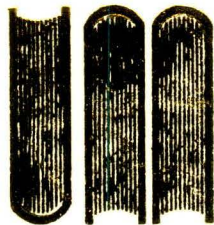


DICNE
\$ 500

BS Guayaquil Ecuador

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

clasif.
040.54
G216d
1977

Título

DESCUBRIMIENTO E IDENTIFICACION

DE NEISERIAS

Folio 800900

REPORTE DEL PROGRAMA DE

EVALUACION FINAL

QUE PRESENTA

Autor

IRMA CRISTINA GARCIA VILLALPANDO

EN OPCION AL TITULO DE:

LICENCIADO EN QUIMICA CON

ESPECIALIDAD EN ANALISIS CLINICOS

MONTERREY, N. L.

NOVIEMBRE DE 1977

800900

DEDICO ESTE TRABAJO A:

MIS PADRES

MIS HERMANOS

MI ASESORA LA MAESTRA,

Q.F.B. BLANCA SILVIA GARZA DE A.

LAS PERSONAS QUE
GENEROSAMENTE COLABORARON
PARA LA REALIZACION DE
ESTE TRABAJO.

I N D I C E

PAGINA

INTRODUCCION	1
NEISERIAS	4
MATERIAL Y TECNICAS UTILIZADAS	23
RESULTADOS	26
DISCUSION Y CONCLUSIONES	29
RESUMEN	33
BIBLIOGRAFIA	34

I N T R O D U C C I O N

Las razones que me motivaron a realizar este trabajo fueron que generalmente en los laboratorios en México se lleva a cabo la identificación de la familia Neisseriaceae, y solo reportan cocos gram-negativos con características morfológicas de *N. catarrhalis*, si se aisló la neiseria de garganta y *N. gonorrhoeae* si se aisló de vagina, uretra o cervix, basándose en la prueba de oxidasa positiva y frotis de la colonia o bien por el examen microscópico directo del frotis de exudado; este reporte no ofrece suficiente exactitud y además no permite reconocer los portadores de *N. meningitidis* de los que solo tienen *N. catarrhalis* u otras neisérias que generalmente son inofensivas.

¿ Quién puede decir que de las neisérias que se han reportado como inocuas, fueron patógenas y que si se identifican se puede evitar brotes en el futuro, reconociendo a portadores ? O bien que la persona sana en una determinada época debido a "stress" o bajas defensas de su organismo desarrolle una patología por *N. meningitidis*.

• Mi inclinación por identificar las neiserias por medio de fermentación de carbohidratos se debió a que no se requería un reactivo en especial y que fuese accesible a los laboratorios clínicos.

Las muestras que se toman normalmente para estudio bacteriológico no se siembran directamente y debería hacerse ya que las neiserias son susceptibles a la desecación, bajas o altas temperaturas y generalmente no sobreviven mucho tiempo fuera del cuerpo humano; lo que se hace normalmente es utilizar un medio para transportar la muestra.

Siendo esta la realidad en el trabajo diario, es importante el uso de un medio de transporte adecuado para la muestra.

Al hacer un estudio de comparación entre dos medios de transporte para ver cual me resultaba más adecuado para descubrir, aislar e identificar el mayor número de neiserias con el fin de descubrir algunas patógenas, utilicé caldo de soya tripticaseína y thioglycollate nutrient medium por ser los más accesibles a los laboratorios clínicos, por su facilidad para conseguirse en el mercado, y por su costo que puede conside-

rarse dentro de los límites normales de adquisición.

Las muestras fueron obtenidas del Centro de Salud
No. 1 cuya colaboración agradezco.

NEISSERIAS

Los miembros de la familia Neisseriaceae son cocos gram-negativos que crecen en pares o en masas.

Desde el punto de vista de la bacteriología médica los cocos gram-negativos más importantes son los que pertenecen al género *Neisseria*. (7)

Hay diez especies reconocidas en el género *Neisseria*, dos de las cuales son de patogenicidad reconocida para el hombre: *N. gonorrhoeae* (gonococo) agente causal de la blenorragia y *N. meningitidis* (meningococo) responsable de la meningitis epidémica. Existen otras neisseries que habitan normalmente en la faringe humana y que son saprofitas, como *N. catarrhalis*, *N. flava*, *N. sicca*, etc.. La diferenciación de las neisseries patógenas es importante. (2) (7)

