuestro medio, principalmente en hospitales infantiles donde son capaces de provocar cuadros epidémicos o esporádicos. Se ha sugerido que la deficiencia nutricional favorece su presentación y aumenta la susceptibilidad a este tipo de infecciones o a la gravedad del cuadro clínico. (1,6,8).

Las Enterobacterias constituyen un grupo de microorganismos muy importante dentro de la Microbiología Médica.

La familia enterobacteriacea está compuesta por microorganismos con una variación en su estructura antigénica y en sus propiedades bioquímicas. (20,24).

Se incluyen varias especies, las cuales se pueden localizar en el intestino del hombre y animales, así como en suelo y plantas. Cuando cualquiera de las especies de esta familia infecta a otros órganos dan lugar a infecciones oportunistas, por tal motivo, los miembros de la familia Enterobacteriacea representan una importante causa de infecciones comunitarias y hospitalarias, originadas por una gran cantidad de factores como diferentes metodologías, poblaciones, climas, condiciones higiénicas, así como predisposición por parte del individuo. (12,19)

La falta en condiciones higiénicas son una de la mayor causa de infecciones gastrointestinales, debido a que las bacterias presentes en la materia fecal llegan a contaminar el agua, alimentos y utensilios diversos provocando consecuentemente la enfermedad del individuo. Por lo tanto en caso de sospecha de una enfermedad intestinal, la muestra de elección la constituyen las materias fecales recién evacuadas las cuales se transportan de manera aséptica al laboratorio para sembrarse en los medios de cultivo de elección como pueden ser enriquecidos, selectivos y diferenciales; enseguida se realizan las pruebas bioquímicas pertinentes para posterior identificación del agente causal de la infección. (17,18,24)

1,1 Clasificación.

Se cuenta con diversas formas basadas en una serie de características bioquímicas que permiten su clasificación en subgrupos y la determinación de su estructura antigénica. Se toma en cuenta la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano, las cuales guían el metabolismo de las bacterias. (11,17,24,26).

a) Clasificación del Manual Bergey:

En ella las especies se integran tomando en cuenta las principales reacciones bioquímicas. (cuadro 1).(19,20,25)

b) Clasificación de Kauffman:

Se basa principalmente en las reacciones bioquímicas, serología, y en algunos casos mediante fagotipia. (cuadro 2) (20)

c) Clasificación de Edwards y Ewing:

En ella se agrupan los miembros de la familia en géneros, especies y biotipos sobre la base de sus semejanzas morfológicas, bioquímicas y genéticas. Toma en cuenta las pruebas bioquímicas, sensibilidad a bacteriófagos específicos, uso de antibiogramas y estudios en la hibridación del DNA de las bacterias. Es la más usada. (cuadro 3).(20,25, 32).

d) Clasificación del Centro de Control de Enfermedades (CDC) :

Es la más reciente clasificación la cual incluye algunos cambios en la taxonomía y nomenclatura de algunos -

Cuadro 1.

Manual de Bergey (3a. ed.)

Familia : Enterobacteriaceae

Género I: Escherichia

Especies: E. coli

Género II: Edwardsiella

Especies: E. taria

Género III: Citrobacter

Especies: C. intermedius

C. freundii

Género IV: Salmonella

Especies: S. cholerae-suis

S. typhi

S. enteritidis

S. arizonae

Género V: Shigella

Especies: S. dysenteriae

S. flexneri

S. boydii

S. sonnei

Género VI: Klebsiella

Especies: K. pneumoniae

K. ornithi

K. rhinoscleromatis

Género VII: Enterobacter

Especies: E. cloacae

E. aerogenes

Género VIII: Haemolia

Especies: H. alvei

Género IX: Serratia

Especies: S. marcescens

Género X: Proteus

Especies: P. vulgaris

P. mirabilis

P. morgani

P. penneri

P. inconstans

Género XI: Yersinia

Especies: Y. enterocolitica

Y. pseudotuberculosis

Y. pestis

Género XII: Erwinia

Especies: E. herbicola

Cuadro 2 .

Clasificación según Kauffman	
Tribu	Género
A) <u>Eschericheae</u>	I. <u>Escherichia</u> II. <u>Shigella</u> III. <u>Salmonella</u> IV. <u>Typhobacter</u>
B) <u>Klebsiellae</u>	I. <u>Klebsiella</u> II. <u>Enterobacter</u> III. <u>Hafnia</u> IV. <u>Serratia</u>
C) <u>Proteae</u>	I. <u>Proteus</u> II. <u>Morganella</u> III. <u>Retziarella</u> IV. <u>Providencia</u>

(20)

Cuadro 3.

Familia Enterobacteriaceae	
Tribus	Géneros
I. Escherichiae	Escherichia Edwardsiella Nitrobacter Salmonella Shigella
II. Klebsiellae	Klebsiella Enterobacter Hafnia Serratia
III. Proteus	Proteus Providencia
IV. Yersiniae	Yersinia
V. Erwiniae	Erwinia

Sacado del Manual de Ewing (1972).

(32).

organismos. Se basa en los parámetros fenotípicos, la -
transferencia de genes a través de los plásmidos y técnicas
de hibridación del DNA. (Cuadro. 4). (17).

1.2. Morfología.

La familia Enterobacteriaceae está formada
por bacilos rectos Gram negativos de pequeño tamaño, (2 a
3 micras de largo, por 0.4 a 0.6 micras de ancho). Son ae-
robios o anaerobios facultativos, no esporulados. La mayo-
ría de ellos móviles, aunque puede haber algunas cepas que
no lo son, y variantes inmóviles de especies móviles.
(24, 25).

1.3. Fisiología y Metabolismo .

Las Enterobacterias crecen con facilidad -
en medios ordinarios simples, principalmente a 37°C.
(3, 13, 24).

Son catalasa positiva y oxidasa negativa, redu-
cen nitratos a nitritos, no licúan el alginato y la glicoc-
sa es utilizada por ellos de manera fermentativa con forma-
ción de ácidos, o bien ácidos y gases. (3, 13, 24).

Los distintos géneros y especies de esta fami-
lia pueden ser identificados a partir de su capacidad para
fermentar hidratos de carbono específicos, para utilizar -

Quadro 4 .

<u>Tribu</u>	<u>Gêneros</u>	<u>Especies</u>	<u>Cambios</u>	<u>Adiçôes</u>
I. <u>Escherichiae</u>	<u>Escherichia</u> <u>Shigella</u>	<u>coli</u>		
		<u>tyssenteriae</u>		
		<u>flexneri</u>		
		<u>flexneri</u>		
		<u>flexneri</u>		
II. <u>Edwardsiellae</u>	<u>Edwardsiella</u>	<u>parva</u>		
III. <u>Salmonellae</u>	<u>Salmonella</u>	<u>choleraesuis</u>		
		<u>typhi</u>		
		<u>enteritidis</u>		
		<u>disenteriae</u>		
		<u>disenteriae</u>		<u>3. anatum</u>
IV. <u>Klebsiellae</u>	<u>Klebsiella</u>	<u>pneumoniae</u>		<u>Y. oxytoca</u>
		<u>ozaenae</u>		
		<u>pneumoniae</u>		
		<u>pneumoniae</u>		
	<u>Enterobacter</u>	<u>aerogenes</u>		<u>E. sakazakii</u>
		<u>aerogenes</u>		<u>E. gergoviae</u>
		<u>agglutinans</u>		
	<u>Serratia</u>	<u>marcescens</u>	<u>Serratia olivae</u>	
		<u>marcescens</u>		
<u>marcescens</u>				
V. <u>Proteae</u>	<u>Proteus</u>	<u>mirabilis</u>		
		<u>mirabilis</u>		
		<u>mirabilis</u>		
		<u>mirabilis</u>		
	<u>Providencia</u>	<u>stuartii</u>		
		<u>stuartii</u>		
		<u>stuartii</u>		
		<u>stuartii</u>		
VI. <u>Yersinia</u>	<u>Yersinia</u>	<u>pestis</u>		<u>Y. enterocolitica</u>
		<u>pestis</u>		<u>Y. enterocolitica</u>
		<u>pestis</u>		<u>Y. enterocolitica</u>
VII. <u>Erwiniae</u>	<u>Erwinia</u> <u>prostrans</u>			

ciertos substratos (p. ej. citrato) como única fuente de carbono, y para dar lugar a productos finales característicos (p. ej. indol a partir de triptófano, amoniaco a partir de la urea, y sulfuro de hidrógeno). (6, 3, 24).

