

67

1994 JUN 22 11:57 AM



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

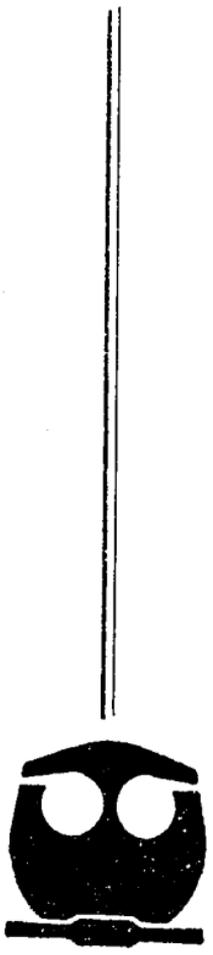
EVALUACION Y COMPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE SALMONELLA.

TRABAJO ESCRITO VIA DE EDUCACION CONTINUA QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: NORMA JAIMES SALGADO

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profa. Biserka Sveshtarova Pekarkova.
VOCAL: Prof. Rodolfo Pastelin Palacios.
SECRETARIO: Prof. Raúl Garza Velásco.
1er. SUPLENTE: Profa. Adriana Guadalupe Mejía Chávez.
2do. SUPLENTE: Profa. Mayte Astigarraga Zavaleta.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

ASESOR:



M en C. BISERKA SVESHITAROVA PEKARKOVA.

SUSTENTANTE:



NORMA JAIMES SALGADO.

**!Oh; que gratas las horas
de los tiempos lejanos
en que quiso el estudiante
regalar sus horas de ilusión
al quehacer diario del conocimiento.
Y después, ver que lo
aprendido le es
útil a la humanidad.**

DEDICO ESTE TRABAJO

CON CARÍÑO Y AGRADECIMIENTO

**A MIS PADRES ANTONIA Y ROGELIO
POR SU APOYO Y AYUDA INCONDICIONAL.**

**A MIS HERMANAS ROCIO Y LETY
POR SU EJEMPLO DE TRABAJO Y SUPERACION.**

**A MI CUÑADO JAVIER Y A MIS SOBRINOS KATY Y JAIR
POR SU CARÍÑO.**

**A TODOS MIS AMIGOS
POR SU APOYO Y COMPAÑIA.**

**CON PROFUNDO AMOR A MI HIJA LAURA ITZEL
Y A MI ESPOSO PEPE.
PORQUE SON EL MAS GRANDE ALICIENTE PARA MI
SUPERACION PERSONAL Y PROFESIONAL**

INDICE

CAPITULO I	INTRODUCCION
CAPITULO II	GENERALIDADES 2.1 Características generales de <i>Salmonella</i> 2.2 Medios de Cultivo.
CAPITULO III	MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA DETECCION, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>SALMONELLA</i> 3.1 Medios de Preenriquecimiento 3.2 Medios de Enriquecimiento selectivo 3.3 Medios selectivos 3.4 Pruebas Bioquímicas 3.4.1 Convencionales 3.4.2 Rápidas 3.5 Pruebas Serológicas
CAPITULO IV	DISCUSION
CAPITULO V	CONCLUSION
CAPITULO VI	BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I

INTRODUCCION

- *Salmonella* es una bacteria común en la naturaleza que se puede encontrar en el tracto intestinal y materia fecal tanto de humanos como de animales causando gastroenteritis. También se encuentra contaminando carnes crudas de res, puerco, pollo, huevo y alimentos preparados.
- El término usado para describir la enfermedad resultante de la ingestión de *Salmonella* es la Salmonelosis, y para que una persona se infecte necesita consumir alimentos con un cierto número de bacterias vivas, de esta manera la bacteria entra al tracto digestivo dando como resultado una gastroenteritis. Los síntomas usualmente aparecen 12 a 36 horas después de ingerir la comida contaminada. Pueden aparecer: dolor abdominal, diarrea, náusea, vómito, dolor de cabeza, escalofrío y fiebre, con consecuente deshidratación.
- La severidad y duración de los síntomas dependen del tipo de *Salmonella* presente, la cantidad de comida contaminada ingerida y la susceptibilidad de la persona involucrada. El diagnóstico de esta infección está determinado por el número de evacuaciones, los síntomas, la etiología y los resultados de laboratorio, y su evolución está determinada por el tratamiento. La enfermedad usualmente dura 2 a 6 días y se puede presentar muerte en personas inmunocomprometidas como recién nacidos, ancianos, pacientes enfermos de SIDA, cáncer o enfermos debilitados por alguna otra enfermedad.(2)
- Las enfermedades diarreicas constituyen una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en la niñez, en la mayoría por no decir en todos los países en desarrollo.
- En un estudio epidemiológico efectuado en el Hospital General de Madrid durante el período de Julio de 1980 a Junio de 1983, se estudiaron 6970 pacientes con cuadro de gastroenteritis, encontrando los siguientes microorganismos 710 *Salmonella spp.*, 506 *Campylobacter jejuni*, 359 *Shigella spp.*, 12 *Yersinia enterocolitica*, 1466 *Rotavirus*, 134 *Giardia lamblia* y 4 *Entamoeba histolytica*.
- El cloranfenicol mostró una buena actividad contra la mayoría de las cepas probadas de *Salmonella spp.*, y *Campylobacter jejuni*. La incidencia de *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* fue muy marcada en los meses secos y calientes del año.(3)
- La determinación de los agentes causales puede contribuir a una mejor vigilancia e identificación precoz de epidemias o brotes y permitir la evaluación de medidas específicas de intervención.

- No es posible recomendar ni un solo método para el aislamiento de *Salmonella* que sea completamente satisfactorio para todas las muestras a analizar, ya sean alimentos, o materia fecal de pacientes, ni tampoco para todos los serotipos de la bacteria, los métodos que se utilizan son en esencia similares en principio y en general llevan consigo la siguiente serie de pasos en su técnica: pre-enriquecimiento, enriquecimiento, siembra en placa de agar selectivo, e identificación taxonómica de las colonias sospechosas de ser *Salmonella*. La complejidad del proceso de aislamiento e identificación de *Salmonella* se debe, principalmente al hecho de que estos gérmenes se diseminan fundamentalmente en las materias fecales, sea de modo directo o indirecto. Por esta razón *Salmonella* está, por lo general, presente en los alimentos junto a otros microorganismos, en particular con miembros de las enterobacterias.
- La finalidad del enriquecimiento no selectivo, es permitir que las células bacterianas comiencen en proceso de multiplicación normal, sin estar expuestas a sustancias inhibitorias o selectivas que pueden ser tóxicas para estos microorganismos.
- El empleo de caldos de enriquecimiento tiene como fin estimular la multiplicación de *Salmonella* y reducir o inhibir el crecimiento de los microorganismos competidores, tales como coliformes, particularmente si estos microorganismos competidores están presentes en un número mayor de *Salmonella*.
- Los medios sólidos de agar selectivo contiene por lo general sustancias inhibitorias, así como un sistema indicador que colorea específicamente determinados tipos de colonias y da un color particular al agar que las rodea permitiendo de este modo el reconocimiento de las colonias sospechosas de ser *Salmonella*.
- El presente trabajo tiene como objetivo hacer de una manera sencilla una evaluación de los diferentes medios de cultivo para el aislamiento e identificación de *Salmonella* existentes en el mercado, resaltando ventajas y desventajas de cada uno con respecto a los demás.