Gonococo.- Neisser fue el primero que observó en 1879, la presencia constante de un coco particular en el pus de la gonorrea. Era el único microorganismo que se encontraba, no solo en las secreciones uretrales y vaginales de la gonorrea ordinaria, sino también en el exudado conjuntival de la infección gonorreica. En 1885, Bumm logró cultivos puros de este microorganismo y pudo demostrar su relación en voluntarios humanos. Esta bac-

teria, llamada generalmente gonococo, se ha denominado *Micrococcus gonorrhoeae* y *Diplococcus gonorrhoeae*; pero el género *Neisseria* es actualmente aceptado por casi todos, y el nombre correcto del germen es *N. gonorrhoeae*. (4)

En las preparaciones de pus gonorreico, el gonococo se presenta en pares y los cocos están en contacto por sus caras planas; en las preparaciones teñidas la imagen recuerda la de un grano de café. En cultivos puros, los cocos son ovoides o esféricos, y a menudo se agregan en masas irregulares, faltando la disposición típica en diplococos. En frotis de pus el gonococo es casi exclusivamente intracelular; con frecuencia pueden encontrarse muchísimos gérmenes dentro de un solo leucocito. En las primeras fases de la infección hay gonococos fuera de las células, igual que en las gonorreas de larga duración. El gonococo no es móvil ni forma esporas. (4)

El gonococo es gram-negativo, característica de tinción de gran valor diagnóstico, pues permite diferenciar el gonococo de otros cocos existentes en uretra, vulva y vagina. Algunas veces pueden encontrarse otros

cocos gram-negativos dentro de los leucocitos, pero es raro. Algunas cepas son más negativas que otras, y los gonococos que se encuentran dentro de masas de pus pueden conservar la tinción, por lo tanto es necesario preparar frotis delgados y uniformes. El gonococo se tiñe con colorantes de anilina, pero son preferibles los policromos, por ejemplo la tinción de Pappenheim. En las preparaciones teñidas pueden encontrarse gránulos intracelulares, pero en general los gonococos de cultivos jóvenes se tiñen uniformemente, en tanto que los de cultivos viejos (24 hrs. más) contienen grandes formas de involución hinchadas que se tiñen mal. (4)

El gonococo es una bacteria muy exigente en cuanto a sus necesidades nutritivas; para su aislamiento primario requiere de medios de cultivo enriquecidos. En un principio, estos eran enriquecidos añadiéndoles líquido de ascitis o hidrocele, aunque algunas cepas pueden desarrollarse sobre agar-glucosa digerido por tripsina, y que además contenga cistina. El medio más empleado ha sido agar-chocolate (sangre calentada). Y el medio fundamental puede enriquecerse con plasma de caballo y hemoglobina, añadiendo a veces azul A de Nilo. (4)

Hay cepas que requieren arginina, hipoxantina y -

uracilo (10), otras necesitan la adición de glutamina y carboxilasa, pues no pueden fosforilar tiamina, y además ciertas cepas necesitan glutatión. Es probable que las necesidades de desarrollo queden reflejadas con mayor exactitud por los medios necesarios para el aislamiento o cultivos iniciales. (4)

Es necesario cierto grado de humedad; debe haber agua de condensación sobre los tubos o las placas, y la atmósfera de la estufa debe saturarse de agua. Se desarrolla mejor si se incuba en una atmósfera que contenga aproximadamente 10% de CO_2 ; esta medida es fundamental para el aislamiento primario. (4)

En caso de cultivo prolongado en medios de laboratorio el gonococo pierde algunas de sus exigencias, y finalmente algunas cepas pueden llegar a desarrollarse en medios ordinarios de caldo. Sin embargo, es difícil conservar los cultivos, ya que el gonococo muere en 2 a 3 días a temperatura ambiente, y en 6 a 8 días a 37°C ; pero viven más tiempo si se conservan en ambiente frío. Aún con resiembras continuas los gonococos mueren y es frecuente que los cultivos se pierdan. La temperatura óptima para el desarrollo es de 37°C ; no hay cultivo -

por debajo de 30° C, y las temperaturas de 40 a 41° C - son claramente perjudiciales. El gonococo se desarrolla en anaerobiosis, pero es fundamentalmente un germen aerobio. (4)