La fermentación de la lactosa es una característica diferencial para el estudio de cultivos sospechosos, algunos de los cuales tienen la propiedad de desarrollarse en presencia de sustancias como el verde brillante, - el tetratronato, o bien desoxicolato de sodio. (1, 3, 19, 24, 25).

1.4. Antígenos Bacterianos.

Aunque las reacciones metabólicas permiten la identificación de los principales bacilos entéricos, - su identificación final se basa generalmente en su estructura antigénica . (3).

Antígenos somáticos "O".- Los antígenos somáticos se encuentran localizados en el cuerpo o soma de la bacteria. Son antígenos termestables que están compuestos de complejos fosfolípidos y polisacáridos. El análisis del antígeno O revela que está constituido de 60% de polisacárido, de 20% a 30% de lípidos y de 3.5 a 4.5 de hexosamina. Este antígeno es resistente al alcohol y ácidos diluidos. (3, 11, 17, 19) . (fig. 1)

antígenos Flagelares "H".- Estos antígenos son de naturaleza proteica, y como su nombre lo indica, son los constituyentes químicos de los flagelos de las bacterias. Son termolábiles. (3, 11,17,25).(fig.1)

Los aminoácidos que contienen y el orden en que se encuentran determina la especificidad. Los antígenos H son inactivados lentamente por alcohol. (3,11,17,25).

Antígenos de superficie "K".- Estos antígenos también se denominan capsulares, comprenden a los antígenos que se encuentran en la cápsula, o más apropiadamente, en los elementos de envoltura. Cuando se encuentra en cantidades suficientes en la superficie, este antígeno inhibe la aglutinación de suspensiones bacterianas vivas o muertas con su antígeno O. (3,11,17,25).

El antígeno K puede ser subdividido de acuerdo a sus características físicas y químicas. Muchas de las variedades del antígeno K no son destruidas por la acción del calor, sin embargo algunas características son alteradas por el calentamiento a diferentes temperaturas y períodos específicos de tiempo. El antígeno K también es polisacárido. La reacción de aglutinación con este antígeno es lenta. Las principales clases de antígenos K que se encuentran en el género Salmonella son el antígeno Vi y el K. (3,11,17,19,25).

El antígeno Vi fue descrito primeramente por Felix y Pitt, resulta fundamental para aclarar la serología de Salmonella typhi. Se destruye por calentamiento a 60°C - por una hora, o bien por ácidos y fenol. (3,11,17,19)(fig.1)

El antígeno K o mucoso es otra clase de antígeno K que se encuentra en las salmonelas, debido a que alguna fracción de este antígeno es común para muchas salmonellas no se ha utilizado de manera general para su identificación. (3,11,19,25).

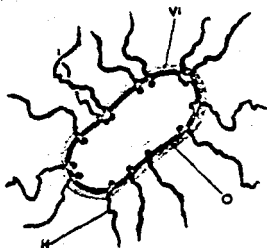


Fig.1 Representación Esquemática de la Localización de los Antígenos celulares.

1.5 Patogenicidad .

La bacteria penetra casi siempre por vía digestiva, mediante la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas multiplicándose activamente en el tejido linfoide del intestino delgado, de donde puede pasar a linfáticos y torrente sanguíneo, vía por la cual se disemina o propaga para implantarse en otros órganos vitales.(1,2,6,7,9,10,17,19).

Patologías específicas.

E. coli enterotoxigénico.- Produce un cuadro causado por enterotoxinas, una termolábil (LT), y la otra termoestable (ST). Esta cepa es muy frecuente encontrarla causando alteraciones en niños menores de 5 años, mientras en adultos es causa de la diarrea del viajero.

La toxina LT tiene un receptor que es un gangliósido de la membrana celular al cual se adhiere provocando la activación de la adenilciclase que transforma el ATP en AMPcíclico con una consecuente salida de iones y una pérdida masiva de agua llevando a un estado diarreico y de deshidratación grave en bebés.

Para la toxina ST, la acción es sobre la guanilato ciclase que transforma el GTP en GMPcíclico.(1,2,6,7,10,17,19,20,27) De igual forma conduce a un estado diarreico pero de aparición rápida y duración corta.

Existe presencia de diarrea, con evacuaciones que van de 5 a 20/día, así como dolor abdominal. No hay presencia de moco, sangre o pus en las heces debido a que no hay destrucción del epitelio.La deshidratación es muy severa - llegando a causar la muerte en muchos casos.

LT

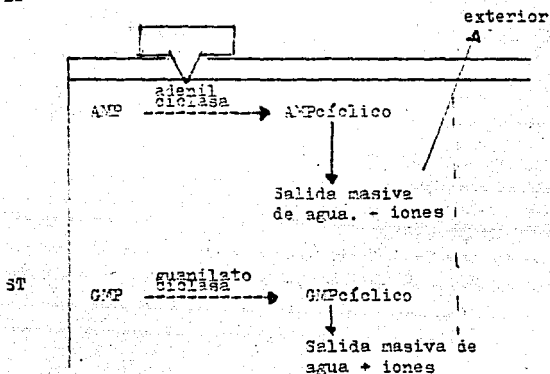


Fig. 2 Esquema que muestra la acción bioquímica de las toxinas de E. coli enterotoxigénica.

E. coli invasor.- Provoca un cuadro local produciendo inflamación en el epitelio intestinal, a consecuencia de la liberación de enzimas proteolíticas provenientes de los macrofagos para eliminar al invasor. . Estas enzimas producen una destrucción tisular y una disminución en el pH. Todo esto induce la formación de microabscesos y úlceras , que provocan la salida de líquido por la falta del epite - lio muerto. Se presenta diarrea que puede ir acompañada de sangre moco y pus (por la gran cantidad de neutrófilos que se encuentran en la zona), hay dolor abdominal, infla-

ción del colon y fiebre. La infección es rápida, va de 1 a 3 días. (1,2,6,7,10,17,19).

E. coli enteropatógeno.- Produce una irritación del intestino con consecuente diarrea, no hay invasión del microorganismo ni producción de enterotoxinas. Los niños son los más susceptibles, y en los adultos causa intoxicación alimentaria.

