



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

COMPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL
AISLAMIENTO SELECTIVO DE Vibrio cholerae



EXAMEN ESPECIAL
FAC. DE QUIMICA

Trabajo escrito

Que para obtener el Título de:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P r e s e n t a :

GUADALUPE GABRIELA GUTIERREZ PEREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

A LA M.C. BISERKA SVESHTAROVA P.

A LA Q.F.B. GUADALUPE VELEZ P.

**A MI MADRE MA. CRISTINA PEREZ DE G. Y A MI PADRE CARLOS GUTIERREZ G. POR EL
APOYO QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO.**

A MI ESPOSO HUGO FLORES POR SU COMPRESION Y PACIENCIA.

A MIS HERMANOS CARLOS Y ALEJANDRO.

JURADO ASIGNADO:

Presidente Prof: Lilia Vierna Garcia

Vocal Prof: Biserka Sveshtarova Pekarkova

Secretario Prof: Rodolfo Pastelín Palacios

1er. suplente Prof: Adriana Guadalupe Mejía

2do. suplente Prof: Minerva Gaitán Gómez


El tema se desarrollo en la biblioteca de la Facultad de Química y la biblioteca del Instituto de investigaciones Biomédicas.

Asesor



M.C. Biserka Sveshtarova Pekarkova

Sustentante



Guadalupe Gabriela Gutiérrez Pérez

COMPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

PARA EL AISLAMIENTO

SELECTIVO DE Vibrio cholerae

INDICE

I. Introducción

II. Objetivos

III. Generalidades

III.1. Medios de cultivo bacteriológicos

III.1.1. Clasificación de los medios de cultivo

III.1.1.1. Por su aspecto físico

III.1.1.2. En base a su composición

III.1.1.3. Por su empleo

III.1.2. Función bioquímica del medio de cultivo

III.2. Diagnóstico

III.2.1. Cuadro clínico diferencial

III.2.2. Diagnóstico de laboratorio

III.2.2.1. Recolección de muestras

III.2.2.2. Estudio de la muestra

III.2.2.2.1. Muestras clínicas

III.2.2.2.2. Detección en agua y alimentos

III.2.3. Tratamiento terapéutico

III.3. Medios de cultivo selectivos para V.cholerae

III.3.1. Requerimientos nutricionales

III.3.1. Agar TCBS (tiosulfato citrato sales biliares sacarosa)

III.3.1.1. Uso o finalidad de empleo

III.3.1.2. Explicación de la prueba

III.3.1.3. Fundamento

III.3.1.4. Fórmula del Agar TCBS

III.3.1.5. Especificaciones del medio de cultivo

- III.3.1.6. Resultados de la morfología colonial
- III.3.2. Agar CPC (Agar cellobiosa polimixina B colistina)
 - III.3.2.1. Uso o finalidad de empleo
 - III.3.2.2. Explicación de la prueba
 - III.3.2.3. Fundamento
 - III.3.2.4. Formula del agar CPC
 - III.3.2.5. Especificaciones del medio de cultivo
 - III.3.2.6. Resultados de las morfología colonial
- III.3.3. Agar DCLS (Agar desoxicolato citrato lactosa sacarosa)
 - III.3.3.1. Uso o finalidad de empleo
 - III.3.3.2. Explicación de la prueba
 - III.3.3.3. Fundamento
 - III.3.3.4. Formula del Agar DCLS
 - III.3.3.5. Especificaciones del medio de cultivo
 - III.3.3.6. Resultado de la morfología colonial
- III.3.4. Conservación de la cepa de referencia de V.cholerae
- IV. Discusión
- V. Conclusión
- VI. Bibliografía

I. INTRODUCCION

De acuerdo al Manual de Bergey (Baumann P., Schubert, H.W. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Vol 1, 1984, p: 518-550) el género Vibrio fue inicialmente propuesto por Verón en 1865; comprende microorganismos anaerobios facultativos en forma de bacilos o bacilos curvos, Gram negativos oxidasa positivo (excepto Vibrio metschnikovii). Poseen ambos metabolismos (respiratorio y fermentativo), no fijan nitrógeno, ni lo desnitrifican, todos son quimioorganotrofos, fermentan la D-glucosa dando como resultado la producción de ácido, pero no de gas. Todos utilizan D-glucosa, D-fructosa, maltosa y glicerol; muchos son capaces de crecer en un medio mineral conteniendo D-glucosa y cloruro de amonio, solo unas cuantas cepas necesitan de factores orgánicos de crecimiento (5).

El género Vibrio está clasificado en la Familia Vibrionaceae junto con otros tres géneros: Photobacterium, Aeromonas y Plesiomonas.

Las formas involucradas (cocolde y vibrioide) usualmente se presentan en cultivos viejos (en fase estacionaria) o bajo condiciones adversas, no forman endosporas, ni microquistes, en medios líquidos son móviles por flagelos polares.

Muchas especies de Vibrio son patógenas para los seres humanos y se pueden relacionar con enfermedades transmitidas por los alimentos. Con excepción del Vibrio cholerae y el Vibrio mimicus las especies de Vibrio no crecen en medios que carezcan de cloruro de sodio y por eso se les llama halofílicas.

Existen más de 20 especies de Vibrio de los cuales solo las 12 siguientes, se han aislado de muestras clínicas humanas.

V.alginolyticus	V.fluvialis	V.carchariae
V.cholerae 01	V.fumissil	V. metschnikovii
V.cholerae no 01	V.cincinnatiensis	V.mimicus
V.damsela	V.hollisae	V.parahaemolyticus

En 1854 Pacini señaló por primera vez a V.cholerae como causante del cólera, que es una especie patógena produce una infección intestinal aguda grave y que en los casos no tratados produce la muerte dentro de las 24 horas de su aparición.

La especie comprende varios grupos de antígenos somáticos (O), entre ellos el grupo 01, que está relacionado con los Biotipos, clásico y Eitor. Los dos Biotipos se encuentran separados en dos serotipos principales: Ogawa e Inaba y raramente un tercer serotipo, el Hikojima.