El gonococo es un germen muy frágil. Muere también por efecto de antisépticos diluidos; por ejemplo, el fenol al 1% mata el germen en 1 a 3 minutos. El gonococo es notablemente sensible a algunos colorantes de flavina, y las sales de plata lo destruyen pronto. Es sensible a la desecación; en condiciones ordinarias suele resistir poco tiempo a la exposición al aire de 1 a 2 hrs. aunque en masas de pus desecado puede llegar a vivir seis a siete semanas. A diferencia de la mayor parte de las bacterias gram-negativas, es sensible tanto a la penicilina como a la estreptomycinina y las tetraciclinas. (4)

El gonococo no es muy activo bioquímicamente. Fermenta solamente la glucosa, produciendo principalmente ácido láctico; esta característica la hace distinguirse de otras neiserias no pigmentadas; las reacciones de fermentación son fidedignas y se utilizan para identificación, pero el medio basal empleado debe ser tal que asegure el crecimiento del microorganismo. No produce in-

dol, ni reduce nitratos, ni altera la leche tornasolada. Produce catalasa y una característica que se ha empleado en el diagnóstico diferencial es la formación de oxidasa de indofenol. La muestra se cultiva sobre agar-chocolate en atmósfera que contenga 8% de CO_2 , se saca y se aplica con un nebulizador, una solución al 1% de tetrametil-p-fenilendiamina. Las colonias de bacterias que producen oxidasa de indofenol toman color púrpura brillante. Las bacterias no mueren de inmediato y pueden -resembrarse antes de media hora. Esta reacción de la oxidasa en unión con el examen de frotis en busca de diplococos gram-negativos intracelulares, suele permitir -el diagnóstico de laboratorio de la gonorrea. (4)

Variaciones.- Muchos investigadores han encontrado que las características de cultivo del gonococo cambian. Se ha visto que podían encontrarse dos tipos de colonias, relacionados con el tipo inmunológico. Las primeras designadas como T 1, son grandes, irregulares, aplanadas, translúcidas, de color obscuro por luz transmitida oblicua. Las colonias del otro tipo, T 2, son menores, redondas, elevadas, con una superficie desigual ligeramente convexa y opacas. Ambos han demostrado ser virulen-

tós inoculados a voluntariós humanos; T 1, tiende a convertirse en T 2, "in vivo", y T 2, en T 1. Otros dos tipos de colonias denominadas T 3 y T 4, se distinguen por formar colonias mayores, más planas y menos coloreadas y son avirulentas. (4)

Toxinas.- Con excepción de una hemolisina débil - los gonococos no forman sustancias tóxicas extracelulares, pero la sustancia misma del germen resulta tóxica para los animales de experimentación que la reciben por vía parenteral; produce supuración al instalarla en la uretra humana. Esta toxicidad puede extraerse con álcali diluido como "nucleoproteína", y de este material o de la bacteria completa mediante ácido tricloro-acético o dietilenglicol, en el último caso se comporta como - antígeno de Boivin, o sea la endotoxina de los bacilos gram-negativos, (lipopolisacárido, polipéptido) ejemplo la del colibacilo; se ha demostrado que difería mucho - por carecer de ácido diaminopimélico y glicina y tener menores cantidades de otros compuestos aminados. El - carbohidrato de esta sustancia está formado por D-glu-cosamina, glucosa y galactosa, es probable que los ami-noácidos unan los componentes azúcar y lípido en la mo-

lécula completa. La actividad farmacológica de la endotoxina del gonococo parece ser inespecífica, al igual que para otras endotoxinas. Su papel en la patogenia de las infecciones gonococicas se desconoce todavía. (4)

El gonococo es un parásito obligado humano ya que no se encuentra en otros animales, transmitido por el contacto sexual en la mayoría de los casos, y es la causa de un gran número de infecciones en el hombre, incluyendo uretritis purulenta aguda en hombre, cervicitis (en la mayoría asintomática) en mujeres, salpingitis, proctitis y otras complicaciones en los adultos, vulvovaginitis en niñas, y oftalmia del recién nacido. La infección puede ocurrir también por extensión a otros sitios, incluyendo articulaciones, criptas rectales, sangre, etc.. Es menos frecuente la oftalmia gonorreica del recién nacido, la cual es una consecuencia conocida de infección materna durante el parto. Se calcula que alrededor de 10% de todos los casos de ceguera se deben a este padecimiento, la vulvovaginitis en las mujeres pre-adolescentes es usualmente el resultado de un ataque criminal o por contacto con un fomite infectado. (2) El hombre es el único huésped conocido. La vulvo-

vaginitis gonorreica epidémica en niñas pequeñas, es el caso de infección transmitida por ropa de cama, toallas, bañeras comunes, etc. y es generalmente debida en su totalidad a infecciones por *N. catarrhalis* o *N. sicca*. (5)