Se presenta dolor abdominal, diarrea intensa, fiebre y deshidratación grave en los niños. (1,2,6,7,9,10,17)

Shigelosis.- Agente causal es Shigella sp. La acción del microorganismo es muy potente, ya que con un menor número de bacterias se produce la infección. El período de incubación va de 1 a 4 días. El microorganismo atraviesa la pared intestinal a nivel de colon por pinocitosis, y se localiza en la mucosa donde se reproduce causando inflamación y disminución de pH. Hay infiltración de neutrófilos, los cuales liberan enzimas que provocan la destrucción del tejido y necrosis de la zona, provocando hipoxia y descamación, así como también la formación de microabcesos y zonas sanguinolentas.

Se caracteriza por la presencia de dolor abdominal, diarrea y fiebre de aparición repentina, es común la presencia de moco y sangre en las heces. (1,2,6,7,10,17,19,20,27, 31).

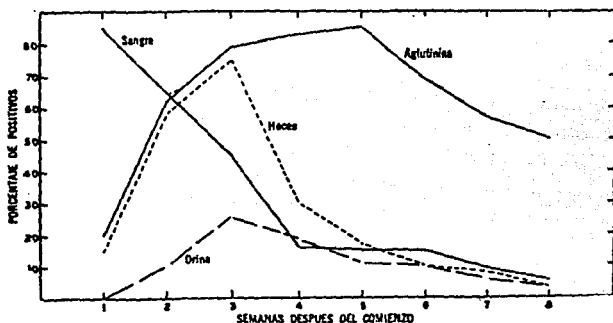
Gastroenteritis.- Agente causal E. coli. Se presenta como un cuadro diarreico, en el cual el microorganismo llega a nivel de colon estableciéndose ahí sin llegar a penetrar. O bien la bacteria puede proliferar en células epiteliales y posteriormente penetrar a la mucosa intestinal causando una inflamación de la zona, y producción de diarrea. Es un cuadro rápido de 1 a 3 días con ligero dolor abdominal, se puede asociar fiebre por acción de las endotoxinas que causan la sintomatología. El cuadro es localizado en el intestino, no invade sangre. (1,2,6,7,9,10,20).

Fiebre Tifoidea.- Agente causal Salmonella sp. El padecimiento es de hecho una invasión sistemática del cuerpo, en particular del sistema linfático. Su período de incubación varia de 7 a 21 días.

Puede existir el antecedente de diarrea con un principio incidioso y de fiebre moderada, malestar general, anorexia y dolor de cabeza. Posteriormente la fiebre es elevada, de 39^o- 40^o C, el pulso es más lento, dolor de cabeza muy fuerte, el malestar es generalizado y existe la postración de la persona ya que en la etapa temprana las bacterias se encuentran en intestino a nivel de ileon terminal, donde los macrófagos cercanos a las placas de Peyer los atrapan. De los macrófagos de las placas de Peyer pasan a nódulos mesentéricos asociados al intestino y llegan a torrente linfático hasta la unión con el sistema circulatorio y de ahí a sangre, produciéndose de esta forma la septicemia afectando otros órganos como hígado, riñón, bazo, etc., además de que la bacteria regresa a intestino por vía hema

tógena, causando un grave daño al paciente, pudiéndose producir en éste incluso la muerte.

El paciente se agrava y presenta un estado tóxico marcado, el cual va acompañado de leucopenia. (1,2,6,7,10,20)



Grafica 1. Frecuencia aproximada de cultivos positivos de - sangre, heces y orina, así como respuestas de - aglutininas en la fiebre tifoidea.

Una vez que la persona ha superado esta etapa, se pueden observar los daños causados por el microorganismo, como son úlceras en el intestino en forma de rosario, por lo que las heces van con sangre, pus o moco. Hay presencia de deficiencias hepáticas, esplenomegalia, los polimorfonucleares están disminuidos, hiperplasia de nódulos linfoides, monocitosis y esplenomegalia.

1.6. Métodos Generales de rutina para el cultivo y aislamiento.

En caso de sospecha de una enfermedad intestinal - la muestra de elección la constituyen las materias fecales recién evacuadas, o bien obtener las muestras para el cultivo por medio de un hisopo rectal (principalmente en caso de niños), o por rectosigmoidoscópico. La muestra debe ser tomada antes de la administración de algún medicamento. (8,13,15,17)

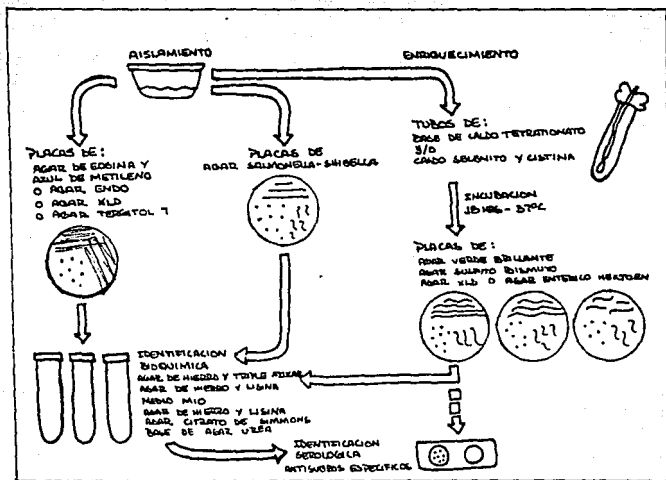
En caso de sospecha de fiebre tifoidea, la muestra varía dependiendo de la etapa en que se encuentre la enfermedad. El hemocultivo es importante durante la primera semana de la enfermedad, y en algunos casos el cultivo de médula ósea, que puede ser positivo cuando los hemocultivos son negativos. Para la segunda etapa se recomiendan el análisis de heces y orina. (8,13,15,17,21,25)

Para el cultivo y aislamiento del microorganismo se siguen dos procedimientos, uno es la siembra directa de la muestra en placa, usando los medios de rutina como:

el agar Salmonella-Shigella (SS), el sulfito bismuto o el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD); y un medio diferencial como el agar Mac Conkey, o el agar eosina azul de metileno (EMB). Además el método indirecto en el cual se utiliza primero un caldo de enriquecimiento que es inhibidor de la flora normal del intestino; como el caldo con tetracionato de Muller, caldo Gram negativo (GN), o el cal

do con selenito de Leifson. Aunque si se intenta aislar - E. coli (enterotóxica, enteroinvasiva y enteropatógena), Klebsiella, Enterobacter o Citrobacter , no se recomiendan caldos de enriquecimiento. (8,13,15,17,21,24,25)

Diagrama de Flujo : Coprocultivo aislamiento e identificación.



1.7. Identificación .

La mayoría de las formas lactosa negativas como - Salmonella sp y Shigella sp, dan lugar a pequeñas colonias incoloras en medios con desoxicolato citratado de Mac Conkey, EMB, TLD y SS. Aunque en agar Salmonella-Shigella especies de Salmonella sp dan colonias incoloras con centro negro, debido a la producción de gas H₂S. Las especies de Shigella sp muestran inhibición variable, y sus colonias - incoloras no presentan enegresimiento. Las cepas móviles de Proteus sp que se desarrollan en agar SS son no invasoras. (21,24,25).

Las colonias de microorganismos que fermentan la lactosa en agar con desoxicolato citratado (si no son inhibidas) en agar Mac Conkey y en medio SS aparecen rojas; en - agar EMB se presentan de color púrpura oscuro a negro y a menudo tienen brillo metálico. (21,24,25)

En agar con sulfito bismuto, la S. typhi da lugar a colonias negras con un reflejo metálico, la mayoría de los coliformes fermentadores de lactosa y las shigelas son totalmente inhibidos. (17,21,24,25)

Cabe mencionar que la diferenciación final del microorganismo se lleva a cabo sometándolo a pruebas bioquímicas, y en algunos casos serología.