CAPITULO II.

GENERALIDADES

2.1 Características generales de *Salmonella*.

Bacilo corto gram-negativo, de 0.7 - 1.5 x 2.0 - 5 micras, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, móvil (por flagelos peritricos) con excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. Aerobia facultativa. Sus colonias en agar son generalmente de 2 - 4 mm de diámetro. Reduce los nitratos a nitritos. Produce gas a partir de glucosa, con excepción de *S. typhi* y *S. dublin* produce sulfuros, pero algunos tipos de *Salmonella* no lo hacen por ejemplo *S. choleraesuis* y la mayoría de las cepas de *S. paratyphi A*. Indol negativo. Puede utilizar el citrato como única fuente de carbono con excepción de *S. typhi* y *S. paratyphi A*. La mayoría de las cepas de *Salmonella* no utilizan el malonato con excepción de *S. arizonae*. Es comúnmente ureasa-negativo. La descarboxilación de la lisina es positiva para la mayoría de cepas de *Salmonella* con una importante excepción, *Salmonella paratyphi*. La mayoría de las cepas de *Salmonella* también descarboxilan la ornitina a excepción de *S. typhi*. Generalmente *Salmonella* no fermenta la lactosa pero algunas cepas de *S. arizonae* la fermentan lentamente. (1)

Existen cerca de 2000 serotipos, clasificados de acuerdo a sus determinantes antigénicas las cuales muestran varios grados de virulencia.

2.2 Medios de Cultivo

No todos los medios están destinados para promover el crecimiento de todas las bacterias; los medios se encuentran adaptados para el microorganismo o microorganismos del cual van a estimular el crecimiento y en ocasiones no son adecuados para el crecimiento de algunos microorganismos (específicos).

Los medios de cultivo para aislamiento pueden ser medios simples nutritivos conteniendo todos los constituyentes esenciales para el crecimiento.

Los medios de cultivo selectivos o inhibitorios se utilizan cuando la muestra procede de una parte del cuerpo (piel, garganta, boca, nariz, intestino, vagina) que contiene una flora microbiana natural, el desarrollo de los habitantes normales puede ser ampliamente inconveniente y el bacteriólogo requerirá limitar o suprimir este crecimiento y al mismo tiempo, favorecer el crecimiento de los invasores, los cuales en patología clínica son los microorganismos "deseados".

Los medios de cultivo para el mantenimiento son simples y no deben estimular el crecimiento abundante; el agar nutritivo (en sus diferentes formulaciones) es el más común.

INGREDIENTES PARA MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS

Los ingredientes para medios de cultivo microbiológicos son todas las sustancias que puedan utilizarse en la elaboración de los medios de cultivo

Clasificación:

Sustancias químicas definidas

Sustancias gelatinizantes (gel de sílice, polímeros orgánicos)
Sustancias nutritivas (sales, carbohidratos, aminoácidos, etc.)
Sustancias reactivas (para reacciones de prueba: Sales, carbohidratos, aminoácidos, urea).
Activadores selectivos (colorantes, antibióticos, etc).
Sustancias reguladoras del potencial Redox (cisteína, tioglicolato, etc).
Indicadores (azul de anilina, azul de bromotimol, rojo de fenol, resazurina, etc).
Sustancias reguladoras del pH (fosfatos y carbonatos).

Sustancias químicas no definidas

Sustancias gelatinizantes (agar-agar, gelatinas, agarosas, etc).
Sustancias nutritivas,
Extractos (carne, levadura, malta, cerebro, corazón, arroz).
Hidrolizados (peptonas inclusive).
Caseína (ácida y pancreática).
Lactalbúmina (pancreática).
Carne (papáinica, péptica, pancreática, triptica).
Hígado (autolizado, pancreático).
Gelatina (pancreática).
Harina de haba de soja (papáinica).
Levadura (autolizado, pancreática).
Sustancias naturales (sangre, suero, leche completa ácida, suero de la leche, etc).
Sustancias reactivas (caseína, caseínatos, lecitina, yema de huevo, fécula, sangre, etc).
Activadores selectivos (bilis, etc).
Sustancias reguladoras del potencial redox (hemoglobina, polvo de hígado, trozos orgánicos, etc).

Todos los laboratorios deben garantizar un control suficiente de los medios y reactivos que emplean.

En el control de la calidad esta incluida la selección satisfactoria de materias primas, la preparación de medios de acuerdo con las fórmulas aprobadas y el uso de cepas bien caracterizadas (de referencia), para verificar las posibilidades de sostener la proliferación que ofrece el medio preparado.

Los recuentos de microorganismos viables están basados frecuentemente en el número de colonias que desarrollan en placas de agar de recuento (existen diversas formulaciones para este fin) que han sido inoculadas con cantidades conocidas de muestra y luego incubadas bajo condiciones de ambiente específicas.

Se puede obtener una amplia variedad de condiciones cambiando la composición de los medios de cultivo, el ambiente gaseoso, el tiempo y temperatura de incubación.

CAPITULO III

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA DETECCION, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *SALMONELLA*.

Por regla general, el aislamiento de *Salmonella* comprende tres fases fundamentales:

- A) Preenriquecimiento o Enriquecimiento no selectivo
- B) Enriquecimiento selectivo
- C) Siembra en placas de medios selectivos

3.1 Medios de Preenriquecimiento o Enriquecimiento no selectivo

CALDO LACTOSA

Es un medio de cultivo exento de sustancias inhibitorias para el ensayo previo orientativo de bacterias coliformes. Es el medio recomendado por la American Public Health Association (APHA) y otras autoridades sanitarias para investigar la presencia de enterobacterias en agua, leche, gelatina y productos farmacéuticos. (4,5) (Tabla 1)

AGUA DE PEPTONA (TAMPONADA)

Para el enriquecimiento no selectivo de bacterias, especialmente de enterobacterias patógenas a partir de alimentos y otros materiales.