Diagnóstico bacteriológico.- Sólo se establece el diagnóstico de gonorrea con seguridad aislando e identificando el microorganismo causante. (4)

Aunque algunos investigadores han dicho que la demostración de diplococos intracelulares gram-negativos en frotis directo es primitiva, ello permite el diagnóstico probable, pero no seguro, de gonorrea. La validez de tal diagnóstico aumenta con el método de tinción de anticuerpo fluorescente en los frotis. El diagnóstico a base de frotis teñidos es menos seguro en la mujer que en el varón; igual ocurre con los cultivos. (4)

Por estudios que se han hecho, los cultivos de gonococo dan más resultados positivos que el frotis directo solamente; además, permiten identificar los gonococos cultivados. Es muy importante la supervivencia de estos microorganismos ya que es una bacteria relativamente frágil durante el transporte de muestras. La solución mas satisfactoria parece ser el medio de transporte de - -

Stewart, (9) Para cultivo el medio de elección es una infusión de agar-chocolate o algunas modificaciones de la misma, inoculando directamente con la muestra y sedimentando si se trabaja con orina o L.C.R. En la práctica, se añaden antibióticos a los cuales el gonococo no es sensible, para hacer el medio selectivo; por ejemplo, una combinación de polimixina B (25, UI/ml.) y ristocetina (10 microgramos/ml.). El cultivo debe incubarse con 10% de CO₂ ; esta atmósfera se logra poniendo las placas en un frasco con una vela encendida, y cerrándolo herméticamente. La prueba de la oxidasa sirve para distinguir las colonias oxidasa positivas y, si se toman inmediatamente, pueden prepararse subcultivos. La identificación se basa en las fermentaciones de azúcares en un suero con caldo o suero y agar que contenga un indicador. La tinción de anticuerpo fluorescente puede aplicarse a los frotis de cultivos puros así aislados, como a frotis directos. (4)

Meningococo.- Esta bacteria fue descrita por Marchiafava y Celli en el exudado meníngeo, en 1884; pero fue Weichselbaum quien, en 1887 logró el cultivo puro del germen y lo describió en detalle, como micro-

còco característico encontrado en seis casos de meningi-
tis cerebroespinal aguda. Esto fue confirmado con los
trabajos de Jäger. (4)

El meningococo ha recibido muchos nombres: Micro-
coccus meningitidis, M. intracellularis meningitidis, -
Neisseria intracellularis y según Bergey, N. meningiti-
dis. Este último es el generalmente aceptado. (4)

Morfología y tinción.- N. meningitidis es un di-
plococo gram-negativo, con morfología parecida a un gra-
no de café.

En frotis de L.C.R., el meningococo se parece mu-
cho al gonococo: y se presenta en pares o tetradas, ...
dentro de los leucocitos y fuera de ellos. Los meningococos
están aplanados en su unión, igual que los gono-
cocos, y pueden variar mucho su tamaño en un mismo fro-
tis. En los cultivos el meningococo suele medir algo -
menos de una micra de diámetro y presentarse en pares;
a veces hay cadenas cortas. También se ha observado -
variación de tamaño en cultivos, en particular los de -
más de 24 hrs. Son frecuentes las formas de involución
y es probable que las células mayores sean de tipo dege-
nerativo.

Generalmente no son manifiestas las cápsulas (reacción de Quellung). (3) (1) El meningococo no es móvil ni forma esporas.

Las formas de involución que se encuentran en los cultivos presentan tinción irregular: células jóvenes - pueden mostrar gránulos metacromáticos cuando se tiñen con azul de metileno alcalino de Löffler y otros colorantes; esta característica es más notable en el meningococo que en el gonococo. No es posible distinguir con seguridad el meningococo del gonococo por su morfología; la identificación depende del cultivo y las fermentaciones diferenciales. (4) Se requiere mucho más cuidado en la decoloración que en el caso de otros organismos gram-negativos. Ocasionalmente organismos muy jóvenes pueden ser gram-positivos y esto puede estar asociado con su susceptibilidad a la penicilina. (8)

Las cepas de meningococo varían mucho en cuanto a posibilidad de cultivo; algunas cepas se desarrollan, aunque no muy abundantemente, en medios ricos que contengan suero o sangre completa. El agar-chocolate y el agar-sangre son los medios más útiles. Las necesidades nutritivas de el meningococo, son semejantes a las del

gónococo, pero algunas cepas al parecer no requieren ci
tina. (4)