2. Fundamentación :

Las enterobacterias, muy especialmente las enteropatógenas, son la principal familia asociada a cuadros diarreicos.

Las diarreas de origen infeccioso debidas a enteropatógenos (Salmonella, Shigella, las Escherichia coli patógeno, Vibrio, etc.), tienen un papel primordial en este tipo de procesos patológicos. La diarrea es un síntoma fundamental en la mayor parte de las enfermedades intestinales de etiología infecciosa; se presenta con mayor frecuencia - en los niños menores de 5 años, causando diarreas intensas que conducen a deshidratación grave, además de fiebre, dolor abdominal, malestar general, e incluso evacuaciones - sanguinolentas.

Las estadísticas demuestran que las infecciones intestinales bacterianas son una de las principales causas de mortalidad infantil en los países en donde la higiene, la alimentación y los cuidados médicos no son satisfactorios. (19,20, 27,30).

Para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales bacterianas se realizan entre otros el coprocultivo, - que se practica en el laboratorio con material fecal. Generalmente se emplean los medios de rutina: EMB ó Mac Conkey, VB y SS.

El medio de cultivo usado puede ser selectivo y diferencial para de esta forma, emplear un solo medio de cultivo y -

así disminuir el costo y el tiempo del análisis, lo cual beneficia directamente al paciente.

La diferenciación de las cepas patógenas se lleva a cabo mediante pruebas bioquímicas y posteriormente serología. (19,24,29,30).

3. Planteamiento del Problema .

Actualmente se emplean más de dos medios de cultivo en el aislamiento de bacterias productoras de infecciones gastrointestinales, lo cual origina un mayor gasto de material y tiempo en el diagnóstico de dichas infecciones, provocando a su vez un incremento en el costo del análisis. Esto afecta en gran forma al paciente, el cual obtiene el reporte de resultados del análisis por el laboratorio, para posteriormente recibir el tratamiento adecuado.

Ahora bien, a esto se suman los resultados falsos negativos que se pueden obtener, debido a la selectividad del medio, o a la baja proporción de patógenos con respecto a la flora normal que los enmascara.

Por lo tanto, es necesario optimizar el análisis - con el uso de un solo medio de cultivo selectivo y diferencial, que reduzca de esta forma el trabajo, tiempo y costo en la realización del análisis con un buen margen de seguridad.

4. Objetivos.

- 1.- Formular un nuevo medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias gastrointestinales.
- 2.- Disminuir el tiempo de aislamiento e identificación de las bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales, a fin de administrar un tratamiento rápido y adecuado.
- 3.- Proporcionar una buena confiabilidad al medio para identificación de microorganismos patógenos.
- 4.- Realizar un estudio comparativo del medio de cultivo usado, con respecto a los demás medios, que incluye la validación del método.

5. Hipótesis de trabajo.

Si se combinan adecuadamente las principales características metabólicas de las bacterias patógenas encontradas en un coprocultivo, será factible aislarlas en un medio de cultivo selectivo. De este modo se reducirá el trabajo, tiempo y costo del análisis.

5. Material y Métodos.

Material

- Algodón
- Asa y portaasa bacteriológica
- Caja Petri de vidrio
- Celdas para espectrofotómetro (13 x 100)
- Cubreobjetos
- Frasco de boca ancha con tapa de rosca de 1 lt.
- Gasa
- Gradillas para tubo de ensaye
- Guantes de asbesto
- Guantes de cirujano
- Hisóvos estériles
- Marcador de tinta permanente
- Masking tape
- Matraz aforado de 1000 ml
- Matraz aforado de 250 ml
- Matraz aforado de 100 ml
- Matraz aforado de 50 ml
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Mechero Bunsen
- Panel oh
- Pipetas graduadas de 1 ml
- Pipetas graduadas de 2 ml
- Pipetas graduadas de 5 ml
- Pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas de 0.1 ml
- Pipetas serológicas de 0.2 ml
- Frascos goteros de 60 ml
- Portaobjetos
- Probeta graduada de 500 ml
- Probeta graduada de 50 y 100 ml
- Tela de alambre con asbesto
- Termómetro de -10 a 200°C
- Trípode metálico
- Tubos de ensaye de 13 x 100
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Vasos de precipitado de 100 y 50 ml

Material Biológico:

	Características									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<u>Salmonella typhi</u>	+	A	-	+	-	-	-	+	-	-
<u>Shigella sonnei</u>	-	A	-	+	-	-	-	-	-	+
<u>Escherichia coli</u>	-	A	+	-	-	-	-	+	+	+
<u>Proteus vulgaris</u>	+	A	+	+	-	-	+	+	-	-
100 pacientes										

1= H₂S en TSI

2= Mucosa

3= Indol

4= Rojo de nitilo

5= VP

6= citrato

7= urea

8= movilidad

9= lactosa

10= ornitina descarboxilasa

+ positivo

A ácido

- negativo

Equipo :

- Agitador mecánico para tubos de ensayo, VORTEX-GENIE, modelo K-550-G
- Autoclave
- Balanza analítica METTLER modelo H-80
- Balanza Granataria CHAUSS, modelo Florham Park
- Contador de colonias Sol.-Bat. modelo No. 432
- Espectrofotómetro Erusch and Lomb, modelo Espectronic 20
- Incubadora MAPSA, modelo EG-334
- Microscopio AMERICAN OPTICAL, modelo Cne-Ten
- Penetrómetro ASTM, modelo Universal con cono de penetración Humbolt H-2522, peso 102.5g
- Refrigerador Mabe, modelo Space Line

Colorantes

- Azul de Bromotimol
- Cristal violeta
- Rojo de Fenol 0.5%
- Safranina

Soluciones

- Solución de Kovacs
- Solución de Lugol

Reactivos

- Cloruro férrico
- Citrato ferroso
- Citrato férrico amoniacal
- Citrato de sodio
- Lactosa
- Sulfato férrico amoniacal
- Sulfato ferroso amoniacal
- Tiosulfato de sodio
- Urea

Medios de Cultivo

- Base de Agar Sangre (Merck)
- caldo BHI (Bioxon)
- Caldo Salenito (Bioxon)
- Agar agar (Bioxon)
- Agar eosina azul de metileno (EAB) (Merck)
- Agar Salmonella-Shigella (SS) (Merck)
- Agar Verde Brillante (VB) (Merck)
- Extracto de Levadura (Bioxon)
- Peptona de Caseína (Bioxon)

Solventes

- Acetona (Merck)
- Agua Destilada (DNEP-E)
- Alcohol etílico absoluto (Merck)

Otros

- Pulque

7. Metodología.

La metodología descrita a continuación, es la que se llevó a cabo para alcanzar los objetivos planteados la cual comprende seis etapas desglosadas cronológicamente de la siguiente manera :

- Etapa I : Soporte de crecimiento del medio. Se obtuvo un medio en el cual desarrollan las Enterobacterias, comparando con agar sangre.
- Etapa II : Consistencia del medio. Se le dió al medio la solidez adecuada para su uso.
- Etapa III : Diferenciación del medio. Se dan características diferenciales al medio, con la adición de lactosa, urea y sales de hierro.
- Etapa IV : Estabilidad del medio de cultivo. Se determinó la vida media del medio colocando un lote en condiciones de almacenamiento normales (refrigeración), y se probaron a intervalos regulares de 4 días, sembrando las cepas originales.
- Etapa V : Estudio comparativo del medio. Se observa el comportamiento del medio de cultivo formulado con respecto a tres medios de cultivo comerciales, utilizando para ello 100 muestras alíneas.
- Etapa VI : Estudio de Costos. Relación del precio del medio formulado con respecto al de tres medios de uso común para coprocultivo.

