



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

"EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE  
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PREPARADOS  
EN CONDICIONES ESTANDAR"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A N :  
CARLOS ALBERTO BOLAÑOS GONZALEZ  
INOCENCIA ANACORETA VARGAS

ASESORES: O.F.I. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA  
O.F.B. VICTOR G. AVILA MIRANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

271676



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

C.N.A.M.

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación de la estabilidad de diferentes medios de cultivo  
preparados en condiciones estándar".

que presenta el pasante: Carlos Alberto Bolaños González  
con número de cuenta: 9056991-3 para obtener el TÍTULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de Diciembre de 1998

PRESIDENTE

Q.F.I. Andrea A. Becerril Osnaya

*Andrea A. Becerril Osnaya*

VOCAL

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

*Susana E. Mendoza Elvira*

SECRETARIO

Q.F.B. Marcela Hernández Vargas

*Marcela Hernández Vargas*

PRIMER SUPLENTE

Q.F.B. Gloria L. Arellano Martínez

*Gloria L. Arellano Martínez*

SEGUNDO SUPLENTE

Q.B.P. Amparo Londoño Orozco

*Amparo Londoño Orozco*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación de la estabilidad de diferentes medios de cultivo  
preparados en condiciones estándar".

que presenta la pasante: Inocencia Anacoreta Vargas  
con número de cuenta: 8754116-6 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de Diciembre de 199 8

PRESIDENTE	<u>Q.F.I. Andrea A. Becerril Osnaya</u>	<u>Andrea A. Becerril Osnaya</u>
VOCAL	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	<u>Susana E. Mendoza Elvira</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	<u>Marcela Hernández Vargas</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Gloria L. Arellano Martínez</u>	<u>Gloria L. Arellano Martínez</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.B.P. Amparo Londoño Orozco</u>	<u>Amparo Londoño Orozco</u>

## **AGRADECIMIENTOS**

**CARLOS ALBERTO BOLAÑOS GONZALEZ**

### **A DIOS :**

Por permitirme culminar esta meta sumamente importante para mi.

### **A MIS PADRES:**

*A mi mamá por enseñarme con el ejemplo que todas las metas que se proponen en la vida pueden alcanzarse, solo con la perseverancia y dedicación son el camino para lograrlas.*

A mi papá por los consejos y especialmente por predicar con el ejemplo.

Gracias a ambos por su apoyo moral y económico así también por darme la mejor herencia que los padres pueden dar a los hijos: LA EDUCACION.

### **A MI HERMANO:**

David por ser el compañero de mis travesuras y a veces mi víctima " Vi " , he aquí un pequeño presente y en él, al mismo tiempo te agradezco y te lo dedico.

### **A MIS TIOS:**

En especial a mi tío Memo (RIP), a mis tías Maguin (RIP), Tere, Carmela con quienes siempre he contado incondicionalmente y a quienes tengo tanto que agradecer y dedicar de igual manera.

### **A LA PROFESORA ANDREA:**

Muy en especial, agradezco y dedico el presente trabajo a la profesora Andrea, además de la amistad, apoyo y tiempo dedicado a mi persona. Le doy las gracias querida PROFESORA.

### **A MIS AMIGOS DE GENERACIÓN:**

Gerardo, Francisco ( "Crispo" ), César ( "C3PO" ), Arturito (Pitufo), Dávalos (Abuelo), José ("Chino"), David y Martha; les agradezco su amistad, tanto en los momentos de "relajo" como en los de estudio.

A mis amigos que conocí a lo largo del desarrollo de trabajo experimental y de escritura del mismo: Marce, Amalia, Vero, Ara, Mine, Quique, Lupitas, Manuel, por su amistad y apoyo: GRACIAS.

En especial a Guadalupe Avilés, por sus consejos y su amistad desinteresada.

Por último agradezco a mi compañera de tesis "INO" con quien mantuve a lo largo del trabajo una excelente amistad y le doy las gracias por haberme soportado en los buenos como en los malos momentos. Gracias "INO".

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **INOCENCIA ANACORETA VARGAS.**

#### **A DIOS:**

Mi primer agradecimiento es a DIOS por el don inapreciable que es la vida y por haberme rodeado de personas maravillosas.

#### **A MIS PADRES:**

Por ser modelo de fortaleza y constancia, quiero compartir con ustedes un poco de lo mucho que he recibido y darles el reconocimiento de este trabajo.

A ti mamá porque en todos los aspectos has sido el más grande pilar que ha dado el mejor soporte de mi vida.

#### **A MIS HERMANOS:**

Por su paciencia, apoyo moral y económico. Gracias.

Gaby: Por tu entusiasmo y sensibilidad. Siempre recuerda que la vida es una carrera. No llores si la pista es áspera y la meta distante. Un día la alcanzarás.

Martha, Mary Cruz, Bety, Raquel, Ma. Eulalia, Mario, Remedios: No hay palabras con que agradeceres toda la ayuda incondicional que siempre he recibido de ustedes.

#### **A MIS SOBRINOS:**

Quienes son motivo de superación constante, gracias por enseñarme a sonreír.

#### **A MIS CUÑADOS:**

Gracias por el apoyo que siempre nos han brindado, en los buenos y malos momentos.

#### **A MIS TIOS.**

Angela y Aurelio. Gracias tío por darnos tu apoyo, consejos y palabras de aliento en los momentos difíciles.

### **A MIS AMIGOS:**

Que han estado conmigo en las buenas y en la malas y que por esto los considero como una extensión de mi familia. Gracias Felipe, Crescencio, Anita, Martha, Irene, Marisa, Claudia, Crucita, Gabina, Ma Elena, Luz Maria. Ustedes me han enseñado lo que es realmente la amistad.

Gracias Marce, Amalia, Cesar, Araceli, Minerva, Enrique, Manuel, Vero y Lupitas por su amistad y apoyo.

Gracias Lupita A. R. por tu ayuda incondicional. Siempre dispuesta a dar una mano amiga.

Y de manera muy en especial a la profesora Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya, por ser amiga y guía, por su disposición y valiosa ayuda

### **A TI CHARLIE:**

Gracias por tu amistad y buena disposición que siempre tuviste en el desarrollo de nuestro trabajo de tesis, porque gracias a este esfuerzo conjunto logramos una de nuestras anheladas metas. Sinceramente te deseo que después de este logro se multipliquen aun más con mucha dicha y prosperidad junto con quienes amas.



## AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO** y a la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN CAMPO 1**, por la oportunidad de poder considerarla como nuestra segunda casa, que nos hace hombres y mujeres profesionistas.

Con cariño y agradecimiento muy especial para nuestros Maestros y Directores de tesis.

❖ **Q.F.I. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA**

❖ **Q.F.B. VICTOR G. AVILA MIRANDA.**

A nuestro honorable y distinguido jurado:

❖ **ANDREA A. BECERRIL OSNAYA.**

❖ **SUSANA E. MENDOZA ELVIRA**

❖ **MARCELA HERNANDEZ VARGAS**

❖ **GLORIA L. ARELLANO MARTINEZ**

❖ **AMPARO LONDOÑO OROZCO**

Al Ing. **JUAN GARIBAY BERMUDEZ**, por su tiempo y asesoramiento estadístico. Gracias.

Al Q.F.B. **ROBERTO BOTELLO**. Por el material proporcionado.

A la empresa **ATYDE:**

**Q.F.B VICTOR GIL AVILA MIRANDA.**

Por su asesoría y material proporcionado para la realización del trabajo experimental. Gracias.

**A LOS PROFESORES DE LAS FES-C:**

Con gratitud y Respeto, por transmitirme sus enseñanzas.

**AL PERSONAL DE LOS LABORATORIOS DE COMPUTO ( SALAS  $\alpha$  Y  $\beta$ ):**

Agradecemos a todo el personal del centro de computo tanto a los profesores como a los prestadores de servicio social por el asesoramiento y facilidades prestadas para la escritura del presente trabajo.

**A LOS LABORATORISTAS:**

Irene, Martin y Lucha por su amistad y disposición de apoyarnos siempre incondicionalmente.

A todas aquellas personas que de alguna manera u otra nos ayudaron y contribuyeron en el desarrollo de la tesis, pero también aquellas que nos hicieron más difícil el camino, porque gracias a ellos aprendimos a valorar el esfuerzo que realizamos para poder titularnos.

**MUCHAS GRACIAS A TODOS.**

## INDICE

*Abreviaturas*

*Índice de cuadros*

*Índice de diagramas*

*Índice de gráficas*

*Índice de figuras*

*Resumen*

<i>I.</i>	<i>Generalidades</i>	<i>1</i>
<i>I.1</i>	<i>Medios de cultivo</i>	<i>4</i>
<i>I.2</i>	<i>Clasificación de los medios de cultivo</i>	<i>6</i>
<i>I.3</i>	<i>Características de medios de cultivo</i>	<i>8</i>
<i>I.4</i>	<i>Usos y aplicaciones de los medios de cultivo</i>	<i>16</i>
<i>I.5</i>	<i>Conservación de m.o.</i>	<i>19</i>
<i>I.6</i>	<i>Control de calidad en la preparación de los medios de cultivo y su funcionamiento</i>	<i>23</i>
<i>I.7</i>	<i>Control de calidad del equipo</i>	<i>28</i>
<i>I.8</i>	<i>Fuentes de error en la preparación</i>	
<i>II.</i>	<i>Objetivo general</i>	<i>31</i>

<i>II.1</i>	<i>Objetivos particulares</i>	<i>31</i>
<i>II.2</i>	<i>Hipótesis</i>	<i>32</i>
<i>III</i>	<i>Parte experimental</i>	<i>33</i>
<i>III.I</i>	<i>Material</i>	<i>35</i>
<i>III.1.1</i>	<i>Cristalería</i>	<i>35</i>
<i>III.1.2</i>	<i>Equipo</i>	<i>35</i>
<i>III.1.3</i>	<i>Medios de cultivo deshidratados</i>	<i>36</i>
<i>III.1.4</i>	<i>Reactivos</i>	<i>37</i>
<i>III.1.5</i>	<i>Material biológico</i>	<i>38</i>
<i>IV.</i>	<i>Metodología</i>	<i>39</i>
<i>IV.I</i>	<i>Mantenimiento del cepario</i>	<i>41</i>
<i>IV.2</i>	<i>Preparación de medios de cultivo</i>	<i>48</i>
<i>IV.3</i>	<i>Prueba de promoción e inhibición de crecimiento</i>	<i>51</i>
<i>IV.4</i>	<i>Metodología para la realización de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. (método de Kirby-Bauer)</i>	<i>55</i>
<i>V.</i>	<i>Resultados</i>	<i>58</i>
<i>V.1</i>	<i>Resultados de los medios de cultivo evaluados</i>	<i>66</i>
<i>V.2</i>	<i>Análisis estadístico</i>	<i>78</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS.

<b>Abreviatura:</b>	<b>Significado:</b>
ADH	Arginina
AMY	Amigdalín
ARA	L-Arabinosa
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
$\beta$ -Gal	2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
Cit	Citrato de sodio
°C	Grado centígrado
CO <sub>2</sub>	Dioxido de Carbono
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica

EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EMD	Emanuel Merck Darmsdat
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropat6gena
ETEC	<i>Escheriachia coli</i> enterot6xigenica
FRU	Fructosa
GLU	Glucosa
GEL	Gelatina Kohn 's
GGT	Gama Glutamato Transferasa
g	Gramo
gl	Grados de libertad

hr	Hora
H <sub>2</sub> S	Acido sulfhídrico
IMViC	Indol,rojo de metilo, Vogues Proskawer, Citrato
INO	Inositol
LAC	Lactosa
LIP	Lipasa
L	Litro
Lb	Libra
MAL	Maltosa
MAN	Manitol

MEL	Melibiose
MOB	API M (motilidad)
MDG	$\alpha$ -methyl-D-glucoside
MNE	<i>D-Mannose</i>
min.	Minuto
ml.	Mililitro
mm.	Milimetro
<i>m.o.</i>	<i>microorganismo</i>
MCTC	Colección Nacional de Cultivos Tipo
N <sub>2</sub>	Nitrógeno gaseoso

N	Normalidad (eq/lt)
NIT	Nitrato de potasio
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NAG	N-acetyl-glucosamina
ODC	Ornitina
OX	citocromo oxidasa
OF/O	Oxidación
OF/F	Fermentación
ONPG	ortho-nitro-phenyl-β-D- galactopyranoside
O <sub>2</sub>	Oxígeno



PAL	Fosfatasa alcalina
Pro A	Proline Arylamidase
PVC	Polivinilcelulosa
pH	Concentración de iones hidrógeno
SAC	Sacarosa/Sucrosa
SSF	Solución salina fisiológica
TSI	Triple azúcar hierro
ufc	Unidad formadora de colonia
V	Dinucleótido de nicotinamida y adenina o NAD fosfato
X	Hemina
μL	Microlitro

## INDICE DE CUADROS

		Pág.
<b>Cuadro No. 1</b>	Indicadores de pH de uso mas frecuente en laboratorio de bacteriología.	6
<b>Cuadro No. 2</b>	Procedimiento de control de calidad del equipo microbiológico comúnmente usado.	28
<b>Cuadro No. 3</b>	Condiciones para el mantenimiento de los m.o.	45
<b>Cuadro No. 4</b>	Características generales de los m.o. empleados	46
<b>Cuadro No. 5</b>	Resultados cualitativos experimentales de los medios de cultivo evaluados.	62
<b>Cuadro No. 6</b>	Resultados de los ensayos en agar <b>Mueller-Hinton</b>	71
<b>Cuadro No. 7</b>	Resultados cuantitativos experimentales de los medios de cultivo evaluados	73
<b>Cuadro No. 8</b>	Valores promedio de los resultados cuantitativos experimentales de los medios de cultivo evaluados.	76
<b>Cuadro No. 9</b>	Tratamiento estadístico del medio sales manitol empleando la prueba "t de Student"	79
<b>Cuadro No. 10</b>	Resultados del tratamiento estadístico de los medios de cultivo evaluados.	81

## INDICE DE DIAGRAMAS

Pág.

<b>Diagrama No. 1</b>	Descripción del desarrollo experimental para la realización del proyecto “Evaluación de la estabilidad de diferentes medios de cultivo en condiciones estándar”.	34
<b>Diagrama No. 2</b>	Mantenimiento del cepario.	44
<b>Diagrama No. 3</b>	Preparación de medios de cultivo.	50
<b>Diagrama No. 4</b>	Prueba de promoción e inhibición de crecimiento.	54
<b>Diagrama No. 5</b>	Metodología de Kirby-Bauer para la realización de prueba de susceptibilidad en placa.	57

## INDICE DE GRAFICAS

Pág.

<b>Grafica No. 1</b>	Tiempo de vida óptima de los medios de cultivo evaluados.	77
<b>Grafica No. 2</b>	Región de aceptación y rechazo para el ejemplo del agar sales manitol	80

## INDICE DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura No. 1.</b>	Estructura base del agar-agar que se emplea como agente solidificante en los medios de cultivo	5
<b>Figura No. 2.</b>	Dispensador Peristáltico de flujo continuo, matraces Erlenmeyer, Manguera de silicón-teflón y cajas Petri.	40
<b>Figura No. 3</b>	Almacenamiento de medios de cultivo en placa (refrigeración 2-8°C).	41
<b>Figura No. 4</b>	Sobres de m.o. liofilizados proporcionados por la empresa ATYDE.	41
<b>Figura No. 5</b>	Sistema microaerofílico (Jarra Gaspack).	43
<b>Figura No. 6</b>	Micropipetas, puntas, asas de platino y tubo No. 0.5 del nefelometro de MacFarland para la realización de la técnica de Miles & Misra.	53
<b>Figura No. 7</b>	Medios de cultivo deshidratados.	58
<b>Figura No. 8</b>	Presentación de medios de cultivo en placa.	59
<b>Figura No. 9</b>	Estandarización de la técnica de Miles & Misra en agar casoy con <i>Staphylococcus aureus</i> (diluciones $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ ).	60
<b>Figura No. 10</b>	Serie de diluciones de los microorganismos empleados en la técnica de Miles & Misra.	60
<b>Figura No. 11</b>	Incubación de medios de cultivo en placa, del ensayo de promoción e inhibición de crecimiento técnica de "Miles & Misra" a una temperatura de $35.5 \pm 1^\circ \text{C}$ .	61

- Figura No. 12** Ensayo de promoción de crecimiento en **agar sangre** de *Streptococcus pneumoniae* ( $\alpha$ -hemólisis), *Staphylococcus aureus* ( $\beta$ -hemólisis y *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemólisis). 66
- Figura No. 13** Ensayo de promoción de crecimiento en **agar chocolate** con *Neisseria meningitidis* ( $\alpha$ -hemólisis), *Haemophilus influenzae* tipo "b" y *Haemophilus influenzae* (muestra clínica). 66
- Figura No 14** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar brotacin** de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. 67
- Figura No. 15** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar chromocult** con *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. 67
- Figura No. 16** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar EMB** con *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. 68

- Figura No. 17** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar verde brillante** con *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. 68
- Figura No. 18** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar salmonella-shigella** con *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. 69
- Figura No. 19** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar Chapman** con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. 69
- Figura No. 20** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar sales manitol** con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. 70
- Figura No. 21** Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en **agar Nickerson** con *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. 70
- Figura No. 22** Ensayo de susceptibilidad a antibióticos en **agar Mueller-Hinton** sobre cultivos de microorganismos grampositivos y gramnegativos. 72

## *Resumen.*

El presente proyecto se realizó en la FES-Cuautitlán, durante el periodo que comprendió del 1 de diciembre de 1997 al 30 de marzo de 1998.

- En éste, se evaluaron medios de cultivo preparados en placa, durante 90 días (12 semanas), observando que la funcionalidad de los mismos fuera la óptima.
- Para el **control de calidad** fue necesario la implementación de un cepario y su *mantenimiento en condiciones óptimas*, a lo largo del proyecto, a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas primarias y secundarias (API 20), para que de esta manera se verificara la pureza de las mismas y su confiabilidad en el ensayo del **control de calidad** en los medios de cultivo que se evaluaron.
- Así también se requirió la técnica "Miles & Misra" para el ensayo de promoción e inhibición de crecimiento.
- Se evaluó la difusión de antibióticos en agar **Mueller-Hinton**, empleándose el método de Kirby Bauer.

De lo anterior se obtuvieron resultados de estabilidad y funcionalidad, en donde los medios ricos fue de 4-8 semanas, para los medios diferenciales y selectivos de 13 semanas.

Los resultados obtenidos en el ensayo de *promoción e inhibición de crecimiento* se analizaron por comparación con un medio de referencia (agar **casoy**), con ayuda del método estadístico "t de student" con 99 % de confianza.

Por lo anterior podemos decir que es factible realizar el almacenamiento en refrigeración de los mismos, durante un periodo determinado, asegurando su estabilidad y funcionalidad.

## *I. Generalidades*

Los m.o. varían en sus requerimientos de desarrollo, estos necesitan fuentes de nitrógeno, carbono y oligoelementos como el manganeso, molibdeno, zinc, cobre, cloro, etc., mientras que otros más exigentes tienen necesidad de factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas, hidrolizados de proteínas en forma de peptonas, que proveen componentes nitrogenados en forma más accesible, que se obtienen por tratamiento con ácidos, álcalis o enzimas.

El carbono se necesita en la mayor parte de las veces en forma de compuestos orgánicos (glucosa, acetato, piruvato, malato, extracto de levadura, extracto de carne, de res y peptona), que sirven como fuente energética. El oxígeno se toma principalmente de la atmósfera. Las necesidades de hidrógeno se cubren principalmente con los compuestos orgánicos y, en casos particulares, también a partir de compuestos inorgánicos. El nitrógeno proviene de sales en forma de nitratos, nitritos o compuestos amónicos, o de componentes más complejos como aminoácidos, péptidos o proteínas. Los otros elementos se toman principalmente de sales.

Las peptonas son sustancias hidrosolubles obtenidas a partir de proteínas por tratamiento enzimático. Son mezclas de péptidos que, en función de la proteína de partida y la enzima utilizada, presentan composiciones particulares, diferenciables por su contenido en vitaminas e hidratos de carbono. (5, 9, 31, 33, 34)

Las proteínas se obtienen preferentemente a partir de caseína, de carne, de gelatina o de harina de soya. La hidrólisis enzimática se realiza mediante tripsina, pepsina, papaína o



jugo pancreático. Los hidrolizados son mezclas de péptidos de alto y bajo peso molecular, que se obtienen por procedimientos inorgánicos a partir de proteínas. Los extractos son productos de maceración en solución acuosa obtenidas por calentamiento, que se reducen a polvo por evaporación. Son ricos en proteínas de bajo peso molecular y en factores de crecimiento. El extracto de carne se obtiene a partir de carne magra sometida a digestión enzimática. Y que carece de hidratos de carbono y, por lo tanto, puede utilizarse provechosamente para reacciones de fermentación. El extracto de malta se obtiene a partir de cebada malteada. Gracias a su contenido elevado en diferentes hidratos de carbono, principalmente en maltosa, es adecuado especialmente para la preparación de medios de cultivo de levaduras y mohos.

Antes de la década de los 50's, casi todos los laboratorios fabricaban sus propios medios, partiendo frecuentemente de los ingredientes básicos crudos. Los laboratorios ya no preparan medios de este modo, con la posible excepción de unos pocos que producen algunos medios para utilizar en sus laboratorio de tuberculosis. Actualmente la forma más común de preparar medios de cultivo es a partir de medios deshidratados, los cuales solo requieren adición de agua para su reconstitución, se presentan en forma de polvo o granulado.

También pueden emplearse medios deshidratados con aditivos que pueden ser: sangre, suero u otros factores de desarrollo, que generalmente son materiales inestables. Y que sirven para respaldar el desarrollo de microorganismo exigentes. (5, 9, 31, 33, 34)

A comienzos de la década de los 60's, las compañías empezaron a preparar y comercializar medios en tubos y placas. Las primeras ofertas fueron de agar sangre ovina y ciertos medios para tuberculosis como el Löwenstein-Jensen. La **responsabilidad del control de calidad** en la preparación de los medios recae en el fabricante hasta el momento de su venta al consumidor.

