

9  
20je.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"**

**" DETERMINACION DE LA CONCENTRACION Y  
COMPOSICION DE ANTIBIOTICOS PARA EL AISLAMIENTO  
Y CULTIVO DE CAMPYLOBACTER "**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
SANDRA CABRERA GOMEZ

Asesores: QFB Rosalinda Escalante P.

QFB Leticia Hernández C.

U. N. A. M.  
FES.  
ZARAGOZA



LO NUMERO E.M.  
DE NUESTRA REPLICACION

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

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

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

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

A DIOS

Por ser la luz que ilumina e iluminará mi camino  
y permitirme llegar a este momento tan importante de mi vida.



A mi Madre

Por su valor ante la vida y ser la razón más importante para seguir adelante.

A Roger

Por su amor, su comprensión y su apoyo en todo momento.



A la memoria de una persona a la cual no supe demostrar cuanto la quería,  
pero siempre llevo su recuerdo conmigo.

Mi Abuelo

A Alma Ivonne

Por su gran apoyo de siempre  
y ser una de las personas más importantes en mi vida.

A Ma. Inés, César, Victor, Angel y C. Leonel

Por su apoyo incondicional y ser mi verdadera familia.

A Leticia Cecilia

Por su apoyo, su comprensión y por ser una amiga de verdad.



A Leticia Hernández

Por abrirme las puertas de BD,  
por su tiempo, su asesoramiento y por ser una estupenda persona.

A Rosalinda Escalante

Por su tiempo, sus conocimientos aportados y su gran calidad humana.



Y a todas las personas y amigos que, de una u otra forma,  
contribuyeron a la culminación de una de las metas más importantes de mi vida.

# **Agradecimiento**

A los miembros del jurado:

**Rosalinda Escalante Pliego  
Leticia Hernández Corona  
Araceli García del Valle  
Francisco Alvarado Pérez  
Luis A. Mora Guevara**

por su valiosa cooperación en la revisión de este trabajo.

---

**A todo el personal de Becton Dickinson,  
en especial a Tere por las facilidades brindadas.**

# Contenido

---

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Planteamiento del problema.....	4
3. Generalidades.....	5
3.1 Género <i>Campylobacter</i> .....	5
3.1.1 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	6
3.1.2 Susceptibilidad antimicrobiana.....	7
3.2 Desarrollo y aislamiento del género <i>Campylobacter</i> .....	7
3.3 Medios de cultivo.....	9
3.3.1 Definición.....	9
3.3.2 Composición.....	9
3.3.3 Clasificación.....	11
3.4 Mecanismo de acción de antibióticos.....	13
4. Objetivos.....	17
5. Hipótesis.....	18

<b>6. Material y métodos</b> .....	<b>19</b>
<b>Diagrama de Flujo</b> .....	<b>19</b>
<b>6.1 Selección del medio de cultivo para el desarrollo de</b>	
<b>Campylobacter</b> .....	<b>20</b>
<b>6.1.1 Requerimientos de la base</b> .....	<b>21</b>
<b>6.1.2 Preparación de las bases</b> .....	<b>21</b>
<b>6.2 Método Cilindro - Placa</b> .....	<b>22</b>
<b>6.2.1 Material y equipo</b> .....	<b>22</b>
<b>6.2.2 Procedimiento</b> .....	<b>22</b>
<b>6.2.2.1 Preparación del inóculo</b> .....	<b>22</b>
<b>6.2.2.2 Preparación de la capa siembra</b> .....	<b>24</b>
<b>6.2.2.3 Colocación y llenado de los cilindros</b> .....	<b>24</b>
<b>6.2.2.4 Preparación del estándar del antibiótico</b> .....	<b>24</b>
<b>6.2.2.5 Preparación de la muestra</b> .....	<b>25</b>
<b>6.2.2.6 Lectura y cálculos</b> .....	<b>25</b>
<b>6.3 Promoción de crecimiento</b> .....	<b>26</b>
<b>6.3.1 Técnica de Miles y Mishra</b> .....	<b>26</b>
<b>6.3.2 Distribución en superficie</b> .....	<b>26</b>
<b>6.3.3 Vaciado en placa</b> .....	<b>26</b>
<b>6.3.4 Preparación del inóculo</b> .....	<b>27</b>
<b>6.4 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana (Kirby - Bauer)</b> .....	<b>28</b>
<b>6.4.1 Material y equipo</b> .....	<b>28</b>
<b>6.4.2 Procedimiento</b> .....	<b>28</b>
<b>6.4.2.1 Método estándar para la preparación del inóculo</b> .....	<b>28</b>
<b>6.4.2.2 Método alternativo para la estandarización del inóculo</b> .....	<b>29</b>
<b>6.4.2.3 Método de prueba</b> .....	<b>29</b>

<b>7. Resultados</b> .....	<b>31</b>
7.1 Selección del método de promoción de crecimiento.....	31
7.2 Selección de la base.....	32
7.3 Determinación de la potencia de antibióticos .....	33
7.4 Determinación de la combinación de antibióticos para el aislamiento de <i>Campylobacter</i> .....	33
7.5 Promoción de crecimiento e inhibición.....	34
7.5.1 Sembrado por estría.....	34
7.5.2 Aislamiento a partir de mezcla in vitro.....	35
7.6 Prueba de susceptibilidad de antibióticos (Kirby-Bauer).....	38
<b>8. Análisis de resultados y conclusiones</b> .....	<b>39</b>
8.1 Recomendaciones.....	41
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>42</b>
<b>Apéndice 1. Preparación de Medios de Cultivo (Potencia de Antibióticos)</b> .....	<b>45</b>
<b>Apéndice 2. Preparación de Soluciones Reguladoras</b> .....	<b>47</b>
<b>Apéndice 3. Preparación de medios de cultivo y soluciones para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana</b> .....	<b>48</b>
Estándar de turbidez.....	48
Agar Mueller-Hinton.....	49
Caldo Mueller-Hinton .....	50
<b>Apéndice 4. Preparación de medios de cultivo para promoción de crecimiento</b> .....	<b>51</b>
Agar Soya-Tripticasina.....	51
Caldo Soya-Tripticasina .....	52

# *Resumen*

---

Las enfermedades gastrointestinales son causa importante de morbilidad y mortalidad en países que como México tienen dificultades para mantener un buen control sanitario de sus alimentos. Sobre todo en la última década, el género *Campylobacter* además de su importancia como productor de infección gastrointestinal, también se encuentra asociado con una amplia variedad de enfermedades sistémicas.

Recientemente, se han realizado estudios para probar la eficiencia de los medios de cultivo comerciales, y los resultados han mostrado que el medio con mayor índice de error, es el destinado para *Campylobacter*, seguido de Thayer Martin, en donde la constante para ambos es la adición de antibióticos en su preparación.

El presente trabajo se realizó con el fin de mejorar la composición y concentración de los antibióticos contenidos en el medio de cultivo para favorecer el aislamiento y crecimiento del *Campylobacter jejuni*.

La parte experimental comprendió varios aspectos como fue el seleccionar la base que cumpliera con los requisitos nutricionales del microorganismo. La selección se llevó a cabo empleando la técnica de promoción de crecimiento por distribución de superficie.

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron las bases B3 y B4, las cuales fueron enriquecidas con sangre de carnero al 10% para aumentar el grado de recuperación del género *Campylobacter*.

Por otro lado fue necesaria la determinación de la potencia de los antibióticos que se emplearon en el medio para calcular su concentración en él.

Una vez realizado lo anterior se probaron 4 combinaciones diferentes (base-antibiótico) empleando el método de sembrado por estria con diferentes microorganismos.

De acuerdo a los resultados de recuperación de los microorganismos, se seleccionaron las bases 3d y 4c, las cuales se volvieron a probar empleando un mayor número de cepas de la misma especie y género.

Finalmente se seleccionó la base 3d, en la cual se observó la mayor inhibición de los microorganismos sembrados y el crecimiento del *Campylobacter jejuni* fue satisfactorio.

Se realizó la prueba de susceptibilidad de antibióticos (Kirby-Bauer) con el fin de verificar la resistencia del *Campylobacter* a los antibióticos que se iban a incluir en el medio de cultivo.