El medio final es el taniz de todas las etapas y por lo tanto el mejor que obtuvimos.

En las primeras etapas se trabajó sobre ensayo y error por lo que los medios descritos no son los únicos que se seleccionaron, sino los más representativos y de mayor utilidad al proyecto.

Etapa I : Durante esta etapa se desarrollaron los primeros ensayos para la obtención de un soporte de crecimiento sólido.

La preparación de los medios fue de la siguiente manera : se procedió a pesar cada una de las sustancias integrantes de la formulación del medio de cultivo, a **pro-
var** mezclándolos con agua o bulque según sea el caso. Con-
tinuando con un calentamiento a ebullición por 1 min. para
disolver el agar, enseguida se esterilizó en autoclave a 15
libras por 15 minutos, para posteriormente ser vertido a -
las cajas de petri estériles (de 20 a 25 ml/caja).

Cada uno de los medios elaborados fueron inoculados con las siguientes bacterias:

Escherichia coli

Salmonella typhi

Mycobacterium smegmatis

Proteus vulgaris

Todas ellas incubadas en condiciones aeróbicas a una tem-
peratura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ x 24 hrs.

Medio 1. (Peptona de Caseína como nutriente)

	A	B	C	D
Agar- Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5% cts.
Peptona de Caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5% v
Agua destilada como disolvente				

Medio 2. (Pulque como nutriente a pH 7.0)

	A	B	C	D
Agar- Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5% cts.
Tipo de <i>Fulcus</i> (100ml)-		e	r	c v

- e = estéril (pulque de pulquería, fresco, esterilizado a 15 lb x 15 minutos)
- r = refrigerado (pulque de pulquería almacenado en refrigeración a 10 días).
- c = comercial (pulque comercial).

Medio 3. (Enriquecer el medio 1 con extracto de levadura 0.5%).

	A	B	C	D
Agar - Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5% cts.
Peptona de Caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5% v
Extracto de Levadura.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5% cts.
Agua como disolvente				

Medio 4. (Enriquecer el medio 1 con extracto de levadura 1.0%).

	A	B	C	D
Agar- Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5% cte.
Peptona de Caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5% v
Extracto de Levadura	1.0%	1.0%	1.0%	1.0% cte.
Agua como disolvente				

Medio 5. (Enriquecer el medio 1 con extracto de levadura 1.5%).

	A	B	C	D
Agar- Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5% cte.
Peptona de Caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5% v
Extracto de Levadura	1.5%	1.5%	1.5%	1.5% cte.
Agua como disolvente				

Medio 6. (Enriquecer el medio 2 con extracto de levadura 0.5%).

	A	B	C	
Agar - Agar	1.5%	1.5%	1.5%	cte.
(Tipo de pulque (100ml).	-	e	r	v
Extracto de Levadura	0.5%	0.5%	0.5%	cte.

Medio 7. (Enriquecer el medio 2 con extracto de levadura al 1.0%).

	A	B	C	
Agar-Agar	1.5%	1.5%	1.5%	cte.
Circ de pulque	-	e	r	v
Extracto de levadura	1.0%	1.0%	1.0%	cte.

Medio 8. (Enriquecer el medio 2 con extracto de levadura al 1.5%).

	A	B	C	
Agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	cte.
Circ de pulque	-	e	r	v
Extracto de levadura	1.5%	1.5%	1.5%	cte.

Estepa II : (Consistencia del medio). Una vez obtenidos los medios más adecuados para el desarrollo de enterobacterias, se procedió a verificar si la concentración de agar era la adecuada para darle al medio la solidez requerida.

Medio II 1. (Variaciones en las concentraciones de agar del medio 4B).

	A	B	C	D	E	
Factora de Caseína	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	cte.
Extracto de Levadura	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	cte.
Agar-agar	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	v
Agua como disolvente						

Medio II 2. (Variación en las concentraciones de agar del medio 7B).

	A	B	C	D	E	
Extracto de levedura	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	cte.
Balque estéril (ml)	100	100	100	100	100	cte.
Agar-Agar	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	v

Medio II 3. (Consistencia con concentraciones de agar en rangos cercanos al del Medio II.1D).

Establecida aparentemente una consistencia adecuada de los medios se procedió a verificarla realizando pruebas de penetrabilidad variando la concentración de agar en rangos cercanos al medio óptimo, comparando contra base de agar sangre

	A	B	C	
Peptona de caseína	0.5%	0.5%	0.5%	cte.
Extracto de levedura	1.0%	1.0%	1.0%	cte.
Agar-Agar	1.3%	1.5%	1.7%	v
Agua como disolvente				

Medio II 4. (Consistencia con concentraciones de agar en rangos entre el medio II 2B y II 2E)

	A	B	C	D	
Extracto de levedura	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	cte.
Balque estéril (ml)	100	100	100	100	cte.
Agar-Agar	1.5%	1.7%	1.9%	2.0%	v

Etapa III. (Diferenciación del Medio). Ya obtenido el soporte de crecimiento sólido más adecuado, se procede a darle características diferenciales al medio, empleando al rojo de fenol como indicador de pH por su rango de viraje (6.4-3.2).

Lactosa.

Medio III 1L	A	B	C	D
Pectona de Caseína.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura.	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Lactosa	0.3%	0.5%	1.0%	1.5% ✓
Rojo de Fenol(%)	0.002	0.002	0.002	0.002
Agua como disolvente				

Medio III 2L (Adición de Lactosa al medio con pulque)

	A	B	C	D
Pulque (ml)	100	100	100	100
Extracto de Levadura.	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-Agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Lactosa	0.3%	0.5%	1.0%	1.5% ✓
Rojo de fenol(%)	0.002	0.002	0.002	0.002

Detección de la producción de H₂S .

Medio III 1B. (Variación de tiosulfato de sodio)

	A	B	C	D
Pectona de Caseína.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Tiosulfato de sodio	0.04	0.08	0.12	0.16 ✓
Sulfato férrico amon. 1g	1g	1g	1g	1g

Agua como disolvente

Medio III 2S. (Adición de sulfato ferroso amoniacal)

	A	B	C	D
Peptona de Caseína.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Agar-Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Tiosulfato de sodio	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g
Sulfato ferroso amoniacal.	0.04g	0.08g	0.12g	0.16g ▼
Agua como disolvente				

Medio III 3S. (Adición de cloruro férrico)

	C	D
Peptona de Caseína.	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura.	1.0%	1.0%
Agar-Agar	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%
Tiosulfato de sodio	0.12g	0.12g
Cloruro Férrico	0.04g	0.08g
Agua como disolvente		

Medio III 4S. (Adición de citrato ferroso)

	C	D
Peptona de Caseína.	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura.	1.0%	1.0%
Agar-Agar	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%
Tiosulfato de sodio	0.12g	0.12g
Citrato ferroso	0.04g	0.08g
Agua como disolvente		

Medio II 68. (adición de nitrato férrico anónico)

	A	B	C	D
Pentona de Cassel- na.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Leva- dura,	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Tiosulfato de so- dio.	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g
Nitrato férrico anónico.	0.04g	0.03g	0.12g	0.16g v
Agua como disolvente				

Variación de Tiosulfato de Sodio, tomando como base al -
Medio III 68.