Al aislar el meningococo, es necesario que el medio de cultivo esté a 37° C en el momento de la inoculación y se conserve a esta temperatura hasta ponerlo en la estufa. La incubación en una atmósfera de 10% de CO₂ facilita el desarrollo entre límites de 25°C 42°C con -
óptimo a 37°C. Aunque hay escaso desarrollo en anaerobiosis, el meningococo resulta en la práctica un germen aerobio. (4)

El cultivo continuo en medios de laboratorio produce un desarrollo más abundante, y la bacteria probablemente reduzca sus exigencias nutritivas. Sin embargo, es difícil conservar cultivos de meningococo, pues tienden a perecer. En casi todos los medios estas bacterias mueren en pocos días si no se resiembran, pero la vitali
dad puede conservarse varias semanas en cultivos por ino
culación profunda en agar-almidón (1% de almidón de maíz en agar nutritivo), el cultivo debe conservarse en la es
tufa. (4)

La aparición relativamente pronta de formas de involución en los cultivos de meningococo, así como la po-

cá viabilidad en caso de no hacerse resiembras tal vez pueda atribuirse a la formación de una autolisina activa; en suspensión salina en la estufa, puede haber autolisis, en pocas horas. La autolisina es termolábil, pues se destruye a 65° C en 30 minutos, y ésta es la forma como deben inactivarse las suspensiones preparadas para estudios de aglutinación. (4)

Al igual que el gonococo, el meningococo es un microorganismo frágil que resiste mal las influencias nocivas; a diferencia de muchas bacterias, muere en pocos días a 0° C. (4)

El meningococo tiene poca actividad fermentativa. A partir de glucosa y maltosa, forma grandes cantidades de ácido, probablemente láctico en su mayor parte. La fermentación de la maltosa permite distinguir el meningococo del gonococo. No posee gran actividad proteolítica, pues no licúa el suero coagulado. (4)

Se han descrito colonias de *N. meningitidis* de tipo liso y rugoso. Las cepas de aislamiento reciente suelen ser lisas en tanto que los cultivos antiguos son rugosos. Se observan colonias mucoides. El cambio de liso a rugoso se acompaña de pérdida parcial de la especificidad inmunológica.

N. meningitidis puede ser clasificada antigénicamente dentro de los grupos A, B, C y D. Los grupos A y B son encapsulados, mientras que las clases del grupo B son generalmente no encapsulados. Los primeros producen colonias elevadas y más mucosas que las observadas con las clases del grupo B, las cuales son pequeñas, ásperas y amarillentas. Las cepas del grupo A están generalmente involucradas en las epidemias de meningitis mientras que las cepas del grupo B son aisladas en la mayoría de los casos esporádicos entre los brotes. (2)

La mayoría de las cepas de N. meningitidis aisladas de pacientes con infección meningocócica o de portadores sanos cayó dentro de los grupos serológicos B y C; las cepas del grupo A y D son raramente aisladas en los E.E.U.U.. En 1961 Slaterus en Holanda reportó el aislamiento meningococo que no reaccionó con anti-suero preparado contra grupos A, B, C y D (cepas), provisionalmente clasificó estos nuevos tipos como X, Y y Z. Vedros y sus colaboradores también describieron una nueva cepa, Grupo E; actualmente Grupo Z (CDC Grupo 29 E), Boshard (Slaterus Y), y 135 son reconocidos. (2)

La meningitis por meningococos en el hombre, y la producida en animales de experimentación, suelen acompañarse de profunda toxemia, sin embargo, el meningococo no forma toxina soluble, aunque la substancia celular se ha comprobado que es de tipo lipopolisacárido. Este poder tóxico no es afectado por el calor (100° C durante 30 minutos) y la velocidad con que desaparece sugiere que la endotoxina está formada por dos substancias, la una más termostable que la otra. (4)

Epidemiología.- Como todas las infecciones respiratorias la meningitis por meningococo se disemina por contacto directo e infección por gotitas de secreciones de boca, nariz y garganta. La infección es transmitida hasta cierto punto por pacientes y convalecientes pero son de importancia fundamental en el proceso portadores sanos. Algunas personas son portadores transitorios - mientras que, los crónicos, eliminan meningococos más o menos continuamente o en forma esporádica. Los exámenes semanales pueden ser negativos durante un período, que en un caso llegó a 4 meses y medio, volviendo a aparecer el mismo tipo de meningococo. (4)