En la actualidad, la elección adecuada del medio de cultivo depende del número, el tipo de muestras manipuladas, los recursos disponibles para la preparación, las pruebas de **control de calidad** y el almacenamiento. Algunos lineamientos para la selección de los medios entre los centenares que existen, son los siguientes:

1. Si el laboratorio tiene instalaciones y personal limitados, usar medios comercialmente preparados.
2. Elegir medios definidos antes que aquellos que tienen componentes no identificados.
3. Elegir medios con un amplio potencial de crecimiento.
4. Antes de adoptar un medio nuevo, compararlo primero con un control.
5. Cuando se emplea un medio selectivo para un aislamiento primario, incluir también uno no selectivo. Cuando se emplean dos medios selectivos, elegirlos con diferentes niveles de inhibición, por ejemplo **agar verde brillante** muy selectivo con el menos inhibitorio **agar xilosa-lisina- desoxicolato**.(2, 5, 8, 30, 31)

## 1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo se utilizan para una variedad de propósitos en el laboratorio. Su rendimiento debe por ende juzgarse aceptable para asegurar que sirvan a los fines para los cuales se han preparado. Los medios de cultivo se emplean para propagar bacterias, hongos y virus. Un medio debe no sólo respaldar el desarrollo de un m.o., sino que éste debe exhibir una morfología colonial y microscópica típica en el medio. Las variaciones en la composición del medio pueden alterar estas características.

Para la producción de medios de cultivo sólidos, se añade un agente de solidificación a las soluciones nutritivas líquidas. El agar-agar (ver figura No.1) es un agente de solidificación prácticamente ideal. Funde solamente a temperaturas superiores a 90°C, pero al enfriar permanece líquido hasta una temperatura de aproximadamente 40°C. El agar-agar es un extracto seco, gelificante, obtenido de algas rojas, principalmente a partir de las especies *Gellidium*, *Rhodophyceae* y *Gracilaria*. El agar no es tóxico para las bacterias y es atacado (hidrolizado) por muy pocas de ellas; por lo tanto se utiliza universalmente en una concentración de 1.5-2% como gel en la preparación de medios de cultivo sólidos. Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos: agarosa y agarpectina. La proporción de agarosa y agarpectina es variable, con valores extremos de 75% de agarosa y 25% de agarpectina, según la clase de alga empleada.(2, 8, 33, 54)

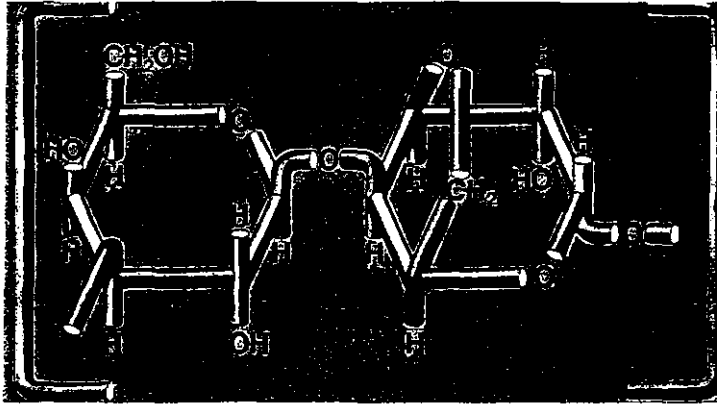


Figura No. 1. Estructura base del agar-agar que se emplea como agente solidificante en los medios de cultivo.

La agarosa es un polímero lineal, compuesto por unidades alternas de D-galactosa y de 3,6-anhidro-1-galactosa, enlazadas por uniones  $\alpha$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 alternadas. Este se emplea para pruebas de inmunodifusión y para inmunoelectroforésis. La agarpectina es una cadena ramificada, por uniones dextro y levo galactosa esterificada por grupos sulfato que contienen también ácidos glucurónico y pirúvico. El agar es una mezcla de polisacáridos, pero puede contener una variedad de impurezas, particularmente sales inorgánicas que varían según la fuente y método de extracción.

En los medios de cultivo pueden estar contenidos colorantes como indicadores de pH y potencial redox, cuyo cambio de color sea característico para un determinado intervalo de pH que produce el crecimiento microbiano en los diferentes medios de cultivo. Estos indicadores se utilizan principalmente para detectar la producción de ácido a partir de los hidratos de carbono contenidos en el medio (ver cuadro No. 1). (30, 34)

El azul de metileno y la resazurina son los indicadores redox más utilizados; por su color indican la presencia o ausencia de oxígeno.(30, 34)

Cuadro No.1. Indicadores de pH de uso más frecuente en medios de cultivo en el laboratorio de bacteriología.

ACIDO ← pH → ALCALINO

INDICADOR	COLOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	COLOR
Azul de timol	Rojo	■	■	■												Amarillo
Tornasol	Rojo					■	■	■	■							Azul
Púrpura de bromocresol	Amarillo					■	■	■	■							Púrpura
Azul de china	Azul					■	■	■								Incoloro
Azul de bromotimol	Amarillo					■	■	■	■							Azul
Rojo de fenol	Amarillo					■	■	■	■							Rojo
Rojo neutro	Rojo					■	■	■	■							Amarillo
Azul de timol	Amarillo								■	■	■	■				Azul

## 1.2 Clasificación de los medios de cultivo

Dentro de la clasificación de los medios de cultivo en el laboratorio de bacteriología, se encuentran en base a su estado físico y por su contenido de nutrientes (composición).

❖ **Estado físico:**

Sólidos: contiene 1.5% de agar.

Líquidos o caldo: 0% de agar.

Semisólidos: contienen 0.7-0.9% de agar.

❖ **Contenido de nutrientes:**

Medios simples o medios mínimos.

Son aquellos que contienen una fuente de carbono, de nitrógeno, etc. Es decir, son medios que en general contienen los nutrientes esenciales para promover el desarrollo de m.o. poco exigentes nutricionalmente. Tales medios pueden ser: Caldo tioglicolato y caldo triptosa.

Medios ricos.

Son aquellos que contienen una fuente de carbono, de nitrógeno, extracto de levadura, de carne y peptona, como son: agar sangre, agar chocolate, Loeffler, los cuales pueden ser enriquecidos con aditivos como: yema de huevo, líquido ascítico, leche, suero, etc. (2, 30, 33, 47)

Medios de enriquecimiento.

Son altamente selectivos y suelen estar diseñados para aislar un m.o. específico, por ejemplo: caldo tetrionato que contiene peptonas, sales biliares, carbonato de sodio, sirve para aislar *Salmonella* de heces, orina y alimentos (carne, leche, etc.); Caldo selenito de sodio que contiene lactosa, selenito de sodio, y sirve para el aislamiento de *Salmonella* de muestras de heces y sangre.

### Medios diferenciales.

Contiene sustancias donde estas no deben tener influencia en la proliferación de los m.o. Estos permiten diferenciar a los m.o. en base a sus propiedades metabólicas. Los medios diferenciales contienen colorantes, azúcares e indicadores para revelar una respuesta bioquímica característica (generalmente un color) y se emplean para diferenciar grupos de microorganismos tales como fermentadores y no fermentadores de lactosa. Son medios que se utilizan de primera elección en laboratorios de Diagnóstico Microbiológico para el aislamiento de los miembros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y otros m.o. gramnegativos, además sirven de base para comparación de la funcionalidad de medios de cultivo de innovación. (2, 30, 33, 47)

### Medios selectivos.

Contienen sustancias que ofrecen buenas condiciones de crecimiento solamente a determinados m.o., mientras que otros no pueden proliferar, o lo hacen lentamente. Los medios selectivos contienen, además de los componentes presentes en los medios diferenciales, agentes para inhibir la mayoría de las enterobacterias y seleccionar de una muestra cepas resistentes a mayores concentraciones de los componentes (inhibidores como sales biliares).

### *1.3 Características de medios de cultivo.*

De los medios de cultivo que se evaluarán en este proyecto, mencionaremos composición y características bioquímicas a observar en ellos.

### **Agar sangre.**

#### **Composición (g/litro):**

Sustrato nutritivo (Extracto de corazón y peptonas) 20.0 g; cloruro de sodio 5.0 g; agar-agar 15.0 g; aditivo: sangre de carnero desfibrinada 50 mL.

Este medio sostiene el desarrollo de todos los m.o. con importancia clínica excepto los más exigentes. En el **agar sangre** se determina la capacidad de ciertos m.o. para producir enzimas extracelulares que actúan sobre los glóbulos rojos ya sea por lisis completa (hemólisis beta) o por una coloración verdosa alrededor de la colonia (hemólisis alfa) o por ausencia de alteración (a veces denominada hemólisis gama).

### **Agar chocolate.**

#### **Composición (g/litro):**

Sustrato nutritivo especial (base columbia) 23.0 g; almidón 1.0 g; cloruro sódico 5.0 g; agar-agar 13.0 g.

Este medio completo de gran calidad, es utilizable, tanto para el cultivo de m.o., incluso exigentes, así también como base para la preparación de diversos medios de cultivo especiales. El **agar chocolate**, que contiene los factores X (hemina) y V (NAD), se prepara en el laboratorio calentando **agar sangre** fundida a una temperatura (80 °C) justo lo suficientemente elevada para lisar los glóbulos rojos a fin de que se libere la hematina (factor X). A esta temperatura también se inactiva la NADasa. Dado que el factor V es termolábil, se debe tener cuidado de no sobrecalentar el medio durante su preparación.



### **Agar brolacin.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona 3.0 g; extracto de levadura 2.0 g; extracto de carne 2.0 g; L(-)-cistina 0.28 g; lactosa 10.0 g; azul de bromotimol 0.03 g; agar-agar 12.0 g.

Este medio se emplea para la determinación del número de m.o., aislamiento e identificación orientativa de m.o. existentes en orina.

Debido a la amplia disponibilidad de sustancias inhibitoras y a la posibilidad de lograr una cierta diferenciación de las colonias, resulta también un medio de cultivo universal que goza de preferencia. Como sustancia reaccionante contiene lactosa. La degradación a ácido de esta última origina un vire de color hacia el amarillo, del azul de bromotimol. La alcalinización provoca un vire a azul intenso. La notable pobreza de electrolitos provoca la represión de la invasión de las especies de *Proteus*.

### **Agar chromocult.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona 3.0 g; cloruro sódico 5.0 g; dihidrógenofosfato potásico 1.7 g; hidrógenofosfato dipotásico 3.0 g; piruvato sódico 1.0 g; triptófano 1.0 g; agar-agar 12.0 g; lauril sulfato sódico 0.01 g; mezcla de cromógenos 0.2 g.

Medio selectivo para la identificación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en muestras de agua y de alimentos. Gracias a la acción conjunta de peptonas selectas, piruvato y tampón de fosfatos se garantiza un rápido crecimiento también de coliformes con daños subletales. El contenido en lauril sulfato inhibe ampliamente el crecimiento de m.o. grampositivos, sin afectar el crecimiento de coliformes.(33)

La identificación simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* se hace posible por la nueva combinación, de patente solicitada (laboratorios Merck de México), de dos sustratos cromógenos. El sustrato Salmon-GAL sufre ruptura por la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa característico de coliformes y provoca una coloración roja de las colonias de coliformes. La identificación de la  $\beta$ -D-glucuronidasa característica para *Escherichia coli* tiene lugar mediante el sustrato X-glucurónico, cuyo producto de ruptura produce una coloración azul de las colonias positivas. Ya que *Escherichia coli* rompe tanto Salmon-GAL como X-glucurónico, las colonias se tiñen de violeta-azul oscuro y debido a ello son fáciles de diferenciar de las restantes coliformes, que se presentan de color rojo. El contenido en triptófano mejora la reacción de indol para la confirmación adicional de *Escherichia coli* y aumenta con ello la seguridad de identificación en combinación con la reacción Salmon-GAL y la reacción X-glucurónico.

### **Agar Rambach.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona 8.0 g; cloruro sódico 5.0 g; desoxicolato sódico 1.0 g; mezcla cromógena 1.5 g; propilenglicol 10.5 g; agar-agar 15.0 g.

Medio de cultivo para diagnóstico diferencial para identificación de *Salmonella* en alimentos y muestras clínicas. Los sustratos de sustancias alimentarias contenidas en el **agar Rambach** permiten un buen crecimiento de enterobacteriáceas. El desoxicolato sódico produce una inhibición de la flora acompañante grampositiva. El **agar Rambach**, permite diferenciar las salmonellas claramente de otros m.o. Esto es posible por la adición de

propilenglicol al medio de cultivo. Las salmonellas forman ácido a partir del propilenglicol y en combinación con el indicador de pH producen colonias rojas características.

Para diferenciar las coliformes de las salmonellas el medio de cultivo contiene un cromógeno, que indica la presencia de la separación de  $\beta$ -galactosidasa característica para los coliformes. Los m.o. coliformes crecen en forma de colonias verdes-azuladas/violeta-azuladas. Otras enterobacteriáceas y m.o. gramnegativos crecen en forma de colonias incoloras /amarillentas.

### **Agar EMB.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona 10.0; hidrógenofosfato dipotásico 2.0; lactosa 5.0; sacarosa 5.0; eosina amarillenta 0.4; azul de metileno 0.07; agar-agar 13.5.

Medio selectivo para la demostración y el aislamiento de Enterobacteriáceas patógenas (26). El contenido en lactosa y sacarosa hacen posible la distinción de salmonellas y de shigellas lactosa-negativas y sacarosa-negativas, frente a la flora acompañante lactosa negativa pero sacarosa-positiva (ejemplo: *Proteus vulgaris*, *Citrobacter*, *Aeromonas hydrophila*). Los m.o. de acompañamiento indeseables, grampositivos especialmente, resultan ampliamente inhibidos en su crecimiento, gracias a los colorantes presentes en la formulación.(33)

### **Agar MacConkey.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona de caseína 17.0 g; peptona de carne 3.0 g; cloruro sódico 5.0 g; lactosa 10.0 g; mezcla de sales biliares 1.5 g; rojo neutro 0.03 g; cristal violeta 0.001g; agar-agar 13.5 g.

Agar selectivo para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y bacterias coliformes, a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben considerablemente la flora grampositiva. La lactosa, junto con el indicador de pH rojo neutro, sirve para la comprobación de la degradación de dicho azúcar.

### **Agar verde brillante.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona de carne 5.0 g; peptona de caseína 5.0 g; extracto de carne 5.0 g; cloruro sódico 3.0 g; hidrogenofosfato disódico 2.0 g; lactosa 10.0 g; sacarosa 10.0 g; rojo de fenol 0.08 g; verde brillante 0.0125 g; agar-agar 12.0 g.

Medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *Salmonella* excepto *Salmonella typhi*, a partir de materiales patológicos, heces, orina, alimentos, etc. El medio de cultivo contiene lactosa, cuya degradación a ácido se reconoce por el vire a amarillo del rojo de fenol, que actúa como indicador de pH. En ambiente alcalino presenta color rojo intenso. La flora acompañante grampositiva así como *Salmonella typhi* y *Shigella* resultan muy reprimidas por la presencia de verde brillante y por el contenido de sacarosa permite el reconocimiento de la flora acompañante lactosa débil o lactosa-negativa pero sacarosa positiva.

### **Agar salmonella-shigella.**

**Composición (g/litro):** Peptonas 10.0 g; lactosa 10.0 g; bilis de buey desecada 8.5 g; citrato sódico 10.0 g; tiosulfato sódico 8.5 g; citrato de amonio férrico 1.0 g; verde brillante 0.0003 ; rojo neutro 0.025; agar-agar 12.0.

Medio para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de heces, alimentos y otros materiales objeto de investigación. El verde brillante, la bilis de buey y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben considerablemente la flora acompañante. Con el tiosulfato además de iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias. Las colonias de coliformes quedan señaladas por la demostración de la degradación de lactosa a ácido, a cargo del indicador de pH rojo neutro.(33)

### **Agar Chapman.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona de caseína 10.0 g; extracto de levadura 2.5 g; hidrógenofosfato dipotásico 5.0 g; gelatina 30.0 g; lactosa 2.0 g; D(-)manitol 10.0 g; cloruro sódico 75.0 g; agar-agar 12.0 g.

Para el aislamiento y la diferenciación de *Staphylococcus* a partir de alimentos y otros materiales. Sobre este medio de cultivo crecen solamente m.o. que poseen una elevada tolerancia a la sal común. Entre ellos, las colonias de *Staphylococcus* son diferenciables utilizando como criterios la degradación del manitol, la gelatinólisis y la formación de pigmento.

### **Agar sales manitol.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona 10.0 g; extracto de carne 1.0 g; cloruro sódico 75.0 g; D(-)manitol 10.0 g; rojo de fenol 0.025 g; agar-agar 12.0 g.

Medio selectivo para la demostración de *Staphylococcus* patógenos en alimentos y otros materiales objeto de investigación (10). Debido a la concentración extremadamente

alta de sal, permite solamente el crecimiento de m.o. tolerantes a ella. entre los que se encuentran los del género *Staphylococcus*. La degradación del manitol. con formación de ácido, está notablemente correlacionada con la patogenicidad del m.o. en cuestión y sirve, por lo tanto, como indicativo de la presencia de *Staphylococcus aureus*.

### **Agar Nickerson.**

#### **Composición (g/litro):**

Extracto de levadura 1.0 g; peptona de harina de soya 2.0 g; glicina 10.0 g; D(+)glucosa 10.0 g; indicador sulfito bismuto 2.0 g; agar-agar 15.0 g.

Medio para el aislamiento y diferenciación orientativa de hongos del género *Candida* y otras levaduras (37). Junto con el extracto de levadura, glicina y glucosa como base nutritiva, este medio de cultivo contiene un "indicador sulfito bismuto" para inhibir ampliamente la flora acompañante. *Candida* y la mayoría de otras levaduras se desarrollan sin inconveniente, bajo la reducción simultánea del sulfito bismuto, tomando una coloración parda.(33)

### **Agar caseoy.**

#### **Composición (g/litro):**

Peptona de caseína 15.0 g; peptona de harina de soya 5.0 g; cloruro sódico 5.0 g; agar-agar 15.0 g.

Medio de cultivo universal, exento de sustancias inhibitoras y de indicadores, diseñado para su utilización en un amplio espectro de aplicaciones. Por su rica y abundante base nutritiva, este medio de cultivo es adecuado también para el cultivo de

microorganismos exigentes. Se utilizan como tales, o como base para la fabricación de medios especiales de cultivo por ejemplo, Agar-sangre y Agar-Proteus.(24)

### **Agar Mueller - Hinton.**

#### **Composición (g/litro):**

Infusión de carne 2.0 g ; hidrolizado de caseína 17.5 g ; almidón 1.5 g ; agar-agar 13.0 g.

Medio de cultivo empleado para el ensayo de la sensibilidad, o para ensayo de resistencia de agentes patógenos médicamente importantes frente a antibióticos y sulfamidas. El **agar Mueller-Hinton** se utiliza para la realización del ensayo de difusión en placas. La composición de dicho medio garantiza, por una parte, condiciones favorables de crecimiento y por otra parte, cuenta con la ausencia, muy considerable, de antagonistas de las sulfamidas. Para mejorar de forma considerable el crecimiento de m.o. exigentes. puede añadirse sangre al **agar Mueller-Hinton**. Esto puede sin embargo, conducir a resultados erróneos en el ensayo de enterococos frente a aminoglucósidos (28, 33).

#### *I. 4 Usos y aplicaciones de los medios de cultivo.*

##### **❖ Medicina Humana y Veterinaria.**

En el campo de la medicina humana, se efectúan investigaciones microbiológicas en el diagnóstico de infecciones y para el control de las medidas terapéuticas que le siguen. Para ello se utilizan medios de cultivo para la selección y la diferenciación. para el recuento de

los m.o. y la identificación bioquímica, y para la prueba de la sensibilidad. Por ende métodos análogos se utilizan en medicina veterinaria. (6, 34, 38, 46, 53)

#### ❖ **Industria Farmacéutica**

La mayor parte de los productos de la industria farmacéutica deben cumplir con una especificación microbiológica establecida de acuerdo a la Farmacopea respectiva.. En consecuencia, el **control de calidad** microbiológico es una fase importante en el proceso de producción.

#### ❖ **Industria Cosmética**

Casi todos los productos cosméticos contienen sustancias biológicas activas, como vitaminas, hormonas, aceites y grasas de origen animal y vegetal. Todos los productos con constituyentes biológicos pueden contener m.o. patógenos, incluso en condiciones óptimas de producción. Para la prevención de infecciones es en este caso igualmente importante el análisis microbiológico para la protección del consumidor.

#### ❖ **Industria Láctea**

La leche cruda es un medio de cultivo ideal para numerosos m.o. Debido a su contenido natural de m.o., la leche y los productos lácteos deben satisfacer las exigencias particularmente rigurosas con lo que respecta a la calidad bacteriológica. (6, 34, 38, 46, 53)



### ❖ **Industria Cárnica**

En los mataderos es donde se procede a investigaciones microbiológicas en la carne para que quede garantizada la calidad irreprochable de los productos cárnicos. Además del análisis de la carne para establecer su contenido en m.o., se determina, mediante ensayos de detección de residuos de antibióticos, si un animal ha estado tratado con antibióticos antes del sacrificio.

### ❖ **Industria Alimentaria y de Bebidas**

Productos naturales tales como la leche, la nata, los huevos, la fruta, los jugos de fruta, etc., pueden deteriorarse debido a la presencia de m.o. Su tratamiento está sometido a reglamentaciones particularmente estrictas. Una condición previa importante para las investigaciones microbiológicas es la preparación del material a ensayar y la elección del medio de cultivo más conveniente al objetivo de las investigaciones proyectadas. (6, 34, 38, 46, 53)

### ❖ **Fabricación del Material de Embalaje**

En la fabricación de embalajes para los productos alimentarios, debe existir la garantía que el contenido quede protegido contra las influencias desfavorables, por ejemplo, contra la de los m.o. Gracias a los análisis microbiológicos se tiene la seguridad que sólo se utilizan materiales de embalaje que no transforman el contenido en foco de infección.

## ❖ Control del Agua Potable y Agua de Uso Industrial

Debe prestarse atención particular al control del agua potable y del agua de uso industrial. Actualmente el agua de numerosas fuentes naturales, debido a las contaminaciones provenientes del medio ambiente y del poder de autopurificación biológico perturbado, no puede utilizarse directamente ni como agua potable ni como agua de uso industrial. El agua debe purificarse y someterse a control microbiológico. (6, 34, 38, 46, 53)

### *1.5 Conservación de microorganismos.*

El objetivo primordial de la conservación de un m.o. es mantenerlo vivo, en las condiciones más cercanas a las que tenía al ser aislado, sin mutaciones o variaciones y por supuesto, libre de contaminaciones. Algunas especies pueden conservarse vivas por periodos prolongados, pero si ello se logra a costa de pases frecuentes pueden modificarse muchas de las características originales.

Existen métodos muy diversos para la conservación de m.o. y hay variaciones muy marcadas en cuanto al medio más adecuado para diferentes especies. Las instituciones (hospitales, laboratorios farmacéuticos, centros de investigación) en donde se necesita la conservación tienen igualmente gran diversidad de equipo, espacio de almacenamiento, capacidad económica, etc.