Medio III 68.

	A	B	C	D	E	F
Pentona de Cassel- na.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Leva- dura.	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Tiosulfato de so- dio.	0.0g	0.2g	0.4g	0.8g	1.0g	1.2g v
Sulfato ferroso amoniacal.	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g
Agua como disolvente.						

Medio III 7S. (Variación de tiosulfato de sodio)

	A	B	C	D	E
Peptona de Caseína.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura.	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Tiosulfato de Sodio.	0.60g	0.70g	0.80g	0.90g	1.00g ▼
Sulfato ferroso amoniacal	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g
Agua como disolvente					

Adición de Citrato de Sodio. Tomando como base al medio III-7SC

Medio III 8S. (Adición de citrato de sodio)

	A	B	C	D	E	F
Peptona de caseína.	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura.	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Lactosa	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Tiosulfato de sodio.	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g
Sulfato ferroso amon.	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g
Citrato de Sodio.	0g	0.07g	.15g	.22g	.30g	.38g ▼
Agua como disolvente						

Adición de la urea como último metabolito, utilizando una solución de urea acuosa estéril al 40%, tomando como base al medio III 33D.

Medio III 11.

	A	B	C	D	E
Bentonita de Indefina	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Extracto de Levadura	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Sacosa	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Fosfato de Sodio	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g	0.3g
Sulfato ferroso anhid.	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g	0.12g
Nitrato de calcio	6ml	6ml	6ml	6ml	6ml
Urea	0%	0.1%	0.2%	0.5%	1% ✓
Soln de fonal	.002%	.002%	.002%	.002%	.002%

Agua para disolvente

Etapa IV . (Estabilidad del Medio de Cultivo).

Se preparó medio de cultivo formulado necesario para un lote de 30 cepas, mantenidas a refrigeración y en una bolsa de polietileno, inoculando a diferentes períodos de tiempo a lo largo de un mes, empleando las cepas que se han venido usando.

Etapas V. (Estudio Comparativo del medio) .

Al medio finalmente formulado, se le comparó en efectividad de aislamientos con otros medios generalmente usados, como el 53, EMB, y VB, usando para ello 100 muestras clínicas, a las cuales se les realizaron también pruebas bioquímicas .

Etapas VI. (Estudio de costos) .

Se realizó un estudio comparativo del costo de medio por litro , de cada uno de los medios que se usaron, así como del medio formulado.

8. Resultados .

Cada uno de los resultados reportados están dados con respecto al número que se le ha dado en el apartado correspondiente en la metodología.

Los resultados a continuación expresados se dan bajo la siguiente relación:

- = negativo, sin crecimiento
- + = **crecimiento escaso**
- = **crecimiento bajo**
- ++ = **crecimiento moderado**
- +++ = **buen crecimiento**
- a = **Diferenciación metabólica positiva**
- b = **Diferenciación metabólica negativa**
- c = **Diferenciación metabólica moderada**

Medio 1. (Peptona de Caseína como nutriente)

Cepa	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	-	±	++	++
<u>S. typhi</u>	-	±	++	++
<u>Shigella sonnei</u>	-	-	++	++
<u>Proteus vulgaris</u>	-	-	+	++

Medio 2. (Pulque como nutriente)

Cepa	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	-	++	++	-
<u>S. typhi</u>	-	++	++	-
<u>Shigella sonnei</u>	-	++	++	-
<u>Proteus vulgaris</u>	-	++	++	-

Medio 3. (Enriquecimiento con extracto de levadura al 0.5%)

Cepa	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	+	++	+++	+++
<u>S. typhi</u>	+	++	+++	+++
<u>Shigella sonnei</u>	±	+	++	+++
<u>Proteus vulgaris</u>	+	++	+++	+++

Medio 4. (Enriquecimiento con extracto de levadura al 1%)

Cepa	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	++	+++	+++	+++
<u>S. typhi</u>	++	+++	+++	+++
<u>Shigella sonnei</u>	+	+++	+++	+++
<u>Proteus vulgaris</u>	++	+++	+++	+++

Medio 5 . (Enriquecimiento del medio con extracto de levadura al 1.5%).

Cepa	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	+++	+++	+++	+++
<u>S. typhi</u>	++	+++	+++	+++
<u>Shigella sonnei</u>	++	+++	+++	+++
<u>Proteus vulgaris</u>	+++	+++	+++	+++

Medio 6 . (Enriquecimiento del medio 2 con extracto de levadura al 0.5%).

Cepa	A	B	C
<u>E. coli</u>	+	+++	+++
<u>S. typhi</u>	+	+++	+++
<u>Shigella sonnei</u>	+	++	++
<u>Proteus vulgaris</u>	+	+++	+++

Medio 7 . (Enriquecimiento del medio 2 con extracto de levadura al 1%).

Cepa	A	B	C
<u>E. coli</u>	+++	+++	+++
<u>S. typhi</u>	+++	+++	+++
<u>Shigella sonnei</u>	++	+++	+++
<u>Proteus vulgaris</u>	+++	+++	+++

Medio 8 . (Enriquecimiento del medio 2 con extracto de levadura al 1.5%).

Cepa	A	B	C
<u>E. coli</u>	+++	+++	+++
<u>S. typhi</u>	+++	+++	+++
<u>Shigella sonnei</u>	+++	+++	+++
<u>Proteus vulgaris</u>	+++	+++	+++

Medio II 1. (Variación en las concentraciones de agar del medio 4B)

	A	B	C	D
Consistencia ...	Líquido	semisólido	sólido	sólido duro

Medio II 2 . (Variación en las concentraciones de agar del medio 7B)

	A	B	C	D
Consistencia ...	Líquido	semisólido	blando	sólido duro

Establecida aparentemente una consistencia adecuada de los medios, se procedió a verificarla realizando pruebas de penetrabilidad variando la concentración de agar en rangos cercanos al medio íntimo, comparándolo contra base de Agar Sangre (92 u. de penetrabilidad).

Medio II 3. (Consistencia en concentraciones de agar en rangos cercanos al del medio II.1.D)

	A	B	C
Unidades de Penetrabilidad ...	101	90	73

Medio II 4. (Consistencia con concentraciones de agar en rangos entre el medio II.2.D y II.2.3)

	A	B	C	D
Unidades de Penetrabilidad ...	108	95	36	70

Lactosa

Medio III II

	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	b	c	a	a
<u>E. typhi</u>	b	c	a	a

Medio III 2L.