El estado de portador es mucho más frecuente que los casos de enfermedad. Ocurre con facilidad epide-

mias de meningitis por meningococo en los ejércitos; la fiebre cerebroespinal epidémica fue, con la influenza - una de las enfermedades mas importantes en los ejércitos de la primera guerra mundial. La influencia de factores predisponentes que causan mayor sensibilidad es muy importante en la vida militar; es probable que la fatiga, exposición al mal tiempo y factores semejantes reduzcan la resistencia normal de los nuevos reclutas. La baja - resistencia, en general unida a las posibilidades de diseminación por la vida en común de los cuarteles, es sin lugar a duda factor importante en la producción de estas epidemias. Las epidemias en la población civil difieren de las anteriores en el sentido de que suelen afectar niños (mayores de 3 meses) y adolescentes. La sensibilidad parece ser mayor en los niños menores de 10 años, menor en adolescentes y baja después. (4)

La falta relativa de sensibilidad de la población - general explica el carácter localizado de los brotes de enfermedad; grupos íntimamente relacionados con el foco de infección escapan a la enfermedad en tanto que otros, aparentemente aislados, son víctimas de ella. En general los portadores constituyen el enlace entre enfermos.

Las epidemias consisten frecuentemente en una serie de brotes recurrentes, en lugar de la ola epidémica única y neta que suele producirse en otras enfermedades. (4)

Los estudios llevados a cabo en el ejército hablan de diferencias raciales de sensibilidad, pues la morbilidad y la mortalidad resultaron dos veces más elevadas en los soldados de raza negra que en los de raza blanca. (4)

Diagnóstico bacteriológico.- En la meningitis el hallazgo de diplococos característicos gram-negativos en el L.C.R. centrifugado, basta para establecer un diagnóstico de presunción. Puede hacerse cultivo por inoculación directa en agar-chocolate o agar-sangre de sedimento de L.C.R. o torundas de exudado nasofaríngeo (para reconocer el estado de portadores). El hemocultivo es útil en las primeras etapas y en los casos que no muestren síntomas meníngeos. Los meningococos se encuentran en la nasofaringe en los portadores asintomáticos. Es fundamental que la muestra no se enfríe por debajo de la temperatura corporal antes de inocularse en el medio caliente (a 37° C). Igual que el gonococo, el meningococo da la prueba de oxidasa posi-

tiva que resulta muy útil en los cultivos nasofaríngeos. Los meningococos pueden identificarse por pruebas de fermentación y aglutinación utilizando antisueros polivalentes. Es posible establecer el tipo de meningococo mediante aglutinación; en los últimos años ha sido útil la reacción de hinchazón de cápsula o reacción de Quellung descrita al tratar de neumococos. (4) (1)

MATERIAL Y TÉCNICAS UTILIZADAS

Por cada paciente se hicieron dos frotis (exudado - faríngeo o exudado vaginal) mediante un aplicador con punta de algodón estéril e inoculado con material del paciente éstos se hicieron rodar sobre una pequeña área de cada portaobjetos se secaron al aire y se colocaron - en caja para portaobjetos.

Dos hisopos estériles e inoculados fueron colocados en sendos medios de transporte: caldo de soya triptica-seína⁺ y Thioglycollate nutrient medium⁺. Cada tubo con tenía 12 ml. de éste y había sido previamente preparado.

El material anterior fue transportado al laboratorio.

En él lo primero que se hizo fue poner las cajas de agar-chocolate (Mueller-Hinton⁺ al cual se le añadió - Hemoglobina en polvo⁺) a temperatura de 36° C aproximada

⁺ Caldo de soya tripticaseína, (BIOXON)

⁺ Thioglycollate nutrient medium, (MERCK)

⁺ Agar de Mueller-Hinton, (BBL)

⁺ Bacto-Hemoglobin, (DIFCO)

mente, lo cual se logró colocando las cajas en la mesa - de trabajo cerca del mechero.

Para el aislamiento se tomaron los hisopos se les quitó el exceso de medio de transporte oprimiendo el - aplicador contra las paredes del tubo y se inocularon - sendos medios de agar-chocolate por estrías. Se incubaron a 36° C, en atmósfera húmeda y con un 8-10% de CO₂ - aproximadamente por 24 hrs. ("candle jar").

Los frotis se fijaron, se tiñeron según el método - de Gram y se observaron en el microscopio, buscando la presencia de diplococos gram-negativos intracelulares o extracelulares.