Así pues las necesidades, disponibilidades de equipo y personal dictan los métodos para la conservación de los m.o. específicos que muchas veces son caras o de difícil obtención. Los m.o. de colección necesitan un manejo escrupuloso. (18)

Un aspecto al que debe dedicarse mucha atención es la forma en que se etiquetan los cultivos. Cada m.o. debe tener un número de registro que remita a fichas con toda la información requerida. El mínimo de datos debe incluir origen, especie, clave, fecha de aislamiento, características fenotípica, pruebas específicas en las que debe utilizarse y método de conservación.

Los métodos de conservación de m.o. se dividen en grupos a corto y largo plazo :

**Conservación a corto plazo :**

❖ Resiembras: Este es el método tradicional y más fácil de conservación, por medio de pases periódicos a medio fresco. Los intervalos entre las resiembras varían según la especie, el medio empleado y las condiciones del medio ambiente. Las condiciones que establecen como variables principales son el medio de mantenimiento y la frecuencia entre resiembras.(18)

- ❖ Almacenamiento en aceite mineral : Muchos m.o. se conservan satisfactoriamente por meses o años sumergiendolos en aceite mineral estéril de grado medicinal. Es un método muy sencillo y barato. Consiste en obtener un crecimiento del m.o. en tubos con medio sólido, inclinado y agregar asépticamente el aceite mineral cubriendo por completo el área inclinada. Los tubos se guardan en posición vertical en refrigeración.
  
- ❖ Congelación : Existen diferentes resultados cuando se emplea este método a diversas especies. Existen m.o. que soportan perfectamente la congelación y otros, como Neisseria y Haemophilus que son muy sensibles a ella. El sistema que emplea nitrógeno líquido es el que da mejores resultados, pero tiene desventajas de su costo elevado, el personal altamente especializado que debe manejarlo para evitar riesgos.
  
- ❖ Papel : Es un método en el que los m.o. son desecados sobre discos o tiras de papel filtro estéril. Es una técnica fácil y barata, que puede aplicarse con éxito para mantener cultivos empleados en **control de calidad**.

Conservación a largo plazo :

Liofilización.

Este proceso consiste en la deshidratación de suspensiones de m.o. congelados sometidos a bajas presiones. Con lo que el agua pasa del estado sólido a gas, sin pasar por el estado líquido. Los m.o. liofilizados pueden almacenarse por tiempo muy prolongado si se mantienen en condiciones que eviten su contacto con oxígeno, humedad y luz. Con este método se prepara una elevada cantidad de viales que ocupan un espacio pequeño, facilitando su almacenamiento.(18)

Los aspectos principales en la conservación por este método son:

- a) Selección de viales.
- b) Selección del agente crioprotector.
- c) Preparación y propagación del m.o.
- d) Liofilización.
- e) Almacenamiento.
- f) Rehidratación de m.o. liofilizados.
- g) Ultracongelación.

## *I. 6. Control de Calidad en la preparación de los medios de cultivo y su funcionamiento.*

El **control de calidad** consiste en una evaluación sistemática del trabajo para asegurar que el producto final se ajuste, hasta un grado aceptable a límites de tolerancia previamente establecidos, donde finalmente se proporcionen resultados verídicos (únicos).

Para realizar el **control de calidad** de medios de cultivo es necesario considerar puntos básicos como son :

- ❖ Personal: Este debe ser una persona capacitada en un área específica y con un entrenamiento práctico.
- ❖ El material de vidrio que comúnmente se utiliza en el laboratorio de control microbiológico, debe estar limpio, seco y libre de cualquier tipo de contaminantes, ya que la presencia de éstos aun en pequeñísimas concentraciones puede afectar los resultados, por lo que se recomienda:
  - ☞ Utilizar material de vidrio de borosilicato de bajo coeficiente de expansión térmica, que tiene excelente resistencia a los ácidos excepto al fluorhídrico.
  - ☞ Para el lavado ordinario usar soluciones detergentes alcalinas o neutras.
  - ☞ Para tratamiento severo, utilizar mezcla crómica, ácido nítrico caliente, ácido sulfúrico, alcohol, hidróxido de potasio en alcohol, fosfato disódico en solución acuosa.

- ☞ Clasificar y separar el material contaminado del no contaminado y colocarlo en los lugares asignados en cada caso, en áreas físicas bien separadas.
- ☞ El material contaminado debe colocarse en recipientes adecuados para su esterilización y lavado posterior.
- ☞ El agar proveniente de cajas, tubos, matraces etc., una vez esterilizado debe recolectarse en bolsas de plástico de alto punto de fusión para su eliminación posterior ; lo recomendable es incinerarlo, no debe eliminarse por el drenaje.(3, 23, 30)
- ☞ El material desechable contaminado debe depositarse en recipientes especiales (ejemplo : bolsas de plástico de alto punto de fusión), y posteriormente esterilizarse, desecharse o incinerarse.
- ☞ Las pipetas contaminadas inmediatamente después de su uso deben colocarse en recipientes que contengan soluciones germicidas ; se les quita el algodón de la boquilla y se procede a su esterilización evitando depositar sobre ellas material que pueda quebrarlas.
- ☞ Durante el lavado no usar fibras ni polvos, auxiliares de escobillones en buen estado y de estropajos y/o esponjas.

- ❖ Colocar el material en escurridores y/o canastillas. Dejar secar al aire. (3, 23, 30)
- ❖ Conservación de m.o.: La conservación óptima de los m.o. es de gran importancia y debe dársele la misma prioridad que a la estandarización de los métodos (incluyendo equipo y reactivos empleados); ya que puede traer consecuencias de correr el riesgo de echar por tierra programas que requieran una estricta constancia de todos los parámetros en el **control de calidad**.
- ❖ Materia prima: Esta debe presentar características homogéneas en el tamaño de partícula, color y no presentar apelmazamiento. El envase debe ser de tapa de aluminio, frasco de vidrio ámbar, composición completa en la etiqueta, debe indicar fecha de caducidad, indicación clara de la preparación y número de lote.
- ❖ Area de trabajo: Está debe ser un área adecuada y segura (como se menciona en la metodología). (3, 23, 30)

El **control de calidad** para medios de cultivo debe, en el análisis final, asegurar que un medio respalde el desarrollo de los m.o., inhibir el desarrollo de m.o. comensales, exhibir una respuesta bioquímica típica, ser estable y tener un tiempo de conservación razonable.



Para tal propósito se deben realizar pruebas de:

### **Esterilidad.**

Pocos son los medios utilizados sin esterilización final, pero son excepciones; casi todos los medios deben ser estériles cuando se inoculan. Cada lote de medio, preparado en el laboratorio o proveniente de una fuente comercial, debe ser controlado para asegurar su esterilidad. Esto se realiza retirando 1 a 5 % del lote y colocándolo en una incubadora bacteriológica a 35° C durante 48 horas. Si aparecen contaminantes en el medio como resultado de esterilización inadecuada, se debe adquirir un lote nuevo. ( 14, 31)

Las placas de medio de cultivo empleadas para control de esterilidad deben descartarse al ser completada la prueba, ya que son inadecuadas para la inoculación a causa de la deshidratación producida luego de 48 hrs. de incubación.

### **Control de calidad de promoción de crecimiento.**

Determinar la capacidad del medio para respaldar el desarrollo de presuntos m.o., inoculando con una cantidad aproximada que nos permita observar la funcionalidad del medio. Un error frecuente en el **control de calidad** es el uso de un inóculo concentrado que puede producir un desarrollo desorientador, para lo cual es necesario estandarizar éste, mediante el empleo de una técnica que nos ayude a este propósito como la técnica de Miles & Misra. La cual se fundamenta en el manejo de una cantidad conocida del m.o., comparandoló con la turbidez del tubo No. 0.5 del nefelometro de MacFarland (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) para posteriormente realizar diluciones.(14, 31)

### **Respuesta bioquímica.**

Al inocular medios empleados para identificar una reacción específica, tal como fermentación o producción de  $H_2S$ , es necesario usar sólo una cepa del m.o. que va a producir la reacción deseada.

### **Medio selectivo.**

Dado que los medios selectivos están diseñados para respaldar el desarrollo de m.o. y para inhibir el de otros, por esto último es necesario inocular el medio con representantes de ambos grupos de m.o. Para asegurarse de que este cumpla su función se puede probar con un inóculo concentrado del m.o. que no debe promover su crecimiento, pues si sucede esto con el inóculo, pasará lo mismo con una pequeña cantidad del mismo m.o. que pudiera estar presente en una muestra clínica. En general, dos cepas de m.o. diferentes son suficientes para verificar las características de desarrollo, la capacidad selectiva o inhibidora y la respuesta bioquímica. ( 14, 31)

### **Antibiograma.**

Es necesario el riguroso **control de calidad** para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el gran número de variables que pueden afectar los resultados. Es posible controlar algunas características físicas y químicas de los medios, como el pH y la profundidad del agar, pero el control final es provisto por una serie de cepas bacterianas de referencia para las que se han establecido los resultados esperados. Los m.o. de control ideales tienen puntos terminales de susceptibilidad en la mitad de las concentraciones antimicrobianas utilizadas y poseen tendencias mínimas a cambiar los patrones de susceptibilidad en el transcurso del tiempo.

Es importante en el caso de los m.o. aislados en el laboratorio de bacteriología clínica la determinación de la actividad bactericida además de la inhibición antibiótica (método de Kirby-Bauer) contra dichos aislamientos. El método más útil para comprobar la adecuación del tratamiento antimicrobiano en muchas infecciones es la respuesta clínica del paciente al tratamiento gracias a las pruebas de susceptibilidad. Es relevante destacar que las pruebas de susceptibilidad antibiótica pretende ser una guía para el clínico y es por esto que se debe asegurar la difusión del antibiótico en el medio de cultivo. (14, 31)

### *1.7 Control de calidad del equipo.*

El **control de calidad**, también corresponde al buen funcionamiento del material y equipo de trabajo en la preparación de medios de cultivo por lo que es recomendable, establecer registros de procedimientos para su mantenimiento en condiciones óptimas de trabajo (ver Cuadro No.2).

Cuadro No.2. Procedimientos de **control de calidad** del equipo microbiológico comúnmente usado.

EQUIPO	PROCEDIMIENTO	INTERVALO	LIMITES DE TOLERANCIA
Refrigeradores	Registro de temperatura	Diario o continuo	2-8°C
Incubadoras	Registro de temperatura	Diario o continuo	35.5±1°C
Baños de agua	Registro de temperatura	Diario	36-38°C 55-57°C
Autoclaves	Prueba con tira de esporas ( <i>Bacillus stercorophilus</i> )	Por lo menos semanal	No crecimiento de esporas en subcultivo indica corrida estéril.
Jarras anaerobias	Tira indicadora con azul de metileno	Con cada uso	La conversión de la tira de azul a blanco indica una baja tensión de O <sub>2</sub> .

### *I.8 Fuentes de error en la preparación de medios de cultivo.*

En la preparación de medios de cultivo se pueden cometer errores y afectar la calidad de los mismos, estos pueden ser:

#### **Medio inadecuado:**

Dado que los medios deshidratados suelen estar dispuestos por orden alfabético en un estante, es posible seleccionar inadvertidamente un frasco equivocado, o un aditivo inadecuado, con lo cual el medio resulta inapropiado para su uso. Es siempre importante leer el rótulo, particularmente cuando se recibe en el laboratorio una nueva partida de medio.(2, 14, 30, 31, 33)

#### **Agua:**

Medir cuidadosamente la cantidad de agua que se añade al reconstituir el medio. Dado que las impurezas hacen que el agua corriente sea inadecuada para la preparación de los medios biológicos, los laboratorios deben usar agua destilada, desionizada o que ha sido tratada de ambas maneras.

#### **Pesaje:**

Emplear balanzas adecuadas para pesar los materiales secos. Los errores de pesaje alteran significativamente la composición final.

#### **Distribución:**

Los medios deben distribuirse exactamente ( $20 \text{ ml} \pm 2 \%$ ) y asépticamente en placas (100 x 15 mm). Esperando un espesor homogéneo de 4 mm, la medición errónea de la

cantidad exacta puede traer como consecuencia por ejemplo, un medio de agar de espesor demasiado fino o demasiado profundo, siendo en ambos casos inadecuado para su utilización. Para tal propósito se recomienda una mesa nivelada.

### **Esterilización adecuada:**

Un error común en la preparación de medios, es el de esterilizar a una temperatura demasiado elevada y/o durante un período demasiado largo. Esto puede producir el deterioro o descomposición de algunos componentes de los medios, que inutiliza a éstos para los fines destinados. (2, 5, 31, 33)

### **Material de Vidrio:**

Se debe tener la precaución de utilizar material de vidrio limpio, ya que los residuos adheridos al vidrio pueden inhibir a algunos m.o. exigentes.

A fin de satisfacer los requerimientos de certificación de licencias, los laboratorios deben llevar a cabo procedimientos de **control de calidad** de acuerdo con un patrón prescrito como es National Control Laboratory Standars. Deben efectuar registros cuidadosos de dichos procedimientos y mantenerlos; los registros deben revisarse para determinar cuáles medios están rara vez fuera de control y cuáles son los que, por razones de inestabilidad u otros problemas, pueden con frecuencia no satisfacer las Normas de Calidad. El **control de calidad** de medios de cultivo es un procedimiento enfocado en forma racional y disciplinada. (2, 5, 31, 33)

## *II. Objetivo general.*

- ❖ Evaluar la estabilidad y funcionamiento de diferentes medios de cultivo preparados en condiciones estándar y almacenados a una temperatura de 2-8°C por trece semanas.

### *II.1. Objetivos particulares.*

- ❖ Mantener un cepario en condiciones óptimas para la realización del control de calidad de los diferentes medios de cultivo probados.
- ❖ Evaluar el **control de calidad** de los diferentes medios de cultivo en placa, realizando pruebas de esterilidad, promoción e inhibición de crecimiento y respuesta bioquímica.
- ❖ Utilizar los resultados del presente trabajo para que ATYDE los emplee como un instructivo en la elaboración y **control de calidad** de medios de cultivo en placa.

## *II.2. Hipótesis.*

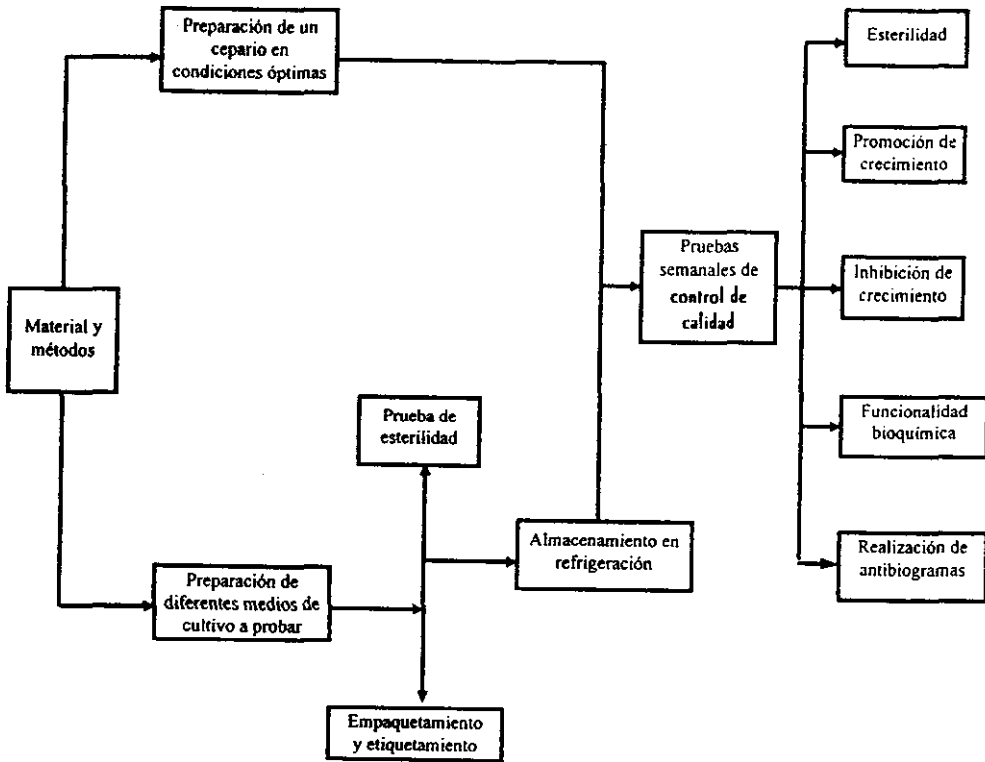
“Si los medios de cultivo deshidratados son preparados en condiciones estándar y almacenados en refrigeración (2-8°C) entonces, estos podrán ser empleados para lo que fueron diseñados, con un funcionamiento óptimo durante un período de trece semanas”.

### *III. Parte experimental*

A continuación se describen tanto el procedimiento en general (ver Diagrama No.1), la preparación y mantenimiento del cepario, la preparación de los medios de cultivo, la técnica de promoción e inhibición de crecimiento de Miles & Misra así como su estandarización, y por último la prueba de susceptibilidad antimicrobiana (técnica de difusión de antibióticos en agar **Mueller-Hinton**).



Diagrama No.1. Descripción del desarrollo experimental para la realización del proyecto "Evaluación de la estabilidad de diferentes medios de cultivo preparados en condiciones estándar".



### *III. Material*

#### *III.1. Cristalería:*

- ❖ Matraz Erlenmeyer de 1000, 2000 y 3000 mL.
- ❖ Tubos de ensaye de fondo plano de 12x82 (20 mL) con tapón de rosca.
- ❖ Probetas graduadas de 250, 500, 1000 y 2000 mL.
- ❖ Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL.
- ❖ Termómetros VWRrand ASTM de 180°C.
- ❖ Vasos de precipitados de 500, 1000 y 2000 mL.
- ❖ Portaobjetos.

#### *III.2. Equipo:*

- ❖ Balanza granataria OHAUS.
- ❖ Microscopio compuesto OLYMPUS.
- ❖ Autoclave ALL AMERICAN # 1925x.
- ❖ Vortéx.
- ❖ Baño María GRANT.
- ❖ Horno Pasteur RIOS-ROCHA.
- ❖ Refrigerador NIETO.
- ❖ Dispensador Peristáltico MONOSTAT.

- ❖ Estufa bacteriológica.
- ❖ Tripies metálicos.
- ❖ Mecheros de Bunsen.
- ❖ Asas bacteriológicas calibradas con baño de platino.
- ❖ Tubo No. 0.5 del nefelometro de MacFarland.
- ❖ Espátulas.
- ❖ Gradillas.
- ❖ Micropipeta de volumen fijo (10  $\mu$ L).
- ❖ Micropipeta de volumen variable (200-1000  $\mu$ L).
- ❖ Puntas estériles para micropipetas.
- ❖ Contenedores para puntas de micropipetas.
- ❖ Cajas Petri desechables de 15x100 mm.

### *III.3. Medios de cultivo deshidratados:*

- ❖ **Agar sangre**
- ❖ **Agar chocolate**
- ❖ **Agar brovacin**

- ❖ **Agar chromocult**
- ❖ **Agar EMB (agar-eosina-azul de metileno)**
- ❖ **Agar verde brillante**
- ❖ **Agar salmonella-shigella**
- ❖ **Agar Chapman**
- ❖ **Agar sales manitol**
- ❖ **Agar Mueller-Hinton**
- ❖ **Agar casoy.**

*III.4. Reactivos:*

- ❖ Cloruro de sodio.
- ❖ Glicerol.
- ❖ Cristal violeta.
- ❖ Alcohol al 70 y 96%.
- ❖ Acetona.
- ❖ Lugol.

- ❖ Safranina.
- ❖ Aceite de inmersión.
- ❖ Papel pH.
- ❖ Agua desionizada.

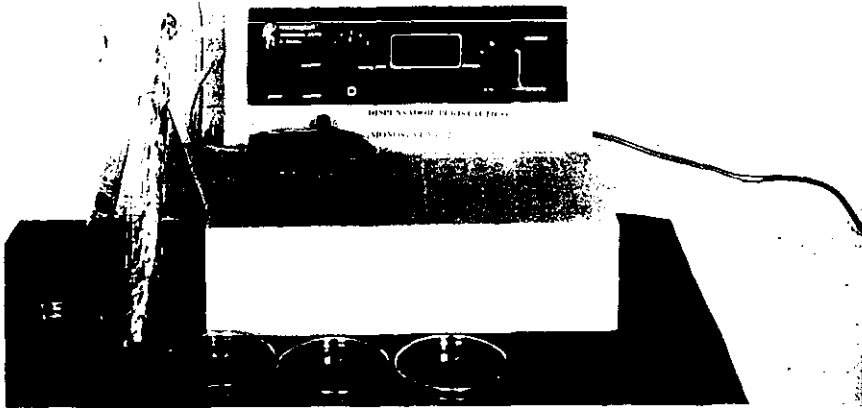
### *III.5. Material biológico:*

- ❖ Sangre de carnero desfibrinada.
- ❖ *Candida albicans* ATCC 10231
- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- ❖ *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615
- ❖ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301
- ❖ *Haemophilus influenzae* tipo "b"
- ❖ *Escherichia coli* ATCC 8739
- ❖ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997
- ❖ *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- ❖ *Neisseria meningitidis* EMD 270
- ❖ *Salmonella enteritidis* NCTC 5188

#### *IV. Metodología.*

Para la obtención de medios de cultivo en placa es imprescindible considerar en el proceso de elaboración de estos (1950 placas de cultivo) lo siguiente:

- ❖ **Esterilidad del área de trabajo.** Esta debe ser un área adecuada y segura, lo cual se logra con el lavado de mesas y pisos con agua, jabón y desinfectantes (cloro, amonio), y por último se limpian mesas y pisos con fenol al 5%. Antes de comenzar el vaciado del medio, se distribuyen mecheros de Bunsen a lo largo de la mesa y estos se mantienen encendidos para dar origen a una atmósfera “limpia”. El personal debe emplear bata, usar cubrebocas, cofia y guantes estériles, además evitar el contacto directo con el medio de cultivo y en lo posible no hablar.
- ❖ **Esterilización del medio de cultivo.** Esta debe de realizarse a la temperatura y tiempo que se indica en el marbete del proveedor (exceptuando si se indica lo contrario) ya que, si no respetan estas indicaciones se pueden afectar las propiedades de los componentes del medio y por consecuencia la funcionalidad del medio de cultivo. Paralelamente a esta etapa del proceso se debe de emplear un indicador biológico de una correcta esterilización (*Bacillus stercorarius* (ampolleta)).
- ❖ **Vaciado del medio de cultivo en placa.** Esta parte del proceso se realiza con la ayuda de un aparato denominado “Dispensador Peristáltico” (ver figura No. 2), el cual consiste en una bomba de vacío de llenado continuo; para proceder al vaciado se tienen que dejar expuestas totalmente las placas en las condiciones de esterilidad como se mencionó en el primer punto.