	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	b	a	a	a
<u>E. typhi</u>	b	c	a	a

Detección de la producción de H_2S

Medio III 1S. (Variación de tiosulfato de sodio)

	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	b	c	a	a
<u>S. typhi</u>	b	c	a	a
<u>Proteus vulgaris</u>	b	c	a	a

Medio III 2S. (Adición de sulfato ferroso amoniacal)

	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	b	c	a	a
<u>S. typhi</u>	b	c	a	a
<u>Proteus vulgaris</u>	b	c	a	a

Medio III 3S. (Adición de cloruro férrico)

	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	b	b	b	b
<u>S. typhi</u>	b	b	b	b
<u>Proteus vulgaris</u>	b	b	b	b

Medio III 4S. (Adición de citrato ferroso)

	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	c	a	a	a
<u>S. typhi</u>	c	a	a	a
<u>Proteus vulgaris</u>	c	a	a	a

Medio III 5S. (Adición de citrato férrico amónico)

	A	B	C	D
<u>E. coli</u>	a	a	b	b
<u>S. typhi</u>	a	a	b	b
<u>Proteus vulgaris</u>	a	a	b	b

Medio III 6S. (Variación de tiosulfato de sodio)

	A	B	C	D	E	F
<u>Es. coli</u>	b	b	b	a	a	a
<u>Es. typhi</u>	b	b	b	a	a	a
<u>Proteus vulgaris</u>	b	b	b	a	a	a

Medio III 7S. (Variación de tiosulfato de sodio)

	A	B	C	D	E
<u>Es. coli</u>	b	c	a	a	a
<u>Es. typhi</u>	b	c	a	a	a
<u>Proteus vulgaris</u>	b	c	a	a	a

Medio III 8S. (Adición de citrato de sodio)

	A	B	C	D	E	F
<u>Es. coli</u>	b	b	c	a	a	a
<u>Es. typhi</u>	b	b	c	a	a	a
<u>Proteus vulgaris</u>	b	b	c	a	a	a

Medio III 1U. (Adición de urea)

	A	B	C	D	E
<u>Proteus vulgaris</u>	b	c	a	c	b
<u>Es. typhi</u>	b	c	a	c	b

Desarrollo en el medio

	A	B	C	D	E
<u>Es. coli</u>	+++	+++	+++	+	-
<u>Es. typhi</u>	+++	+++	+++	+	-
<u>Shigella sonnei</u>	+++	+++	+++	+	-
<u>Proteus vulgaris</u>	+++	+++	+++	++	-

Medio Formulado :

Agar	1.5%
Peptona de Caseina	0.5%
Extracto de Levadura	1%
Lactosa	1%
Diosulfato de sodio	0.3g
Sulfato férrico anódico	0.12g
Roja de fenol	0.002%
Urea	0.2%
Nitrato de sodio	0.23g

Estepa IV : Se procedió a sembrar en el medio de cultivo formulado, las cepas antes usadas, en períodos de 5 días obteniéndose los siguientes resultados:

Cepas	Crecimiento por días					
	5	10	15	20	25	30
1	+++	+++	+++	+++	+++	++
2	+++	+++	+++	+++	+++	++
3	---	---	---	---	---	---
4	+++	+++	+++	+++	+++	++

Estepa V : Se analizaron 100 muestras provenientes del IMSS (clínica 25 y 29), y del Laboratorio de Análisis Clínicos de la ENEP-Zaragoza; pertenecientes principalmente a niños menores de cinco años, las cuales se usaron tanto en el medio formulado como en otros medios de cultivo habituales.

La frecuencia de microorganismos identificados en los diferentes medios de cultivo fue :

# de bacterias	Medio Formulado	Medio EMB	Medio VB	Medio SS
Lactosa (+)	90	100	100	34
Lactosa (-)	74	34	40	34
Productoras de H ₂ S	28	-	-	40
Lactosa (-)				

% sacado con respecto al # de muestras

Etapas 6 : Se realizó una investigación a cerca del precio de los diferentes medios de cultivo utilizados, tomando en cuenta diversos proveedores. Se usó el precio promedio por litro de medio; para posteriormente hacer un porcentaje del litro de medio de cultivo formulado con respecto a los otros medios comercializados.

	Precio x litro de medio
EMB	10,374.00 pesos
3S	11,725.00 "
VE	11,912.00 "
Medio Formulado	8,073.00 "

(Enero-83)

9. Análisis de Resultados .

En los primeros medios se buscó encontrar un soporte de crecimiento óptimo que tuviera los requerimientos nutritivos necesarios para el desarrollo de las bacterias enteropatógenas. Se partió de dos opciones, el medio 1 que contenía pentona de caseína a diferentes concentraciones como fuente de proteínas y aminoácidos; y del medio 2 que contenía pulque como nutriente.

El medio 1 fue enriquecido con extracto de levadura a diferentes concentraciones para optimizar el crecimiento bacteriano, encontrándose que la concentración más adecuada es al 1% (medio 4). Para el medio 2 se probaron tres tipos de pulque, el estéril, el refrigerado y el comercial; de los cuales se eliminó el comercial por contener una serie de conservadores que inhiben el crecimiento bacteriano. Posteriormente se procedió a enriquecer el medio 2 con extracto de levadura, probando diferentes cantidades, obteniendo un óptimo desarrollo al 1% (medio 7).

A continuación se buscó mejorar la consistencia del medio variando las concentraciones de agar, tomando como base al medio 4B y al 7B, siendo adecuada de 1,5% (medio II3B), y de 1,7% (medio II4B) para el medio con pulque .

Por otra parte se procedió a dar características metabólicas al medio, primeramente con la lactosa que es de gran ayuda para la diferenciación de microorganismos patógenos (no fermentadores de lactosa) de los no patógenos; esto con la ayuda de rojo de fenol al 0.002% que es un in-

dicador ácido-base. Se obtuvo una diferenciación adecuada con lactosa al 1%, como lo muestran los medios III,1,13 y III,2,13.

Para poner de manifiesto la producción de H_2S se probaron las sales de hierro: sulfato férrico amoniacal, sulfato ferroso amoniacal, cloruro férrico, citrato ferrico y citrato férrico; agregando al medio tiosulfato de sodio como fuente de azufre, para obtener una mayor sensibilidad.

El cloruro férrico se eliminó debido a que no daba el pigmento negro en la colonia formadora de H_2S . Las otras sales de hierro dieron buenos resultados, pero se eligió el sulfato férrico amoniacal, por ser el de mayor acceso en el laboratorio, usándose a una concentración de 0.12g/dl. Posteriormente se agregó al medio tiosulfato de sodio a diferentes concentraciones para corroborar la concentración más adecuada, eligiéndose el medio III,6,SD, que contiene 0.3g/dl de tiosulfato de sodio.

Para darle un poco de selectividad al medio se agregó citrato de sodio, observándose accidentalmente que se incrementaba la sensibilidad del medio a la producción de H_2S , por lo que se decidió variar sus concentraciones a fin de encontrar la más adecuada, misma que se mostró en el medio III,3SD.

Debe mencionar que una vez que se llegó a la detección de la producción de H_2S , se eliminó el medio que contenía púlsula, debido a que las bacterias presentes en él precipitaban el hierro, evitando de esta forma que la diferenciación metabólica de las bacterias productoras de H_2S pudiera ser observable. Por lo cual se procedió a -

continuar solo con el medio que contiene agua como diluyente.

Continuando con la diferenciación metabólica, se adicionó al medio urea para la diferenciación de los microorganismos que poseen la enzima ureasa, esto es, que tienen la capacidad de hidrolizar la urea.

La producción de amoníaco alcaliniza el medio, lo que provoca un cambio de color en el mismo (de naranja a rosa). Se observó que a mayor concentración de urea se inhibe el crecimiento bacteriano, y a menor concentración, la diferenciación metabólica es escasa, además cabe mencionar que la urea ayuda a disminuir el swarming.

La concentración adecuada de urea para el medio fue de 0.2% (medio III, IUG). Es importante mencionar que la urea debe adicionarse en solución estéril después de esterilizar el medio, para evitar que se descomponga.

Por otra parte, la estabilidad del medio se realizó durante un mes observándose resultados satisfactorios, pues dicho período supera aún el establecido para la mayoría de los medios comerciales, que es en promedio de tres semanas.