# 1. Introducción

---

Las enfermedades gastrointestinales, en donde los alimentos y el agua son importantes agentes transmisores, son causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, constituyendo uno de los principales problemas de salud pública en países, que como México tienen dificultades para mantener un buen control sanitario de alimentos (6). Existen algunos microorganismos universalmente reconocidos como patógenos transmitidos por alimentos, como es el caso de los géneros *Salmonella* y *Staphylococcus*. Conforme avanza el estudio de estos microorganismos y se perfeccionan las técnicas de aislamiento e identificación de ellos, se incluyen especies bacterianas que eran desconocidas hace tan sólo 5 a 10 años y que después de su descubrimiento se ha visto que son igualmente o más importantes que aquellas descritas con anterioridad. Microorganismos como *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila* o *Plesiomonas shigelloides* se presentan con mayor frecuencia causando gastroenteritis. Su amplia distribución en la naturaleza y la gravedad del daño que causan han hecho que sean tan importantes como los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*. Sobre todo en la última década, el género *Campylobacter* además de su importancia como productor de infección gastrointestinal, también se encuentra asociado con una amplia variedad de enfermedades sistémicas (3).

## ***2. Planteamiento del problema***

---

Debido a la gran importancia que el género *Campylobacter* ha adquirido recientemente dentro de las enfermedades gastrointestinales en humanos y a las dificultades que se presentan en su primoaislamiento, surge la necesidad de mejorar la composición y concentración de los antibióticos contenidos en el medio de cultivo con el fin de favorecer su crecimiento.

## 3. Generalidades

---

### 3.1 Género *Campylobacter*

El género *Campylobacter* consiste en un grupo bien definido de bacterias. Son bacilos finos, curvados en espiral, miden de 0.2 - 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 0.5 - 5.0  $\mu\text{m}$  de largo. Los bacilos pueden tener uno o más espirales y una longitud hasta de 8  $\mu\text{m}$ . Se presentan también en forma de coma, de "s" o de ala de gaviota cuando dos células forman cadenas. Las células pueden volverse esféricas o cocoides, en especial en cultivos envejecidos. No son esporuladas y tienen una membrana polar multilaminar en ambas terminales de la célula que está localizada debajo de la membrana citoplásmica. Es gramnegativo y móvil con un movimiento característico en forma de espiral que realiza por medio de un flagelo polar en una o ambas terminaciones de la célula. El flagelo puede ser 2 o 3 veces más grande que la célula. Es microaerofílico, con un tipo respiratorio de metabolismo que requiere una concentración de oxígeno entre 3 y 15 % y  $\text{CO}_2$  entre 3 - 5 %. Ocasionalmente, algunas cepas pueden crecer bajo condiciones aeróbicas (20%  $\text{O}_2$ ) y algunas otras especies bajo condiciones anaerobias con fumarato, formato y fumarato, u oxígeno y fumarato en el medio.

Son quimiorganótrofos. No fermentan ni oxidan los hidratos de carbono. No producen productos finales ácidos o neutros, no requieren suero o sangre para su crecimiento y la energía

que necesitan la obtienen a partir de los aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico, no de los carbohidratos. No hidrolizan la gelatina ni la urea. Son MR-VP negativos, oxidasa positivos, reducen nitratos, no tienen actividad sobre la lipasa ni producen pigmentos (21)(13).

Algunas especies son patógenas para el hombre y los animales, se encuentran en los órganos reproductores, tracto intestinal y cavidad oral del hombre y animales (21).

Las cuatro especies de *Campylobacter* más asociadas a las enfermedades diarreicas son *C.jejuni*, *C.coli*, *C.upsaliens* y *C.lari*. Genéricamente se conocen como *Campylobacter* termófilos porque son capaces de crecer a 42°C, a diferencia de otras especies de *Campylobacter* (11).

### 3.1.1 *Campylobacter jejuni*

Las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* han sido reconocidas como patógenos intestinales típicamente transmitidos por el agua y los alimentos, y forman un grupo que, por sus características de crecimiento y distribución en el ambiente adquiere importancia particular (6).

*Campylobacter jejuni* se ha encontrado en el contenido intestinal de una diversidad de animales, tanto domésticos como silvestres. De ahí se infiere que éstos, sobre todo las aves de corral, son un importante reservorio del microorganismo y pueden ser una importante fuente de infección (6).

*Campylobacter jejuni* se encuentra muy ligado a casos de gastroenteritis, enfermedad caracterizada por la destrucción de las superficies mucosas del yeyuno, ileon y colon, principalmente en niños (21)(18). La enfermedad presenta un periodo de incubación que va de 2 a 5 días, y la duración de ésta puede extenderse hasta más de 10 días. Las manifestaciones clínicas más comunes son enteritis con fiebre, dolores abdominales perumbilicales y jaqueca antes de desarrollar diarrea, la cual puede ser líquida o sanguinolenta (6).

### 3.1.2 Susceptibilidad antimicrobiana

Las cepas de *Campylobacter jejuni* son sensibles in vitro a los aminoglucósidos, cloramfenicol, clindamicina, eritromicina y tetraciclinas, pero son resistentes a la penicilina, cefalosporinas, polimixina, trimetoprim y vancomicina. La eritromicina es el antibiótico de elección para el tratamiento de los pocos casos que requieren terapia antibacteriana, principalmente aquellos con larga persistencia de síntomas como diarrea sanguinolenta o fiebres muy altas. En todos los aislamientos se debe realizar una prueba in vitro para la sensibilidad a la eritromicina, ya que un número muy pequeño de cepas son resistentes a esta droga; en estos casos, se utiliza clindamicina o tetraciclina (17).

### 3.2 Desarrollo y aislamiento del género *Campylobacter*

Debido a que se trata de un microorganismo estrictamente microaerofílico, una de las dificultades asociadas con su aislamiento es establecer un medio adecuado para proveer la atmósfera necesaria para su crecimiento (21).

Se han propuesto varios métodos para su aislamiento y desarrollo. Uno de los más antiguos y tal vez más utilizado es la evacuación del aire de un recipiente de tipo anaerobio y reemplazarlo por una mezcla de gases.

Recientemente se han propuesto otros sistemas, los cuales requieren menos equipo y son más fáciles de usar. Karmali y Fleming sugirieron utilizar el principio de Fortner que consiste en incubar un anaerobio facultativo de rápido crecimiento en una placa de *Campylobacter* para reducir la concentración de oxígeno y así proveer condiciones microaerofílicas. Kaplan sugirió un sistema de incubación en una bolsa de plástico, la cual estaba originalmente diseñada para aislar anaerobios.

Las condiciones microaerofílicas se pueden producir modificando el procedimiento para excluir el catalizador antes de que se selle la bolsa.

Un sistema llamado Campypak II ha sido diseñado recientemente para ser utilizado específicamente con microorganismos microaerofilicos. Este sistema es un sobre en el cual se desarrolla gradualmente dióxido de carbono y una cantidad limitada de hidrógeno. El catalizador que está en la parte trasera del sobre permite que el hidrógeno se combine con oxígeno, pero como solamente hay una cantidad limitada de hidrógeno, el nivel de oxígeno solamente disminuye lo suficiente para producir condiciones microaerofilicas (5).

Nutricionalmente, *Campylobacter jejuni* es considerado quimiorganotrófico y obtiene su energía a partir de los aminoácidos o de intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico, frecuentemente se describe que el aislamiento es bastante difícil debido a sus condiciones microaerofilicas y nutricionales.

Actualmente se prefiere el uso de medios selectivos adicionados de antibióticos, ya que el *Campylobacter jejuni* está asociado a otros microorganismos que conforman la flora bacteriana y el empleo de medios selectivos no elimina estos microorganismos pero sí limita su crecimiento favoreciendo el de *Campylobacter* (21).

Existen medios selectivos disponibles comercialmente para lograr el aislamiento de este microorganismo como el medio Skirrows, el de Butzler y Campy-BAP, los cuales son incubados a 42-43°C en una atmósfera microaerofilica. Sin embargo, se han realizado estudios recientemente para probar la eficiencia de estos medios de cultivo comerciales, y los resultados han mostrado que el medio con mayor índice de error, es el destinado para el aislamiento y cultivo de *Campylobacter*, seguido de Thayer Martin, en donde la constante para ambos, es la adición de antibióticos en su preparación (1).

### 3.3 Medios de cultivo

#### 3.3.1 Definición

Un medio de cultivo se conoce como el material nutritivo en el que se pueden recuperar, multiplicar y aislar los microorganismos, así como efectuar pruebas de susceptibilidad. Generalmente se presenta desecado en forma de polvo fino o granular, pero también se puede presentar hidratado y preparado (8).