El primer caso de cólera en México se presentó el 27 de Junio de 1833 en Saltillo, Coahuila, a partir de esta fecha, la epidemia se propagó a la mayor parte del país. El origen de estas epidemias se supone fue a partir de Nueva Orleans y de Cuba. La segunda, tercera y la séptima pandemias de cólera han afectado a México. La séptima pandemia que es la que actualmente continúa se inició en 1961 (8).

II. OBJETIVOS .

II.1. Realizar un análisis comparativo entre los diferentes medios de cultivo que se pueden utilizar para el aislamiento selectivo de V.cholerae.

II.2. Obtener una conclusión, de cual medio de cultivo puede ser el más adecuado para el aislamiento selectivo de V.cholerae.

III. GENERALIDADES .

III.1. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIOLÓGICOS.

Aunque se han descrito numerosos medios de cultivo sus ingredientes esenciales son relativamente pocos. Van desde soluciones de sales inorgánicas apropiadas para microorganismos autotrofos, hasta medios de cultivo complejos preparados con carne digerida enriquecida con sangre o suero.

Los medios de cultivo pueden contener principalmente carne digerida (peptona, caldos nutritivos), la cual es el producto de autólisis o hidrólisis enzimática de la carne o pescado. Para proporcionar una mejor fuente de vitaminas y coenzimas , los medios son enriquecidos con frecuencia por medio de extractos de carne (infusiones de carne) o extractos de levadura.

III.1.1. Clasificación de los medios de cultivo.

existen varias características o especificaciones con las cuales se pueden clasificar a los medios de cultivo.

III.1.1.1. Por su aspecto físico.

a. Medios líquidos.

Se emplean fundamentalmente para:

- Cultivar microorganismos y obtener grandes cantidades de los mismos.
- Estimular y promover la selección de algún o algunos microorganismos e impedir que otros se multipliquen.
- Para identificar al microorganismo estudiado mediante pruebas bioquímicas.

b. Medios semisólidos.

Se usan para identificaciones bioquímicas y poder investigar si el microorganismo estudiado es móvil. Los medios semisólidos tienen una consistencia blanda. Se preparan añadiendo una concentración de agar de 1 a 1.5% o con una mezcla de Agar y gelatina.

c. Medios sólidos.

Se utilizan para obtener colonias aisladas de microorganismos. Los medios sólidos constituyen la mayor parte de los medios de cultivo que se emplean en microbiología. Constan esencialmente de agar, gelatina o albúmina.

III.1.1.2. En base a su composición.

a. Medios sintéticos o de composición definida.

Es aquel en que se conoce la composición química exacta de los ingredientes. Ej.- Solución Ringer y Solución Locke.

b. Medio no sintético.

No se conoce de una manera definida la composición precisa de alguna o de todas las sustancias nutritivas.

Ej.- Extracto de carne, Agar vitaminado.

III.1.1.3. Por su empleo.

a. Medios selectivos.

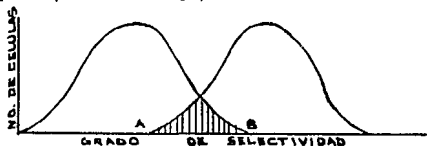
Los medios selectivos sólidos en los cuales mediante el uso de inhibidores, se suprime la flora acompañante, con el objeto de aislar el patógeno buscado selectivamente. La elección de inhibidor y la concentración adecuada, es una operación delicada, puesto que la selectividad desde el punto de vista bacteriológico, no puede ser nunca absoluta en una población de microorganismos.

Según la distribución de Gauss en cada población existe un pequeño grupo de células muy lábiles y otro pequeño grupo de células resistentes, siendo la mayoría células de sensibilidad media. Se tiene un ejemplo concreto en donde la población de Salmonella es en conjunto más resistente al inhibidor (por ejemplo tetracionato) que la población de otras enterobacterias, pero existe un grupo intermedio coincidente. Si se selecciona la concentración de inhibidor

correspondiente al punto A (FIG.1) las salmonellas no serán inhibidas y crecerán numerosos contaminantes con lo que se dificultará el diagnóstico.

En el punto B no crecerá ninguna bacteria indeseable, pero también se suprimirán numerosas células de salmonella especialmente lábiles. En los valores comprendidos entre A y B se encuentra la concentración crítica de inhibidor a seleccionar empíricamente.

Fig.1. Comportamiento de dos grupos de bacterias en un medio selectivo



De aquí se puede deducir que un medio nutritivo único proporciona una seguridad insuficiente, por lo que es necesario utilizar combinaciones de dos o tres medios.

Por ejemplo los medios utilizados para el aislamiento de enterobacterias de cultivos mixtos están diseñados para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y retardar el crecimiento de E.coli y otras bacterias coliformes, esto permite el desarrollo de otras bacterias de interés médico a partir de muestras donde hay escaso número en comparación con la concentración masiva de otros organismos entéricos.

Algunos ejemplos importantes de medios selectivos son:

- Agar para Salmonella y Shigella
- Agar entérico de Hecktoen
- Agar sulfito de bismuto
- Agar TCBS *
- Agar Desoxicolato citrato lactosa sacarosa *
- Agar modificado con Celobiosa polimixina B y colistina *

* Estos medios de cultivo son específicos para el aislamiento selectivo de V.cholerae.

b. Medios de enriquecimiento selectivo.

Son medios selectivos que estimulan la multiplicación de algún microorganismo e impiden o inhiben la reproducción de otros.

Ej.- Base de caldo tetrionato y Caldo selenito de sodio.

c. Medios diferenciales.

Son aquellos que contienen indicadores de ácido-base o redox que detectan cambios en el medio o producen condiciones específicas en el medio.

En muchos casos no se busca un patógeno desconocido, sino un grupo de organismos en especial, que se diferencia de otros en virtud de una o más características.

Ej.- Agar EMB y Agar ENDO.

d. Medios especiales para cultivo de Hongos y Levaduras.

Son medios especiales que se usan para el desarrollo de Hongos y Levaduras.