Por su composición, este medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de la International Organization for Standardization (1975), a las normas DIN 10181 para el análisis de cárnicos, así como a lo señalado por las Disposiciones sobre Productos derivados del Huevo, del Ministerio Federal Alemán para la Juventud, Familia y Salud (1975). (4,5) (Tabla 1).

La tabla 1 presenta las principales características de los medios de enriquecimiento no selectivo.

3.2 Medios de Enriquecimiento selectivo

CALDO SELENITO- CISTINA

Este medio se utiliza para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*, a partir de heces, orina, agua y alimentos. El medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de la APHA (1984) para el análisis de alimentos.

Este caldo es mas selectivo para el aislamiento de *Salmonella*, a partir de productos de carne cuando se incuba durante 16 a 18 horas a 43°C en vez de 37°C. Se recomienda el uso de este medio de enriquecimiento para la transportación de especímenes de *Vibrio cholerae* ya que éstos sobreviven de 2 a 5 días en éste caldo. Si se ajusta el pH a 7.8 mediante la adición de carbonato de sodio, los vibrios sobreviven de 8 a 10 días a temperaturas entre 22 y 25°C. (4,5) (Tabla 2)

CALDO TETRATIONATO

Este medio se utiliza para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* a partir de diversos materiales, especialmente productos cárnicos y otros alimentos.

Por su composición este caldo corresponde a lo prescrito en la United States Pharmacopeia XXI (1985).

El medio de cultivo basal preparado puede almacenarse durante largo tiempo, pues el tetracionato se sintetiza, a partir del tiosulfato, hasta que se añade el compuesto de yodo antes de su uso.

Forma de actuación. El terationato, junto con el tiosulfato excedente, inhibe a Coliformes y otras bacterias acompañantes. *Proteus* es inhibido por la adición de 0.04 g/litro de Novobiocina. (4,5) (Tabla 2)

CALDO DE ENRIQUECIMIENTO DE *SALMONELLA*, seg. RAPPAPORT.

Este medio se utiliza para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*, con excepción de *S. typhi*, a partir de material de investigación de origen fecal, según Rappaport y col. (1956-1959).

En el enriquecimiento de *Salmonella*, este caldo aventaja a otros medios nutritivos de enriquecimiento, obteniéndose un rendimiento de alrededor del 100%. Un aumento adicional del rendimiento se consigue añadiendo tetracionato y utilizando amarillo de metacromo en vez de verde de malaquita Hofer (1969). Goosens y col. (1984) informan sobre las altas cuotas de aislamiento de *Salmonella* utilizando un medio de cultivo semisólido sobre la base de caldo Rappaport. (4,5) (Tabla 2)

CALDO MOSSEL

El caldo Mossel puede ser utilizado para el enriquecimiento selectivo de todas las enterobacterias, a partir de alimentos y otros materiales de investigación, según Mossel y col. (1963).

Este medio de cultivo corresponde a lo prescrito en los Decretos y Ordenanzas sobre Productos derivados del huevo (1975), a la European Pharmacopoeia II y a la Farmacopea Alemana.

De los cultivos que muestren crecimiento se hacen después resiembras por extensión, sobre medios de cultivo selectivos. (4,5) (Tabla 2).

CALDO GN

Caldo de enriquecimiento GN según HAJNA.

Para el cultivo selectivo de bacterias intestinales Gram negativas, a partir de todo tipo de materiales de investigación.

Este medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de la American Public Health Association (1960) para la investigación de productos lácteos.

En el caldo de enriquecimiento GN, el rendimiento de *Salmonella* y *Shigella* resulta sensiblemente mejorado, especialmente en combinación con el agar XLD. (4,5) (Tabla 2).

La tabla 2 presenta las principales características y formas de actuación de los medios de enriquecimiento selectivos.

3.3 Siembra en placa de Medios Selectivos.

AGAR EMB (Agar-Eosina-Azul de metileno-lactosa-sacarosa)

Este medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de los Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1975) y a las de la United States Pharmacopoeia XXI (1985).

Forma de actuación. El contenido en lactosa y sacarosa hacen posible la distinción entre *Salmonella* y *Shigella* lactosa-negativas y sacarosa-negativas, frente a la flora acompañante lactosa-negativa pero sacarosa-positiva. Las colonias características de *Salmonella* y *Shigella* son transparentes, de color ámbar. (4,5) (Tabla 3)

TABLA 1

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO O ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVO	
MEDIO	CARACTERISTICAS
Caldo Lactosa	Es un medio nutritivo exento de sustancias inhibitorias
Agua Peptonada (tamponada)	Es un caldo rico en sustancias nutritivas que provoca una alta cuota de sobrevivencia de bacterias danadas subletalmente y un crecimiento intenso. El tampón de fosfato evita una variación de pH perjudicial para las bacterias.

TABLA 2

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO		
MEDIO	INHIBIDOR	CARACTERISTICAS
Caldo Selenito-Cistina	Selenit:	Inhibe el crecimiento de bacterias intestinales coliformes y enterococos, principalmente en las primeras 6-12 horas de incubación. Salmonella, Proteus y Pseudomonas no son inhibidas.
Caldo tetratronato	Tetratronato Sales biliares Verde brillante	Todas las bacterias reductoras de tetratronato, como por ejemplo Salmonella y Proteus, pueden multiplicarse mas o menos sin obstáculo. El ácido procedente de la reducción de tetratronato es neutralizado por el carbonato cálcico. Las sales biliares inhiben considerablemente a los microorganismos de la flora intestinal normal. La adición de verde brillante sirve sobre todo para inhibir a la flora Gram (+).
Caldo Rappaport	Verde de malaquita Cloruro de magnesio	El verde de malaquita y el cloruro de magnesio inhiben notablemente el crecimiento de la flora intestinal normal, en tanto que la mayoría de las especies de Salmonella se multiplican sin obstáculos. Únicamente S.typhi y Shigella resultan inhibidas también por el verde de malaquita. Por este motivo no es adecuado este medio de cultivo para el enriquecimiento de estos agentes patógenos.
Caldo Hoesel	Verde brillante Bilis de buey	La flora indeseable acompañante es ampliamente inhibida por el verde brillante y la bilis de buey. El contenido en glucosa favorece el crecimiento de todas las Enterobacterias. El fuerte tamponamiento de este medio nutritivo impide el descenso del pH y la consiguiente inhibición en el crecimiento del cultivo.
Caldo GN	Citrato Desoxicolato	La triptosa sirve como base nutritiva. El Citrato y el Desoxicolato actúan como agentes selectivos para inhibir el crecimiento de microorganismos Gram (+), especialmente estreptococos fecales, todo tipo de bacilos esporulantes y ciertas bacterias coliformes.