Los factores de mayor importancia en la formulación de un medio efectivo para el cultivo de microorganismos son los siguientes:

- Debe contener los nutrientes esenciales
- Debe tener un contenido de humedad satisfactorio
- Debe tener el pH adecuado
- La consistencia del medio debe ser favorable para el cultivo
- Debe promover el crecimiento de los organismos deseados, y si es selectivo, debe inhibir a los otros (2).

#### 3.3.2 Composición

La composición de un medio de cultivo, generalmente se realiza a partir de una base muy simple, la cual contendrá algún extracto de carne u otra infusión simple, peptonas, sales y agua (7). Los extractos, infusiones y peptonas, proporcionan al organismo aminoácidos, vitaminas, sales y pequeñas cantidades de carbono, nitrógeno, hidrógeno y otros elementos (7)(16).

Las peptonas específicamente, son las fuentes de nutrientes más comunes en los medios de cultivo. Estas son materiales solubles en agua derivados de proteínas obtenidas por medio de la hidrólisis o digestión del recurso material (carne, vegetales, leche, etc.) a través de enzimas ácidas, alcalinas o específicas. Las características de las peptonas dependen del material protéico empleado y del método de hidrólisis. Las hidrólisis ácidas

y alcalinas tienden a destruir el contenido vitamínico de la proteína y una porción del contenido de aminoácidos. Las hidrólisis enzimáticas tienden a preservar las vitaminas y mantener el contenido de aminoácidos intacto (2).

Las sales, usualmente NaCl, sirven para obtener la isotonicidad requerida para el mantenimiento de presiones osmóticas constantes y otras como la de potasio, calcio y magnesio sirven para controlar la permeabilidad de las células en la formulación de los medios de transporte (2)(7).

Por otro lado también se incluyen las sales metálicas que son una fuente importante de iones esenciales para el crecimiento de lactobacilos o estreptococos lácticos (2).

También se utilizan indicadores colorimétricos. Frecuentemente, los indicadores de pH son el rojo de fenol, azul de bromotimol, púrpura de bromocresol y rojo neutro. Estos se utilizan para visualizar la producción de ácido a partir de un sustrato de hidrato de carbono en el medio. En general, el rojo de fenol es el indicador de pH más utilizado ya que cambia de color a un pH que es óptimo para el crecimiento de muchas especies microbianas. El azul de metileno y la resazurina son los indicadores redox más ampliamente utilizados (2).

Se incluyen diversas sustancias en el medio de cultivo para hacerlo selectivo, colorantes como el cristal violeta, azida de sodio, altas concentraciones de NaCl, telurito, selenito, lauril sulfato de sodio y feniletanol (2).

Los agentes antimicrobianos son inhibidores efectivos de algunos tipos específicos de organismos, por lo tanto, sirven como agentes selectivos cuando se incorporan en la formulación de los medios.

La calidad del agua, que sirve como rehidratante, como medio de transporte, o como ambos, es una importante consideración dentro de la preparación de los medios, por lo tanto, para estos fines, esta debe ser destilada o desionizada (2).

Casi cualquier caldo nutritivo puede solidificarse adicionando 1.5 - 2.0 % de agar, el cual es un polisacárido obtenible de una especie de alga marina roja (Rhodophyceae). La característica física del agar que lo hace útil para la microbiología es su única capacidad gelificante. Es líquido cuando se calienta a ebullición y se mantiene en este estado mientras se enfría a 45 - 50°C forma un gel firme y una vez gelificado no se licúa hasta que se calienta a temperatura de ebullición otra vez. El agar por sí mismo es esencialmente inalterable por el crecimiento microbiano y así es ideal para solidificar muchos medios nutritivos (15).

### 3.3.3 Clasificación

Los medios de cultivo se pueden clasificar utilizando dos criterios.

Por su aspecto físico:

#### **Medios líquidos.**

Se emplean fundamentalmente para:

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

#### **Medios semisólidos.**

Se utilizan para identificaciones bioquímicas y averiguar si el germen estudiado es móvil.

Los medios semisólidos tienen una consistencia blanda.

#### **Medios sólidos.**

Se utilizan para obtener colonias aisladas de microorganismos. Los medios sólidos constituyen la mayor parte de los medios de cultivo empleados en la microbiología (8).

### Por su uso se clasifican en:

#### **Medios básicos.**

Un medio básico es aquel que permite la proliferación de cualquier microorganismo y carece de propiedades inhibitorias. Este medio puede no ser enriquecido o enriquecido con un aditivo, usualmente sangre de animal, con el propósito de cultivar microorganismos altamente exigentes. (Caldo y agar nutritivo, caldo y agar de soya, caldo y agar BHI).

#### **Medios enriquecidos.**

Aquellos medios básicos que han sido complementados con líquidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas y otros nutrientes claramente definidos como tales. (Agar sangre, agar sangre chocolate, caldo y agar con suero, suero de Loeffler con sangre, agar Bordet Geongou y Thayer Martin).

#### **Medios selectivos.**

Aquellos medios básicos o enriquecidos sólidos que contienen sustancias que impiden el desarrollo de algunos microorganismos, pero en una flora mixta permiten el aislamiento y recuperación del germen o grupo de gérmenes de interés.

#### **Medios diferenciales.**

Aquellos medios básicos o enriquecidos que contienen indicadores ácido-base, redox o sustancias que detectan cambios en el medio o producen condiciones específicas en el mismo.

#### **Medios selectivos de enriquecimiento.**

Son medios líquidos enriquecidos que estimulan la multiplicación de algún germen determinado e impiden o inhiben la reproducción de otros.

#### **Medios para cultivar gérmenes anaerobios.**

Son medios de cultivo para aquellos gérmenes que requieren condiciones de anaerobiosis o de microaerofilia.

### **Medios de transporte.**

Sirven para transportar las muestras que contienen a los microorganismos del sitio de la toma del producto hasta el laboratorio donde va a efectuarse el estudio. Estos medios impiden que se altere la proporción original de la flora microbiana en los especímenes (7)(8).

Cada medio de cultivo debe presentar las siguientes especificaciones:

- Contenido de humedad (medio deshidratado)
- Composición del medio
- Método de preparación
- Condiciones de presión y temperatura para la esterilización del medio preparado ( en autoclave)
- Advertencia de no esterilizar el medio, si es el caso
- Características de desarrollo de los microorganismos en el medio
- Advertencia sobre la conservación de los medios preparados (8).

## **3.4 Mecanismo de acción de antibióticos**

Como se mencionó anteriormente, la asociación de *Campylobacter* con la flora mixta ha dado pauta a la incorporación de antibióticos en los medios de cultivo para su aislamiento e identificación, por lo que es necesario conocer un poco acerca de ellos y sobre su mecanismo de acción.

**Agente antimicrobiano:** es toda sustancia que actúe contra microorganismos.

**Antibiótico:** es una sustancia derivada de organismos vivos y capaz de inhibir parte de los procesos vitales de algunos microorganismos. Los antibióticos pueden obtenerse de bacterias, hongos, mohos, algas, líquenes y de plantas superiores. Los antibióticos se clasifican empleando uno, o varios de los siguientes criterios:

- a) su composición química
- b) su fuente
- c) sus límites de actividad sobre distintos tipos de microorganismos in vitro
- d) su valor terapéutico

Dentro de un punto de vista diagnóstico, el tercer criterio sería más útil. Así, los antibióticos pueden dividirse en cuatro grandes grupos:

- a) Los que actúan primordialmente contra bacterias grampositivas como la bacitracina, casi todas las penicilinas, la eritromicina, la lincomicina, la vancomicina por mencionar algunos de los más importantes.
- b) Los que actúan primordialmente contra bacterias gramnegativas: una pocas penicilinas, la colistina, la gentamicina, la novobiocina, y la polimixina B.
- c) Los que actúan contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas: algunas penicilinas, la estreptomina, el cloramfenicol, la tetraciclina, la cefalosporina, la kanamicina, la neomicina. Es cierto que la estreptomina actúa principalmente sobre las bacterias gramnegativas, pero bajo el criterio que se ha elegido, tendría que considerársela aquí. Las otras enumeradas se conocen popularmente como antibióticos de amplio espectro, ya que interfieren con una amplia variedad de microorganismos.
- d) Los que actúan especialmente contra hongos: la anfotericina, la nistatina y la griseofulvina.