Ej.- Agar Dextrosa Sabouraud y Agar Dextrosa y papa.

e. Medios de cultivo de anaerobios.

Son medios especiales diseñados para microorganismos que requieren condiciones de anaerobiosis.

Ej.- Agar para anaerobios y Caldo tioglicolato.

f. Medios para valorar la potencia de antibióticos.

La industria química farmacéutica cuenta con 13 medios de cultivo diferentes para estos fines, se designan con el nombre propio seguido de un número del 1 al 13.

Ej.- Agar base (medio para antibiótico no. 1)

Agar para ensayo de Neomicina (medio para antibiótico No.11)

g. Medios de transporte.

Sirven para transportar los especímenes que contienen los microorganismos del sitio de la toma del producto hasta el laboratorio donde va a efectuarse el estudio sin que se altere la proporción de la flora microbiana de los mismos.

h. Medios para filtración a través de membrana.

Pueden ser líquidos o sólidos. En el primer caso se preparan a la concentración usual y permiten el crecimiento de microorganismos presentes en la membrana.

Los medios sólidos tienen un contenido mínimo de Agar para favorecer la difusión de nutrientes en el medio a la membrana.

III.1.2. Función bioquímica del medio de cultivo.

El contenido de nutrientes presentes en un medio de cultivo le servirán al microorganismo para sintetizar los diversos compuestos de su protoplasma y por lo tanto multiplicarse. El microorganismo requiere disponer de un medio que contenga los constituyentes químicos adecuados para sostener las reacciones biosintéticas necesarias. Las sustancias químicas que debe recibir el microorganismo para poder crecer y multiplicarse constituyen necesidades nutritivas.

Estos factores nutricionales se pueden clasificar en:

1. Componentes necesarios como fuentes de energía

2. Componentes necesarios para la construcción de nuevo material celular.

a) Compuestos necesarios como fuentes de Carbono.

b) Compuestos necesarios como fuentes de Nitrógeno, P, S y oligoelementos.

c) Compuestos orgánicos necesarios en su forma como factores de crecimiento.

Si dispone de estos factores necesarios los microorganismos crecerán en el medio físicoquímico adecuado (temperatura, pH, O₂ , favorables).

Las diversas bacterias tienen necesidades nutricionales diferentes, incluso una misma bacteria puede tener requerimientos diferentes según las condiciones del crecimiento y la ausencia de otras sustancias en el medio.

III.2. DIAGNOSTICO .

III.2.1. Cuadro clínico diferencial.

En la mayoría de los pacientes infectados, el cólera no origina ninguna manifestación clínica. El espectro clínico abarca tres estadios el primero se refiere al caso que no presenta deshidratación: hay menos de cuatro evacuaciones diarias, no tiene vómito, no ha perdido peso y no hay deshidratación. El segundo es el caso con deshidratación moderada, que se presenta cuando el paciente tiene 4 a 10 evacuaciones diarias, vómito escaso, pérdida de peso corporal menor al 5% y algunos datos de deshidratación como son orina escasa, mucosas secas, somnolencia e irritabilidad. El tercer estadio es el caso con deshidratación grave en el que el paciente tiene más de 10 evacuaciones diarias, vómito frecuente, pérdida de más del 5% del peso corporal y los datos de deshidratación son aparentes como ausencia de orina, mucosas secas, inconsciencia, hipotonía, convulsiones, hipotensión, signos de acidosis y otros.

En un principio las evacuaciones son de color café con contenido fecal, pero pronto adquieren un color gris pálido, con discreto "olor a pescado", la presencia de moco da la apariencia de agua de arroz.

III.2.2. Diagnóstico de laboratorio.

III.2.2.1. Recolección de muestras.

Las muestras deben ser recolectadas en la fase aguda de la enfermedad con hisopos rectales, durante la convalecencia es mejor la toma directa de la materia fecal. Cuando la muestra no es procesada de inmediato, se usa el medio de transporte de Cary-Blair, en el cual los *Vibrios* pueden sobrevivir hasta tres semanas.

III.2.2.2. Estudio de la muestra.

III.2.2.2.1. Muestras clínicas.

- a. A partir de Cary Blair o de la muestra directa, se inoculan con un hisopo de algodón en un tubo con tapón de rosca de 16X100 10ml de agua peptonada alcalina de pH= 9.0.
- b. Incubar de 6 a 8 horas a 37 °C, tomar 3 asadas de la superficie con cuidado y tratando de no agitar el tubo (en la superficie se encuentran los Vibrios en mayor cantidad).
- c. Sembrar las 3 asadas en placas de Agar TCBS. Aislar colonias por estría cruzada. Flamear el asa entre cada estría. Incubar de 18 a 24 horas a 37°C.
- d. Las colonias típicas en el Agar TCBS de V.cholerae , son amarillas planas, un poco convexas de aproximadamente 2 mm. de diámetro. Las colonias típicas en el caso de V.parahaemolyticus son color azul verdosas, grandes y planas.

Nota: No todas las colonias amarillas en Agar TCBS son de V.cholerae ya que también dan colonias amarillas: V.alginolyticus, V.cincinnatiensis, V.fluvialis, V.furnissii, V.metschnikovii (que es el único oxidasa negativo) y algunos Biotipos de V.vulnificus debido a que todos ellos fermentan la sacarosa.

e. Una vez identificadas las colonias típicas en Agar TCBS se efectúan las pruebas bioquímicas y serológicas.

f. Pruebas bioquímicas.

Prueba	V.cholerae
- Medio MIO	Omitina descarboxilasa (+)
	Movilidad (+)
	Indol (+)
- Agar LIA	Lisina descarboxilasa (+)
- Agar TSI	producción de Acido (+)
	Gas (-)
	H ₂ S (-)
- Caldo arginina	Arginina deshidrogenasa (-)
- Prueba de la oxidasa	(+)

g. Pruebas serológicas.

- Aglutinación con suero polivalente:

V.cholerae no 01 (-)

V.cholerae 01 (+)

- Aglutinación con antisueros específicos Ogawa e Inaba.