AGAR MacCONKEY

El agar MacCONKEY es un medio selectivo para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y bacterias coliformes, a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales, etc. según MacCONKEY (1905).

La formulación de este medio de cultivo corresponde considerablemente con las recomendadas por la United States Pharmacopoeia XXI (1985), European Pharmacopoeia II y Deutschen Arzneibuch.

El espécimen puede sembrarse directamente en la placa por estría superficial, o bien inocularlo a partir de medios líquidos de enriquecimiento, tales como Caldo Tetrionato o Caldo Selenito Cistina. Incubar placas y caldos a 35°C. de 18 a 24 horas. Hacer resiembras de estas últimas en placas de agar de MacConkey y volver a incubar.

Se recomienda sembrar simultáneamente las muestras con otros medios selectivos tales como Eosina azul de metileno, Agar SS, Agar Tergitol 7, Agar XLD, Agar Entérico Hektoen, Agar Sulfito de Bismuto (altamente específico para *Salmonella typhi*), Agar Verde Brillante, especiales para *Salmonella*. (4,5) (Tabla 3).

AGAR XLD (Agar-Xilosa-Lisina-Desoxicolato)

El agar XLD se utiliza para el aislamiento y diferenciación de enterobacterias patógenas, especialmente de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

Por su formulación, este medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de la United States Pharmacopoeia XXI (1980), de la European Pharmacopoeia II y de la APHA (1984).

En combinación de un enriquecimiento adecuado, con el Agar XLD se puede detectar un número notablemente mayor de *Salmonella* y *Shigella* que con otros medios de cultivo selectivos. En el procedimiento de siembra directa por estría, el Agar XLD aventaja también en este sentido a otros medios de cultivo. (4,5) (Tabla 3).

AGAR SS (Agar para *Salmonella* y *Shigella*)

El agar SS se emplea para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de heces, alimentos y otros materiales objeto de investigación.

El medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de la APHA (1984) para la investigación de alimentos.

Debido a su gran poder de inhibición, este medio puede sembrarse con una buena cantidad del material en estudio, pero además deberán inocularse paralelamente otros medios menos inhibidores como Agar MacConkey, Agar EMB, Agar Tergitol 7, Agar XLD y Agar Entérico Hektoen. (4,5) (Tabla 3).

AGAR BISMUTO SULFITO

Es un medio de Wilson y Blair altamente selectivo para aislar *Salmonella typhi*, así como otros bacilos entéricos de heces, aguas negras, aguas de bebidas y diversos alimentos.

Corresponde a las recomendaciones de la United States Pharmacopeia XXI (1985), así como a las recomendaciones de la APHA (1984) para análisis de alimentos.

La selectividad del medio depende en gran parte de la dispersión uniforme del precipitado del sulfito de bismuto en el gel final. Es por esta razón que el medio debe mantenerse bien mezclado y no vaciarse mientras esté demasiado caliente. El medio caliente una vez depositado en las placas, tiende a precipitar el sulfito de bismuto en forma irregular y desordenada propiciando que en unas zonas se encuentre demasiado concentrado y en otras casi nada o ausente. Las placas una vez solidificadas deberán presentar una opacidad crema uniforme, y gradualmente un color verde muy pálido. Si se guarda en refrigeración, el medio que está en forma reducida, se irá oxidando poco a poco hasta adquirir un color francamente verde. Al llegar a este momento el medio se debe desechar.

Junto a este medio, por ser fuertemente inhibidor, se aconseja inocular también otros medios selectivos menos inhibidores, tales como Agar EMB, Agar MacConkey, Agar Tergitol 7, Agar XLD, Agar Entérico Hektoen, etc.(4,5) (Tabla 3)

AGAR VERDE BRILLANTE (seg. KAUFFMAN)

El agar Verde Brillante es un agar selectivo para la demostración y el aislamiento de *Salmonella* (con excepción de *S. typhi*) de heces, orina, carnes, leche y otros materiales objeto de investigación.

Este medio de cultivo corresponde a lo prescrito en la Legislación sobre inspección de Carnes y Normativa de Investigación de artículos de importación, de la República Federal de Alemania. Debido a que es un medio fuertemente inhibidor, inocule las placas con una asada bien cargada con el material en estudio. Al mismo tiempo sobre otros medios selectivos menos inhibidores como el Agar XLD, SS, MacConkey, EMB, Agar Tergitol 7 y Agar entérico Hektoen. Cuando se sospecha que el material en estudio contiene bajas concentraciones de *Salmonella*, es necesario inocular la muestra inicialmente en Caldo Tetrionato o Caldo Selenito.

Para la inhibición del grupo *Proteus* se recomienda la adición de 0.2% de desoxicolato de sodio al medio de cultivo. (4,5) (Tabla 3).

AGAR LEIFSON (Agar-desoxicolato-citrato, seg. LEIFSON)

Este medio se utiliza para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* según Leifson.

Este medio de cultivo corresponde a la European Pharmacopeia II y a la Deutschen Arzneibuch.

El medio de cultivo se siembra por extensión con el material de muestra a partir de un cultivo de enriquecimiento.

En atención al intenso efecto inhibitor del Agar LEIFSON, se recomienda hacer cultivos en paralelo con otros medios de cultivo selectivos de menor potencia inhibitora. (4,5) (Tabla 3).

AGAR PARA ENTEROBACTERIAS DE HEKTOEN

El agar Hektoen es un medio selectivo para la demostración y aislamiento de bacterias intestinales patógenas, incluyendo *Salmonella* y *Shigella*, a partir de los más diversos materiales, tales como heces, alimentos y otros.

Frente a otros medios de cultivo selectivos, como por ejemplo Agar SS, Agar Sulfito Bismuto y Agar Verde Brillante, el Agar para Enterobacterias de Hektoen aún cuando posee suficiente efecto represor de la flora de acompañamiento, ejerce escasa inhibición de *Salmonella* y *Shigella* y por lo tanto, permite la obtención de altos rendimientos de estos gérmenes. (4,5) (Tabla 3).

AGAR RAMBACH

El agar Rambach es un medio de cultivo diferencial para identificar *Salmonella* tanto en alimentos como en muestras clínicas.

Puede ser usado como medio para aislamiento primario. Esto permite una identificación presuntiva de colonias de *Salmonella* aún entre coliformes. También puede ser usado después de que la muestra se haya incubado en algún medio de enriquecimiento. El medio es opalescente y ligeramente rosa. (6) (tabla 3).