Si tuvieramos que incluir aquí todos los agentes antimicrobianos, las sulfonamidas cabrían en el grupo C. También llegaríamos a un quinto grupo para concluir la serie, en el que entrarían la isoniacida (INH) y el ácido paraaminosalicilico (PAS), primordialmente activos contra bacilos tuberculosos (7). Los antibióticos empleados en el medio para el aislamiento de *Campylobacter* son los siguientes (2): Vancomicina, Polimixina B, Cefalotina, Anfotericina B, Trimetoprim.

## **Vancomicina**

La vancomicina es un material anfótero, producido por *Streptomyces orientalis*, distribuido como clorhidrato. Tiene un peso molecular elevado (3,300) y se absorbe mal en el intestino.

La vancomicina es intensamente bactericida para estafilococos y enterococos. La droga inhibe las etapas iniciales de la síntesis de mucopéptidos de la pared celular. Las cepas resistentes a la droga no aparecen rápidamente (12)(14).

## **Polimixina B**

La polimixina B es un polipéptido básico, mal absorbido del aparato digestivo, pero fácilmente absorbido después de su inyección. No se distribuye ampliamente en los tejidos y líquidos corporales. No llegan al líquido cefalorraquídeo o a la cavidad pleural a menos que se introduzca localmente (12).

Las polimixinas son bactericidas enérgicos para bacilos gramnegativos, incluyendo a *Pseudomonas* resistentes a otros antibióticos. Las polimixinas revisten la membrana celular de la bacteria y destruyen su función osmótica al obrar como una barrera de la permeabilidad selectiva.

En los tejidos, las polimixinas se hallan ligadas fuertemente a los fosfolípidos de las membranas celulares. Esto limita su disponibilidad para acción antibacteriana (4)(14).

## **Cefalotina**

En 1945 Brotzu aisló un moho del género *Cephalosporium* que produce varios antibióticos denominados cefalosporinas; estos antibióticos se parecen a las penicilinas pero resisten la acción de la penicilinas y son activos tanto contra bacterias grampositivas como gramnegativas. El núcleo de las cefalosporinas, el ácido 7-aminocefalosporánico, guarda un gran parecido con el núcleo de la penicilina, el ácido 6-aminopenicilánico (12).

Aunque la actividad intrínseca de las cefalosporinas naturales es baja, la modificación de su núcleo por la adición de varios grupos R ha dado origen a varios compuestos de gran actividad terapéutica y baja toxicidad. Las cefalosporinas tienen un peso molecular de alrededor de 420; son muy solubles en agua y relativamente estables. La cefalotina, la cefazolina y la cefaloridina se deben inyectar parenteralmente, ya que no se absorben bien en el aparato digestivo (14).

### **Anfotericina B**

La anfotericina B es un antibiótico poliélico producido por una especie de *Streptomyces*; tiene propiedades antibacterianas poco importantes, pero inhibe intensamente el crecimiento de varios hongos patógenos tanto in vivo como in vitro. La anfotericina se liga a los esteroides de la membrana celular del hongo y trastorna su función. Los microcristales de la droga se expenden con desoxicolato de sodio y un amortiguador para ser disueltos en solución de dextrosa (12)(14).

### **Trimetoprim**

La trimetoprima (una diaminotrimetoxibencilpirimidina) inhibe a la reductasa del ácido dihidrofólico de las bacterias y de los protozoarios de manera mucho más eficiente que las mismas enzimas de las células de los mamíferos. Estas enzimas convierten el ácido dihidrofólico a tetrahidrofólico, una secuencia en la sucesión que conduce a la síntesis de purinas y de DNA. La sulfonamidas y la trimetoprima producen un bloqueo concatenado que tiene como resultante un aumento acentuado de la actividad. (12)(14).

## 4. *Objetivos*

---

1. Establecer la base más adecuada para el medio de cultivo tomando en cuenta las necesidades nutricionales del microorganismo.
2. Establecer tanto la composición como la concentración de los antibióticos adecuada para favorecer el crecimiento de *Campylobacter jejuni*.

## ***5. Hipótesis***

---

La obtención de un medio de cultivo selectivo que cumpla con los requisitos nutricionales del género *Campylobacter* e inhiba la flora asociada favorecerá el crecimiento de este microorganismo en el proceso de primoaislamiento.

## 6. Material y métodos

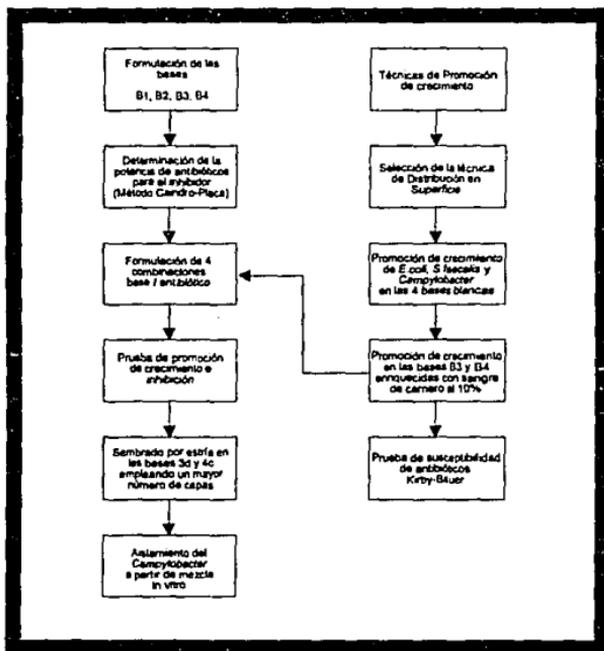


Diagrama de Flujo

## 6.1 Selección del medio de cultivo para el desarrollo de *Campylobacter*.

Para seleccionar la base más adecuada para el agar *Campylobacter* se realizaron las formulaciones de la Tabla 1. Estas tienen como base principal los componentes del Agar *Brucella*, tradicionalmente empleado para el género *Campylobacter*.

COMPONENTE	BASE (1)	BASE (2)	BASE (3)	BASE (4)
g/l	BIOXON	BBL	MERCK	MERCK*
Peptona de caseína	10.5	10.0	11.0	10.0
Peptona de carne	10.0	10.0	10.0	10.0
Dextrosa	1.0	1.0	---	---
Extracto de levadura	2.0	2.0	---	1.0
Cloruro de sodio	5.0	5.0	5.0	5.0
Agar bacteriológico	13.5	15.0	19.0	18.0
Peptona de soya	1.0	---	---	---
Carbonato de sodio	0.3	0.3	0.4	0.4
Sulfito de sodio	---	0.1	---	---
Almidón soluble	---	---	1.0	1.0

\* Variación de Merck

**Tabla 1.** Composición de la base para el desarrollo de *Campylobacter*.

### 6.1.1 Requerimientos de la base

Para la aprobación de cada una de las bases formuladas. éstas tienen que cumplir los siguientes requisitos:

pH (inicial y final) =  $7.3 \pm 0.1$

fuerza de gel = 300 - 500 g/cm<sup>2</sup>

color del polvo - crema

claridad en solución - opaco

sedimento - negativo

partículas insolubles - negativo

humedad - 0.5 %

granulometría - granuloso

### 6.1.2 Preparación de las bases

1. Se pesaron 43.3 g. de polvo de Agar Campylobacter y se disolvieron en un litro de agua.
2. Se llevó a ebullición por un minuto y se esterilizó a 121 °C por 15 min.
3. Se bajó la temperatura entre 35 - 40 °C.
4. Se vació en cajas petri estériles (18-20 ml) y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

## 6.2 Método Cilindro - Placa.

Este método se basa en la presencia de zonas de inhibición formadas por la difusión de la solución de un antibiótico dado a través de un medio de cultivo sólido previamente inoculado con un microorganismo sensible y la posterior comparación de los diámetros de esas zonas, con las formadas por una solución equivalente del patrón de referencia. (9)(19)

### 6.2.1 Material y equipo

- Cajas petri de vidrio o de plástico de 20 x 100 mm con tapas de material adecuado (porosas).
- Cilindros de acero inoxidable o porcelana con las dimensiones siguientes: Diámetro exterior: 8 mm. Diámetro interior: 6 mm. Longitud: 10 mm.
- Vasos de precipitado
- Matraces aforados
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas graduadas y volumétricas estériles
- Mechero Fisher
- Tripié con anillo metálico y tela de asbesto
- Incubadora a 35°C
- Espectrofotómetro
- Autoclave
- Asa bacteriológica

### 6.2.2 Procedimiento

#### 6.2.2.1 Preparación del inóculo

- a) De una cepa del microorganismo utilizado, transferir una porción con la ayuda de un asa a un tubo inclinado con 10 ml del medio adecuado para cada microorganismo (ver Tabla 2), e incubar 24 horas a 35 °C ± 2.