**Figura No. 2.** Dispensador Peristáltico de flujo continuo, Matraz Erlenmeyer, Manguera de silicón-teflón y cajas Petri.

❖ **Empaquetamiento y refrigeración.** La parte del proceso que involucra el empaquetamiento se emplea para reducir en lo posible la deshidratación y disminuir el riesgo de contaminación de las placas por la manipulación, y por último darle a los medios de cultivo en placa una adecuada presentación. Y con el almacenamiento de las placas de cultivo en refrigeración (2-8°C) y protegidos de la luz se persigue dar las condiciones óptimas para el mantenimiento y funcionamiento durante el período que durará el estudio (ver figura No.3).

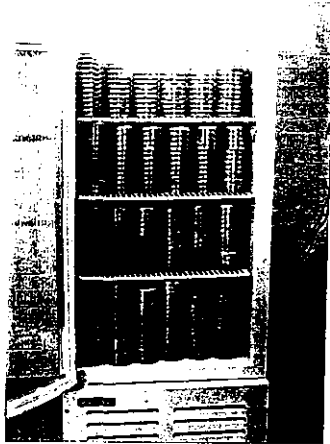


Figura No. 3. Almacenamiento de medios de cultivo en placa  
(refrigeración 2-8°C).

#### *IV.1. Mantenimiento del cepario.*

Los m.o. utilizados en este proyecto fueron proporcionados por la empresa ATYDE, en sobres liofilizados, como se muestra en la figura 4.

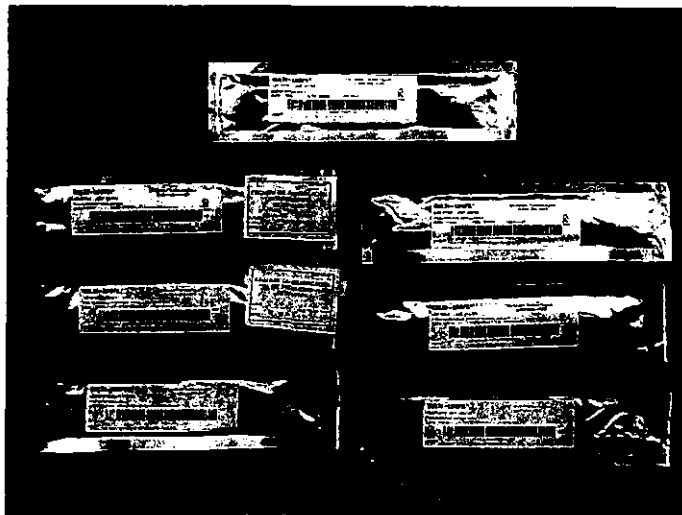


Figura No. 4. Sobres de m.o liofilizados proporcionados por la empresa ATYDE.



A continuación se describen los pasos para la reconstitución de dichos m.o., de acuerdo a las instrucciones del proveedor "CULTI-LOOPS". Este procedimiento es recomendado para m.o. no exigentes. Se recomienda en el sembrado primario, medios no selectivos.

- 1) Incubar el medio apropiado a 37°C.
- 2) Abrir el sobre del liofilizado
- 3) Tomar el liofilizado del sobre, adicionarlo a un tubo con medio líquido, en nuestro caso fue Caldo soya tripticaseína.
- 4) Incubar a 37°C durante 10 min. Para que la película se disuelva completamente.
- 5) Posteriormente agitar, para que se resuspenda el m.o.
- 6) Transferir con pipeta para inoculación del medio apropiado.
- 7) Estriar con asa de uso común.
- 8) Se incubaron a 37°C durante 24 hrs.
- 9) Posteriormente se sembraron en tubos de ensayo, como se menciona en el siguiente parrafo:

Se pueden emplear diversos medios de cultivo nutritivos como son : agar Soya-tripticaseína (AST), agar **Mueller-Hinton** (H-M), agar caseína-Soya (**Casoy**), etc. En el presente estudio se decidió emplear como medio de mantenimiento el **agar casoy** con 0.5% de glicerina. Para lo cual se esteriliza la glicerina a 180°C durante dos horas. la función de

la glicerina en el medio es la de evitar la deshidratación del medio de cultivo y de este modo favorecer la viabilidad de los m.o para su empleo en este estudio. Cabe mencionar que el volumen de glicerina se resta al volumen de agua que se le adicional al medio de cultivo. Se recomienda que el sembrado de los tubos sea de las cepas con 18 a 24 horas de crecimiento (cultivo joven) y a la vez para el ensayo semanal se empleo un tubo de cada cepa y se sembró en placa e incubó de 18 a 24 horas a 35-37°C (ver diagrama No. 2). Por otra parte, se mantuvieron en este cepario m.o. exigentes los cuales se inocularon en frascos de hemocultivo con un período de viabilidad de 21-30 días y cada semana se sembraron de cada uno de los m.o. en placas de **agar chocolate** e incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> (ver figura No.5) para el ensayo de promoción en el medio a evaluar (ver cuadro No.3).(2, 5, 18, 30)

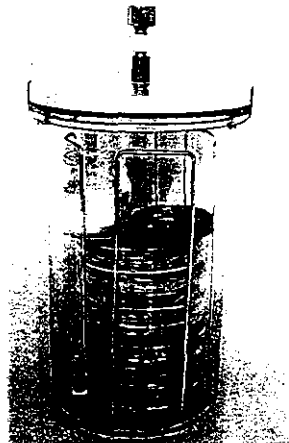
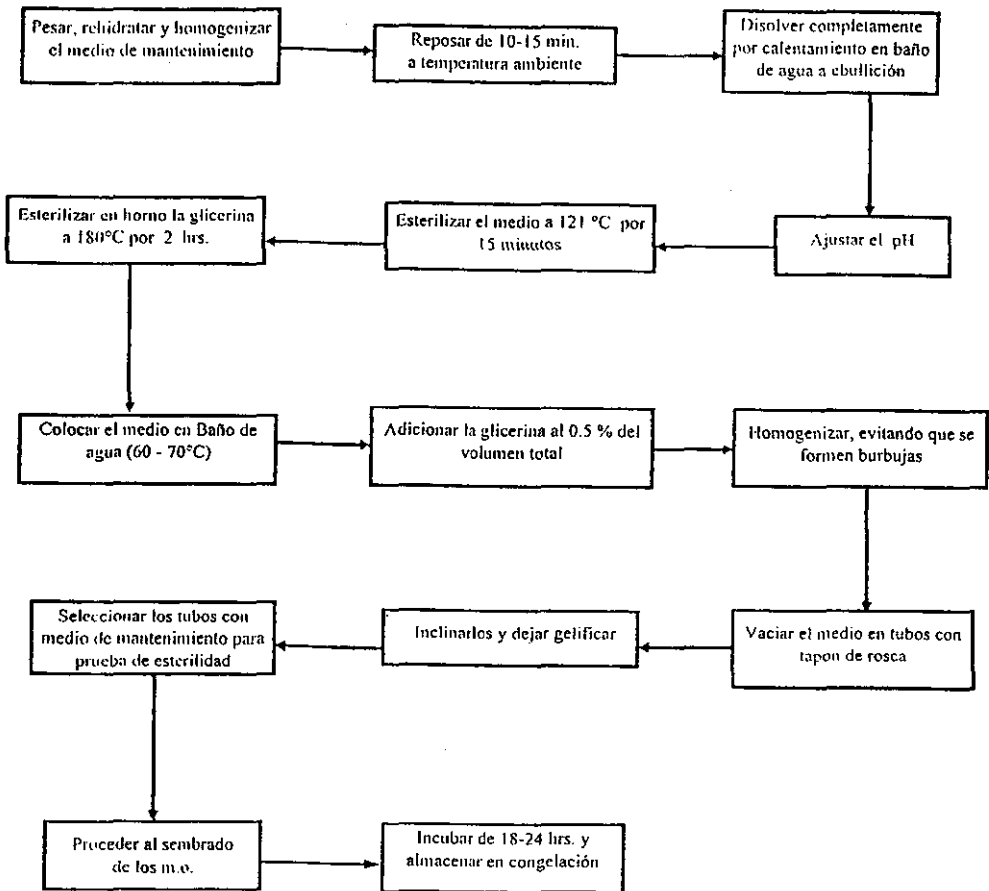


Figura No.5. Sistema microaerofílico (Jarra Gaspack)

Diagrama No.2. Mantenimiento del cepario.



Cuadro No. 3. Condiciones para el mantenimiento de los m.o.

CEPA	Tipo de Microorganismo	Medio de Mantenimiento	Atmósfera	Tiempo de Duración	Almacenamiento
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	No exigente	agar casoy con glicerina	O <sub>2</sub>	20-40 Semanas	Congelación
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	No exigente	agar casoy con glicerina	O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	20-40 Semanas	Congelación
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Exigente	agar sangre	O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	21-30 días	Ambiente
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	Exigente	agar sangre	O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	21-30 días	Ambiente
<i>Haemophilus influenzae</i> Tipo "b"	Exigente	agar chocolate	CO <sub>2</sub>	21-30 días	Ambiente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	No exigente	agar casoy con glicerina	O <sub>2</sub>	20-40 semanas	Congelación
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	No exigente	agar casoy con glicerina	O <sub>2</sub>	20-40 semanas	Congelación
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	No exigente	agar casoy con glicerina	O <sub>2</sub>	20-40 semanas	Congelación
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	No exigente	agar casoy con glicerina	O <sub>2</sub>	20-40 semanas	Congelación
<i>Neisseria Meningitidis</i> EMD 270	Exigente	agar chocolate	CO <sub>2</sub>	21-30 días	Ambiente
<i>Salmonella enteritidis</i> NCTC 5188	No exigente	agar casoy con glicerina	O <sub>2</sub>	20-40 semanas	Congelación

O<sub>2</sub>: Oxígeno ( Aerobiosis).CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono (Anaerobiosis).

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

NCTC: Colección Nacional de Cultivos Tipo.

EMD: Emanuel Merck Darmstadt (Colección).

En el cuadro No.4 se hace referencia de las pruebas bioquímicas primarias, secundarias (API 20, ver anexo) y características de los m.o. que afectan con mayor frecuencia al humano y que en este proyecto se utilizaron como m.o. de referencia (m.o. ATCC, NCTC, EMD) para realizar el control de calidad de los medios de cultivo evaluados y que emplean como m.o. de referencia en los laboratorios de bacteriología.(2, 5, 18, 30)

Cuadro No.4. Características Generales de los m.o. empleados.

Microorganismo	Morfología, Tinción Gram otros aspectos distintivos	Habitat común y forma de encuentro	Principales mecanismos patógenos	Enfermedades típicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos grampositivos con arreglo en racimos de uvas, metabolismo fermentativo, Catalasa(+), O/F: (H).	Nariz, piel (portadores), atraviesan piel y las mucosas, ingestión de alimentos que contienen toxinas.	Inflamación aguda y formación de abscesos que involucran muchas toxinas intracelulares (coagulasa, leucocidina, catalasa, toxina del shock tóxico, enterotoxinas) y componentes de la superficie celular (cápsula, mureína, ácido teicoico, proteína A).	Infecciones piógenas y abscesos en muchos órganos (ejemplo: tejido subcutáneo, médula ósea, endocardio), septicemia, shock tóxico, intoxicación alimentaria.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Pequeños bacilos gramnegativos, nutricionalmente exigentes (X,V), anaerobios facultativos (CO <sub>2</sub> 10%) . Prueba de Saeclitismo, Motilidad(-) . Catalasa (+), Oxidasa (+) .	Naso y orofaringe (portadores), inhalación, contacto con las manos.	Inflamación facilitada por la resistencia a la fagocitosis (cápsula), endotoxina, IgA proteasa, poliproteína de la membrana externa.	Meningitis (lactantes; 3 meses a 2 años) con secuelas, infecciones respiratorias, faringitis aguda, neumonía, epiglotis (adultos), Bacteremia (niños).
<i>Streptococcus pyogenes</i> Grupo A	Cocos grampositivos en cadenas, β-hemolíticos.	Faringe, piel.	Inflamación debido a componentes de la superficie (Proteína M, ácido hipotético, ácido hialurónico, 5a peptidasa, mureína) enzimas extracelulares (hemolisinas, estreptoquinasa, exotoxinas pirógenas); secuelas postsupurativas debido a factores todavía inciertos.	Infecciones primarias Faringitis aguda Erisipela Celulitis Septicemia Secuelas posinfecciosas Fiebre reumática Glomerulonefritis Endocarditis reumática
<i>Salmonella enteritidis</i>	Bacilos gramnegativos, /	Alimentos contaminados con materia fecal, contacto personal, algunas cepas son zoonóticas, ingestión	Capaz de multiplicarse en los macrófagos debido a factores en gran medida desconocidos, diarrea probablemente debida a toxinas	Tifoidea y fiebres relacionadas, gastroenteritis, septicemia.

Continuación...

Microorganismo	Morfología, Tinción (Gram) otros aspectos distintivos	Habitat común y forma de encuentro	Principales mecanismos patógenos	Enfermedades típicas
<i>Candida albicans</i>	Levadura grampositiva Tubo germinativo (+)	Puede infectar cualquier órgano (huéspedes inmunosuprimidos). Forma parte de la flora normal y coloniza la piel y mucosas de la mayoría de las personas.	Células de <i>Candida albicans</i> son capaces de adherirse a la membrana de la célula epitelial vía ligando-receptor y son todavía de mayor capacidad adherente los tubos germinales que las células levaduriformes. Al mismo tiempo no ha sido posible correlacionar el potencial patógeno del m.o. en cuanto a sus extractos o enzima extraída de él.	Enfermedad del Pañal Oncomicosis Enfermedad Sistémica.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos gramnegativos. TSI: ácido/alcalino. H <sub>2</sub> S, gas(+).	En general, en orofaringe de personas sanas.	Inflamación facilitada por la resistencia a la fagocitosis (cápsula), tal vez endotoxina.	Neumonía, otras inflamaciones en pacientes comprometidos. Enfermedades nosocomiales en pacientes inmunosuprimidos.
<i>Escherichia Coli</i>	Bacilos gramnegativos. Reacciones de E. coli: H <sub>2</sub> S neg., gas (+). Indol (+). Rojo de metilo (+). Vogues-Proskauer (-). Citrato de Simmons (-). Ureasa (-).	Agua contaminada con materia fecal, alimentos, contacto personal, ingestión	Diversas formas de diarrea, disentería, debido a enterotoxinas, endotoxinas, toxinas parecidas a la shiga, adhesinas; alguno de estos factores también pueden estar involucradas en las infecciones profundas.	Diarrea secretora (enfermedad del viajero), cistitis, septicemia, meningitis.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos curvos gramnegativos, metabolismo oxidativo. En medio de cultivo cetrimida produce pigmento plicianina, Pigmento Catalasa (+), Oxidasa (+), o/f., Motilidad (+).	Agua, suelos, alimentos, inhalación, penetración a través de interrupciones de la integridad del epitelio	Toxinas (toxina a (ADP-ribosiladora), elastasa, exotoxina S, endotoxina), adhesinas, alginato en la fibrosis quística.	Infecciones piógenas en pacientes quemados, diabéticos, infecciones pulmonares en la fibrosis quística.
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacilos gramnegativos, motilidad (+) Ureasa (-)	Contaminación fecal, en aguas y vegetales	Los factores de virulencia no se conocen muy bien, pero probablemente incluyen endotoxinas.	Diversas formas de diarrea, disentería; algunos microorganismos causan enfermedad sistémica e inflamación local.

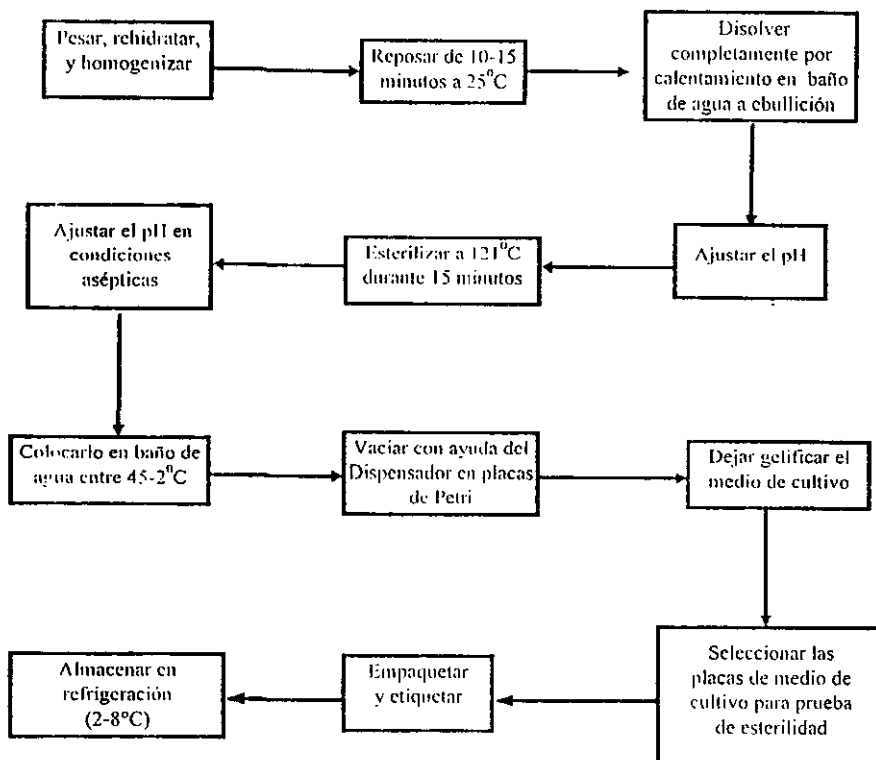
## *IV.2. Preparación de los medios de cultivo.*

- ❖ La cantidad pesada del medio de cultivo seco se le añade la mitad de agua destilada o desmineralizada fría y se distribuye uniformemente por agitación.
- ❖ Seguidamente se añade la cantidad restante de agua y se va balanceando el recipiente de vidrio hasta la completa homogenización del granulado o del polvo.
- ❖ Se dejan reposar durante 10 - 15 minutos a temperatura ambiente los medios de cultivo que contienen el agar, para que este pueda hidratarse. Para disolver completamente los medios de cultivo deben calentarse en baño a ebullición (aproximadamente a 95°C).
- ❖ Los medios de cultivo disueltos se esterilizan en autoclave 15 lb. (121°C) durante 15 min. La duración del calentamiento no debe ser excesiva para así evitar una disminución de la calidad.
- ❖ Ajuste de pH. Los medios de cultivo deshidratados están normalmente ajustados de tal manera que no es necesario corregirlo. En caso de conservación inadecuada, en particular de medios con un contenido elevado en hidratos de carbono, puede disminuir este. El pH por lo que debe ajustarse en este caso con NaOH 2 N o HCl 1 N.

- ❖ Para ciertos medios de cultivo se recomienda la utilización de carbonato sódico, de ácido cítrico, de ácido tartárico o de ácido láctico en solución al 10%. El pH debe medirse antes de la esterilización. Esta medida, realizada después de la esterilización, exige procedimientos operatorios asépticos suplementarios.
  
- ❖ Después de la esterilización, el medio agarificado, todavía líquido o de nuevo licuado, se vierte a una temperatura de 50-60°C en las placas de Petri estériles.
  
- ❖ La capa de las placas debe tener un espesor de entre 3 y 4 mm, es decir, que 20 mL de medio son suficientes para cajas de Petri de 15x100 mm. (14, 34)
  
- ❖ Para las determinaciones de actividad de antibióticos se utilizan 20 ml de medio. Numerosos antibióticos sólo difunden lentamente, debido a su alto peso molecular por lo que se evalúan periódicamente en medios de cultivo que no contengan efectos adversos sobre dichos antibióticos.
  
- ❖ La estabilidad de los medios de cultivo listos para el uso es limitada. Si no, se utilizan de inmediato, se recomienda conservarlos a 2-8°C protegidos de la luz. Los medios de cultivo deben sacarse del refrigerador una hora antes de su empleo (ver diagrama No.3). (14, 34)



Diagrama No.3. Preparación de medios de cultivo.



### 9V.3. Prueba de promoción e inhibición de crecimiento "técnica de Miles & Misra".

Está es una técnica confiable para el control de calidad de medios de cultivo, además de ser de fácil manejo y que requiere de pequeños volúmenes de suspensiones de los diferentes m.o. Para su realización se emplean series de tubos con SSF estériles, asas bacteriológicas, micropipetas y puntas.

La técnica consiste en la preparación de una serie de diluciones decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) de cada una de las cepas de m.o. con un crecimiento de 18 a 24 horas (cultivo joven).

Para esto es necesario antes de efectuar la técnica :

- I. Sembrar las cepas de los diferentes m.o. 24 horas antes, en placas de agar rico (Casoy, AST, M-H, etc.)
- II. Rotular la serie de tubos del número 1 al 5 respectivamente, para cada m.o.
- III. Dividir en cuadrantes (4) las placas (base), posteriormente a esto, colocarlas durante menos de una hora en la estufa a 35°C. Se emplean tres placas por medio de cultivo a evaluar.
  - I. Se prepara una suspensión de la cepa del m.o. igualando la turbidez con el tubo número 0.5 del nefélometro de MacFarland que equivale a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml.

a) De este tubo se toma un volumen de 500  $\mu\text{L}$  con micropipeta y se adiciona a uno de los tubos con SSF estéril (tubo número uno (dilución  $10^{-1}$ )). Homogenizar.

2. De este último (1) tomar un volumen de 500  $\mu\text{L}$  con micropipeta y adicionarlos a otro tubo con SSF estéril (tubo número 1 (dilución  $10^{-2}$ )). Homogenizar, de este modo se realizan las diluciones hasta el tubo número 5 (dilución  $10^{-5}$ ).

Para conocer la dilución a emplear en el ensayo, se debe distribuir 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones en placas del medio de referencia (medio rico). Dejar que se difunda en el medio y posteriormente realizar el barrido o estriado con la ayuda de un asa bacteriológica con baño de platino o en su defecto una varilla de vidrio en forma de "L" estéril. Incubarlas durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35-37°C. (2, 3, 14, 15)

Realizar la lectura de las placas (conteo manual) se recomienda que el número de colonias sea contables. Posteriormente, al encontrar la dilución a emplear se realiza con cada uno de los medios a evaluar (selectivos y diferenciales), con 2 ó 3 placas de cada medio, es suficiente para observar la cuenta de recuperación.