III.2.2.2.2. Detección en agua y alimentos.

a. Agua.

Mezclar dos muestras de agua o hielo fundido.

- transferir 25 ml. de cada mezcla a 225 ml. de agua peptonada alcalina (APW) por duplicado y filtrar de 500 a 1000 ml. a través de filtros de membrana de 0.45 micras y colocar estas en tubos con 10 ml. de APW, incubar en enriquecimiento a 35 a 37 °C y la otra muestra a 42°C.

Después de la incubación transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa a una placa de Agar TCBS o al Agar Modificado de celobiosa polimixina B colistina (CPC).

Nota: La polimixina inhibe al Biotipo clásico de V.cholerae.

- Incubar durante 18 a 24 horas el Agar TCBS a 35-37°C y el Agar mCPC de 24 a 48 horas de 39 a 40°C.

- El crecimiento en Agar TCBS: V.cholerae Eitor y clásico, son grandes lisas, amarillas, con centro opaco y bordes translúcidos.

El crecimiento en CPC: Las colonias de V.cholerae Eitor son púrpuras (negativa para la fermentación de la celobiosa). El V.vulnificus produce colonias amarillas achatadas con el centro opaco y bordes translúcidos. la mayoría de las demás especies de Vibrio no crecen fácilmente en Agar CPC.

- Realización de las pruebas bioquímicas y serológicas de las colonias típicas o sospechosas.

b. alimentos.

- Pesar 25 g. en forma aséptica de la muestra y colocarla en una licuadora estéril en 225 ml. de agua peptonada alcalina, licuar durante dos minutos.
- En este caso se efectúan diluciones seriadas de 10-2 hasta 10-6 con agua peptonada alcalina.
- Incubar el homogeneizado (10- 1) y las demás diluciones de 35 a 37°C por 6 a 8 horas.
- Estríar todos los enriquecimientos en Agar TCBS o Agar CPC. Incubar el Agar TCBS a 35-37°C por 18 a 24 horas o el Agar CPC a 39-40°C por 24 a 48 horas.
- Seleccionar por lo menos tres colonias típicas de cada caja en Agar Gelosa sangre, Agar de soya y tripticasina + 1.5% de cloruro de sodio, incubar a 35-37°C durante 12 a 24 horas.
- Sembrar de los medios anteriores las pruebas bioquímicas y realizar las pruebas serológicas.

III.2.3. Tratamiento terapéutico.

El tratamiento es muy simple y se basa en la restitución de líquidos. Con excepción de casos graves, la reposición de líquidos puede hacerse por vía oral.

En general el tratamiento es el siguiente:

- a) para mantener el equilibrio electrolítico, se debe medir el volumen de la evacuaciones cada 8 horas y administrar la cantidad de líquidos necesaria para compensar las pérdidas y mantener el equilibrio electrolítico.

b) Los antibióticos de preferencia son las tetraciclinas a razón de 500 mg. cada 6 horas durante 2 ó 3 días para adultos.

c) Soluciones de rehidratación por vía intravenosa con dispositivo desechable, tales como la solución Ringer con lactato de sodio.

d) Es necesario rehidratar al enfermo inicialmente hasta el 10% del peso corporal.

III.3. MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS PARA *V.cholerae* .

III.3.1 Requerimientos nutricionales de *V.cholerae* .

De manera característica los vibriones crecen a un pH muy elevado (8.5-9.5) y son destruidos cuando el pH disminuye por lo tanto en los cultivos que contienen carbohidratos fermentables pierde la viabilidad.

La mayor parte de las especies de Vibrio son halotolerantes y el cloruro de sodio con frecuencia acelera su proliferación. Algunos vibriones son halófilos estrictos y requieren la presencia de NaCl para crecer.

En un estudio realizado por Singleton, et.al.(1), se encontró que la relación de la cantidad en la incorporación de los aminoácidos y la cantidad de la respiración esta influenciada por la concentración de NaCl y MgCl₂ . La máxima captación de los aminoácidos ocurre por intermedio o control de la concentración de MgCl₂ . Cuando la concentración de MgCl₂ se incrementa o disminuye la captación de dichos aminoácidos cambia en esa proporción. De forma similar se comporta el modelo utilizado para diferentes concentraciones de NaCl.

La actividad heterotrófica de V.cholerae también se ve afectada cuando las concentraciones de NaCl varían.

Si se prepara un medio con 1% de iones sodio (peso / volumen) más triptosa (ca. 0.0012 M Na+) este medio sirve como soporte de crecimiento a V.cholerae .

Ya que la triptosa sirve sola como soporte de crecimiento a V.cholerae y que si se tiene otro medio que contenga glucosa como suplemento y extracto de levadura como soporte de crecimiento para V. cholerae y se observa que no crece ; de esto se concluye que dicho microorganismo requiere una o más vitaminas y otros factores de crecimiento, además de la adición de NaCl, para crecer.

V.cholerae tiene la capacidad de sobrevivir por períodos extensos de tiempo bajo condiciones adversas y baja temperatura (10°C) y concentraciones reducidas de nutrientes. De esta manera V.cholerae posee una ventaja ecológica, especialmente en ambientes de estuarios y aguas saladas; siendo para V.cholerae preferentemente una salinidad moderada.

La susceptibilidad de las células a la lisis depende también de la concentración de sacarosa en el medio de crecimiento. Se ha sugerido que cationes divalentes se unen a la membrana externa para participar en el mantenimiento de dicha membrana y de su integridad funcional.

En un estudio realizado por Ronald M. Baker et al.(7), se demostró que las células de V.cholerae mostraron un incremento en su cantidad y una disminución del volumen (lo que se traduce en un cambio en su morfología microscópica de células vibrioides a células cocoideas) en una solución basal de sales definidas y un filtrado de agua de mar, de aquí se deduce que el cambio en la morfología microscópica y los demás cambios se producen cuando hay un decremento o privación de nutrientes. Al adicionar nutrientes la viabilidad sostenida y la reversión rápida del estado cocoide a vibriode y subsecuentemente la división celular regresan a su estado normal; lo que puede conferir una ventaja de sobrevivencia en un ambiente con privación transitoria de nutrientes.