Antibiótico	Diluyente Inicial	Diluyente Final	Organismo de Prueba	Medio para Prep. Inóculo	Medio de Siembra	P
Anfotericina B	Dimetilsulfoxido	Buffer 10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (9763)	Agar para ensayo de nistatina (12)	Agar para ensayo de nistatina (12)	48 H
Cefalotina	Buffer 1	Buffer 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (29737)	Agar base (1)	Agar base (1)	24 H
Pollimixina	Buffer 6	Buffer 6	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (4617)	Agar base (1)	Base de agar para polimixina (9)	24 H
Vancomicina	Agua	Buffer 4	<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	Agar base (1)	Medio para ensayo de estreptomicina (5)	5 D

Nota: Preparación de los medios y soluciones (ver apéndice)

P: Período de incubación

**Tabla 2.** Materiales a seleccionar en el método de cilindro-placa para determinación de la potencia de antibióticos.

- b) Con 3 ml de SSI (solución salina isotónica) estéril, tomar el desarrollo microbiano superficial del tubo inclinado e inocular con esta suspensión 250 ml del medio (ver Tabla 2) contenido en una botella de Roux, dispersándola uniformemente sobre una superficie con ayuda de perlas de vidrio estériles. Incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ , durante el tiempo indicado en la Tabla 2. Después de la incubación, recoger en un matraz estéril el desarrollo microbiano superficial con 50 ml de SSI estéril.
- c) Tomar una alícuota y diluirla hasta obtener un 25% de transmitancia a una longitud de onda de 580 nm, ajustar así el volumen total de la suspensión.
- d) Adicionar 5 ml de la suspensión del microorganismo a cada 100 ml del medio específico para cada microorganismo, como se señala en la Tabla 2.

### **6.2.2.2 Preparación de la capa siembra**

1. Colocar 21 ml de medio en cada una de las placas requeridas, solidificarlas sobre una superficie lisa y nivelada.
2. Añadir 5 ml de la suspensión del microorganismo preparada anteriormente inclinando la caja hacia atrás y al frente para distribuir el agar inoculado en forma uniforme sobre la superficie y dejar solidificar.

### **6.2.2.3 Colocación y llenado de los cilindros**

1. Colocar seis cilindros en cada una de las cajas en forma radial a intervalos de 60 grados sobre la superficie inoculada a una altura de 12 mm usando un colocador de cilindros mecánico y cubrir las placas posteriormente para evitar contaminación.

NOTA: Cada juego de tres cajas que corresponderán a cada punto de la curva (a,b,d,e) y al problema se llenan tomando un punto de referencia, a partir del cual se llenarán alternativamente con la concentración del punto medio (c) y los otros tres cilindros con la concentración que corresponda en cada juego de tres cajas.

2. Las cajas se marcan y se incuban a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2$  durante 24 hrs.

### **6.2.2.4 Preparación del estándar del antibiótico**

El estándar previamente secado (si es necesario), se lleva a una concentración inicial media (ver Tabla 3) y finalmente se lleva a cinco concentraciones diferentes en el diluyente que requiera el antibiótico para la preparación de la curva de referencia.

	<b>Vancomicina</b>	<b>Anfotericina</b>	<b>Cefalotina</b>	<b>Polimixina B</b>
<b>Dilución</b>	( $\mu\text{g/ml}$ )	( $\mu\text{g/ml}$ )	( $\mu\text{g/ml}$ )	(U/ml)
a	3.0	0.64	1.0	5.0
b	7.5	0.8	3.0	15.0
c	10.0	1.0	5.0	10.0
d	12.5	1.25	7.0	20.0
e	15.0	1.56	10.0	30.0

a,b,d,e: puntos de la curva. c: punto medio (referencia)

**Tabla 3.** Concentraciones de antibióticos para la realización de la curva de referencia.

#### 6.2.2.5 Preparación de la muestra

La muestra del antibiótico que se está probando previamente secado (si es necesario), se disuelve inicialmente en agua a una concentración de 1 mg/ml., y finalmente en el diluyente que requiera a la concentración media de cada antibiótico.

#### 6.2.2.6 Lectura y cálculos

Quitar los cilindros, medir y anotar los diámetros de cada zona de inhibición con aproximación de 0.1 mm. Los datos se colocan en columna; de tal forma que para cada juego de tres cajas tendremos dos columnas que corresponderán al punto (c) y a algún punto de curva o problema según corresponda.

Una vez teniendo los valores organizados se procede a interpolar en la curva de referencia.

## 6.3 Promoción de crecimiento

### 6.3.1 Técnica de Miles y Mishra

Esta técnica consiste en inocular sobre la superficie del medio fresco, pero libre de humedad excesiva, dos gotas por separado de cada dilución del microorganismo con pipeta calibrada en un tercio de una placa con el medio apropiado. Así, 0.02 ml del inóculo (volumen de cada gota) sobre el medio en tales condiciones, quedará circunscrito a una área circular de unos 15 mm y se absorberá en 10-15 min. A continuación, las placas se incuban y se seleccionan para el recuento, los pares de las diluciones en donde aparezca un mínimo de 20 colonias. (10)

### 6.3.2 Distribución en superficie

La técnica de inoculación en superficie por extensión sobre placas de medio difiere de la anterior en que se emplean inóculos mayores (generalmente 0.1 ml por dilución) y se utiliza una placa para cada dilución. La extensión se realiza con una varilla de vidrio estéril doblada en ángulo recto. Esta técnica tiene franca aceptación por muchos laboratorios y la *ISO (International Standard Organization)*, organismo internacional dedicado a la estandarización de métodos de análisis. Al desarrollar las técnicas en superficie para el recuento de microorganismos previo a su inoculación, debe ponerse especial cuidado en la preparación de las placas. La superficie de la placa ha de encontrarse libre de humedad excesiva para evitar o limitar la confluencia y extensión del desarrollo bacteriano y permitir una definición cierta de las colonias. (10)

### 6.3.3 Vaciado en placa

Consiste en colocar una cantidad conocida de cultivo o de una dilución del microorganismo (0.1 ml) en una caja petri y mezclarla con un volumen de agar fundido y enfriado a 50-55°C. Se dejan solidificar las placas y se incuban por 24 horas a 37°C. Se cuenta el número de colonia. (10)

### 6.3.4 Preparación del inóculo

En las tres técnicas, se emplea la misma preparación del inóculo.

1. Estandarizar la solución con el microorganismo de prueba al 0.5 de McFarland (ver apéndice 3).
2. La lectura deberá estar entre 60 - 70 % de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
3. Una vez estandarizada la solución, transferir 1.0 ml de ésta a un tubo que contiene 9 ml de NaCl 0.85% o medio de cultivo estéril (ver apéndice 4).
4. Mezclar en vortex por 10 segundos y repetir el proceso hasta obtener la dilución deseada.

**Nota:** Para el *Campylobacter* se utilizó caldo de Mueller-Hinton (ver apéndice) como medio de promoción.

## 6.4 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana (Kirby - Bauer)

### 6.4.1 Material y equipo

- Cajas petri de vidrio o de plástico estériles
- Asa bacteriológica
- Tubos de ensaye con rosca
- Vasos de precipitado
- Matraz aforado
- Pipeta graduada
- Hisopos estériles
- Mechero Fisher
- Sensidiscos
- Incubadora a 35°C (calibrada)
- Potenciómetro calibrado

### 6.4.2 Procedimiento

#### 6.4.2.1 Método estándar para la preparación del Inóculo. (20)

1. Seleccionar por lo menos cuatro o cinco colonias correctamente aisladas del mismo tipo morfológico de una placa de cultivo de agar. Tocar la parte superior de cada colonia con una asa y transferir la colonia en crecimiento a un tubo que contiene de 4 a 5 ml de caldo, como el caldo de soya tripticaseína.
2. Incubar el caldo nutritivo a 35-37°C hasta alcanzar o exceder la turbidez de una solución estándar (ver apéndice 3).
3. Ajustar la turbidez del cultivo con solución salina o caldo estériles para obtener una turbidez visualmente comparable a aquella del estándar. Para llevar a cabo este paso satisfactoriamente, se utiliza luz adecuada, y para ayudar a la comparación visual se lee el tubo contra un campo blanco con líneas negras contrastantes.