Distribuir 10  $\mu\text{L}$  de la dilución elegida para el ensayo de **Control de Calidad** en los diferentes medios a evaluar. Para realizar esto, se debe manejar según sea el medio de cultivo: un m.o. que debe crecer, uno que debe diferenciarse del anterior y por último otro que no debe crecer. El último cuadrante se emplea como área de esterilidad por semana.

Permitir que se difunda el líquido en el medio de cultivo, posteriormente realizar un barrido o estriado para una mejor lectura, este barrido se realiza con asa bacteriológica con baño de platino. Posteriormente se incuban las placas durante 18-24 horas a una temperatura de 35°C. realizar la lectura de las placas (conteo manual) se recomienda que el número de colonias oscile entre 20-30 por cuadrante.

El ensayo debe realizarse al mismo tiempo en un medio de referencia para asegurar el crecimiento del m.o. (medio rico como Casoy, AST, M-H, etc) y empleando la misma dilución que para cada uno de las cepas de m.o. empleados para comparación de la recuperación bacteriana en los medios de cultivo evaluados y de referencia (ver diagrama No. 4). (2, 3, 14, 15, 50)

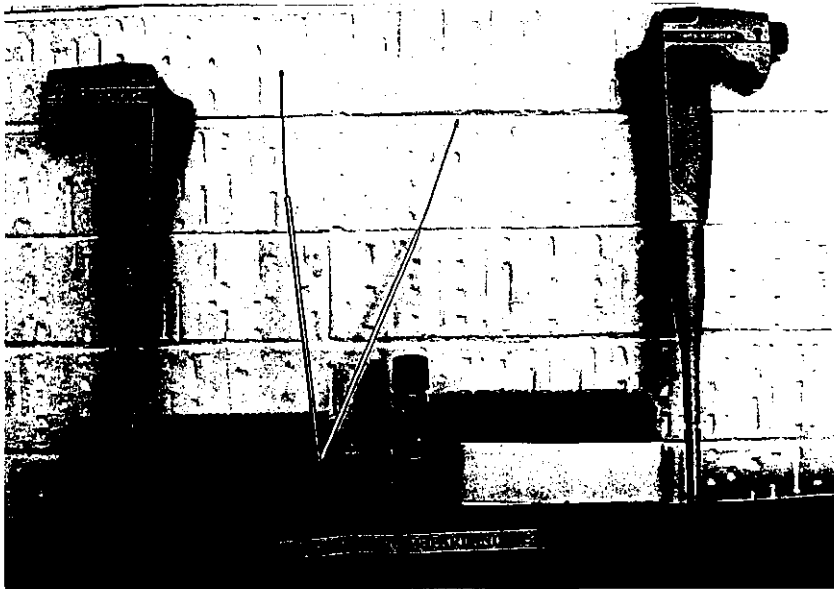
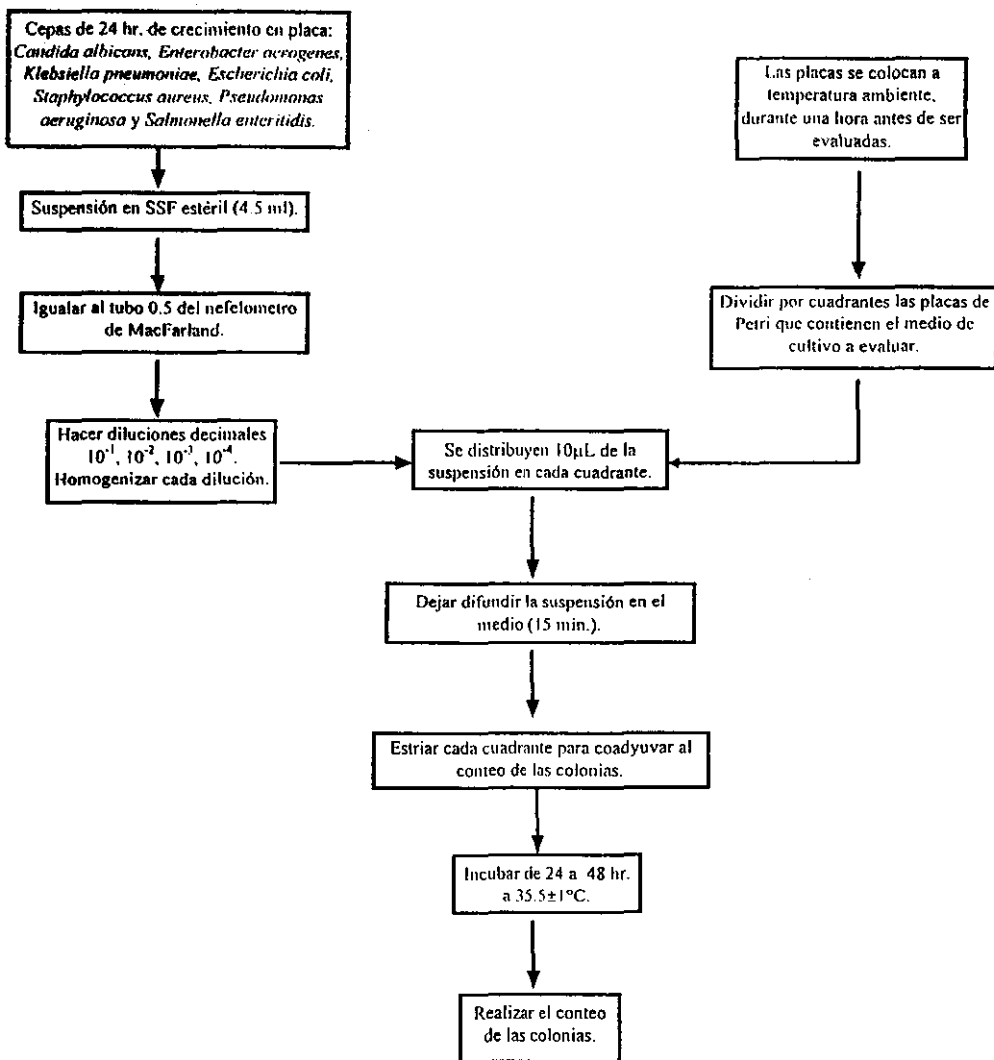


Figura No.6. Micropipetas, puntas, asas de platino y tubo No. 0.5 del nefelometro de MacFarland.

Diagrama No. 4. Prueba de promoción e inhibición de crecimiento.  
"Técnica de Afiles & Misra"



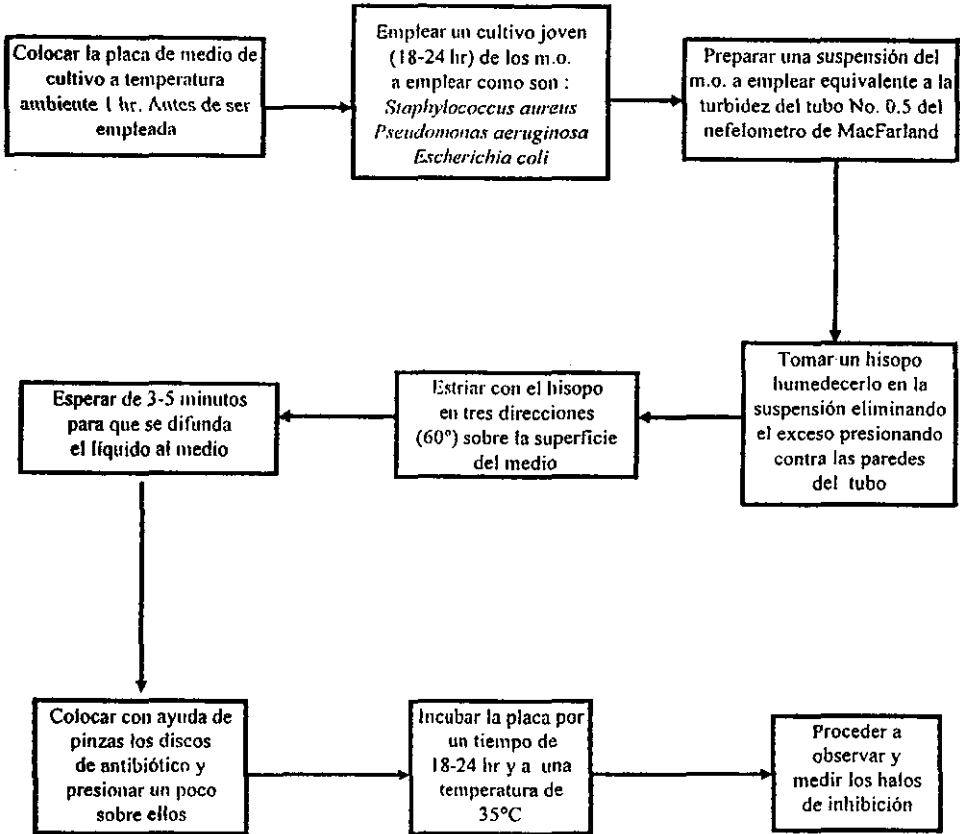
#### *IV.4. Metodología para la realización de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana (método de Kirby-Bauer)*

Se hace extremadamente importante el riguroso control de calidad para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por el número de variables que pueden afectar los resultados de estos. Es posible el control de algunas características físicas y químicas de los medios para este fin, como el pH y el profundidad (espesor) del agar, pero el control final está dado por los m.o. de referencia para los que se han establecido los valores de los resultados esperados. A continuación se describen los pasos a seguir para la correcta realización de dicha prueba.

- 1) La(s) placa(s) medio de cultivo a evaluar se coloca(n) a temperatura ambiente una hora antes de ser empleada(s).
- 2) Se emplea un cultivo joven (18-24 hr.) del m.o. a utilizar en la prueba.  
Se prepara una suspensión del m.o. en 4 mL de un caldo nutritivo como el caldo soya-tripticaseína equivalente a la turbidez del tubo No. 0.5 del nefelometro de MacFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).
- 3) Con un hisopo se humedece en la suspensión obteniendo el inóculo y se remueve el exceso presionando sobre las paredes del tubo.

- 4) Se estria con el hisopo en tres direcciones (60°) la superficie de la placa de medio de cultivo (agar **Mueller-Hinton**).
- 5) Esperar de 3-5 minutos para que se difunda el líquido en el medio.
- 6) Posteriormente se colocan con ayuda de pinzas o despachador automático los discos de antibióticos sobre la superficie del medio.
- 7) Se incuba(n) la(s) placa por un tiempo de 18-24 hr. A una temperatura de 35°C.
- 8) Después del período de incubación se procede a observar y medir los halos de inhibición de la placa con ayuda de una regla (ver diagrama No.5). La susceptibilidad se interpreta con respecto a los de referencia para cada uno de los m.o. empleados en la prueba

Diagrama No.5. Metodología de Kirby-Bauer para la realización de prueba de susceptibilidad en placa.





## V. Resultados

El mantenimiento del cepario fue realizado conforme a lo descrito en la metodología, los m.o. fueron proporcionados en forma de liofilizados como se mencionó en mantenimiento del cepario, es decir, tanto los m.o. exigentes como no exigentes se mantuvieron viables durante el período de estudio de evaluación de los medios de cultivo (ver diagrama No.2 y cuadro No.3). Ahora bien en cuanto a la preparación de los medios de cultivo no hubo cambio alguno en la metodología de los mismos, estos se prepararon a partir de medios de cultivo deshidratados (ver figura No.7), los cuales sólo requirieron de la adición de agua, y para los medios de cultivo **agar sangre** y **chocolate** de la adición de sangre de carnero desfibrinada.

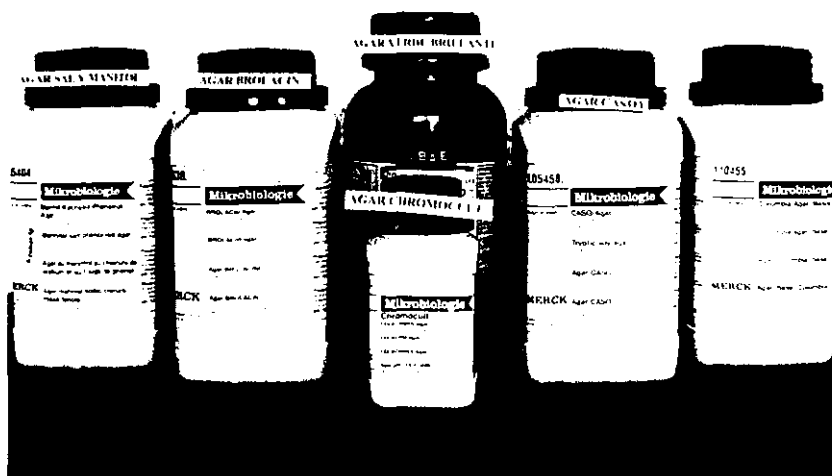
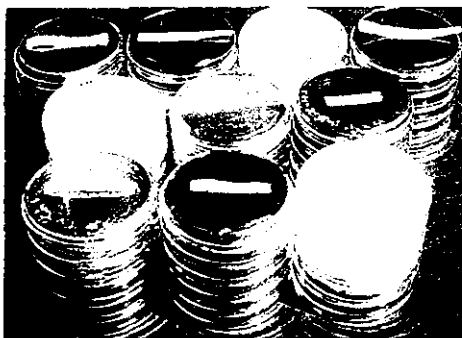


Figura No. 7. Medios de cultivo deshidratados.

Se preparó un sólo lote de medios de cultivo en paquetes de 5 placas y envueltos en PVC (polivinil-celulosa) y almacenados a una temperatura de 2-8°C (ver figura 4 y 8) durante un período de 95 días contando la semana en la que se prepararon.



**Figura No.8.** Presentación de medios de cultivo en placa.

Por otro lado, en relación a la técnica empleada de promoción y crecimiento de Miles & Misra las diluciones empleadas en dicho ensayo fueron las de  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  de acuerdo a las cuentas de recuperación (estandarización, ver figura No. 9 y 10) en los medios diferenciales y selectivos evaluados (ver cuadro No.5, 7 y 8) ; para los medios ricos sólo se realizó promoción de crecimiento observándose morfología colonial y producción de exoenzimas ( $\alpha$  y  $\beta$  hemólisis) (ver Figura No.12 y 13).



Figura No.9. Estandarización de la técnica de Miles & Misra en agar casoy con *Staphylococcus aureus* (diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , y  $10^{-4}$ ).

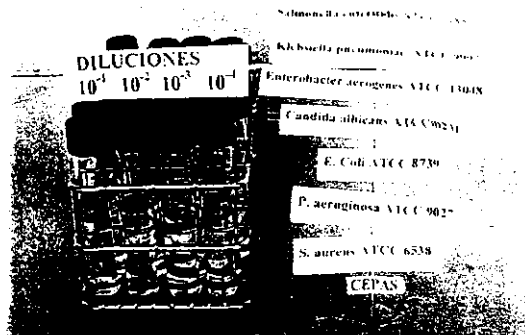


Figura No.10. Serie de diluciones de los m.o. empleados en la técnica de Miles & Misra.

Todas las placas se incubaron durante 24-48 hrs. a 35-37°C en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (ver figuras No.5, 9, 10, 11 y cuadro No.3).



**Figura No. 11.** Incubación de medios de cultivo en placa, del ensayo de promoción e inhibición de crecimiento "técnica de Miles & Misra" a una temperatura de  $35.5 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Del estudio realizado se obtuvieron los siguientes resultados (ver Cuadro No. 5, 6 y 7), donde se expresan de forma cualitativa y cuantitativa los parámetros de esterilidad, promoción e inhibición de crecimiento y respuesta bioquímica).

Cuadro No. 5. Resultados cualitativos experimentales de los medios de cultivo probados

MEDIO DE CULTIVO	ESTERILIDAD	PROMOCION DE CRECIMIENTO	INHIBICION DE CRECIMIENTO	MICROORGANISMO	RESPUESTA BIOQUIMICA	NUMERO DE FIGURA
Agar sangre (Agar base sangre)	+	+		<i>Streptococcus pyogenes</i> grupo A ATCC 19615	Colonias pequeñas claras, con $\beta$ -hemólisis en 24 horas	
	+	+		<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	Colonias grandes y blancas, con $\alpha$ -hemólisis en 24 horas	12
	+	+		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Colonias grandes y blancas con $\beta$ -hemólisis en 24 horas	
NOTA: El agar sangre se observa contaminado a la quinta semana						
Agar chocolate	+	+		<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.	Colonias pequeñas en forma de rocío bien definidas en 24 horas, en presencia de CO <sub>2</sub>	
	+	+		<i>Neisseria meningitidis</i> EMD 270	Colonias planas con tonalidad verdosa en 24 horas, en presencia de CO <sub>2</sub>	13
	+	+		<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	Colonias grandes y blancas, con $\alpha$ -hemólisis en 24 horas, en presencia de CO <sub>2</sub>	
NOTA: El agar chocolate se observa contaminado a la novena semana						
Agar brotacin	+	+	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8731	Colonias amarillas grandes, con borde estrellado, con cambio del medio	
	+	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Colonias blancas grandes, con borde estrellado, sin cambio del medio	14
	+	+	-	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Colonias regulares blancas, sin cambio del medio	
NOTA: El agar brotacin se observa contaminado a la novena semana						

Esterilidad : (+) No contaminado ; (-) Contaminado.

Promoción de crecimiento : (+) Desarrollo del m.o. ; (-) No desarrollo del m.o.

Inhibición de crecimiento : (+) No desarrollo del m.o. ; (-) Desarrollo del m.o.

MEDIO DE CULTIVO	ESTERILIDAD	PROMOCION DE CRECIMIENTO	INHIBICION DE CRECIMIENTO	MICROORGANISMO	RESPUESTA BIOQUIMICA	NUMERO DE FIGURA
Agar chromocult	+	+	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Colonias violetas grandes sin cambio del medio	15
	+	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Colonias blancas grandes con borde estrellado, sin cambio del medio	
	+	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	No crecimiento	

NOTA: El agar chromocult se observa contaminado a la novena semana

EMB (eosina-azul de metileno)	+	+	-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Colonias verdosas con brillo metálico con centro negro en 24 horas	16
	+	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Colonias rosas rugosas, sin cambio del medio.	
	+	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	No crecimiento	

NOTA: El agar EMB se observa contaminado a la décimo cuarta

Agar verde brillante	+	+	-	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Colonias amarillas grandes y el medio sin cambio	17
	+	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Colonias rosadas grandes y el medio sin cambio	
	+	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	No crecimiento	

NOTA: El agar verde brillante se observa contaminado a la décimo cuarta semana

Esterilidad : (+) No contaminado ; (-) Contaminado.

Promoción de crecimiento : (+) Desarrollo del m.o. ; (-) No desarrollo del m.o.

Inhibición de crecimiento : (+) No desarrollo del m.o. ; (-) Desarrollo del m.o.

MEDIO DE CULTIVO	ESTERILIDAD	PROMOCION DE CRECIMIENTO	INHIBICION DE CRECIMIENTO	MICROORGANISMO	RESPUESTA BIOQUIMICA	NUMERO DE FIGURA
Agar salmonella-shigella	+	+	-	<i>Salmonella enteritidis</i> NTCC 5188	Colonias transparentes, con punto negro en el centro	18
	+	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Colonias blancas transparentes sin cambio del medio	
	+	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	No crecimiento	
NOTA: El agar salmonella-shigella se observa contaminado a la décimo cuarta						
Agar Chapman	-	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Colonias regulares blancas con brillo, sin cambio del medio	19
	+	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	No crecimiento	
	+	-	+	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	No crecimiento	
NOTA: El agar Chapman se observa contaminado a la décimo cuarta semana						
Agar sales manitol	+	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Crecimiento de colonias regulares y blancas con brillo, vire del medio de rosa a amarilla	20
	+	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	No crecimiento	
	+	-	+	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	No crecimiento	
NOTA: El agar sales manitol se observa contaminado a la décimo cuarta semana						

Esterilidad : (+) No contaminado ; (-) Contaminado.

Promoción de crecimiento : (+) Desarrollo del m.o. ; (-) No desarrollo del m.o.

Inhibición de crecimiento : (+) No desarrollo del m.o. ; (-) Desarrollo del m.o.

MEDIO DE CULTIVO	ESTERILIDAD	PROMOCION DE CRECIMIENTO	INHIBICION DE CRECIMIENTO	MICROORGANISMO	RESPUESTA BIOQUIMICA	NUMERO DE FIGURA
Agar Nickerson	+	+	-	<i>Candida albicans</i> ATCC 231	Colonias café, de tamaño mediano, sin cambio del medio	
	+	-	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	No crecimiento	21
	+	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	No crecimiento	
NOTA: El agar Nickerson se observa contaminado a la décimo cuarta semana						
Agar Mueller-Hinton.	+	+		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Se realizaron antibiogramas	22
NOTA: El agar Mueller-Hinton se observa contaminado a la novena semana						

Esterilidad : (+) No contaminado ; (-) Contaminado.

Promoción de crecimiento : (+) Desarrollo del m.o. ; (-) No desarrollo del m.o.

Inhibición de crecimiento : (+) No desarrollo del m.o. ; (-) Desarrollo del m.o.