AGAR ONOZ

Es un medio para el cultivo de *Salmonella* según ONOZ.

Las colonias características de *Salmonella typhi* son: el primer día, del mismo color que el medio de cultivo, el segundo día pequeñas, amarillas, al cabo de más días puntos negros ocasionalmente sobre las colonias amarillas, alteración del color del medio de cultivo, hacia el amarillo.

Las colonias características de otras especies de *Salmonella* son: amarillas de tamaño mediano, el primer día desarrollo incipiente de un punto negro sobre la colonia amarilla, el segundo día un punto negro visible, casi siempre, sobre la colonia amarilla y el medio de cultivo amarillo alrededor de la colonia. (4,5). (Tabla 3).

La tabla 3 presenta las principales características y formas de actuación de los medios selectivos.

TABLA 3

MEDIOS SELECTIVOS		
MEDIO	INHIBIDOR	CARACTERISTICAS
AGAR END	Azul de metileno	Los gérmenes de acompañamiento indeseables, bacterias Gram (+) especialmente, resultan ampliamente inhibidos en su crecimiento, gracias al azul de metileno presente en su formulación. La eosina es el indicador que detecta el vir de pH que provocan las bacterias fermentadoras de la lactosa.
AGAR Mac CONKEY	Sales biliares Cristal Violeta	Los gérmenes Gram (+) son inhibidos por las sales biliares y el cristal violeta. Las enterobacterias fermentadoras de la lactosa bajan el pH del medio, que es detectado por el indicador rojo neutro dando colonias rojas o rosadas. Las no fermentadoras de la lactosa dan colonias transparentes, incoloras o amarillas. Crecen también bacilos Gram (-) que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, como Pseudomonas y Bacteroides.
AGAR XLD	Desoxicolato	La degradación a ácido de la xilosa, lactosa y sacarosa produce un viraje a amarillo del rojo de fenol. El tiosulfato y la sal de hierro (III) revelan la formación de ácido sulfhídrico por la precipitación de sulfuro de hierro negro en las colonias. Las bacterias que descarboxilan la lisina, producen cadaverina, y se reconocen por la presencia de un color rojo-púrpura alrededor de sus colonias debido al aumento de pH. Varias de estas reacciones pueden presentarse simultánea o sucesivamente, lo que puede dar lugar a diversos matices de color del indicador de pH, o a un viraje de amarillo a rojo en el transcurso de una incubación prolongada. El efecto inhibitorio de este medio de cultivo es débil.
AGAR SS	Verde brillante Bilis de buey	La elevada concentración de los inhibidores eliminan considerablemente a la flora acompañante. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el enegrecimiento de las correspondientes colonias. Las colonias de coliformes quedan señaladas por la demostración de degradación de lactosa a ácido, a cargo del indicador de pH rojo neutro. Las bacterias no fermentadoras de la lactosa dan colonias claras, transparentes e incoloras.
AGAR BISMUTO SULFITO	Verde brillante Bismuto	El verde brillante y el bismuto inhiben considerablemente a los gérmenes de acompañamiento. Las colonias de Salmonella ácido sulfhídrico positivas presentan enegrecimiento debido al sulfuro de fierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de las correspondientes colonias

MEDIOS SELECTIVOS		
MEDIO	INHIBIDOR	CARACTERISTICAS
AGAR VERDE BRILLANTE	Verde Brillante	El medio de cultivo contiene lactosa, cuya degradación a ácido se reconoce por el viraje a amarillo del rojo de fenol, que actúa como indicador de pH. En ambiente alcalino presenta color rojo intenso. La flora acompañante Gram (+), así como <i>Salmonella typhi</i> y <i>Shigella</i> resultan muy deprimidas por la presencia del verde brillante.
AGAR LEIFSON	Desoxicolato Citrato	Este medio de cultivo contiene concentraciones tan altas de desoxicolato y citrato, de la flora Gram (+) queda totalmente reprimida e inhibidos más o menos los coliformes. La degradación de la lactosa da lugar a una acidificación en los alrededores de las correspondientes colonias y produce un viraje al rojo del indicador de pH rojo neutro. Estas colonias están casi siempre rodeadas de un halo turbio de ácido desoxicólico precipitado. Las colonias de microorganismos lactosa negativos son incoloras. La reducción del sulfato a sulfuro se demuestra en forma de sulfuro de hierro negro.
AGAR HERTZOG	Sales biliares	Debido a los dos indicadores, azul de bromotimol y fucsina ácida, las colonias lactosa-positivas muestran una expresiva diferencia cromática frente a las colonias lactosa-negativas. Igual ocurre en el caso de colonias que fermentan lentamente la lactosa y más fácilmente la sacarosa y la salicina, sustancias reaccionantes fácilmente fermentables, lo que impide hallazgos de patógenos falsamente positivos. La combinación de tiosulfato, como sustancia reaccionante, y una sal de hierro como indicador, da una coloración negra a las colonias ácido sulfhídrico-positivas. Una mezcla de sales biliares inhibe a una gran parte de la flora acompañante. Las colonias de <i>Salmonella</i> son verde azuladas con centro negro.
AGAR RAMBACH	Desoxicolato	Los sustratos nutritivos que tiene permiten a las enterobacterias multiplicarse rápidamente. El desoxicolato de sodio inhibe a la flora Gram (+) acompañante y permite a la vez diferenciar a las especies de <i>Salmonella</i> por un nuevo procedimiento. Esto es posible adicionando al medio de cultivo proplilenglicol. <i>Salmonella</i> forma ácido a partir del proplilenglicol de esta manera hay un viraje del indicador de pH que produce que las colonias tengan un color rojo característico. El procedimiento para diferenciar coliformes de <i>Salmonella</i> es mediante un cromógeno que contiene el medio el cual indica la presencia de beta-Galactosidasa la cual es característica de coliformes. Los microorganismos coliformes forman colonias de color verde azul o violeta azul. Y otras enterobacterias y bacterias Gram (-)

MEDIOS SELECTIVOS		
MEDIO	INHIBIDOR	CARACTERISTICAS
AGAR ONOZ	Verde Brillante Sales Biliares	<p>tales como <i>Proteus</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Shigella</i>, <i>S. typhi</i>, <i>S. paratyphi</i> forman colonias incoloras.</p> <p>Las bacterias Gram (+) son inhibidas casi totalmente en su crecimiento mientras que las enterobacterias lactosa y sacarosa positivas sólo lo son parcialmente. Sus colonias son además diferenciables, debido a matices cromáticos provocados por los indicadores rojo neutro y azul de anilina.</p> <p>Las colonias de <i>Proteus</i> deaminan la fenilalanina formando fenilpiruvato, que forma un complejo pardo oscuro con iones de hierro siendo de este modo diferenciables. La adición de fenilalanina actúa además de forma neutralizante sobre el cloranfenicol, de tal manera que la demostración de <i>Salmonella</i> se ve muy poco limitada durante el tratamiento con este quimioterápico.</p>

3.4 Pruebas Bioquímicas

3.4.1 CONVENCIONALES

Existen diversas pruebas bioquímicas indicadoras del metabolismo específico de las bacterias las cuales son características para cada género y especie. Con estas pruebas se puede identificar al microorganismo en estudio una vez aislado. A continuación se mencionan las pruebas bioquímicas convencionales utilizadas para la identificación de enterobacterias y los medios que se utilizan para su realización.