4. Dentro de los 15 minutos destinados a ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, sumergir un hisopo no tóxico estéril en la suspensión. Rotar el hisopo varias veces, presionando firmemente en la pared interior del tubo arriba del nivel del fluido. Esto eliminará el inóculo excesivo del hisopo.
5. Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller- Hinton (ver apéndice 4), estriando el hisopo sobre la superficie del agar. Repetir este procedimiento dos veces más, rotando la placa aproximadamente 60 grados cada vez para asegurar una distribución homogénea. Si la placa fue estriada satisfactoriamente y el inóculo fue correcto, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá una capa de crecimiento confluyente o prácticamente confluyente. Si solamente crecen colonias aisladas, el inóculo fue demasiado ligero y se debe repetir el procedimiento. Dejar de 3 a 5 minutos pero no más de 15 para aplicar los discos impregnados del antibiótico.

#### **6.4.2.2 Método alternativo para la estandarización del inóculo**

Para pruebas de susceptibilidad de rutina, estandarizar el inóculo haciendo una suspensión de solución salina o de caldo directamente de colonias seleccionadas de una placa de agar con 18 a 24 hrs. de incubación (se debe utilizar un nutriente, medio no selectivo, como el agar sangre). Inmediatamente se ajusta la suspensión para lograr la turbidez del estándar.

#### **6.4.2.3 Método de prueba**

1. Colocar los discos impregnados de antibiótico sobre la superficie de la placa inoculada por uno de los métodos descritos anteriormente. Con la punta de una aguja estéril presione ligeramente cada disco para asegurar el contacto completo con la superficie del agar. Se pueden colocar los discos individualmente o con un aparato dispensador, cuidando que exista una distancia mínima de 24 mm entre centro y centro.

Debido a que algunos fármacos se difunden casi instantáneamente no se debe remover el disco una vez que ha tenido contacto con la superficie del agar.

2. Invertir las placas y colocarlas en una incubadora a 35 °C, después de 15 min. que los discos han sido colocados.
3. Después de 16 a 18 hrs. de incubación, examinar cada placa y medir los diámetros de las zonas de completa inhibición (observadas a simple vista), incluyendo el diámetro del disco. Medir las zonas hasta el milímetro completo más cercano, utilizando calibradores, una regla o una plantilla preparada para este propósito sujeta en la parte trasera de la caja petri iluminada con una luz reflectora contra un campo negro. Si se añade sangre a la base del agar, medir las zonas a partir de la superficie iluminada con la luz reflectora sin la cubierta.
4. El punto final debe ser tomado en donde el área no muestra crecimiento visible a simple vista sin incluir crecimiento ligero de pequeñas colonias las cuales pueden ser detectadas sólo con dificultad en el margen de la zona de crecimiento inhibido. Colonias grandes que crecen en una zona clara de inhibición deben ser subcultivadas, reidentificadas y reanalizadas.
5. Interpretar los tamaños de las zonas de inhibición.

# 7. Resultados

---

## 7.1 Selección del método de promoción de crecimiento.

Se realizaron los métodos de promoción de crecimiento de Miles-Mishra, Distribución por superficie y Vaciado en placa. Los resultados de recuperación se muestran en la Tabla 4 para *E.coli*, ya que es un microorganismo relativamente sencillo en su manejo, nutricionalmente y de rápido crecimiento (24 hrs. a 35°C).

	Vaciado en Placa UFC/ML	Miles-Mishra UFC/ML	Distribución en Superficie UFC/ML
$10^{-16}$	----	100	140
$10^{-15}$	----	990	1000
$10^{-14}$	----	Inc	Inc
$10^{-13}$	----	Inc	Inc
$10^{-12}$	----	Inc	Inc
$10^{-11}$	----	Inc	Inc

Inc: Incontables

**Tabla 4.** Resultados de promoción de crecimiento para *E. coli* empleando tres técnicas

## 7.2 Selección de la base

Seleccionado el método de promoción de crecimiento, se corrieron las cuatro bases formuladas, descritas en la Tabla 1, con los siguientes microorganismos:

- *Streptococcus faecalis*
- *Escherichia coli*
- *Campylobacter fetus*
- *Campylobacter jejuni*

De acuerdo a los resultados de recuperación que se presentan en la Tabla 5, se eligieron las bases B3 y B4 por ser las de mayor recuperación de las especies de *Campylobacter*.

BASE DE AGAR	<i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>
	-16 10	-16 10	-14 10	-14 10
B1	1405	155	76	-----
B2	1295	250	73	-----
B3	1470	185	87	89
B4	1100	275	78	111

**Tabla 5.** Resultados de promoción de crecimiento para las bases del medio de cultivo para el desarrollo de *Campylobacter*.

Las bases B3 y B4 fueron enriquecidas con sangre de carnero al 10 % con el fin de aumentar el grado de recuperación del género *Campylobacter*, realizando nuevamente la técnica de distribución por superficie obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 6.

Base de agar enriquecida con sangre de carnero al 10%	<i>S. faecalis</i> 10 <sup>-16</sup>	<i>E. coli</i> 10 <sup>-16</sup>	<i>C. fetus</i> 10 <sup>-16</sup>	<i>C. jejuni</i> 10 <sup>-16</sup>
B3	Inc	Inc	+300	321
B4	Inc	Inc	315	295

Inc: Incontables

**Tabla 6.** Resultados de promoción de crecimiento por distribución en superficies en bases 3 y 4 enriquecidas.

### 7.3 Determinación de la potencia de antibióticos

Utilizando el método cilindro-placa se determinó la potencia de los siguientes antibióticos:

Vancomicina = 1102.5 µg/mg

Polimixina B = 7700 U/mg

Anfotericina B = 1115 µg/mg

Cefalotina = 683 µg/mg

### 7.4 Determinación de la combinación de antibióticos para el aislamiento de *Campylobacter*.

Los antibióticos se esterilizaron por filtración y se realizaron los ajustes de acuerdo a la potencia determinada anteriormente para formular las concentraciones y combinaciones mostradas en la Tabla 7.

Las dos bases seleccionadas como idóneas para el desarrollo de *Campylobacter* serán probadas empleando las cuatro combinaciones de antibióticos.

	A	B	C	D
Vancomicina	2.0 mg	2.0 mg	10.0 mg	10.0 mg
Polimixina B	50.0 µg	50.0 µg	2,500 U	2,500 U
Trimetoprim	-----	1.0 mg	-----	5.0 mg
Cefalotina	-----	-----	15.0 mg	15.0 mg
Anfotericina	-----	-----	2.0 mg	2.0 mg

**Tabla 7.** Combinación de antibióticos a probar para el aislamiento de *Campylobacter*.

## 7.5 Promoción de crecimiento e inhibición

### 7.5.1 Sembrado por estría

Para cada una de las combinaciones base/antibiótico, se probaron por estría los siguientes microorganismos:

*Escherichia coli* 25922

*Proteus mirabilis* 196

*Streptococcus faecalis* 14506

*Candida albicans* 10231

*Staphylococcus aureus* 25923

<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
<i>Campylobacter fetus</i>	33246
<i>Campylobacter jejuni</i>	33291
<i>Campylobacter jejuni</i>	29428

Los resultados de recuperación se muestran en la Tabla 8.

Nota: Las cepas utilizadas son de la colección ATCC.

En base a estos resultados, se seleccionaron las bases 3d y la 4c, las cuales se volvieron a probar empleando un mayor número de cepas de la misma especie y género.

*E.coli*: 25922, 11775, 001, 002, 003, 004, 005, H.I.006, H.I.007

*P.mirabilis*: 031, 12453, H.I.190, H.I.185, H.I.175, H.I.196

*S.faecalis*: 14506, 054, 33186, 027, 29212

*C.albicans*: 60193, 10231, 057

*C.fetus*: 33246

*C.jejuni*: 33291

*C.jejuni*: 29428

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Nota: Las cepas empleadas corresponden a la colección ATCC, al cepario de Becton Dickinson y al cepario del Hospital Infantil.

### 7.5.2 Aislamiento a partir de mezcla *in vitro*.

Finalmente, se realizó una mezcla de microorganismos (*P.mirabilis* 196, *E.coli* 25922, *C.albicans* 60193, *C.jejuni* 29428, *C.jejuni* 33291 y *C.fetus* 33246) en caldo de Mueller-Hinton (ver apéndice 3). Esta mezcla se estandarizó al 60 - 70 % de absorbancia a 540 nm y se inocularon las bases con un hisopo estéril seguido de una estriada, se incubaron en las condiciones requeridas y se obtuvo la inhibición de los otros microorganismos.