V.1. Resultados de los medios de cultivo evaluados

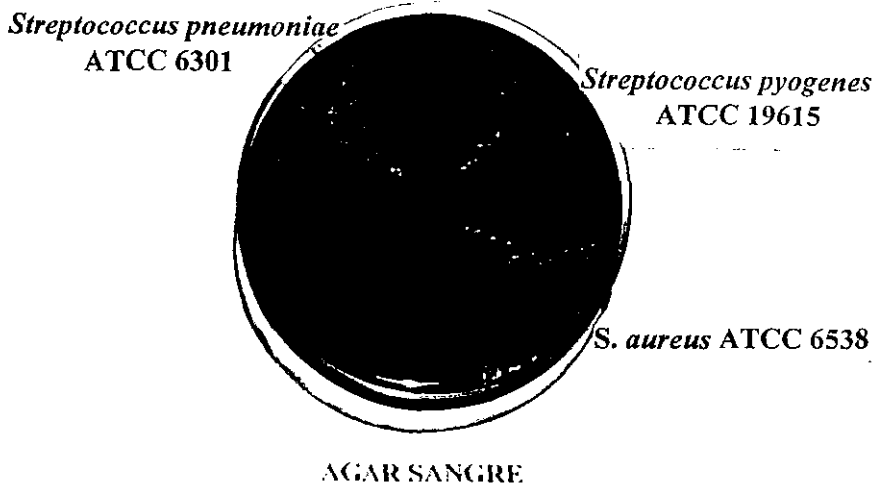


Figura No. 12. Ensayo de promoción de crecimiento en agar sangre de *Streptococcus pneumoniae* ( $\alpha$ -hemólisis), *Staphylococcus aureus* ( $\beta$ -hemólisis) y *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemólisis)

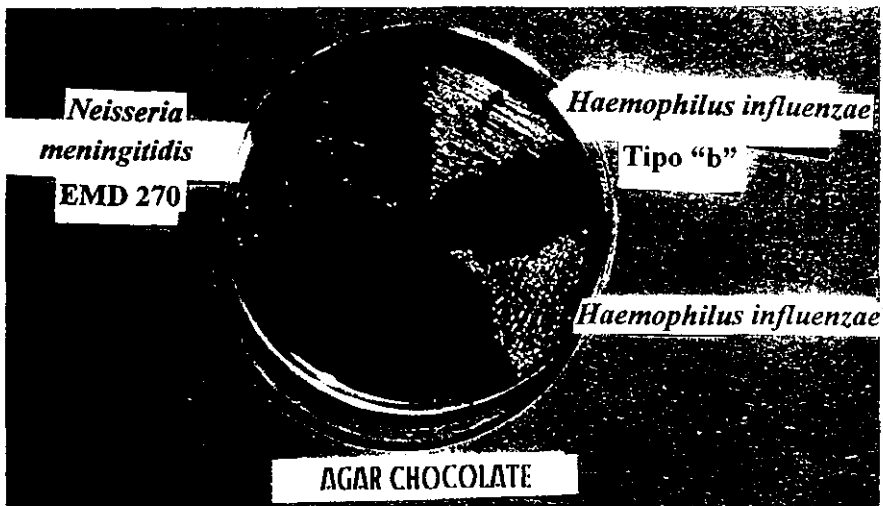


Figura No. 13. Ensayo de promoción de crecimiento en agar chocolate con *Neisseria meningitidis* ( $\alpha$ -hemólisis), *Haemophilus influenzae* tipo "b" y *Haemophilus influenzae* (muestra clínica).

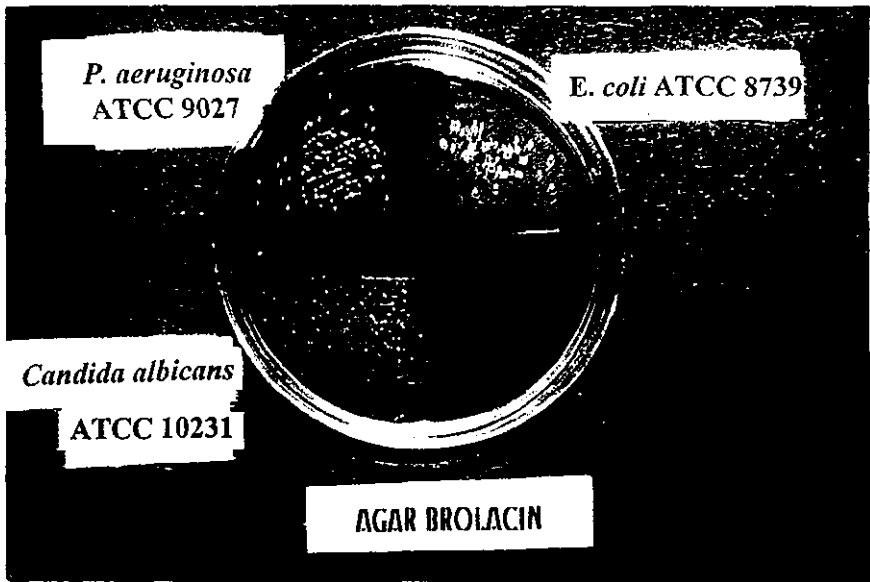


Figura No. 14. Ensayo de promoción de crecimiento en agar brolacin de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

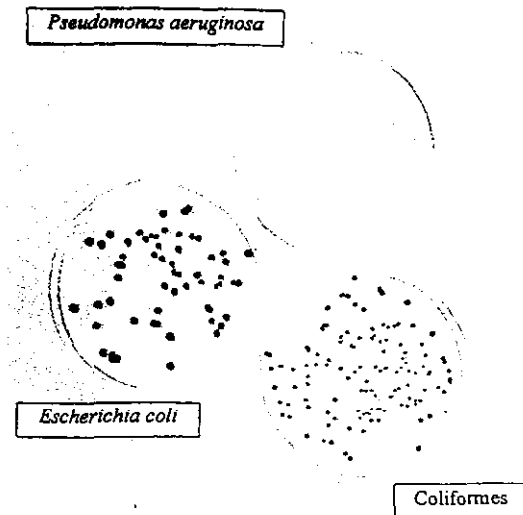


Figura No. 15. Ensayo de promoción y diferenciación de crecimiento en agar chromocult con *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y coliformes.

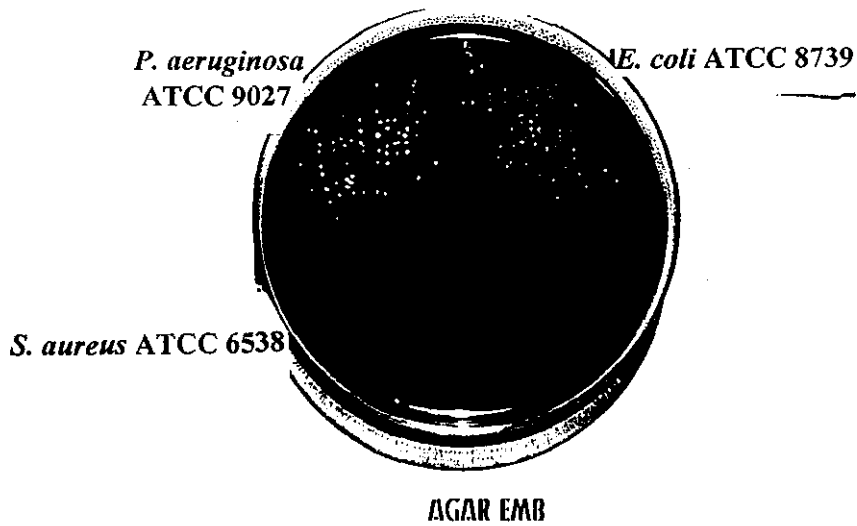


Figura No. 16. Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar EMB con *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

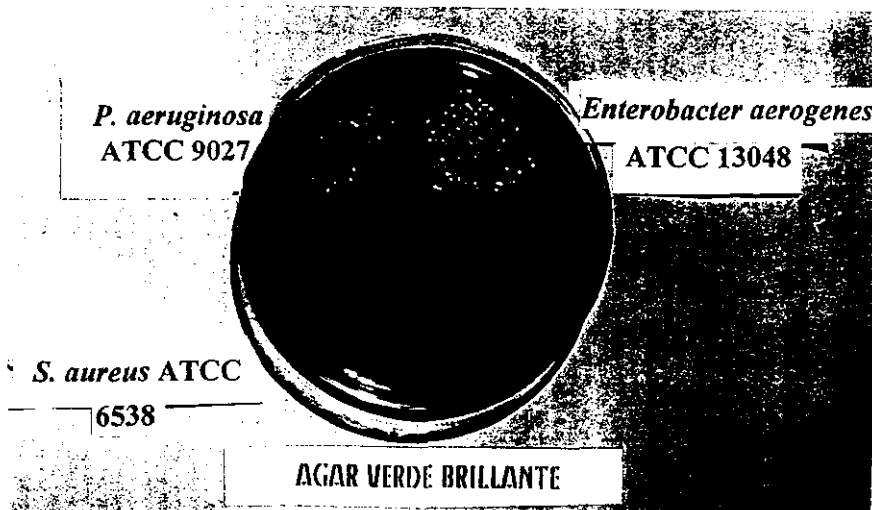


Figura No. 17. Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar verde brillante con *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

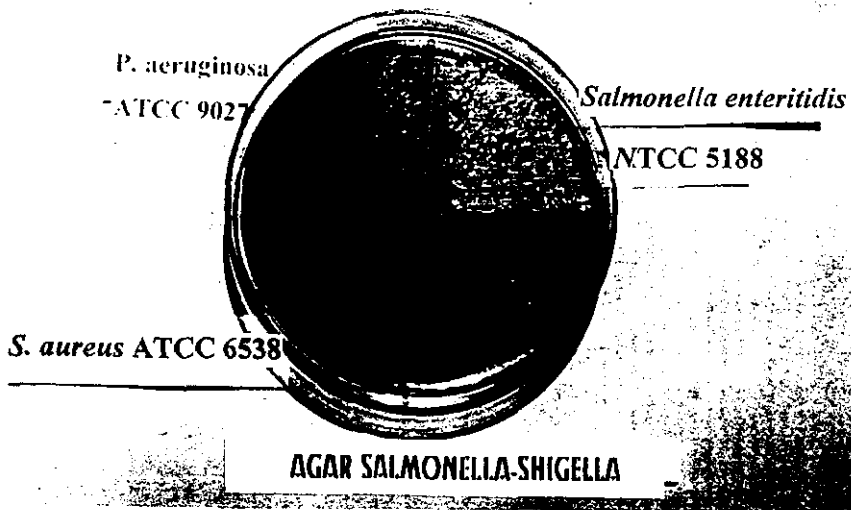


Figura No. 18. Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar salmonella-shigella con *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

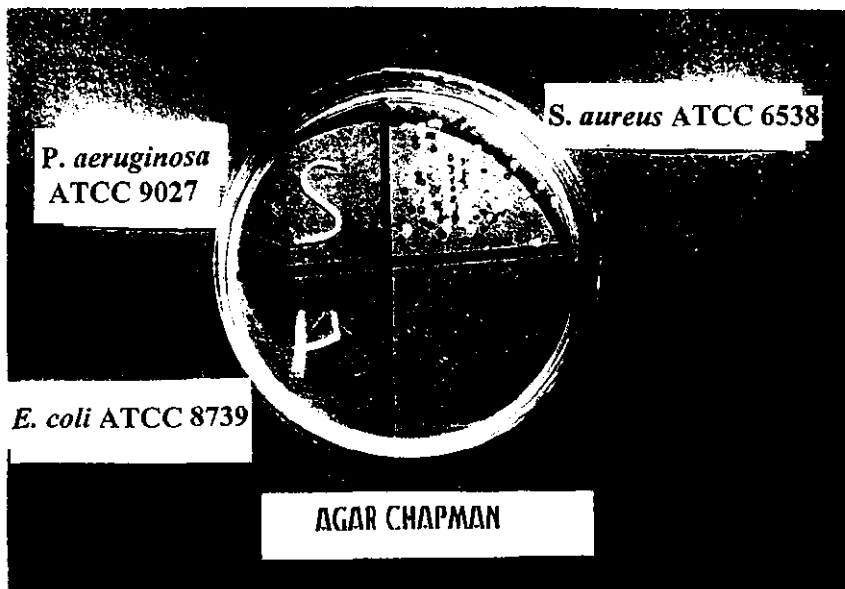


Figura No. 19. Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar Chapman con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

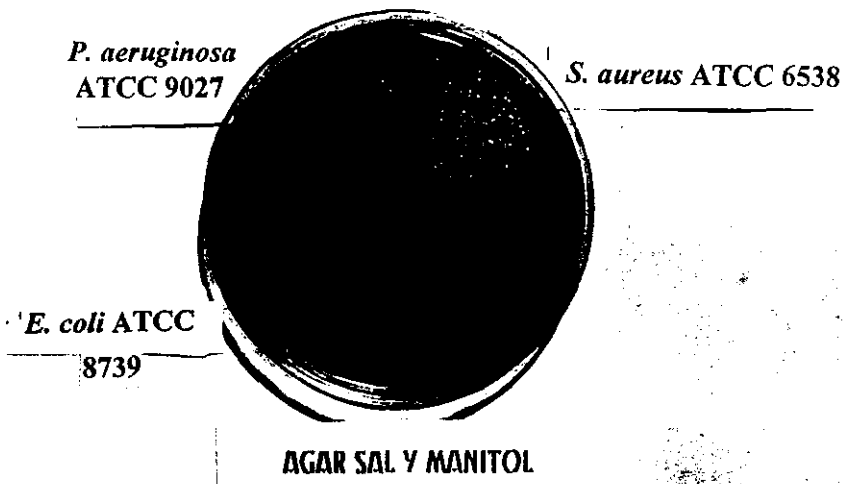


Figura No. 20. Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar sales manitol con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

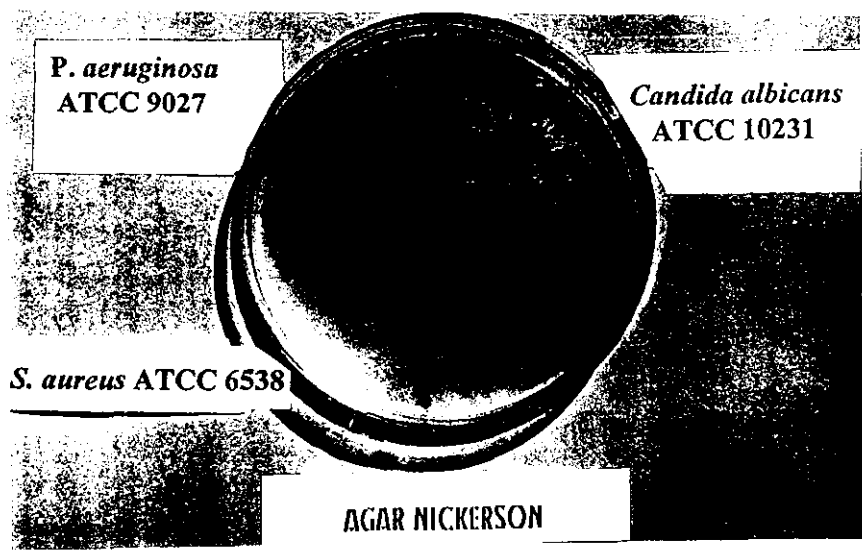


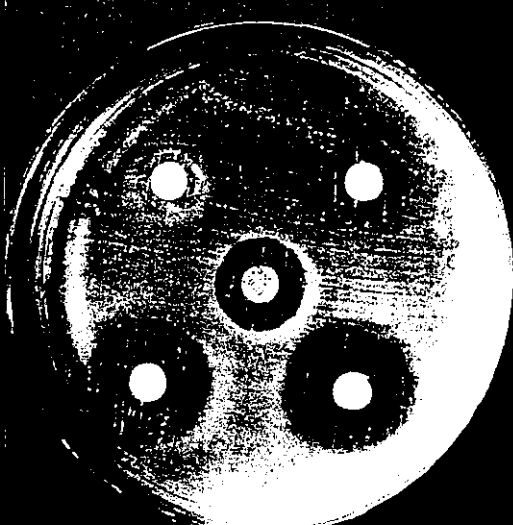
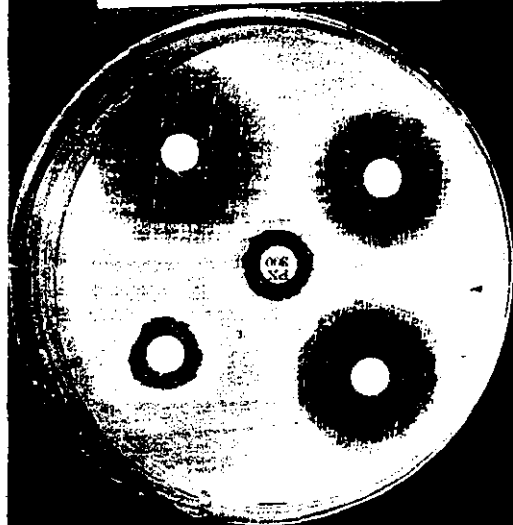
Figura No. 21. Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento en agar Nickerson con *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

**Cuadro No. 6.** Resultados de los ensayos en agar **Mueller-Hinton** para la realización de antibiogramas, los medios que se utilicen dependerá del antibiótico a evaluar y del m.o. que se está empleando.

<b>Diámetro del halo de inhibición en mm.</b>			
<b>Cepas de ensayo</b>			
<b>DISCO DE ENSAYO</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>	<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 8739</b>
<b>Gentamicina 10 µg</b>	20	22	21
<b>Eritromicina 15 µg</b>	13	10	16
<b>Polimixina B 300 UI</b>	12	18	16
<b>Ampicilina 10 µg</b>	24	-	10
<b>Sulfametoxazol 23.75 µg + Trimetoprim 1.25 µg</b>	28	-	26

*S. aureus* ATCC 6538

*E. coli* ATCC 8739



**AGAR MUELLER HINTON**

**AGAR MUELLER HINTON**

Figura No. 22. Ensayo de susceptibilidad de antibióticos en agar Mueller-Hinton. La zona de inhibición es el área donde no se observa crecimiento, ya que el antibiótico está presente en concentración inhibitoria para los m.o. susceptibles.

Junto con la evaluación cualitativa (Respuesta Bioquímica) se realizó una evaluación cuantitativa (Cuenta Bacteriana) la cual consistió en el conteo de las colonias de m.o. en los medios de cultivo diferenciales y selectivos, siendo comparada esta cuenta bacteriana con la obtenida en un medio de referencia el cual no debe tener presente en su composición sustancias inhibitorias; dichos resultados se muestran en los siguientes cuadros (7 y 8).

Cuadro No.7. Resultados cuantitativos experimentales de los medios de cultivo probados.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	SEMANAS DEL MES DE ENERO				
		Semana basal	1	2	3	4
Agar sales manitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	99/123/107	114/131/126	108/103/111	131/124/114	120/133/111
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0
Agar brofacin	<i>Escherichia coli</i>	66/58/63	47/51/59	48/56/63	53/67/50	65/69/66
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	135/141/134	150/161/155	171/163/158	170/161/167	176/179/180
	<i>Candida albicans</i>	93/101/99	117/111/120	94/103/95	99/105/113	95/111/119
Agar EMS (media-azul de metileno)	<i>Escherichia coli</i>	50/54/57	46/49/56	45/52/61	48/51/55	59/63/68
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	144/153/150	140/155/163	164/153/151	159/153/164	170/169/153
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0
Agar salmonella-shigella	<i>Salmonella enteritidis</i>	38/41/50	48/39/53	36/49/59	31/52/48	35/56/44
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56/61/68	67/53/72	78/51/57	69/71/57	66/73/54
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0
Agar verde brillante	<i>Enterobacter aerogenes</i>	107/115/120	97/112/107	83/93/95	114/121/118	111/118/113
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	133/142/151	149/162/157	170/163/169	165/172/169	178/167/184
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0
Agar chromocult	<i>Escherichia coli</i>	82/67/72	85/71/68	81/68/73	84/69/75	71/75/89
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59/67/61	58/70/65	63/69/73	61/68/78	61/68/78
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0
Agar Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i>	120/114/121	135/140/138	118/123/131	140/134/125	133/141/121
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0
Agar Nickerson	<i>Candida albicans</i>	86/77/80	95/90/83	88/93/92	81/93/91	75/81/79
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0
Agar casoy	<i>Staphylococcus aureus</i>	131	129	141	138	140
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	183	179	181	175	183
	<i>Escherichia coli</i>	75	73	69	72	83
	<i>Candida albicans</i>	123	129	128	138	131
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	122	119	101	131	128
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	121	101	119	131	119
	<i>Salmonella enteritidis</i>	85	89	90	87	86

0-12: Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento semasaal

0-190: Número de colonias contadas de cada microorganismo en cada uno de los cuadrantes para cada medio de cultivo probado, realizado por triplicado



Continuación...

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	SEMANAS DEL MES DE FEBRERO			
		5	6	7	8
Agar sales manitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	107/123/134	99/121/109	81/109/117	79/108/103
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
Agar brotacin	<i>Escherichia coli</i>	56/60/58	67/61/65	59/51/69	58/49/55
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	183/186/171	163/168/170	173/177/181	160/165/174
	<i>Candida albicans</i>	99/103/115	95/102/97	95/107/101	97/104/113
Agar EMB (fosfina-azul de metileno)	<i>Escherichia coli</i>	17/51/60	53/61/58	65/59/64	50/48/57
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	172/161/163	155/164/169	172/158/174	151/168/159
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar salmonella-shigella	<i>Salmonella enteritidis</i>	59/41/47	38/43/57	42/46/51	40/47/43
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74/62/49	67/58/63	54/66/59	51/63/57
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar verde brillante	<i>Enterobacter aerogenes</i>	89/93/83	110/117/125	87/96/99	105/111/123
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	185/173/169	161/170/167	175/171/180	159/161/173
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar chromocult	<i>Escherichia coli</i>	74/78/83	79/77/87	83/71/81	84/73/89
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63/69/77	68/71/65	66/68/73	61/64/69
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i>	118/131/138	112/123/118	98/110/129	89/120/117
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
Agar Nickerson	<i>Candida albicans</i>	81/93/87	82/89/85	87/71/80	77/81/87
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar casos	<i>Staphylococcus aureus</i>	131	129	138	123
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	190	175	182	175
	<i>Escherichia coli</i>	69	71	81	74
	<i>Candida albicans</i>	129	123	122	122
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	110	131	104	129
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	129	122	138	129
	<i>Salmonella enteritidis</i>	88	84	89	84

0-12: Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento semanal

0-190: Número de colonias contadas de cada microorganismo en cada uno de los cuadrantes para cada medio de cultivo probado, realizado por triplicado

Continuación...

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	SEMANAS DEL MES DE MARZO			
		9	10	11	12
Agar sales manitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	131/114/126	83/79/81	101/107/114	91/102/103
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
Agar brolactin	<i>Escherichia coli</i>				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
	<i>Candida albicans</i>				
Agar EMB (Eosina-azul de metileno)	<i>Escherichia coli</i>	53/49/47	51/46/51	63/51/70	45/54/58
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	145/151/163	154/143/136	139/146/153	162/135/151
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar salmonella-shigella	<i>Salmonella enteritidis</i>	37/41/45	33/51/39	38/43/35	31/42/33
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59/54/61	51/59/55	58/50/49	53/47/51
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar verde brillante	<i>Enterobacter aerogenes</i>	113/120/110	118/104/121	98/109/102	75/81/90
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	162/164/178	156/149/141	161/149/141	145/151/149
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar Chromocult	<i>Escherichia coli</i>				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
	<i>Staphylococcus aureus</i>				
Agar Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i>	149/125/138	47/89/95	118/121/125	105/117/113
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	0	0
Agar Nickerson	<i>Candida albicans</i>	69/75/81	65/71/82	71/81/75	78/71/82
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
Agar casoy	<i>Staphylococcus aureus</i>	141	122	121	129
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	181	179	181	190
	<i>Escherichia coli</i>	70	71	81	73
	<i>Candida albicans</i>	121	128	130	138
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	128	131	119	101
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	140	113	138	129
	<i>Salmonella enteritidis</i>	90	92	82	83

0-12: Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento semanal.