MEDIO	PRUEBA BIOQUIMICA
Agar Triple Azúcar Hierro= TSI	Fermentación Glucosa - Sacarosa y Lactosa Producción de H ₂ S Producción de gas
Agar de Hierro Lisina=LIA	Descarboxilación de lisina Desaminación de lisina Producción de H ₂ S Producción de gas
Agar Citrato de Simmons	Utilización del Citrato
Caldo Malonato fenilalanina	Presencia o ausencia de flagelos - Producción de Indol. Desaminación de Fenilalanina.
Agar Urea de Christensen	Hidrólisis de la Urea
Medio SIM	Producción de H ₂ S Producción de Indol Movilidad
Caldo RM-VP	Producción de Acetil- Metil-Carbinol
Caldo para ensayo de Ornitina- descarboxilasa Arginina- dihidrolasa	Hidrólisis de Arginina Descarboxilación de Ornitina

El procedimiento se basa en inocular los medios con una colonia del microorganismo en estudio previamente aislada en algún medio selectivo, la inoculación sería; primero los medios líquidos, luego los semisólidos y por último los sólidos. Si se va a utilizar Citrato de Simmons éste se inocula antes que ninguno para no contaminar al medio con alguna otra fuente de carbono que no sea citrato. La tabla 4 presenta las principales características bioquímicas de algunas cepas de *Salmonella*.

TABLA 4

GENERO		Salmonella				
		S. typhi	S. choleraesuis	S. paratyphi A	Salmonella spp	
P R U E B A S	TSI Carbohidratos	K / A	K / A	K / A	K / A	
	W2S / Gas	+ / -	Var / +	- (++) /	+ + / +	
	LIA	K / A	K / K	K / A	K / K	
	Citrato Simmons	-	- (+)	-	+	
	Urea Christensen	-	-	-	-	
	Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	
	Produccion Indol	-	-	-	-	
	Motilidad w	+	+	+	+	
	Uoges Proskauer w	-	-	-	-	
	Lisina decarboxilasa w	+	+	-	+	
	Ornitina decarboxilasa w	-	+	+	+	
	Arginina dihidrolasa	-	Var	- (+)	+ (-)	
	Sacarosa	-	-	-	-	
	Adonitol	-	-	-	-	
	Lactosa	-	-	-	-	
	Produccion de ácido en caldo base rojo	Inositol	-	-	-	- (+)
	Manitol	+	+	+	+	
	Arabinosa	-	-	+	+	
	Rafinosa	-	-	-	-	
	fenol (IX de Carbohidrato)	Ramnosa	-	+	+	+
	Salicin	-	-	-	-	
	Sorbitol	+	+	+	+	
	Trehalosa	+	-	+	+	
	Xilosa	+ (-)	+	-	+	
	Producción = DNAsa	-	-	-	-	
	Crecimiento = KCN	-	-	-	-	
	Halonato	-	-	-	-	
	OHPG	-	-	-	-	

TSI = Lease = Superficie / Fondo.
 LIA = Lease = Superficie / Fondo.
 K = Reacción alcalina (no hay cambio de color en el medio)
 A = Reacción ácida (cambio de color inicial del medio)
 VAR = Reacción Variable.

3.4.2 Rápidas

API (Analytical Profile Index)

El sistema API 20E es una versión miniaturizada y estandarizada de los procedimientos convencionales para la identificación de Enterobacterias y otras bacterias Gram (-). Esta listo para usarse, consta de un sistema de microtubos para desarrollar 23 pruebas bioquímicas a partir de colonias previamente aisladas de la bacteria.

Este sistema identifica a la bacteria en 18-24 horas.

Principios fisicoquímicos. El sistema API 20E consiste en microtubos que contienen diminutos sustratos deshidratados. Los sustratos son reconstituidos adicionando suspensión bacteriana. De esta manera durante la incubación a 37° C los microorganismos reaccionan con el contenido de los tubos y después de 18-24 horas se leen las reacciones por medio de los indicadores del sistema o por la adición de algún reactivo.

El procedimiento se basa en:

- 1.- Hacer una suspensión bacteriana con solución salina al 0.85% ajustando la turbiedad al equivalente del tubo No. 1 de la escala de Mc. Farland.
- 2.- Inocular la tira con esta suspensión, e incubar de 18-24 horas a 35-37 °C.
- 3.- Leer las reacciones formadas, algunas directas y otras mediante la adición de algún reactivo revelador. Hacer también prueba de oxidasa a la bacteria en estudio.
- 4.- Reportar y leer el resultado en el libro de códigos para identificar tanto género como especie del microorganismo en estudio.

La tabla 5 muestra un resumen de los principios fisicoquímicos de las pruebas de API 20E.