III.3.1. Agar TCBS. (Tiosulfato citrato sales biliares sacarosa).

III.3.1.1. Uso o finalidad de empleo.

El Agar TCBS se recomienda para el aislamiento selectivo de V.cholerae y otros Vibrios patógenos intestinales (V.parahaemolyticus).

III.3.1.2. Explicación de la prueba.

El aislamiento y cultivo de los organismos ahora asignados al género Vibrio ha ido aumentando por el desarrollo de un medio que es altamente selectivo para los vibriones causantes del cólera, diarrea y contaminantes de alimentos. Este medio fue desarrollado por Kobayashi, et al (4). y modificado por Nakanishi . La combinación de agua peptonada alcalina y Agar TCBS es usado en muchos procedimientos para V.cholerae y otros Vibrios de heces.

III.3.1.3. Fundamento.

Las elevadas concentraciones de tiosulfato y citrato así como el medio fuertemente alcalino, inhiben notablemente las enterobacterias presentes en heces o alimentos. Además el tiosulfato sirve como fuente de azufre y en combinación con el citrato férrico, se detecta la producción de ácido sulfhídrico o sulfuro de hidrógeno.

Las cantidades exactamente determinadas de bilis de buey y de colato suprimen el crecimiento de enterococos y la proliferación de Proteus dentro de un amplio cuidado de los Vibrios.

La sacarosa es incluida como carbohidrato fermentable para detectar el metabolismo de los vibrios. Algunas cepas de Proteus sacarosa positivas pueden formar colonias semejantes a las de Vibrio.

El azul de timol y el azul de bromotimol son incluidos como indicadores de pH, presentando un viraje de color hacia amarillo por la formación de ácido.

III.3.1.4. Formula del Agar TCBS.

Extracto de levadura	5 g.
Proteosa peplona	10 g.
Sacarosa	20 g.
Tiosulfato de sodio	10 g.
Sales biliares	3 g.
Bilis de buey	5 g.

Cloruro de sodio 10 g.
Citrato férrico 1 g.
Azul de bromotimol 40mg.
Azul de timol 40mg.
Agar 15 g.
Agua destilada 1000 ml.

III.3.1.5. Especificaciones del medio de cultivo.

Especificación	Norma
pH	8,6 + 0,2
Temperatura de gelificación	33 + - 0,2
Color	Verde oscuro brillante
Claridad	Translúcido
Cantidad a pesar	88 g / 1000 de H ₂ O dest.

NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE

USAR EL MEDIO RECIENTEMENTE PREPARADO.

Procedimiento de preparación (medio en polvo).

1. Pesar 88 g. del medio y colocar en 1000 ml de agua destilada.
2. dejar reposar durante 15 minutos.
3. Calentar hasta ebullición con agitación frecuente y dejar hervir durante 1 minuto, hasta completar la disolución.
4. **NO ESTERILIZAR.**
5. Enfriar a 45 + 5°C y vaciar en placas.

Los especímenes que provienen de hisopos rectales, vómito pescado u otros alimentos pueden ser sembrados directamente sobre la placa del medio, se recomienda que el inóculo sea fuerte especialmente si la muestra no es fresca o reciente, ya que el medio es altamente selectivo y los *Vibrios* tienden a morir fácilmente.

Los hisopos que contienen especímenes sospechosos pueden ser transportados al laboratorio en medio de transporte de Cary Blair. Una observación importante es que las muestras que contengan Vibrio no se deben refrigerar.

Aunque en un reporte realizado por Singleton, et al (1), indica que V. cholerae puede existir por extensos períodos de tiempo a bajas temperaturas (10°C).

Las placas se incuban protegidas de la luz a 35-37°C durante 18 a 24 horas. Si después de las 24 horas el crecimiento es negativo, reincubar 24 horas más.

III.3.1.6. Resultados de la morfología colonial .

Después del período de incubación las placas deben mostrar buen crecimiento. En las placas en las que el procedimiento usado es por la técnica de dilución (NMP) y utilizando varilla de vidrio para extender el inóculo, se debe observar que el número de microorganismos disminuye al aumentar la dilución, y consecuentemente en las estrias se encuentran colonias aisladas de Vibrio .

La morfología colonial típica es la siguiente:

V.cholerae .- Las colonias de V.cholerae variedad (Eitor y clásico) son grandes, lisas, amarillas* con centro opaco y los bordes translúcidos y ligeramente achatadas.

V.parahaemolyticus .- Colonias grandes de color azul a verdes en el centro.

Nota: las especies de Vibrio no producen colonias pequeñas de color crema en Agar TCBS. Las colonias de V.mimicus son verdes (sac-). La mayoría de las especies de Vibrio crecen en agar TCBS y producen colonias amarillas.

E.coli .- Crecimiento inhibido .

P.aeruginosa .- Crecimiento inhibido .

S.faecalis .- Crecimiento inhibido .

P.vulgaris .- Crecimiento inhibido .

P.mitrabilis .- pueden crecer algunas colonias de color amarillo claro convexas y pequeñas.

Experimentos realizados por K.M. Nicholls, et al (3) , muestran que la reducción artificial del pH con HCl o la reducción del pH por la presencia de bacterias que fermentan sacarosa, permiten el crecimiento de Proteus ssp.. Esto puede verse en el cultivo como colonias "satélite" de Proteus alrededor de aquellos vibrios que fermentan la sacarosa.

* Indica la utilización de la sacarosa. En un estudio realizado por J.Vila, et al (2) . se indica que al variar la concentración de sacarosa se puede ver al microscopio electrónico que en el Agar TCBS se presentan marcadas diferencias en la morfología celular, además si la concentración de sacarosa es menor al 1% la prueba de la oxidasa es negativa para V.cholerae cuando se espera sea positiva.