0-190: Número de colonias contadas de cada microorganismo en cada uno de los cuadrantes para cada medio de cultivo probado, realizado por triplicado.

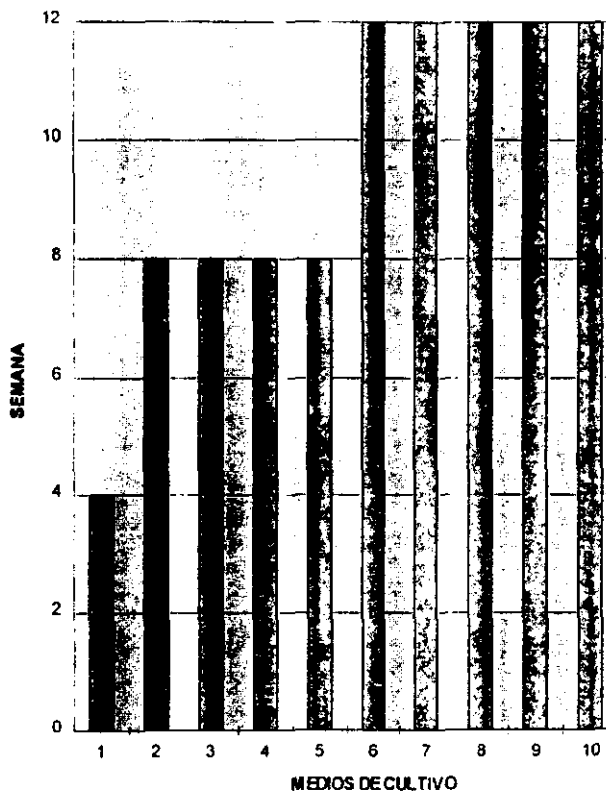
Cuadro No.8. Valores promedio de los resultados cuantitativos experimentales de los medios de cultivo probados.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	SEMANAS DE ENERO A MARZO												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Agar sales manitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	110	124	107	123	121	121	110	102	97	124	81	107	94
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar bromocresol	<i>Escherichia coli</i>	62	52	56	57	67	58	64	60	54				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	143	155	164	166	178	180	167	177	166				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	98	97	97	106	108	106	98	101	105				
Agar EMB (Eosina- Azul de Metileno)	<i>Escherichia coli</i>	54	50	53	51	63	53	57	63	52	50	50	61	52
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	149	155	156	159	164	165	163	168	159	153	144	146	149
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar salmonella shigella	<i>Salmonella enteritidis</i>	43	47	48	44	45	49	46	46	43	41	41	39	35
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62	64	62	66	64	62	63	60	57	58	55	52	50
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar verde brillante	<i>Enterobacter aerogenes</i>	114	105	90	118	114	88	117	94	113	114	114	103	82
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	142	156	167	169	176	177	166	175	164	168	149	150	148
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar chromocult	<i>Escherichia coli</i>	74	71	65	67	78	62	81	78	68				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62	64	68	69	69	67	68	69	65				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Agar Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i>	118	118	124	133	132	129	118	112	109	137	94	121	112
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar Nickerson	<i>Candida albicans</i>	81	89	91	88	78	87	85	79	82	75	73	76	77
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agar castoy	<i>Staphylococcus aureus</i>	131	129	141	138	140	131	129	138	123	141	122	121	129
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	183	179	181	175	183	190	175	182	175	181	179	181	190
	<i>Escherichia coli</i>	75	73	69	72	83	69	71	81	74	70	71	81	83
	<i>Candida albicans</i>	123	129	121	138	131	129	123	122	129	121	128	130	138
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	122	119	101	131	128	110	131	104	122	128	131	119	101
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	121	101	119	131	119	129	122	138	129	140	113	138	129
<i>Salmonella enteritidis</i>	83	84	90	87	86	8	84	89	84	90	92	82	83	

0-12: Ensayo de promoción e inhibición de crecimiento semanal.

0-190: Número de colonias (UFC), de cada m.o. en cada uno de los cuadrantes para cada medio de cultivo probado, realizado por triplicado.

**GRAFICA No. 1 TIEMPO DE VIDA OPTIMA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS.**



**1. agar sangre**

**2. agar chocolate**

**3. agar Mueller Hinton**

**4. agar brovacin**

**5. agar chromocult**

**6. agar sales manitol**

**7. agar Chapman**

**8. agar verde brillante**

**9. agar salmonella-shigella**

**10. agar Nickerson**

## V.2 Análisis estadístico.

De los resultados obtenidos (Cuadro No. 8), se realizó el análisis estadístico, con ayuda del método de "t" de Student con un 99% de confianza, tomándose como ejemplo los valores de recuperación del medio **agar sales manitol** y **agar casoy** (medio de referencia).

Para lo cual se plantearon las siguientes hipótesis:

$H_0: \mu_d = 0$  (A = B) La recuperación bacteriana es la misma en ambos medios.

$H_A: \mu_d < 0$  (A < B) La recuperación bacteriana no es la misma en ambos medios.

Regla de decisión : Si  $t_c > -t_c$  entonces aceptar  $H_0$

Medio: **agar sales manitol** ( $X_A$ )

**agar casoy** ( $X_B$ )

m.o. empleados: *Staphylococcus aureus* ( $X_{A1}$ )

*Pseudomonas aeruginosa* ( $X_{A2}$ )

*Escherichia coli* ( $X_{A3}$ )

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

*Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli*.

SEMANA	X <sub>A1</sub>	X <sub>B</sub>	d	d <sup>2</sup>	X <sub>A2</sub>	X <sub>B</sub>	d	d <sup>2</sup>	X <sub>A3</sub>	X <sub>B</sub>	d	d <sup>2</sup>
0	110	131	-21	441	0	183	-183	33489	0	75	-75	5625
1	124	124	-5	25	0	179	-179	32041	0	73	-73	5229
2	107	141	-34	156	0	181	-181	32761	0	69	-69	4761
3	123	138	-15	225	0	175	-175	30625	0	72	-72	5184
4	121	140	-19	361	0	183	-183	33489	0	83	-83	6889
5	121	131	-10	100	0	190	-190	36100	0	69	-69	4761
6	110	129	-19	361	0	175	-175	30625	0	71	-71	5041
7	102	138	-36	1296	0	182	-182	33124	0	81	-81	6561
8	47	123	-26	676	0	175	-175	30625	0	74	-74	5476
9	124	141	-17	209	0	181	-181	32761	0	70	-70	4900
10	81	122	-41	1601	0	179	-179	32041	0	71	-71	5041
11	107	121	-14	196	0	181	-181	32761	0	81	-81	6561
12	94	129	-35	1225	0	190	-190	36481	0	83	-83	6889
			-292	8032			-1988	426923			-972	72918

Cuadro No. 9. Tratamiento estadístico del medio agar sales manitol, empleando la prueba "t de Student".

$\alpha=1\%$      $\alpha=0.01\%$

$gl=12$      $gl=n-1=13-1=12$

$t_r=2.681$

*Staphylococcus aureus*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Escherichia coli*

$\bar{d} = -\frac{\sum d}{n} = -22.46$

$\bar{d} = -152.92$

$\bar{d} = -74.77$

$S_d = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n} - \frac{(\sum d)^2}{n}} = 11.08$

$S_d = 101.20$

$S_d = 4.49$

$S_{\bar{d}} = \frac{S_d}{\sqrt{n}} = 3.07$

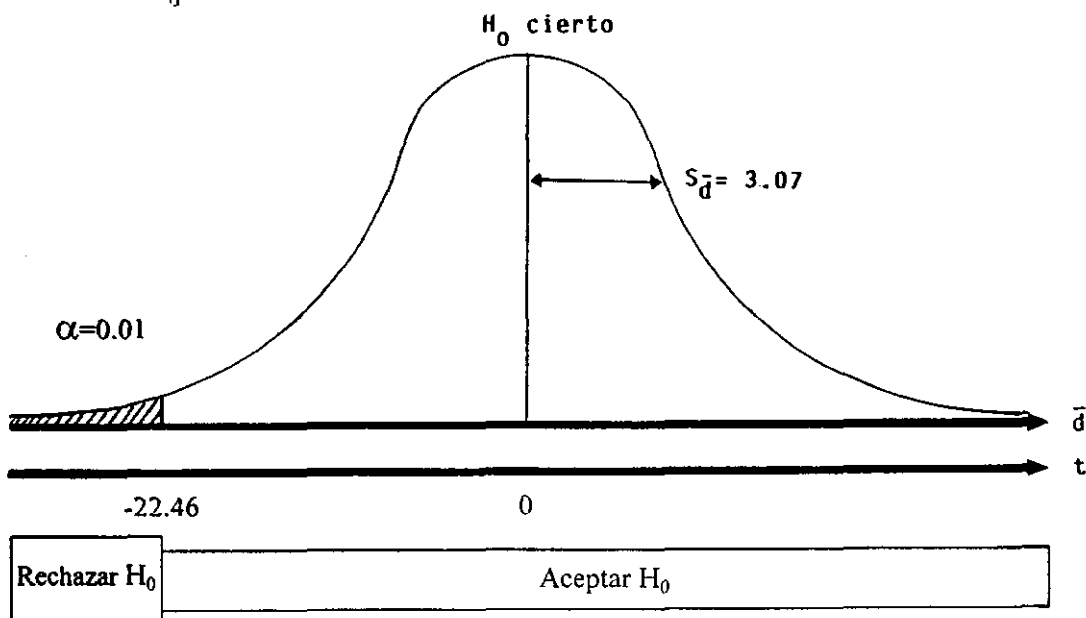
$S_{\bar{d}} = 28.06$

$S_{\bar{d}} = 1.25$

$t_c = -\frac{\bar{d}}{S_{\bar{d}}} = -7.31$

$t_c = -5.44$

$t_c = -60.0$



Gráfica No.2. Región de aceptación y rechazo para el ejemplo del agar sales manitol.

En el cuadro No. 10 se resumen los valores de las medias, desviaciones estándar, errores estándar muestrales y las “t” calculadas para los medios de cultivo probados, cuyo cálculo fué idéntico al planteado como ejemplo (agar sales manitol).

Cuadro No.10. Resultados del tratamiento estadístico de los medios de cultivo evaluados..

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	$\bar{d}$	$S_d$	$S_{\bar{d}}$	$t_c$
Agar sales manitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	-22.46	11.08	3.07	-7.31
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-152.92	101.20	28.06	-5.44
	<i>Escherichia coli</i>	-74.77	4.49	1.25	-60.00
Agar brolactin	<i>Escherichia coli</i>	-15.22	4.82	1.61	-9.84
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-14.11	11.45	3.82	-3.70
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-31.55	7.20	2.40	-13.16
Agar EMB(Eosina azul de metileno)	<i>Escherichia coli</i>	-18.15	10.18	2.82	6.43
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-25.08	9.29	2.58	-9.74
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-1.31	7.24	2.01	-65.66
Agar salmonella shigella	<i>Salmonella enteritidis</i>	-42.46	5.08	1.41	-30.16
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-121.46	7.98	2.1	-54.92
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-131.77	7.24	2.01	-65.66
Agar verde brillante	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-13.92	3.97	1.10	-12.65
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-19.0	4.89	1.36	-13.98
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-131.77	7.24	2.01	65.66
Agar chromocult	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-4.44	2.13	0.71	-6.27
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-113.26	5.7	1.90	-59.73
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-133.33	6.14	2.05	-65.10
Agar Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i>	-12.77	7.82	2.17	-5.88
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-181.08	4.89	1.36	-133.52
	<i>Escherichia coli</i>	-74.76	5.34	1.48	-50.47
Agar Nickerson	<i>Candida albicans</i>	-46.23	8.32	2.30	-20.01
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-181.08	4.89	1.36	-133.52
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-131.77	7.24	2.01	-65.67

- $\bar{d}$  Media de las diferencias
- gl Grados de libertad
- $S_d$  Desviación estándar de las diferencias
- $S_{\bar{d}}$  Error estándar muestral de la distribución de frecuencias
- $t_c$  Parámetro estadístico calculado
- $t_t$  Valor registrado en tablas estadísticas (t de student)
- $X_A$  Agar sales manitol
- $X_{A1}$  *Staphylococcus aureus*
- $X_{A2}$  *Pseudomonas aeruginosa*
- $X_{A3}$  *Escherichia coli*
- $X_B$  Agar casoy
- $X_{B1}$  *Staphylococcus aureus*
- $X_{B2}$  *Pseudomonas aeruginosa*
- $X_{B3}$  *Escherichia coli*
- $\alpha$  Nivel de significancia (region de rechazo)



## *VI. Discusión.*

Para asegurar el funcionamiento de los medios de cultivo utilizados en cualquier estudio, es necesario la validación de dichos medios.

En el presente estudio se evaluaron medios de cultivo: ricos, diferenciales y selectivos. utilizando en algunos de ellos la técnica de promoción e inhibición de crecimiento "Miles & Misra", usando m.o. ATCC y NCTC.

La validación mediante la promoción de crecimiento se hizo necesaria la utilización de diluciones como  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , para detectar la sensibilidad de los medios de cultivo, además esto se sustento con resultados de trabajos anteriores. En algunos reportes se menciona que la cuenta bacteriana debe oscilar entre 100 o menos UFC, otros mencionan que esta depende del m.o. , es decir, de sus características morfológicas en el medio de cultivo evaluado (forma y tamaño), pero que permita el recuento de estas.(3,4,14,15)

Nosotros, tomando como base lo anterior y empleando las diluciones ya mencionadas, obtuvimos una cuenta bacteriana que oscila entre 50 y 190 ufc, en nuestras condiciones de trabajo, siendo estas : equipo (carencia de espectrofotometro), material biológico (m.o.), tipo de medio evaluado (selectivo, diferencial y rico), la preparación de la suspensión, diluciones y volumen del inóculo.

Los m.o. empleados en las pruebas de promoción de crecimiento, deben formar parte de la colección de cada laboratorio y estar identificadas con la clave del cepario de procedencia. La selección de ellos depende del tipo de cultivo a evaluar, como por ejemplo los medios de cultivo diferenciales como el agar EMB deben probarse con un m.o. que fermenta lactosa (*Escherichia coli*), uno que no la fermenta (*Pseudomonas aeruginosa*), y otro que sea inhibido (*Staphylococcus aureus*). En el caso de los medios selectivos se deben emplear m.o. específicos para estos, por ejemplo *Staphylococcus aureus*, se probó en agar sales manitol y como m.o. que no debió crecer *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, cabe señalar que en medios que puedan presentar otras características, es importante considerarlo, como en este caso era importante utilizar un m.o. que diera reacción negativa a la fermentación de manitol, como es el *Staphylococcus epidermidis*, esto no se realizó por no considerarlo en un principio.

Para los medios ricos como el agar brolacín se utilizó un m.o. que fermentara lactosa: *Escherichia coli*, otro que no la fermentara: *Pseudomonas aeruginosa* (33).

En los medios ricos, diferenciales y selectivos se debe observar la intensidad de desarrollo de los m.o. deseables así como las características de sus colonias (tamaño, color y forma), y el vire de color del medio de cultivo.

En los medios ricos como el **agar sangre** y **chocolate** se evaluó exclusivamente el desarrollo de m.o. exigentes, así como la producción de enzimas hemolíticas, que nos orientan a m.o. determinados (**agar sangre**) y m.o. dependientes de factores (factor V y X) como es el *Haemophilus influenzae* tipo "b" (**agar chocolate**). Estos medios son de primera elección para la recuperación de m.o. exigentes como son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Gardnerella vaginalis*.

Para determinar si un medio de cultivo es útil para los fines que se requiere, es necesario que cumpla con la **Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSAI-1993**, publicado en el diario oficial de los Estados Unidos Mexicanos, que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo.

Para el **control de calidad** en la preparación de medios de cultivo, se realizaron registros de temperatura del refrigerador, donde se almacenaron los medios de cultivo durante el tiempo en el que se realizó el proyecto, así como la temperatura de la estufa (anexos). El control de este parámetro fue importante para la rastreabilidad de la esterilidad de los medios, el tiempo que se dejó incubando fue de 48 hrs. Debido a la poca viabilidad de anaquel, puesto que se requería liberar el producto en el tiempo establecido. Sin embargo, es importante mencionar que se debe mantener el producto 7 días consecutivos en incubación para observar la completa esterilidad del medio (hongos, esporas).

Otro parámetro importante es el **control de calidad** del agua, empleada para la preparación de los medios de cultivo y dar al m.o. las condiciones óptimas para la adecuada recuperación, aislamiento, identificación y realización de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, el agua utilizada en este trabajo era desmineralizada proporcionada por la empresa ATYDE (el **control de calidad** realizado es supervisado por la misma empresa).

En cuanto a la estandarización de la balanza granataria, este se debe realizar con ayuda de pesas estándar (por triplicado), para corroborar que la cantidad pesada es la correcta al preparar cada uno de los medios de cultivo.

De los resultados obtenidos. se trataron estadísticamente, utilizando la prueba de "t" de Student con muestras apareadas, para comparar la recuperación bacteriana durante un período de tiempo determinado (13 semanas), obteniéndose de éste, valores como son media, desviación estándar, error estándar muestral y  $t_c$  (Cuadro No.10) para cada uno de los medios diferenciales, selectivos y ricos evaluados.

La regla de decisión nos dice que al comparar el valor  $t_c$  (de los datos experimentales, con un valor  $t_t$  (de una distribución teórica tabulada en función del nivel de significancia elegido), se rechaza la hipótesis  $H_0$  si  $t_c$  es menor que - 2.681 (para los medios que duraron 13 semanas).

Para los medios que tuvieron menor tiempo de estabilidad (prueba de esterilidad), el valor de  $t_t$  , para rechazar  $H_0$  es de -2.896.

En la tabla No. 5 se comparan los resultados de recuperación de los medios selectivos y diferenciales con respecto a un medio de control o referencia, en estudios recientes (45), el medio de referencia es **agar Mueller-Hinton**, con un inóculo conocido ( $3 \times 10^8$  UFC/mL) del m.o. a probar, obteniendo comparaciones confiables. El presente proyecto se fundamentó en la forma de preparar las suspensiones de los m.o., en donde estas se igualan a la turbidez del tubo No. 0.5 del nefélometro de MacFarland y posteriormente de esta suspensión se realizan diluciones.

Para poder comprobar lo anterior, se usaron los valores de  $t_c$ , donde se observaron resultados elevados y desplazados al lado negativo de la aproximación a la campana de Gauss, por lo que se toma la decisión de rechazar  $H_0$ .

En un principio se considero la evaluación del **agar Mac Conkey**, pero esto no fue posible, debido a que este no permitía observar la morfología colonial de *Escherichia coli*, la cual serviría como control para observar la correcta funcionalidad del medio, observándose como colonias irregulares, planas y secas, siendo que estas no son las características de dicho m.o. en este medio. Por lo que se decidió no incluirlo en la evaluación. También, el **agar Rambach** no se evaluó, ya que en su preparación hubo un error, debido a que en el marbete no mencionaba el volumen exacto de los viales y la relación de estos con el medio deshidratado. En cuanto a este medio, era importante su evaluación, ya que un gran número de estudios reportan que posee una alta especificidad y sensibilidad, además de ser un medio de reciente innovación.

Por otra parte la correcta elección del medio de cultivo favorece la recuperación del microorganismo que causa la enfermedad como lo reportan en diversos estudios (1, 17, 25, 29, 43, 45), donde se sugiere una adecuada elección para un diagnóstico confiable y rápido en el primoaislamiento (toma de muestra), basándose en las características bioquímicas del microorganismo patógeno, como sucede por ejemplo, en el crecimiento de enterobacterias y de coliformes que son productores de  $\beta$ -Glucoronidasa (*Escherichia coli*) y 5- $\beta$ -D-Galactosidasa (coliformes) y que en **agar chromocult** producen colonias de color característico por la presencia de los sustratos 5-Bromo-3-indol- $\beta$ -D-glucurónido (GLUagar) y 5-bromo-3-indol- $\beta$ -D-galactósido respectivamente. Actualmente se han implementado nuevos medios de cultivo, como lo es el **agar Rambach**, para la recuperación de salmonellas, ya que, en estudios (19) se hace referencia de que éste es un medio con un alta especificidad y sensibilidad, por el color característico (colonias rojas) a diferencia de otros, como lo son el grupo de coliformes (colonias azules, verdes, violetas o incoloras), esto lo comprobó comparando dicho medio con SM-ID (bioMeriux) y Hektoen Enteric (Becton-Dickinson). Encontrando que de 504 muestras diarreicas sembradas en dichos medios, la recuperación más alta se presentó en **agar Rambach** (98%), seguido de SM-ID(85%) y por último Hektoen Enteric (79%), aunque en nuestro caso no fué posible su evaluación.(19)

También es conveniente mencionar que en otros estudios (41) se innovo que el medio agar **MacConkey** además de ser diferencial lo hacen selectivo, adicionándole sustancias como son 6-benzoil-naftol-fosfato (actividad de fosfatasa), pequeñas cantidades de dextrosa y azul de anilina. obteniendo mejores resultados para la recuperación de enterobacterias lactosa-negativas y glucosa-fermentadoras de otras lactosa-negativas y glucosa-no fermentadoras. De forma similar en otros estudios reportados (25, 41), además de que emplean las mismas sustancias para hacer selectivo el agar MacConkey lo comparan con agar **MacConkey** pero adicionándole cristal violeta, justificandose la factibilidad de modificar los medios de cultivo, ampliando su aplicación y, por ende su uso (Diagnóstico clínico e Industrial).

Actualmente se ha mejorado la capacidad de recuperación de estos complementándolos con diversas sustancias o incrementando la concentración de algunos de sus componentes. (2, 30, 33, 47)

## *VII. Conclusiones*

- ❖ La estabilidad de los medios de cultivo en placa es diferente, esto depende de su composición selectivos, diferenciales y ricos), de la esterilización del medio, del área de trabajo, almacenamiento, y muy en especial de los cuidados por parte del personal, durante el proceso de preparación y específicamente en la esterilización del medio y el vaciado del medio a las placas de Petri.
  
- ❖ El correcto mantenimiento del cepario permitió un confiable **control de calidad** de los medios de cultivo, incluyéndose m.o. tanto exigentes como no exigentes. Un cepario adecuadamente mantenido, permite observar la funcionalidad bioquímica del medio de cultivo, así como, la morfología colonial en placa, importando que éste sea selectivo, diferencial, rico o enriquecido.
  