TABLA 5
RESUMEN DE LOS PRINCIPIOS FISICOQUIMICOS DE LAS PRUEBAS
API 20E

TUBO	PRINCIPIO FISICOQUIMICO	COMPONENTE REACTIVO
ONPG	La hidrólisis del ONPG por la beta-galactosidasa produce ortonitrofenol desarrollando una coloración amarilla, el IPTG (Isopropiltiogalactopiranosido) es usado como inductor.	ONPG IPTG
ADH	La arginina dihidrolasa transforma a la arginina en ornitina, amonio y dióxido de carbono. Esto causa un cambio en el pH del sistema virando el indicador de amarillo a rojo.	Arginina
LDC	La lisina descarboxilasa transforma a la lisina en una amina primaria, cadaverina. Esta amina causa un cambio en el pH del sistema virando el indicador de amarillo a rojo.	Lisina
ODC	La ornitina descarboxilasa transforma a la ornitina en una amina primaria, la putrescina. La amina causa un cambio en el pH del sistema virando el indicador de amarillo a rojo.	Ornitina
CIT	El citrato se encuentra como única fuente de carbono. Su utilización provoca una elevación del pH y vire del indicador de verde a azul.	Citrato de Sodio
H S	El sulfuro de hidrógeno es producido a partir de tiosulfato, el cual reacciona con las sales de hierro produciendo un precipitado negro.	Tiosulfato de Sodio
URE	La ureasa produce amonio a partir de urea, el amonio causa un incremento en el pH provocando un vire en el indicador de amarillo a rojo.	Urea
TDA	La triptofano desaminasa forma ácido indolpiruvico a partir del triptofano. El ácido indolpiruvico produce una coloración café rojiza en presencia de cloruro férrico.	Triptofano
IND	En el metabolismo del triptofano hay formación de indol. El reactivo de Kovacs' forma un complejo colorido (rosa a rojo) con indol.	Triptofano
VP	La acetofina es producida a partir de piruvato de sodio y su formación está indicada por la formación de un complejo colorido. La creatina intensifica el color de esta prueba cuando es positiva.	Piruvato de Sodio Creatina
GEL	La licuefacción de la gelatina por enzimas proteolíticas desarrolla un pigmento negro el cual se difunde a través del tubo.	Gelatina y Carbon

TABLA 5

TUBO	PRINCIPIO FÍSICOQUÍMICO	COMPONENTE REACTIVO
GLU MAN INO SOR RHA SAC HEL AMY ARA	La utilización de carbohidratos provoca formación de ácido con consecuente cambio de pH. El indicador vira de azul a amarillo.	Glucosa Manitol Inositol Sorbitol Ramosa Sacarosa Melobiosa Amigdalina Arabinosa
GLU RED. DE NITRATO	Los nitritos forman un complejo rojo con ácido sulfanílico y N,N-Dimetil-Alfa-Naftil Amina.	Nitrato de Potasio
MAN INO ISOR catalasa	La catalasa produce oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno.	

PRUEBAS SEROLOGICAS

Debido a la elevada incidencia de las enfermedades gastrointestinales en nuestro país, sobre todo en la población infantil, es necesario efectuar la identificación de los agentes etiológicos causantes de estos padecimientos.

Realizar la diferenciación de género y especie es importante desde el punto de vista terapéutico y epidemiológico; por ejemplo de las infecciones causadas por el género de *Salmonella*, el tratamiento no es el mismo si se trata de una fiebre tifoidea que de un cuadro de gastroenteritis.

Para lograr la identificación de las bacterias los microbiólogos recurren a la morfología colonial, morfología microscópica, pruebas bioquímicas y pruebas serológicas. Estas últimas permiten, en forma rápida y sencilla llegar a la identificación final de la bacteria en cuestión.

Fundamento de la prueba. Son reacciones de aglutinación entre los antígenos de *Salmonella* y los respectivos antisueros específicos.

Antisuero S-1:

Antisuero polivalente de *Salmonella* de los grupos A hasta el I más Vi.

Antisuero S-2:

Antisuero polivalente de *Salmonella* de los grupos A hasta el E más Vi.

Antisuero S-3:

Antisuero de *Salmonella* grupo A (Antígeno somático 2).

Antisuero S-4:

Antisuero de *Salmonella* grupo B (Antígeno somático 4).

Antisuero S-5:

Antisuero de *Salmonella* grupo C1 (Antígeno somático 7).

Antisuero S-6:

Antisuero de *Salmonella* grupo C2 (Antígeno Somático 8).

Antisuero S-7:

Antisuero de *Salmonella* grupo D (Antígeno somático 9).

Antisuero S-8:

Antisuero de *Salmonella* grupo E (Antígenos somáticos 3,10 y 15).

Antisuero S-9:

Antisuero polivalente de *Salmonella* de los grupos A, B, D, E y L.

Antisuero S-10:

Antisuero polivalente de *Salmonella* de los grupos C, F, G y H.

Antisuero S-11:

Antisuero polivalente de *Salmonella* de los grupos I, J, K, N, M, O y P.

Antisuero S-12:

Antisuero *Salmonella* antígeno Vi.

La prueba ha dado buena sensibilidad cuando se han utilizado muestras para la serotipificación a partir de caldos de enriquecimiento tales como GN y Selenito (7) después de una incubación de 24 horas. (8) (9)

CAPITULO IV

DISCUSION

Los medios de preenriquecimiento o enriquecimiento no selectivo no tienen ningún inhibidor, en él pueden crecer toda clase de bacterias y hongos y aún darles a los microorganismos que se encuentren dañados nutrientes adecuados para su sobrevivencia y reproducción.

Estos medios se utilizan principalmente cuando la cantidad del patógeno se encuentra en cantidades muy pequeñas, de esta manera el microorganismo se reproduce y es más fácil su detección. La incubación en estos medios puede ser desde 6 hasta 24 horas dependiendo de la muestra en estudio.

Los caldos de enriquecimiento selectivo inhiben principalmente bacterias Gram (+) y favorecen en general el crecimiento de enterobacterias como es el caso de caldo Mossel, algunos inclusive inhiben coliformes como caldo GN, caldo Selenito-cistina y caldo Tetracionato permitiendo el crecimiento de *Salmonella*, y otros como el caldo Rappaport no permiten el crecimiento de *S. typhi* y *Shigella*, sin embargo, las otras especies de *Salmonella* se multiplican sin obstáculos, por lo que este último no es adecuado para el enriquecimiento de estos patógenos.

En general los inhibidores de que constan estos medios son tensoactivos y colorantes, a los cuales es resistente *Salmonella*, por lo que son de gran ayuda para eliminar microorganismos indeseables ya sea flora acompañante o microorganismos de poca importancia para nuestro estudio en especial.

Los medios selectivos tienen la misma finalidad que los medios de enriquecimiento selectivo pues contienen también casi los mismos inhibidores, pero mientras los caldos de enriquecimiento ayudan a proliferar a los microorganismos patógenos y a la vez inhiben a la flora acompañante, los medios selectivos aíslan y ponen de manifiesto características metabólicas propias de los microorganismos que en ellos crecen, como por ejemplo; producción de ácido sulfhídrico, fermentación de algún carbohidrato o utilización de algún otro sustrato provocando un cambio en el pH del medio con consecuente viré del indicador.

Agar Rambach aprovecha 2 características bioquímicas específicas de *Salmonella* spp. las cuales son: metabolismo positivo de propilenglicol y ausencia de la enzima beta-galactosidasa. (11).

La desventaja de este medio es que las cepas de *S. typhi* no pueden ser identificadas en él, puesto que el microorganismo no utiliza el propilenglicol.