III. 3.2. Agar CPC (Agar celobiosa polimixina B colistina) .

III.3.2.1. Uso o finalidad de empleo .

El Agar CPC (celobiosa polimixina B colistina) fue desarrollado para el aislamiento selectivo de V.cholerae y V.vulnificus ; el cual tiene una ventaja significativa sobre otros medios para el aislamiento y diferenciación de Vibrios. Además la fermentación de la celobiosa por V.vulnificus permite la fácil diferenciación de estas dos especies.

Este medio ofrece un potencial significativo como un medio selectivo y diferencial para estas dos especies patógenas.

III.3.2.2. Explicación de la prueba .

De 12 especies patógenas de Vibrio al Humano han sido descritas V.vulnificus y V.cholerae las cuales han recibido mayor atención en los últimos años. V.cholerae es el agente etiológico causante del cólera, del cual se ha investigado su distribución y ecología, además del descubrimiento de dos cepas O1 y no O1 de esta especie en aguas costeras. V.vulnificus es un contaminante de alimentos marinos y puede causar infecciones en heridas y septicemias. V.vulnificus también se encuentra en forma natural en ambientes marinos y estuarios.

El Agar TCBS ha sido utilizado rutinariamente para el aislamiento de Vibrios patógenos y su selectividad para este género ha sido cuestionada. Se encontró que solo el 51% de los aislamientos en este medio fueron miembros de este género, por lo que se necesita un medio superior al Agar TCBS para el aislamiento de Vibrio de fuentes ambientales naturales teniendo como nueva opción este medio Agar CPC.

III.3.2.3. Fundamento.

Este medio tiene la ventaja de la resistencia que presentan V.cholerae y V.vulnificus a la colistina y a la polimixina B, además de la temperatura de incubación a 40°C, elimina muchas bacterias y la fermentación de la celobiosa es un elemento diferencial también.

III.3.2.4. Fórmula del Agar CPC.

El Agar CPC es preparado por la combinación de las siguientes soluciones:

Solución 1

Peptona 10 g.
Extracto de carne 5 g.
Cloruro de sodio 20 g.
Azul de bromotímol 40 mg.
Rojo de cresol 40 mg.
Agar 15 g.
en 900 ml de agua destilada

Solución 2

Celobiosa 10 g.
Colistina 1.36 X 10 UI
Polimixina B 1.0 X 10 UI
Esto en 100 ml. de agua destilada.

III.3.2.5. Especificaciones del medio de cultivo .

<u>Especificación</u>	<u>Norma</u>
pH	7.6 + 0.2
Temperatura de gelificación	32 + 2°C
Color	Verde olivo a café brillante.
Claridad	Translúcido
Cantidad a pesar (sol. 1)	50 g. en 900 ml. de H ₂ O dest.

Procedimiento de preparación:

1. Se pesan 50 g. del medio (en polvo) para la solución 1.
2. Se deja reposar durante 15 minutos.
3. Se pone a calentar hasta ebullición y completa disolución de los componentes.
4. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C, se enfría a 48 a 55 °C.
6. Solución 2 . Disolver la celobiosa por calentamiento en agua destilada. Se enfría y se agregan los antibióticos. Esterilizar esta mezcla por filtración de membrana y agregarla a la solución 1, enfría a 48 - 55°C, mezclar y distribuir en cajas petri.
7. Incubar las placas inoculadas a 40°C durante 24 a 48 horas.

III.3.2.6. Resultados de la morfología colonial .

V.cholerae .- No fermenta la celobiosa, produce colonias púrpuras con una zona de color azul alrededor.

V.vuiniacus .- Produce colonias amarillas con zona clara amarilla alrededor, lo que indica la fermentación de la celobiosa.

Pseudomonas sp. - Crecimiento inhibido.

Photobacterium sp. - Crecimiento inhibido.

Flavobacterium sp. - Crecimiento inhibido.

Nota: Es importante hacer notar que el Agar CPC debe usarse solo preparado recientemente, ya que el medio puede ser más inhibitorio con el tiempo, especialmente para V.cholerae .

III.3.3. Agar DCLS (Agar desoxicolato citrato citrato lactosa sacarosa).

III.3.3.1. Uso o finalidad de empleo.

Es un medio de cultivo moderadamente selectivo para el aislamiento de V.cholerae , Salmonella y Shigella de muestras fecales.

III.3.3.2. Explicación de la prueba .

Este medio es una modificación del Agar Desoxicolato de Liefson, el cual es un medio altamente selectivo y diferencial para bacilos entéricos, en el que, el grado de inhibición es exactamente controlado por la sustitución de químicos puros por una cantidad alta de Billis. El Agar DCLS es solo una de las modificaciones de Desoxicolato contenido en un medio y difiere de las demás por la inclusión de la sacarosa.

III.3.3.3. Fundamento.

Este medio contiene peptona y extracto de carne los cuales son los nutrientes esenciales para el soporte de crecimiento. El desoxicolato es un compuesto que sirve como inhibidor de las bacterias Gram (+) y de los coliformes. La incorporación de dos azúcares permiten la formación de colonias rojas, en donde Salmonella, Shigella y V. cholerae pueden fermentar rápidamente la sacarosa o la lactosa, o ambas. Esto permite una mejor selección de los miembros del Género Shigella y Salmonella, los cuales forman colonias incoloras o al color del medio .

III.3.3.4. Fórmula del Agar DCLS.

Desoxicolato de sodio	2.5 g.
Citrato de sodio	10.5 g.
Lactosa	5.0 g.
Sacarosa	5.0 g.
Digestivo pancreático de caseína	3.5 g.
Digestivo péptico de tejido animal	3.5 g.
Extracto de carne	3.0 g.
Tiosulfato de sodio	5.0 g.
Rojo neutro	0.03 g.
Agar	12.0 g.
En 1000 ml. de agua destilada.	

III.3.3.5. Especificaciones del medio de cultivo .

<u>Especificación</u>	<u>Norma</u>
pH	7.2 + 0.2
Temperatura de gelificación	32 + 2°C
Color	Rojo naranja

Claridad

Translúcido

Cantidad a pesar

50 g. por 1 lt. de H₂O dest.