- ❖ El presente trabajo servirá de apoyo como un “instructivo para elaborar un manual de procedimientos para la preparación de medios de cultivo en placa”, así como también para la realización del **control de calidad** de los mismos.



## Sugerencia

Cabe resaltar la conveniencia de que la FES-Cuautitlán, genere dentro de sus programas de servicio al exterior, uno basado en la comercialización de medios de cultivo preparados en placa, dirigido a pequeños y grandes laboratorios que los requieran. El apoyo por parte de la Universidad consistiría en dar condiciones de trabajo y respaldo económico, permitiendo de este modo la generación de ingresos a está, así como también dará oportunidad a estudiantes realicen su Servicio Social.

### VIII. Referencias.

1. Alonso, J.L.; Amoros, Y.; Chong, S.; y Ganelik, H. 1996. Quantitative determination of *Escherichia coli* in water using CHROMagar registered. J. Microbiol. Methods. **25**:309-315.
2. Alvarez, M.C.; y Mendoza, E.S. Manual básico de bacteriología. Edit. UNAM. México, D.F., 1994. pp.21-57.
3. Avila, V. G. Actividad profesional de una Químico Farmacéutico Biólogo en el área de ventas de una empresa transnacional. Tesis. Químico Farmacéutico Biólogo. UNAM. FES-Cuautitlán. 1997.
4. Avilés, M. G.; y Zamudio, C. Análisis bacteriológico de agua embotellada comercial. Tesis. Químico Farmacéutico Biólogo. UNAM. FES-Cuautitlán. 1996.
5. Bailey. S. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Panamericana. Séptima edición. México, D.F., 1989. Pp.65-68, 118-132.
6. Baird, R.M.; y Lee, W.H. 1995. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Food. Microbiol. **26**:15-24.

7. Baumgartner, C.; Freydiere, A.M.; y Gille, Y. 1996. Direct Identification and Recognition of Yeast Species from Clinical Material by Using Albicans ID and CHROMagar Candida Plates. *J. Clin. Microbiol.* **34**:454-456.
8. Bennington, J. L. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina 1991, pp.50-51, 872-875.
9. Brock, D., T. Microbiología. Edit. Prentice-Hall Hispanoamericana. Cuarta edición. México, D. F., 1993. Pp. 131-138, 360-363.
10. Chapman, G. H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of *Staphylococcus*. *J. Bact.* **50** : 201-203.
11. Chapman, G. H. 1946. A single culture medium for selective isolation of plasma-coagulating *Staphylococcus* and for improved testing of chromogenesis, plasma coagulation, mannitol fermentation and stone reaction. *J. Bact.* **51** : 409-410.
12. Chapman, G. H. 1948. An improved Stone Medium for the isolation and testing for food-poisoning *Staphylococcus*. *Food. Res.* **13** : 100-105.
13. Chapman, G. H. 1952. A simple method for marking multiple tests of a microorganism. *J. Bact.* **63** : 147.

14. Collins, C.H., Lyne, P.M., Crange, J.M. Microbiological Methods. Edit. Butterworth & Hernemann. London, Inglaterra, 1995. Séptima edición. pp. 90-2.
15. Corry, J. E. Quality Assurance and Quality Control of Microbiological culture Media Proceedings of the Symposium held on 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> September in Calas de Mallorca 1979. Edit. E. Merck, Darmstadt. División Diagnóstica. London, Inglaterra, 1980. Pp.21-37.
16. Cox, M., J. 1993. Lysine-Mannitol-Glycerol Agar, a Medium for the isolation of *Salmonella spp.*, including *Salmonella typhi* and Atypical Strains. Appl. Environ. Microbiol. 59:2602-2606.
17. Dalet, F.; Segovia, T. 1995. Evaluation of a new agar in Uricult-trio for rapid detection of *Escherichia coli* in Urine. J. Clin. Microbiol. 33: 1395-1398.
18. De la Cruz, R. 1982. Conservación de microorganismos (observaciones de laboratorio). Infectología 8 : 519-522.
19. Dusch, H.; y Altwegg, M. 1993. Comparison of Rambach Agar, SM-ID medium, and Hektoen Enteric Agar for Primary Isolation of Non-*typhi Salmonella* from Stool Samples. J. Clin. Microbiol. 31:410-412.

20. Fritz, J. S. Química Analítica Cuantitativa. Edit. Limusa. Tercera edición. México, D.F.: 1979. Pp. 604-607.
21. Geiss, H.K.; Geiss, M.; Heller, J.; Sonntag, A.K.; y Sonntag, H.G. 1995. Evaluation of five different agar media for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria meningitidis*. Med. Microbiol. Lett. 4:263-267.
22. Gini, G. A. Manual de procedimientos para la identificación de las bacterias con importancia clínica. Edit. Merck. Guatemala, Guatemala, 1993. Pp. 93.
23. Girál. C., y Castañeda, P. Manual de Validación de Medios de cultivo de SSA. Edit. SSA. México, D.F., 1990. Pp. 12-15.
24. Hawley, P. M., McCormick, A., y Simpson, R. A. 1986. Selective and differential medium for the primary isolation of members of the *Proteae*. J. Clin. Microbiol. 23 : 600-603.
25. Hengstler, K.A.; Hammann, R.; y Fahr, A.M. 1997. Evaluation of BBL CHROMagar Orientation Medium for detection and Presumptive Identification of Urinary Tract Pathogens J. Clin. Microbiol. 35:2773-2777.

26. Holt-Harris, A. Teague, D. A. 1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from the stools. *J. Infect. Dis.* **18** : 596-600.
27. Identification and Susceptibility testing. Manual Methods. Edit. BioMérieux . Marcy l'Etoile, Francia, 1996.
28. Jenkins, R. D. ; Stevens, S. L. Craythorn, J. M. ; Thomas, T. W. ; Guinana, M. E. ; Masten, J. M. 1985. False susceptibility of enterococci to aminoglycosides with blood-enriched Mueller- Hinton agar for disk susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* **22** :369-374.
29. Kodaka, H.; Ishikawa, M.; Iwata, M.; Kashitani, F.; Mizouchi, S.; y Yamaguchi., K. 1995. Evaluation of New Medium with Chromogenic Substrates for Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Urine Samples. *J. Clin. Microbiol.* **33**:199-201.
30. Koneman, E.,W.; Allen, S.D., et al. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1992. Tercera edición. pp. 157-9.
31. Lennette, E.H., et al. Manual de Microbiología Clínica. Edit. Medica Panamericana. México, D.F. Cuarta edición. pp.1304-9.

32. Mac Faddin, J. Identificación bioquímica de bacterias de importancia médica. Edit. Williams & Wilkins Company. México, D.F., 1989, pp.61-204.
33. Medios de Cultivo Merck 1994. Merck de México, S.A. Apartado 8619, 0600 México 1 D.F.
34. Medios de Cultivo (Criterios de Calidad) 1990. Merck de México. S.A. Apartado 8619, 0600 México 1, D.F.
35. Melhus, A. 1996. Juhlin's medium, a selective and differential medium for gram-negative rods. *Med. Microbiol. Lett.* 5:74-81.
36. Mueller, H. J. Y Hinton, J. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 48 : 330-333.
37. Nickerson, W. J. 1953. Reduction of inorganic substances by yeast I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *J. Infect. Dis.* 93 : 43-46.
38. Ollis, G.W.; Rawluk, S.A.; Schoonderwoerd, M.; y Schipper, C. 1995. Detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media. *J.Rev. Vet. Can.* 36:619-623.

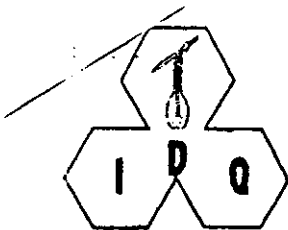
39. Perea, M. L.; Stockbauer, K.E.; Pan, X.; Cravioto, A.; y Musser, J.M.1997. Characterization of Group A *Streptococcus* Strains Recovered from Mexican Children with Pharyngitis by Automated DNA Sequencing of Virulence-Related Genes: Unexpectedly Large Variation in the Gene (*sic*) Encoding a Complement-Inhibiting Protein. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3220-3224.
40. Pineda, R., B. 1995. Síntesis bibliográfica de *Gardnerella vaginalis* 1983-1994. Tesis. UNAM. FES-Cuautitlán. pp.3-4.
41. Pompei, R.; Berlutti, F.; Thaller, M.; Ingranni, A.; y Satta, G. 1996. A modified MacConkey medium which allows the recognition of *Enterobacteriaceae* from other Gram-negative bacteria on primary culture plates. **25**: 271-278.
42. Rapola, S.; Salo, E.; Kliski, P.; Leinonen, M.; y Takala, A.K. 1997. Comparison of four different sampling methods for detecting pharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in children. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1077-1079.
43. Ruiz, J.; Nuñez, L.; Lorente, Y.; Pérez, J.; Simarro, E.; y Gómez, J. 1996. Performance of six culture media for isolation of *Salmonella* species from stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:922-926.



44. Ruiz, J.; Nuñez, L.; Lorente, Y.; Pérez, J.; y Gomez, J. 1996. Comparison of five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. *J. Clin. Microbiol.* **34**:686-688.
45. Ruiz, J.; Nuñez, L.; Díaz, J.; Sempere, M.A.; Gómez, J.; y Usera, M.A. 1996. Comparison of media for the isolation of lactose-positive *Salmonella*. *J. Appl. Bacteriol.* **81**:571-574.
46. Sato, M.; Sánchez, P.; Alves, M.; Stoppe, N.; y Martins, M. 1995. Evaluation of culture media for *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* recovery in swimming pools. *Water-Res.* **29**:2412-2416.
47. Scriban, R. Biotecnología. Edit. El Manual Moderno. México, D.F.1985. Primera edición. pp 52-5.
48. Schaechter, J. Microbiología: Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Edit. Médica-Panamericana. Segunda edición. México, D. F., 1994. pp. 952-955.
49. Sousa-Pinto, Y.; Lewis, R.; y Polne-Fuller, M. 1995. The effect of phosphate concentration on growth and agar content of *Gellidium robustum* (*Gellidiaceae*, *Rhodophyta*) in culture. *Hydrobiologia.* **326-327**: 437-443.

50. The United States Pharmacopeia. Edit. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Vigésimo segunda edición (XXII). Rockville, MD. E. U., 1989. pp. 1484.
51. The VWR scientific products Catalog. Edit. Merck VWR Scientific Products Corporation. Nueva York, USA. , 1997. Pp. 1809.
52. Turng, B.; Guthmiller, J.; Minah, G.; y Falkler, W.A. 1996. Development and evaluation of a selective and differential medium for the primary isolation of *Peptostreptococcus micros*. Oral. Microbiol. Immunol. **11**:356-361.
53. Wallace, J., S.1996. The use of selective and differential agars in the isolation of *Escherichia coli* 0157 from dairy herds. J. Appl. Bacteriol. **81**:663-668.
54. Wayne, D. Bioestadística. Edit. Limusa. México, D, F, 1995. pp. 183-186, 245-256.

# *Anexos*



IN **GRUPO IDQ, S.A. DE C.V.** ICO

18 ORIENTE No. 2831 COL. HUMBOLDT C. P. 72370 TEL. 35-17-15  
 CALLE 18 No. 43-2 BOSQUES DE SN. SEBASTIAN C.P. 72310 TEL 34-26-49

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD

REPORTE DE ANALISIS DE PRODUCTO TERMINADO

GRUPO IDQ, S.A. DE C.V. TEL. 87-72-70FAX 87-72-89

<b>PRODUCTO:</b> AGUA DESTILADA	<b>LOTE:</b>	<b>FECHA:</b> 06/MARZO/98
<b>CLIENTE:</b> ATYDE S.A. DE C.V.	<b>CANTIDAD:</b> -	<b>ANALISTA:</b> J.M. AGUILAR
<b>P R U E B A S</b>	<b>E S P E C I F I C A C I O N E S</b>	<b>R E S U L T A D O S</b>
1.- CONDUCTIVIDAD	MIN. 3 MICRO SIEM	1.5
2.- pH A 20C°	5.0-7.0	5.75
3.- SULFATOS	PASA PRUEBA	PASA PRUEBA
4.- CLORUROS	PASA PRUEBA	PASA PRUEBA
5.- METALES PESADOS	PASA PRUEBA	PASA PRUEBA
6.- SUSTANCIAS OXIDABLES	PASA PRUEBA	PASA PRUEBA
7.- AMONIACO	PASA PRUEBA	PASA PRUEBA
8.- CALCIO	PASA PRUEBA	PASA PRUEBA
9.- DIOXIDO DE CARBONO	PASA PRUEBA	PASA PRUEBA
10.- DESCRIPCION	LIQUIDO INCOLORO E INSIPIDO	PASA PRUEBA
<b>OBSERVACIONES:</b> ATENCION: LABORATORIO C.CALIDAD	<b>AUTORIZO:</b> Q.F.B. JUAN MANUEL AGUILAR G.	

Perfil bioquímico con API 20, de los m.o. utilizados en este proyecto, para el control de calidad de medios de cultivo en placa :

API STAPH consiste en pozos individuales, que contienen substratos deshidratados los cuales se reconstituyen por la adición del medio con el m.o. en estudio.

	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
Staphylococcus aureus	100	100	99	96	88	94	89	0	0	89	97	87	0	0	97	1	90	80	83	0

Temperatura de incubación : 35-37 ° C

Periodo de identificación : 18 - 24 hrs.

Standar de McFarland tubo No. 0.5

API NH consiste en 10 microtubos que contienen sustratos deshidratados, con 12 pruebas de identificación basadas en reacciones enzimáticas o fermentación de azúcar. Las reacciones producidas durante la incubación dan como resultado cambio de color o al agregar reactivos.

	GLU	FRU	MAL	SAC	ODC	URE	LIP	PAL	β-GAL	Pro A	GGT	IND
<i>Haemophilus influenzae</i> .	100	89	12	1	40	92	0	100	0	0	5	74
<i>Neisseria meningitidis</i>	97	0	90	0	0	0	0	0	0	44	100	0

Temperatura de incubación : 35-37 ° C

Periodo de identificación : 2 hrs.

Standar de McFarland tubo No. 4



	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	McC	OF/O	OF/F
<i>Enterobacter aerogenes</i>	93	99	93	99	99	99	99	0	100	0	97	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>	3	90	82	41	67	20	82	0	100	0	95	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	73	99	95	100	99	99	99	0	100	0	0	100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	1	11	0	18	97	12	56	97	100	98	0
<i>Salmonella enteritidis</i>														

Temperatura de incubación : 35 - 37 ° C

Periodo de identificación : 18 - 24 hrs.

Standar de McFarland tubo No.



El API Candida consiste en 10 microtubos con sustratos deshidratados con 12 pruebas de ensayo, como son la acidificación del azúcar o reacciones enzimáticas. Las reacciones producidas durante la incubación son reveladas por el cambio de color o al agregar reactivos

	GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	$\beta$ -MAL	$\alpha$ -AMY	$\beta$ -XYL	$\beta$ -GUR	URE	$\beta$ -NAG	$\beta$ -GAL
Candida albicans	100	100	100	90	3	5	90	0	0	0	99	0

Temperatura de incubación : 35 - 37 ° C

Periodo de identificación : 18 - 24 hrs.

Standar de McFarland tubo No. 3

Las reacciones se leen de acuerdo a la tabla de lecturas y la identificación es obtenida por referencia al índice de perfil analítico o usando el software.

FECHA :	TEMPE- RATURA	H O R A	FECHA :	TEMPE- RATURA	H O R A	FECHA :	TEMPE- RATURA	H O R A
24/xi-97	34°C	17:10	6/I-98	34°C	10:50	13-II-98	35°C	12:10
25/xi-97	35°C	11:40	7-I-98	35°C	13:10	14-II-98	36°C	10:20
27-xi-97	35°C	9:50	8-I-98	35°C	9:30	16-II-98	35°C	11:40
28-xi-97	36°C	14:20	9-I-98	36°C	11:50	17-II-98	35°C	12:50
1-xii-97	35°C	14:40	10-I-98	35°C	14:00	18-II-98	36°C	13:10
2-xii-97	36°C	10:20	12-I-98	36°C	14:10	19-II-98	35°C	9:50
3-xii-97	34°C	12:30	13-I-98	35°C	11:30	20-II-98	35°C	14:30
4-xii-97	35°C	11:10	14-I-98	36°C	9:40	21-II-98	34°C	10:10
5-xii-97	35°C	13:50	15-I-98	36°C	11:20	23-II-98	35°C	9:50
6-xii-97	35°C	10:10	16-I-98	35°C	13:10	24-II-98	36°C	12:00
8-xii-97	35°C	12:30	17-I-98	36°C	10:20	25-II-98	36°C	16:30
9-xii-97	35°C	13:10	19-I-98	35°C	12:30	26-II-98	36°C	10:50
10-xii-97	35°C	11:50	20-I-98	34°C	14:25	27-II-98	36°C	13:00
11-xii-97	34°C	9:30	21-I-98	35°C	10:10	28-II-98	35°C	16:35
12-xii-97	35°C	10:50	22-I-98	35°C	11:30	2-III-98	35°C	10:35
13-xii-97	35°C	13:10	23-I-98	36°C	14:30	3-III-98	35°C	14:10
15-xii-97	34°C	14:35	24-I-98	36°C	10:30	4-III-98	34°C	9:30
16-xii-97	35°C	10:30	26-I-98	34°C	9:50	5-III-98	35°C	9:50
17-xii-97	36°C	10:30	27-I-98	34°C	11:30	6-III-98	35°C	10:30
18-xii-97	36°C	13:30	28-I-98	35°C	12:10	7-III-98	36°C	14:10
19-xii-97	36°C	9:50	29-I-98	35°C	13:50	9-III-98	35°C	11:50
20-xii-97	36°C	12:30	30-I-98	34°C	14:30	10-III-98	36°C	13:30
22-xii-97	36°C	10:50	31-I-98	36°C	11:50	11-III-98	35°C	15:35
23-xii-97	35°C	14:30	2-II-98	34°C	10:20	12-III-98	35°C	10:50
26-xii-97	35°C	10:50	3-II-98	34°C	10:50	13-III-98	36°C	12:30
27-xii-97	36°C	13:35	4-II-98	36°C	14:20	14-III-98	36°C	10:10
29-xii-97	36°C	15:20	5-II-98	35°C	16:50	16-III-98	35°C	11:30
30-xii-97	35°C	14:30	6-II-98	35°C	13:10	17-III-98	35°C	12:50
31-xii-97	34°C	10:50	7-II-98	36°C	13:50	18-III-98	34°C	16:30
1-I-98	35°C	9:50	9-II-98	35°C	10:30	19-III-98	35°C	17:10
2-I-98	36°C	17:10	10-II-98	34°C	11:50	20-III-98	35°C	13:30
3-I-98	35°C	9:30	11-II-98	35°C	12:20	21-III-98	36°C	12:10
5-I-98	35°C	14:35	12-II-98	35°C	14:40	23-III-98	36°C	10:45

FECHA :	TEMPE- RATURA	H O R A	FECHA :	TEMPE- RATURA	H O R A	FECHA :	TEMPE- RATURA	H O R A
24/XI/97	-3°C	17:10	6/I/98	6°C	10:50	13/II/98	7°C	12:10
25/XI/97	-2°C	11:40	7/I/98	6°C	13:10	14/II/98	7°C	10:20
27/XI/97	-2°C	9:50	8/I/98	6°C	9:30	16/II/98	7°C	11:40
28/XI/97	-1°C	14:20	9/I/98	5°C	11:50	17/II/98	7°C	12:50
1/XII/97	0°C	14:40	10/I/98	6°C	14:00	18/II/98	6°C	13:10
2/XII/97	1°C	10:20	12/I/98	7°C	14:10	19/II/98	7°C	9:50
3/XII/97	2°C	12:30	13/I/98	7°C	11:30	20/II/98	7°C	14:30
4/XII/97	2°C	11:10	14/I/98	7°C	9:40	21/II/98	7°C	10:10
5/XII/97	3°C	13:50	15/I/98	7°C	11:20	23/II/98	7°C	9:50
6/XII/97	5°C	10:10	16/I/98	7°C	13:10	24/II/98	7°C	12:00
8/XII/97	3°C	12:30	17/I/98	6°C	10:20	25/II/98	7°C	16:30
9/XII/97	4°C	13:10	19/I/98	7°C	12:30	26/II/98	7°C	10:50
10/XII/97	6°C	11:50	20/I/98	7°C	14:25	27/II/98	6°C	13:00
11/XII/97	3°C	9:30	21/I/98	7°C	10:10	28/II/98	6°C	16:35
12/XII/97	2°C	10:50	22/I/98	7°C	11:30	2/III/98	6°C	10:35
13/XII/97	4°C	13:10	23/I/98	7°C	14:30	3/III/98	7°C	14:10
15/XII/97	3°C	14:35	24/I/98	7°C	10:30	4/III/98	7°C	9:30
16/XII/97	5°C	10:00	26/I/98	7°C	9:50	5/III/98	7°C	9:50
17/XII/97	4°C	10:30	27/I/98	7°C	11:30	6/III/98	7°C	10:30
18/XII/97	2°C	13:30	28/I/98	6°C	12:10	7/III/98	7°C	14:10
19/XII/97	3°C	9:50	29/I/98	6°C	13:50	9/III/98	7°C	11:50
20/XII/97	4°C	12:30	30/I/98	6°C	14:30	10/III/98	7°C	13:30
22/XII/97	6°C	10:50	31/I/98	6°C	11:50	11/III/98	7°C	15:35
23/XII/97	5°C	14:30	2/II/98	5°C	10:20	12/III/98	7°C	10:50
25/XII/97	4°C	10:50	3/II/98	5°C	10:50	13/III/98	7°C	12:30
27/XII/97	4°C	13:35	4/II/98	6°C	14:20	14/III/98	7°C	10:10
29/XII/97	5°C	15:20	5/II/98	6°C	16:50	16/III/98	6°C	11:30
30/XII/97	4°C	14:20	6/II/98	6°C	13:10	17/III/98	6°C	12:50
31/XII/97	5°C	10:50	7/II/98	6°C	13:50	18/III/98	7°C	16:30
1/I/98	3°C	9:50	9/II/98	6°C	10:30	19/III/98	7°C	17:10
2/I/98	4°C	17:10	10/II/98	6°C	11:50	20/III/98	7°C	13:30
3/I/98	3°C	9:30	11/II/98	6°C	12:20	21/III/98	7°C	12:10
5/I/98	4°C	14:35	12/II/98	6°C	14:40	23/III/98	7°C	10:45