El crecimiento de *Campylobacter* que se obtuvo se verificó por medio de una tinción de Gram.

Microorganismo	3a	3b	3c	3d	4a	4b	4c	4d
<i>E. coli</i>	2	4	1	1	1	4	1	1
<i>C. albicans</i>	3	3	—	—	3	4	—	—
<i>S. faecalis</i>	3	2	—	—	4	2	1	—
<i>P. mirabilis</i>	4	4	2	1	4	4	1	2
<i>S. aureus</i>	1	1	—	—	1	1	—	—
<i>B. bronchiséptica</i>	1	1	1	1	1	1	—	—
<i>C. jejuni</i>	2	3	3	3	3	2	3	3
<i>C. jejuni</i>	3	3	3	4	3	3	4	4
<i>C. fetus</i>	3	3	4	3	3	3	3	3

1. Escaso crecimiento (casi nulo)    2. Poco crecimiento  
3. Crecimiento moderado            4. Crecimiento abundante

**Tabla 8.** Resultados de recuperación de microorganismos por estría en las combinaciones base-antibiótico.

Microorganismo		3d	4c	AST
<i>E. coli</i>	001		X	X
	002		X	X
	003		X	X
	004		X	X
	005		X	X
	006		X	X
	007		X	X
	11775		X	X
25922		X	X	
<i>S. faecalis</i>	14506			X
	054			X
	33186			X
	027			X
	29212			X
<i>P. mirabilis</i>	031		X	X
	12453		X	X
	190	( )		X
	185	( )		X
	175	X	X	X
	196		X	X
	009		X	X
<i>C. albicans</i>	60193			X
	10231			X
	057			X
<i>C. jejuni</i>	29428	X	X	X
	33291	X	X	X
<i>C. fetus</i>	33246	X	X	X

AST: Control de prueba para crecimiento  
 |: Inhibición  
 X: Crecimiento

**Tabla 9.** Resultados de recuperación de diferentes cepas en las combinaciones base-antibiótico

## 7.6 Prueba de susceptibilidad de antibióticos (Kirby-Bauer)

Se realizó la susceptibilidad antimicrobiana del género *Campylobacter* con el fin de determinar la terapia idónea para su tratamiento.

La prueba se realizó empleando los siguientes antibióticos: Vancomicina, Trimetoprim, Polimixina B, Cefalotina, Tetraciclina, Eritromicina, Cloramfenicol, Penicilina.

Los resultados obtenidos de la medición de los halos de inhibición para cada antibiótico se muestran en la Tabla 10, en donde se observa que efectivamente el *Campylobacter* es resistente a la vancomicina, trimetoprim, polimixina B, cefalotina y penicilina mientras que para la tetraciclina, eritromicina y cloramfenicol, se presenta como un microorganismo susceptible a ellos.

La susceptibilidad que presenta el *Campylobacter* ante la polimixina es muy baja por lo que en la mayoría de los casos se considera resistente

Antibiótico	<i>C. jejuni</i>		<i>C. fetus</i>	
	Base blanca	Base con sangre	Base blanca	Base con sangre
Vancomicina	R	R	R	R
Trimetoprim	R	R	R	R
Polimixina B	16	17	15	16
Cefalotina	R	R	20	18
Tetraciclina	30	30	30	30
Eritromicina	30	30	25	26
Cloramfenicol	30	30	30	30
Penicilina	R	R	R	R

R: Resistente

**Tabla 10.** Resultados de las mediciones de los halos de inhibición (mm) en la prueba de susceptibilidad de antibióticos Kirby - Bauer.

## 8. *Análisis de resultados y conclusiones*

---

1. La promoción de crecimiento fue realizada aplicando tres técnicas que son: la de vaciado en placa, Miles Mishra y distribución en superficie. Siendo ésta última la idónea según los resultados obtenidos para *E.Coli* además de tener ciertas ventajas sobre las otras técnicas como son:
  - La disponibilidad de placas ya preparadas para efectuar las inoculaciones.
  - Una mejor definición de la morfología colonial para fines adicionales al mero recuento.
  - Una mayor probabilidad de disponer de subcultivos puros a partir de las colonias desarrolladas.
  - Una condición más favorable para el desarrollo de los microorganismos aerobios estrictos.
  - La omisión del daño que sufren algunas células durante el vaciado del medio de cultivo caliente.
  - En algunos casos, una notable economía de material, pueden inocularse por duplicado tres diluciones de la muestra en sólo una caja.

- La presencia de partículas de alimentos o la turbiedad del medio de cultivo que tanto dificulta el recuento de colonias en la técnica de vaciado en placa, no tienen efecto alguno sobre los recuentos de las colonias desarrolladas en la superficie.
  - Los recuentos suelen ser más elevados que con la técnica de vaciado en placa.
2. Empleando la técnica de distribución en superficie, las bases seleccionadas como de mayor recuperación para *Campylobacter* fueron las formulaciones diseñadas por la marca comercial Merck de México (Bases 3 y 4). Esto es debido principalmente a que dentro de su formulación cuentan con el almidón soluble como ingrediente, el cual tiene la función de promover el crecimiento del microorganismo contrarrestando los factores tóxicos presentes en el medio.
  3. Con estas bases seleccionadas, se aplicaron las combinaciones de antibióticos como se describen en la Tabla 5 de resultados, encontrando que la combinación D - que contiene Vancomicina (10 mg/l), Polimixina (2,500 U/l), Trimetoprim (5.0 mg/l), Cefalotina (15.0 mg/l) y Anfotericina (2.0 mg/l) - es la que mayor inhibición presenta para los microorganismos asociados a la flora intestinal facilitando el aislamiento e identificación de *Campylobacter*.
  4. Al tratar de reproducir las condiciones clínicas para el aislamiento del *Campylobacter* en una mezcla, también demostró ser la base 3d el medio idóneo para su aislamiento.
  5. En cuanto a la prueba de susceptibilidad aplicada en este caso, que fue la de Kirby-Bauer, encontramos ciertas variantes a la técnica original como son la preparación del inóculo en caldo de Mueller-Hinton y el agar de Mueller-Hinton (ver apéndice 3) en el cual se describen todos los resultados de susceptibilidad publicados a la fecha, debió de enriquecerse con 10% de sangre de carnero defibrinada empleando un tiempo de incubación de 42 a 48 hrs. en condiciones microaerofílicas.

Aunque la terapia a aplicar durante enfermedades gastrointestinales causadas por *Campylobacter* es bien conocida, consideramos necesario el desarrollo de la metodología para la susceptibilidad in vitro de este género.

6. Dentro del ámbito comercial de los medios de cultivo más ampliamente conocido en México, no se cuenta con el medio idóneo para el aislamiento del género *Campylobacter* por lo que se recomienda o bien la preparación de la base a partir de ingredientes o la combinación de la base Merck más los antibióticos sugeridos por Becton Dickinson.

## 8.1 Recomendaciones

- Con el fin de verificar la eficacia y reproducibilidad de la base y combinación de antibióticos determinados en este trabajo, se sugiere un análisis comparativo empleando muestras clínicas para comprobar la inhibición del medio y su eficiencia como medio de cultivo para el aislamiento de *Campylobacter*.
- Debido a la falta de un buen medio de cultivo, considero necesario realizar un estudio a nivel poblacional con el propósito de determinar la frecuencia e importancia del género *Campylobacter* en enfermedades gastrointestinales presentes en niños y adultos de la población mexicana.

## 9. Bibliografía

---

1. Bartlett Raymond C., Barry Arthur L.  
*Quality Assurance of Commercially Prepared Microbiological Culture Media*  
NCCLS, Vol. 10, No 14, 1992.
2. *BBL Manual of Products and Laboratory Procedures*, 6a. ed.  
Cockeysville, Maryland, 1988.
3. Bouchan Valencia Patricia.  
*Prueba de Susceptibilidad in vitro a 16 Agentes Antimicrobianos contra Campylobacter fetus subespecie jejuni - subespecie coli.*  
Cuautitlán, Facultad de Estudios Superiores. UNAM, 1989.
4. Bowman, W.C.; Rand, M.J.  
*Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas.*  
Nueva Interamericana. 2a. ed. México, D.F. 1985
5. Buck, George E.  
*Evaluation of the CampyPak II Gas Generator System for isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni.*  
J. Clin. Microbiology. January 1982, Vol. 15. No. 1, pags. 41-42.
6. Castillo Ayala Alejandro.  
*Nuevas Bacterias Patógenas Transmitidas por Alimentos.* Laboratorio de Microbiología Sanitaria. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guadalajara, 1992.
7. Delaat, Adrian N.C.  
*Microbiología* Interamericana 2da. ed.  
México, 1985.