Posteriormente el medio de cultivo formulado fue comparado con tres medios de cultivo comerciales: SS, VB, EMB; realizándose las pruebas bioquímicas a las bacterias aisladas, encontrándose que se obtiene un aislamiento semejante al de los otros medios; de acuerdo a nuestros resultados, observamos que el medio puede **considerarse** como de moderada selectividad y de buena diferenciación metabólica con muestras clínicas.

Aunque es necesario mencionar que en el medio formulado, pueda existir la confusión entre Salmonella y Proteus

ya que ambos pueden producir H_2S y dar colonias negras en el medio.

Por otra parte, se puede observar ennegrecimiento del medio por la formación del swarming originado por algunas cepas de Proteus vulgaris el cual no puede ser inhibido totalmente en el medio.

En lo referente al costo del medio de cultivo formulado, fue comparado con otros tres medios de cultivo comerciales, y se observó que dicho medio es más económico que los otros, además pudiera ser de ayuda en la rutina del laboratorio, pues podría usarse en sustitución de dos de los medios generalmente usados (EMB y VB), y esto debido a sus propiedades de moderada selectividad y buena diferencia parasítica.

10. Conclusiones .

De acuerdo con los resultados presentados es posible observar, que el medio formulado es un medio útil para el aislamiento de enterobacterias causantes de enfermedades gastrointestinales, ya que se considera que posee una buena sensibilidad para la demostración de lactosa y H_2S y, moderada selectividad.

La consistencia del medio es más dura que la del medio SS. Se considera un medio de bajo costo, ya que se reduce el uso de tres medios a dos, además de que por sí solo es más económico que los medios EMB, VE y SS. Tiene buena confiabilidad en cuanto al aislamiento de enterobacterias, como se observó al comparársele con otros medios comerciales.

Gracias a ello es posible una identificación presuntiva del microorganismo patógeno. Se recomienda realizar nuevos estudios encaminados a disminuir la sensibilidad del H_2S , y aumentar la selectividad con el fin de obtener óptimos resultados.

11. Bibliografía .

- 1.- Sánchez A. " Comparación entre rehidratación oral y parenteral en niños deshidratados por gastroenteritis" Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. , Vol. 42, No. 1 , pp.16-20 , Enero (1995).
- 2.- Larry K. " Fecal Leukocytes in Enteric Infections" , University of Texas Medical School at Houston and Hosp. Infantil de México. pp. 562 - 565 (1976).
- 3.- Vega F. "El vómito como indicador clínico de la diarrea por rotavirus " , Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. Vol. 42, No. 3, pp. 169 - 174 , Marzo (1995).
- 4.- Larry K. " Prospective study of enteropathogens in - children with diarrhea in Houston and México " , Journal of Pediatrics , Vol. 93, No. 3, pp. 333 - 333, Septiembre (1979).
- 5.- Morales M. " Frecuencia de Campylobacter fetus ss jejuni y Yersinia enterocolitica en niños con diarrea aguda " , Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. Vol. 41, No. 2, pp. 86 - 89 , Feb. (1994).
- 6.- Pérez P. " Relación entre cuadro diarreico y estudio nutricional en niños " , año V, No. 8, pp. 219 - 222, Infatología , Agosto (1985).

- 7.- Alverado A. " Frecuencia de Microorganismos patógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda ", Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. Vol. 42, No. 6, pp. 354 - 359, Jun (1935).
- 3.- Davis D. " Tratado de Microbiología " 2a. edición, - Salvat Editores, Barcelona, pp. 773 - 804 (1935).
- 9.- Clarte J. " Etiopatogenia de las diarreas infecciosas", Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. Vol. 42, No. 1 , pp. 66 - 72 , Enero (1935).
- 10.- Kauffmann F. " The bacteriology of enterobacteriaceae" pp. 261 - 233, (1966).
- 11.- Edwards y Ewing. " Isolation and Preliminary Identification ", 4th. ed. Chapter 3, pp. 28 - 24 (1935).
- 12.- Kelly T. " Enterobacteriaceae ", Manual of Clinical - Microbiology, 4th. ed. Chapter 24, pp. 263 - 277 (1935).
- 13.- Farmer J. " Biochemical Identification of New Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens ", Journal of Clinical Microbiology, Vol. 21, No. 1 , pp. 46 - 76, Jan (1933).

- 14.- Hickman B. " *Leminorella*, a new genus of Enterobacteriaceae; Identification of *Leminorella richardii* sp. nov. Found in Clinical Specimens ", *Journal of Clinical Microbiology* , Vol 21, No. 1 , pp. 234 - 239 , Feb. (1935).
- 15.- Young G. " Rapid Microbiochemical Method for presumptive identification of gastroenteritis - Associated Members of the family Enterobacteriaceae ", *Journal of Microbiology*, vol. 21, No. 6, pp. 914 - 918, June (1935).
- 16.- Overman T. " Comparison of the API Rapid E Four - Hour System for the identification of Routine Clinical Isolates of the Enterobacteriaceae " , *Journal of Microbiology*, Vol. 21, No. 4, pp. 542 - 545, Apr (1935) .
- 17.- Lennette, E. " *Manual of Clinical Microbiology* ", Ed. Lennette; American Society for Microbiology - Chapter 15, pp. 195- 217. (1970).
- 18.- González, G. " *Disenteria por bacilo de Shiga en México* ", *Salud Pública de México.* , Vol. 13, No. 3 , . pp. 235 - 239 . Mayo (1971).

- 19.- Freeman, B. " Tratado de Microbiología de Burrows ", 21a. edición, Ed. Interamericana, México. pp. 429 - 445, (1983).
- 20.- Bojalil, J. " Microbiología Médica ", Tomo I, 1a. ed. Editorial Méndez Oteo, México, pp. 495 - 525, (1981).
- 21.- Bioxon . " Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico ", Tomo I, pp. 39 - 96, (1980).
- 22.- Wolpert, E. " Estudio del paciente con diarrea ", Atención Médica, pp. 44 - 62, Jul (1980).
- 23.- Cepelia , B. " Nociones Elementales de Microbiología Médica ", Cáp. 14, Ed. Pco. Méndez Cervantes, México, pp. 155 - 177, (1973).
- 24.- Koneman, E. " Diagnóstico Microbiológico ", 1a. ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. pp. 154-168, (1983) .
- 25.- Bailey - Scott. " Diagnóstico Microbiológico ", 6th ed. , Editorial Médica Panamericana , Argentina, pp. 210 - 256, (1983).
- 26-Edwars, P. " The antigens of Enterobacteriaceae ", - Chapter 4 , 4th ed. , Burgess ed Burgess Pub. Co USA, pp. 43 - 66 , (1935).

- 27.- Carpenter, " Microbiología ", 4ta. ed. Editorial - Interamericana, México. pp. 405 - 410 .
- 28.- Gordon, J " The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology", J. Pathology Bacteriology, 31 :195 - 199, (1923).
- 29.- Mac Faddin, J. " Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria ", 2a. ad. , Editorial London Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 27, 94, 104 - 110, (1930).
- 30.- Clarte, B. " El papel de las bacterias en la etiología de las diarreas infecciosas infantiles en la ciudad de México " , Rev. Instit. Salubr. Enferm. trop. Vol..24, No. 1-4. México, Ene-Dic (1959).
- 31.- Pérez, N. " epidemiología de las bacterias ", Gaceta Médica de México. Tomo LXXIX, No. 3, pp. 173 - 182, Marzo, (1953).
- 32.- Braude, I.A., " Microbiología Clínica ", Editorial Panamericana, Buenos Aires. pp. 384, (1984).