Existe otro medio que similarmente detecta colonias de *Salmonella*, es el SM-ID (bioMérieux, S.A. Montalieu-Vecieu, France). En el que las colonias características de *Salmonella* son distinguidas por su coloración roja, mientras que las de los coliformes son colonias azules o violetas, igual que en el medio Rambach. Las características bioquímicas usadas en este medio son: la formación de ácido a partir de glucuronato y la ausencia de la enzima beta-galactosidasa. La selección de estas características hace que el número de resultados falsos positivos en el medio SM-ID sea más probable que el número obtenido con agar Rambach, porque algunas cepas de *E.coli*, *Shigella* spp. y *Morganella morganii* tienen reacciones idénticas que *Salmonella* spp. Por otro lado, el medio SM-ID permite la detección de *S.typhi* y *S.paratyphi* porque ambos utilizan el glucuronato.

Como se puede observar estos 2 medios tienen ventajas y desventajas. No obstante, agar Rambach es más recomendable y puede ser usado como medio para aislamiento primario, pero si se resiembró a partir de algún caldo de enriquecimiento selectivo, su especificidad puede reducir sustancialmente la carga de trabajo en el laboratorio, porque permite una identificación presuntiva de colonias de *Salmonella* entre coliformes y otros microorganismos lactosa negativos.

Las colonias aisladas de algún medio selectivo (14) sospechosas de ser *Salmonella* spp. se pueden identificar con los medios convencionales o rápidos (13,15) de pruebas bioquímicas, las cuales usualmente requieren 24 horas de incubación.

De acuerdo a estudios reportados en España en la sección de microbiología de algunos hospitales se recomienda una prueba fácil y rápida que permite una detección presuntiva de *Salmonella* spp. utilizando colonias aisladas en un medio selectivo como agar SS ó agar Hektoen. (10,12).

Este estudio se concentró en las colonias H₂S positivo, lactosa negativo aisladas en estos medios. A estas colonias se les agregó 5 microlitros del reactivo y se observó el desarrollo de fluorescencia después de 3 a 5 minutos.

La prueba se basa en la detección de la enzima C8 esterasa presente en *Salmonella* spp. La enzima actúa sobre un sustrato formado por un éster de 8 átomos de C conjugado con 4-metilumbeliferona (llamado reactivo de la prueba de MUCAP), liberando este último compuesto el cual es fluorescente a 365 nm. El desarrollo de un azul fluorescente sobre o alrededor de las colonias fué considerado como resultado positivo. Se observó la ausencia de fluorescencia natural de las colonias sin la adición del reactivo de MUCAP.

Todas las colonias se identificaron por pruebas bioquímicas y el método indicó tener tanto buena especificidad como sensibilidad.

CONCLUSION

Para investigar la presencia de *Salmonella* en muestras ya sean biológicas, de alimentos, productos farmacéuticos, etc. es necesario muchas veces darle un tratamiento previo a la muestra, el cual consiste en 3 fases fundamentales:

- 1) Preenriquecimiento ó enriquecimiento no selectivo.
- 2) Enriquecimiento selectivo
- 3) Siembra en placa de medios selectivos.

Una vez aislado el microorganismo se procede a identificarlo bioquímica y serológicamente.

Dentro de los medios selectivos se encuentran los que son de baja selectividad como son: EMB, Mac Conkey, XLD, los de mediana selectividad: SS, Onoz, Rambach, Verde brillante, Leifson, y los de alta selectividad: Sulfito bismuto y Hektoen.

Es recomendable utilizar a la vez varios medios para el aislamiento de *Salmonella* a partir de medios de enriquecimiento selectivo para obtener mejores resultados, principalmente cuando el patógeno se encuentre en concentraciones muy bajas en la muestra, ya que queda comprobado que no es posible recomendar un solo medio para el aislamiento de *Salmonella* que sea completamente satisfactorio.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- (1) OMS. OPS. Manual de investigaciones de laboratorio de infecciones entéricas agudas Octubre 1983.
- (2) Richard L. Guerrant, M. D., David S. Shields, M.D., Stephen M. Thorson, M.D. 1985. Evaluation and Diagnosis of Acute Infectious Diarrhea. The American Journal of Medicine; 78: 91-97.
- (3) Velasco, A., Mateos, M. L., Más, G., Pedraza, A., Díez, M., Gutiérrez, A. 1984. Three-Year Prospective Study of Intestinal Pathogens in Madrid, Spain. Journal of Clinical Microbiology; 20: 290-292.
- (4) Manual de Medios de Cultivo. 1990. Merck.
- (5) Manual de Medios de Cultivo. Bioxón.
- (6) Rambach, A. Enrichment, Isolation and Detection of Salmonella. E. Merck. Frankfurter Strabe 250. D-6100 Darmstadt 1.
- (7) Rohner, P., Dharan, S., Auckenthaler, R., 1992. Evaluation of the Wellcolex Colour Salmonella Tests for Detection of Salmonella spp. in Enrichment Broths. Journal of Clinical Microbiology; 30: 3474-3276.
- (8) Metzler J., Nachankin I., 1988. Evaluation of a Latex Agglutination Test for the Detection of Salmonella and Shigella spp. by using Broth Enrichment. Journal of Clinical Microbiology., 26: 2501-2504.
- (9) Bouvet P., Jeanjean S., 1992. Evaluation of two Colored Latex Kits, the Wellcolex Colour Salmonella Test and the Wellcolex Colour Shigella test, for Serological Grouping of Salmonella and Shigella Species. Journal of Clinical Microbiology; 30: 2184-2186.
- (10) Aguirre M., Cacho J., Folgueira L., López M., García J. and Velasco A. 1990. Rapid Fluorescence Method for Screening Salmonella spp. from Enteric Differential Agars. Journal of Clinical Microbiology. 28: 148-149.
- (11) Dusch H. and Altwegg M., 1993. Comparison of Rambach Agar, SM-ID Medium, and Hektoen Enteric Agar for Primary Isolation of Non-typhi Salmonellae from Stool Samples. Journal of Clinical Microbiology. 31: 410-412.

- (12) Ruiz J., Sempere M., Varela M. and Gomez J., 1992. Modification of the Methodology of Stool Culture for Salmonella Detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 525-526.
- (13) Greene L., Appelbaum P. and Kellogg J. 1984. Evaluation of a Two-Hour Method for Screening Pathogens From Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 20: 285-287.
- (14) Fan Kaili., Morris A. and Reller B. 1993. Application of Rejection Criteria for Stool Cultures for Bacterial Enteric Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2233-2235.
- (15) Carol Ann Imperatrice and Irving Nachamkin. 1993. Evaluation of the Vitek EPS Enteric Pathogen Screen Card for Detecting Salmonella, Shigella, and Yersinia spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 433-435.