Procedimiento de preparación (medio en polvo).

1. Hidratar 50 g. del medio de cultivo con 1000 ml de agua destilada.
2. Dejar reposar durante 15 minutos.
3. Calentar hasta ebullición y completa disolución, dejar hervir durante 1 minuto.
4. NO ESTERILIZAR.
5. Enfríar el medio a 45 + 5°C y vaciar en placas.
6. Sembrar la muestra tan pronto como sea posible después de recibirla en el laboratorio.
7. Incubar las placas protegidas de la luz a 35 a 37°C durante 18 a 24 horas. Si después de 24 horas el crecimiento es negativo, reincubar otras 24 horas adicionales.

III.3.3.6. Resultados de la morfología colonial.

Después del período de incubación las placas deberán presentar el área sembrada con el crecimiento esperado y en el término de la estría colonias aisladas.

E.coli .- Colonias escasas rosas a rojizas, con una zona de precipitación de sales biliares, son planas y grandes.

S.typhimurium .- Colonias incoloras a palo de rosa, convexas, pequeñas.

S.faecalis .- Crecimiento inhibido .

Sh.flexneri .- Colonias incoloras a rosa brillante, convexas, pequeñas.

V.cholerae .- Colonias incoloras a rojas.

Proteus .- Colonias incoloras a rojas.

III.3.4. Conservación de cepas de referencia de V.cholerae.

Para la conservación de una cepa de referencia de V.cholerae se recomienda, sean sembradas en tubos de gelosa con medio de BAB (base de agar para sangre, sin sangre), TSA o agar nutritivo, sembradas por estiría y picadura; no conservar en TSI, ni en ningún medio que contenga carbohidratos, ni inhibidores. Los tubos se tapan bien con tapón de hule que emone bien y se sellan con parafilm o parafina para evitar la deshidratación del medio, de esta forma se podrán mantener viables durante un año. No deberá mantenerse en refrigeración, únicamente colocar en un lugar fresco protegido de la luz. (5).

IV. DISCUSION .

El objetivo principal de este trabajo fue realizar una comparación entre los medios de cultivo selectivos que se pueden utilizar para el aislamiento e identificación de la bacteria causante del cólera, que actualmente ha convertido a mucha gente en parte de la estadística de mortandad por enfermedades en nuestro país. Por esta razón este análisis puede ser interesante, aunque habría que llevar a cabo estudios más amplios y profundos a nivel experimental para lograr obtener conclusiones definitivas.

En base a los datos que se recopilaron el Agar TCBS (tiosulfato citrato sales biliares sacarosa) es el medio selectivo que más es usado rutinariamente, tanto para el análisis de muestras clínicas, como para el estudio de agua y alimentos. Este medio en su inicio fue recomendado por la Organización Mundial de la Salud e incluso se reporta una investigación en donde se realizó una evaluación de varias marcas comerciales que producen este medio; encontrándose que existen muchas diferencias entre cada una de las marcas involucradas, desde la propia morfología colonial de los Vibrios (en especial V.cholerae) hasta lo que se refiere a la capacidad inhibitoria de marca muestreada.

En este caso se podría pensar en dos posibilidades:

1. Unificar los criterios normativos para todas las marcas, o bien
2. Que los analistas conozcan esas diferencias entre las marcas.

Sin embargo esto último resulta más complicado y por lo tanto se plantea la unificación de especificaciones para todas las marcas que existen en el mercado.

Considerando que existen otros dos medios selectivos para V.cholerae :

a. El Agar DCLS (desoxicolato citrato lactosa sacarosa). Este medio se menciona que es selectivo para V.cholerae , Sin embargo si en una muestra existen Salmonella y Shigella el aislamiento ya no resulta ser tan selectivo como podría esperarse y que comparado con los resultados que se obtienen con el Agar TCBS pues definitivamente no es adecuado para el estudio específico de la bacteria del cólera u otros Vibrios.

De hecho y como se menciona anteriormente el medio más usado rutinariamente en todos los estudios es el Agar TCBS.

Otra desventaja importante en relación al uso del Agar DCLS con respecto al Agar TCBS , es el crecimiento de Proteus que aunque también se puede dar el caso de que dicha bacteria crezca en TCBS es posible diferenciar más fácilmente las colonias de V.cholerae en TCBS que en DCLS por las características que presentan en cada medio.

b. El otro medio selectivo que se considera útil para el aislamiento de V.cholerae es el medio CPC (Agar celobiosa polimixina B colistina) que es en realidad el medio más recientemente diseñado para el aislamiento selectivo del vibrio.

Este medio se ha utilizado más para el estudio de muestras de agua y alimentos que para el área clínica.

Se reportan estudios que han valorado la eficiencia de este medio de cultivo frente al Agar TCBS y comparados ambos con un medio nutritivo el Agar BHI en este estudio se trabajo una capa y el resultado obtenido fue:

CFU / ml. sobre:

	Agar BHI	Agar CPC	Agar TCBS
<u>V.cholerae</u>	5 X 10 ⁸	1.6 X 10 ⁸	3.4 X 10 ⁸

Se obtiene que la recuperación de V.cholerae en CPC y TCBS Agar fueron cercanamente iguales a la que hubo en Agar BHI , Raymond, et.al. (6).

Sin embargo se ha encontrado el Biotipo clásico de V.cholerae no crece en el CPC por lo que resulta una desventaja frente al Agar TCBS; además otra desventaja aunque no tan radical como la anterior es el proceso de preparación es más complejo y además el periodo de incubación también es más largo.

Pero la ventaja significativa del uso de CPC podría ser que las demás especies del género Vibrio no crecen en este medio, indicando que es más selectivo en comparación con el Agar TCBS.