Después del período de incubación se hizo la prueba de oxidasa. Se tomó un disco Taxo N⁺, se humedeció con agua estéril y se colocó cerca de las colonias sospechosas (aproximadamente 10 mm.). Las colonias oxidasa positiva se tornaron rojas y después negras. Se tomaron - unas colonias, se inoculó agar-chocolate se incubaron a 36° C por 24 hrs. en "candle jar".

+ Differentiation Discs Taxo N, (BBL)

De las colonias sospechosas, aisladas se tomaron aproximadamente cinco y se colocaron en un tubo con caldo de soya tripticaseina (0.5 ml. a temperatura de 36° C). Se incubó por 2 hrs.. Se hizo frotis de una colonia, se tiñó por el método de Gram y se observó al microscopio - para comprobar que eran diplococos gram-negativos.

Se inocularon las superficies de sendos tubos de CTA⁺ con carbohidratos (dextrosa, maltosa, sacarosa, lactosa y fructosa). Se incubaron a 36°C. Se observaron a las 24, 48, 72 y 96 hrs. para ver si había fermentación. Se tomaron muestras de las superficies de los tubos, se hicieron frotis y se inoculó agar-chocolate por estrías. Se incubó por 24 hrs. y se observó el crecimiento (pureza del mismo).

⁺ Medio CTA, (BBL)

RESULTADOS

Los microorganismos aislados en las 78 muestras estudiadas se encuentran anotados en las tablas 1 y 2.

De las neiserias aisladas se hizo la identificación de especie observando fermentación de carbohidratos y basándome en la tabla 3. (2)

TABLA 1

MICROORGANISMOS AISLADOS EN 38 CULTIVOS
DE EXUDADO FARINGEO

Neisseria catarrhalis o Neisseria flavescens	4	10.5 %
Neisseria sicca o Neisseria perflava	14	36.8 %
Staphylococcus aureus	3	7.8 %
Staphylococcus albus	14	36.8 %
Estreptococos beta- hemolíticos	12	31.5 %
Estreptococos gama	4	10.5 %
Estreptococos alfa- hemolíticos o Diplococcus pneumoniae	9	23.6 %
Pseudomonas	1	2.6 %

TABLA 2

MICROORGANISMOS AISLADOS EN 40 CULTIVOS
DE EXUDADO VAGINAL

Lactobacillus	19	47.5 %
Staphylococcus aureus	2	5.0 %
Staphylococcus albus	2	5.0 %
Estreptococos beta-hemolíticos	7	17.5 %
Estreptococos gama	3	7.5 %
Proteus spp.	6	15.0 %
Enterobacteriaceas	21	52.5 %

TABLA 3

DIFERENCIACION DE LAS NEISSERIAS

MICROORGANISMOS	FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS (CTA Base, incubación de 1 a 4 días 36°C)				
	DEXTROSA	MALTOSA	SACAROSA	LACTOSA	FRUCTOSA
<i>N. catarrhalis</i>	-	-	-	-	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	A	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	A	A	-	-	-
<i>N. sicca</i>	A	A	A	-	A
<i>N. lactamica</i>	A	A	-	A(tardía)	-
<i>N. hemolisans</i> &	A	A	A	-	A
<i>N. flava</i>	A	A	-	-	A
<i>N. perflava</i>	A	A	A	-	A
<i>N. subflava</i>	A	A	-	-	-
<i>N. flavescens</i>	-	-	-	-	-

& Hemolisis beta en el segundo o tercer día.

A Producción de ácido.

5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los medios de transporte utilizados fueron colocados en tubos con tapón de algodón y preparados la tarde anterior o bien calentados antes de su utilización para mantener el medio en anaerobiosis, y la cantidad que se utilizó fue para que la muestra con el inóculo quedara bien sumergida en ellos.

El agar-chocolate que se utilizó en este estudio fue preparado usando Mueller-Hinton como base, ya que es un medio útil para cultivar neiserias y Hemoglobina (polvo) en lugar de sangre por encontrarse más accesible.

Las neiserias de los cultivos necesitaron de resiembras para aislarlas. En los cultivos vaginales no se aisló neiseria alguna. Posiblemente debido a que los pacientes de este estudio fueron escogidos al azar, y no debido a que el medio no fuera el adecuado, ya que por reportes anteriores se ha demostrado la superioridad del agar-chocolate en el aislamiento de neiserias. (6)

Algunas colonias de neiserias incubadas más de 24 hrs. se autolisaron; sin embargo si después de incubados por 24 hrs. se dejan a temperatura ambiente podían vivir

hasta una semana.