8. *Diario Oficial*. México. Miércoles 20 de abril de 1994.
9. *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos*, 5a. Ed, 1988.
10. Fernández Escartín Eduardo  
*Microbiología Sanitaria: Agua y Alimentos*.  
Vol I. EDUG / Universidad de Guadalajara, 1981.
11. Griffiths, P.L., et. al.  
*Differentiation between Thermophilic Campylobacter Species by species-specific antibodies*.  
J. Appl. Bacteriology, 1992 (72) pags. 467-474.  
Whiteknights, Reading, UK.
12. Jawetz, Ernest, et.al.  
*Manual de Microbiología Médica*.  
El Manual Moderno. 11a. edición  
México, 1985.
13. Lennette, Balows, Mausler, Shadomy.  
*Manual de Microbiología Clínica*.  
Panamericana. 4a. edición, 1981.
14. Litter, Manuel.  
*Farmacología Experimental Clínica*. Editorial El Ateneo. 7a. ed. Argentina 1986.
15. Lorian, Victor M.D., Williams & Wilkins  
*Antibiotics in Laboratory Medicine*.  
New York.
16. Lynch, Matthew J; Stanley S. Raphael; et.al.  
*Métodos de Laboratorio*  
Ed. Nueva Interamericana. 2a. ed.  
México, 1985.
17. Mackie and McCartney.  
*Practical Medical Microbiology*  
Vol. II of Medical Microbiology. 13a. ed., Churchill Livingstone. New York, 1989.
18. Murray Patrick R, et. al.  
*Medical Microbiology* 1990.  
Wolfe Medical Publications Ltd.

19. USP XXI  
*US Pharmacopeial Convention Inc.*  
1985.
20. Waltz, J. Allan et.al.  
*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*  
NCCLS. Vol. 10, No. 7. 4a. edición. 1992.
21. Williams & Wilkins  
*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*  
Vol I. USA. 1986.

## Apéndice 1

### Preparación de Medios de Cultivo (Potencia de Antibióticos)

<b>Medio para antibióticos # 1</b>	<b>(g/l)</b>
Peptona de gelatina	6.0
Peptona de caseína	4.0
Extracto de levadura	3.0
Extracto de carne	1.5
Dextrosa	1.0
Agar	15.0
pH = 6.6 ± 0.1	

<b>Medio para antibióticos # 5</b>	<b>(g/l)</b>
Peptona	6.0
Extracto de levadura	3.0
Extracto de carne	1.5
Agar	15.0
pH = 7.9 ± 0.1	

<b>Medio para antibióticos # 9</b>	<b>(g/l)</b>
Fosfato dipotásico	2.5
Peptona de caseína	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	2.5
Agar	20.0
pH = 7.3 ± 0.2	

<b>Medio para antibióticos # 12</b>	<b>(g/l)</b>
Peptona	9.4
Extracto de levadura	4.7
Extracto de carne	2.4
Cloruro de sodio	10.0
Dextrosa	10.0
Agar	23.5
pH = 6.1 ± 0.1	

## Apéndice 2

### Preparación de Soluciones Reguladoras

#### Buffer No. 1

Al 1 %, pH = 6.0

Disolver 2.0 g de fosfato dibásico de potasio y 8.0 g de fosfato monobásico de potasio en 1000 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a  $6.0 \pm 0.05$

#### Buffer No. 4

0.1 M, pH = 4.5

Disolver 13.61 g de fosfato de potasio monobásico en 1000 ml de agua destilada.

Ajustar el pH con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N a  $4.5 \pm 0.05$

#### Buffer No. 6

Al 10 %, pH = 6.0

Disolver 20.0 g de fosfato de potasio dibásico y 80.0 g de fosfato de potasio monobásico en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N a  $6.0 \pm 0.05$

#### Buffer No. 10

0.2 M, pH = 10.5

Disolver 35.0 g de fosfato de potasio dibásico en 1000 ml de agua destilada y añadir 2 ml de hidróxido de potasio 10 N. Ajustar el pH con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N a  $10.5 \pm 0.1$

## Apéndice 3

Preparación de medios de cultivo y soluciones para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Estándar de turbidez.

### MATERIAL

- Vasos de precipitado
- Matraz aforado
- Tubos de ensaye con rosca

### EQUIPO

- Balanza analítica
- Vortex mecánico

### PROCEDIMIENTO

Para estandarizar la densidad del inóculo, se utiliza un estándar de turbidez de sulato de bario.

1. Preparar este estándar de turbidez adicionando 0.5 ml de  $\text{BaCl}_2$  0.048 M (1.175% p/v  $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a 99.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.18 M (0.36 N) 1% v/v.
2. Distribuir de 4 a 6 ml en tubos de rosca del mismo tamaño a los utilizados para el cultivo o crecimiento del inóculo.
3. Sellar fuertemente estos tubos y almacenarlos en la obscuridad a temperatura ambiente.
4. Agitar vigorosamente este estándar de turbidez en un vortex mecánico antes de su uso.

## Agar Mueller-Hinton

### MATERIAL

- Matraz Erlenmeyer (1 litro)
- Cajas petri de vidrio ó plástico
- Vasos de precipitados
- Baño a 45°C

### EQUIPO

- Autoclave

### PROCEDIMIENTO

1. Preparar el Agar Mueller-Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a la recomendación del fabricante.
2. Inmediatamente después de esterilizar, permitir que enfríe en un baño a 45-50°C.
3. Agregar sangre de carnero desfibrinada al 10% en condiciones asépticas.
4. Vertir el medio recientemente preparado y enfriado en cajas petri sobre una superficie plana y nivelada para dar una profundidad uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a aproximadamente 60 a 70 ml de medio para placas de 14 cm de diámetro interno. Se pueden utilizar cajas petri de vidrio o de plástico pero la base de la caja debe ser plana.
5. Permitir que el medio agar enfríe a temperatura ambiente y a menos que la placa se utilice el mismo día, almacenar en refrigeración.
6. Utilizar placas hasta con siete días después de la preparación a menos de que se tomen precauciones adecuadas, como envolver en plástico para minimizar la evaporación.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## **Caldo Mueller-Hinton**

### **MATERIAL**

- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de rosca
- Pipeta graduada
- Gradilla
- Tripié con anillo metálico
- Tela de asbesto
- Mechero Fisher

### **EQUIPO**

- Autoclave

### **PROCEDIMIENTO**

1. Preparar el Caldo Mueller-Hinton a partir de la base deshidratada de acuerdo a la recomendación del fabricante.
2. Distribuir 9 ml de medio en cada uno de los tubos de rosca que se deseen preparar.
3. Esterilizar en autoclave a 116° C por 10 min.
4. Permitir que el medio enfríe a temperatura ambiente y a menos que los tubos se utilicen el mismo día, almacenar en refrigeración.

## Apéndice 4

### Preparación de medios de cultivo para promoción de crecimiento.

#### Agar Soya-Tripticaseína

##### MATERIAL

- Matraz Erlenmeyer
- Cajas petri de vidrio ó plástico
- Tripié con anillo metálico
- Tela de asbesto
- Mechero Fisher

##### EQUIPO

- Autoclave

##### PROCEDIMIENTO

1. Preparar el Agar Soya-Tripticaseína a partir de la base deshidratada de acuerdo a la recomendación del fabricante.
2. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 min.
3. Inmediatamente después de esterilizar, permitir que enfrie a 45-50 °C.
4. Vertir el medio recientemente preparado y enfriado en cajas petri sobre una superficie plana y nivelada en condiciones asépticas.
5. Permitir que el medio agar enfrie a temperatura ambiente y a menos que la placa se utilice el mismo día, almacenar en refrigeración.

## **Caldo Soya-Tripticaseína**

### **MATERIAL**

- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de rosca
- Pipeta graduada
- Gradilla
- Tripié con anillo metálico
- Tela de asbesto
- Mechero Fisher

### **EQUIPO**

- Autoclave

### **PROCEDIMIENTO**

1. Preparar el Caldo Soya-Tripticaseína a partir de la base deshidratada de acuerdo a la recomendación del fabricante.
2. Distribuir 9 ml de medio en cada uno de los tubos de rosca que se deseen preparar.
3. Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 min.
4. Permitir que el medio enfríe a temperatura ambiente y a menos que los tubos se utilicen el mismo día, almacenar en refrigeración.