Actualmente, en la práctica el medio de cultivo que se utiliza rutinariamente es el agar TCBS; la Secretaría de Salud ha estandarizado los métodos usados para la detección de la bacteria del cólera en nuestro país, así mismo ha establecido programas de entrenamiento y capacitación para todo el personal que forma parte del sector Salud (DDF, IMSS, DIF, ISSSTE) y también a laboratorios de ciudades prioritarias para el aislamiento e identificación de V.cholerae 01, poniendo también a disposición del personal manuales para el manejo efectivo de esta enfermedad diarreica.

En el Art. 47 de la Norma técnica 339 Capítulo IX se establece lo siguiente:

En los Estados se llevan a cabo las siguientes acciones con el fin de integrar un programa estatal para la prevención y control del cólera:

- Se llevan a cabo reuniones técnicas y de difusión.

- Se elaboran programas estatales específicos.

- Se realizan los procedimientos para la obtención de financiamiento y operación de los programas. (9).

En este sentido es importante mencionar que de acuerdo a la información bibliográfica obtenida en este trabajo y lo que se realiza en forma práctica, el análisis efectuado, está de acuerdo con las técnicas ya estandarizadas sobre el uso de agar TCBS como medio de aislamiento selectivo para V.cholerae, hasta el momento.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

V. CONCLUSION .

En general se puede concluir que actualmente el medio de cultivo selectivo más adecuado puede ser el Agar TCBS, sin embargo existe otra nueva y buena opción para diferenciar a V.cholerae , que es el medio CPC que es más efectivo para el monitoreo ambiental de aguas de estuarios y alimentos marinos.

Sin embargo es importante resaltar que es necesario efectuar investigaciones más amplias para poder integrar el uso de este nuevo medio (CPC) en el área clínica, para obtener mejores resultados en el diagnóstico de este microorganismo que actualmente se ha convertido en un mal que ocupa un lugar importante en nuestra sociedad.

Es importante tener en cuenta que existen numerosas marcas que ofrecen los medios y que las variaciones obtenidas para cada marca son considerables, lo que puede causar riesgos en la obtención de un diagnóstico; vale la pena mencionar la necesidad de establecer normas comunes para todas las marcas, para que se pueda reflejar esto en mejores controles y resultados en el diagnóstico.

VI. BIBLIOGRAFIA .

1. Arthur H. Bryan, Charles A. Bryan, Charles G. Bryan
Bacteriología principios y prácticas
Compañía editorial Continental
México, D. F. (1984), pag: 97-98.
2. Bailey and Scott
Diagnostic microbiology
The C.V. Mosby Company
New York (1986) , 7a. edición, pag: 86-87.
3. Boletín de información sobre cólera en America
Secretaría de Salud, dirección general de epidemiología
Actualizado al 2 de Mayo de 1991.
México, D.F. , pag: 1-11
4. Dr. Hans Fey
Compendio de bacteriología general médica
Ed. Acribia, Zaragoza (España), (1978) , pag: 46-49.
5. (1) F.L. Singleton , R. Atwell , S. Jangi , and R.R. Colwell
Effects of temperature and salinity on *V. cholerae* growth
App. and environmental microbiology, Vol 44 (5); Nov (1982), pag:1047-1048.
6. George Massad and James D. Oliver
New selective and differential medium for *V. cholerae* and *V. vulnificus*
App. and environmental microbiology, Vol 53 (9), Sept (1987), pag: 2262-2264.
7. (2) J. Vila , S. Abdalla, J. Gonzalez, C. Garcia, J.A. Bombi and M.T. Jimenez de Anta.
A one minute oxidase test to detect *Vibrio*, strains isolated from cultures on thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS).
Journal of applied bacteriology, Vol 72, (1992), pag: 490-492.
8. (3) K.M. Nicholls, S.V. Lee and T.J. Donovan
an evaluation of commercial thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS)
Journal of applied bacteriology, Vol 41 , (1976), pag: 265-269.
9. (4) Kobayashi, Enomoto, Sakasaki and Kuwahara
A new selective medium for pathogenic vibrios TCBS Agar (modified Nakanishi's Agar).
Japanese journal of bacteriology , Vol 18 , (1963) , pag: 387-391.
10. Manual de BBL Products and laboratory procedures
David A. Power, PhD., Editor and Peggy J. Mc Cuen, PhD.
Cockeysville, Maryland.
Sixth edition, 1988, pag: 143; 256-257.
11. Microbiología médica
Jawetz, Melnick y Adelberg
Ed. Manual Moderno
14 ed., México , D.F. , 1992, pag: 243-245.

12. (5) Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de V. cholerae O1
Secretaría de Salud, Instituto Nacional de diagnóstico y referencia epidemiológica.
Publicación técnica de INDRE no. 10, México, D.F., 1991, pag: 6-23.
13. (9) Manual sobre cólera para personal de Salud, Instituto Nacional de diagnóstico y
referencia epidemiológica.
Publicación técnica del INDRE no. 11, México, D.F., Junio, 1991, pag: 2-24, 44.
14. Manual de técnicas y procedimientos para investigación de V. cholerae en agua y
alimentos.
Secretaría de Salud, Subsecretaría de regulación y fomento sanitario, Laboratorio
Nacional de salud pública.
México, D.F., Febrero, 1992, pag:6-23.
15. Normas técnicas de la S.S.A. para medios de cultivo publicados en el diario oficial.
Norma técnica no. 142, para la identidad y especificidad de medios de cultivo (ge
neralidades).
Lunes 18 de Mayo de 1987.
16. (6) Raymond G. Bryant, Josephine Jarvis and J. Michael Janda.
Use of sodium dodecyl sulfate polymixin B sucrose medium for isolation of *V. vulnif*
icus from shellfish.
App. and environmental microbiology, Vol 53 (7), July (1987), pag: 1558-1559.
17. (7) Ronald M. Baker, F.L. Singleton and M.A. Hood.
Effects of nutrient deprivation on *V. cholerae*.
App. and environmental microbiology, Vol 48 (4), April (1983), pag: 930-940.
18. (8) Vigilancia epidemiológica internacional.
Boletín trimestral, Vol 5 no. 14, 15 de Abril de 1991.
Sistema Nacional de Salud México.