Las colonias de neiserias que se tomaron del medio y se colocaron en caldo de soya tripticaseína, para identificación posterior no se disolvían, algunas se fragmentaban al agitarlo, y después de 2 hrs. de incubación se podían observar, y el caldo era transparente. Con él se hacía la identificación.

Antes de inocular los tubos de CTA se observaba un frotis de las colonias para ver pureza de las mismas, ya que en la mayoría de las veces las colonias de estreptococos se encontraron junto a las de neiserias y se observaron en los frotis.

La inoculación se hizo tomando asadas del caldo y descargándolas en sendos tubos de CTA con carbohidratos.

Después se observó el crecimiento en los medios y fermentación de carbohidratos a las 24, 48, 72 y 96 hrs.. Las colonias en las superficies fueron aproximadamente de 2mm.

Cuando las colonias de neiserias no estaban aisladas, y se colocaron en el caldo de soya tripticaseína, después de 2 hrs. de incubación, el caldo estaba turbio y si con él se inoculaban los CTA con carbohidratos a las 24 hrs. se observaba nuevamente la fermentación de

carbohidratos, y especialmente de lactosa.

Se tomaron de esas colonias y se sembraron por estrías en agar-chocolate y posteriormente se inocularon tubos de CTA con carbohidratos y después de 24 hrs. de incubación se observó la fermentación de los carbohidratos llegando a la conclusión de que la fermentación de los carbohidratos era debida a contaminación.

En el agar-chocolate se observaron colonias de estreptococos alfa y beta hemolítica que producían zonas verdes los primeros y zonas claras los segundos y esto fue confirmado por frotis e inoculación a agar-sangre, observándose hemólisis alfa en los primeros y hemólisis beta en los segundos.

Las colonias de estreptococos beta hemolíticos interfirieron en la identificación ya que en las resiembras se observaron colonias de neiserias rodeadas por estreptococos las cuales se estaban autolizando y se observaba hundimiento en el centro de la colonia; al paso del tiempo se observaba la superficie rugosa.

Las colonias que se observaron en el agar-chocolate con pigmento blanco o amarillo, fueron identificadas como Staph. albus o Staph. aureus por frotis e inocula-

ción a agar-sangre en donde se observó la misma pigmentación.

Las pseudomonas se identificaron por la prueba de oxidasa positiva y la no fermentación de carbohidratos.

En algunos cultivos de vagina observé crecimiento difuso sobre el agar-chocolate el cual fue identificado por pruebas bioquímicas como Proteus. En otras se observaron colonias polimorfas que por frotis se identificaron como bacilos gram-negativos.

También se observaron colonias blancas translúcidas de tamaño y formas variables, las que por frotis se identificaron como bacilos gram-positivos (lactobacillus).

Los medios de transporte utilizados en este estudio fueron buenos como medio de transporte de neiserias. Pero por su facilidad de adquisición y por su costo resultó ser mejor el caldo de soya tripticaseína.

R E S U M E N

Se hicieron cultivos de 78 pacientes, 38 fueron de exudados faríngeos y 40 de vaginales.

Se hicieron frotis y se colorearon por la técnica de Gram, con el objeto de observar las neiserias, intra o extracelulares.

Se transportaron los exudados usando dos medios: Thioglycollate nutrient medium y Caldo de soya tripticaseina.

El aislamiento de neiserias se llevó a cabo en agar-chocolate y la identificación de género, con discos Taxo N y la de especie con CTA con carbohidratos.

De las 78 muestras tomadas, no se aisló *N. gonorrhoeae* ni *N. meningitidis*, solo se aislaron 4 *N. catarrhalis* o *N. flavescens* y 14 *N. sicca* o *N. perflava* de exudados faríngeos.

Los dos medios de transporte resultaron efectivos para las neiserias.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Austrian, R., and Gold, J.: Ann. Intern. Med. -
60:759, 1964.
- 2.- Bailey, R.W. and Scott, G. E. 1974.- Diagnostic
Microbiology. 4th. ed. The C. V. Mosby Company
Saint Louis. 129 pp.
- 3.- Bauer, J.D., Ackermann, P.G., Toro, G. 1974.- -
Clinical laboratory methods. 8th. ed. The C. V.
Mosby Company. Saint Louis. 670 pp.
- 4.- Burrows, W. 1974.- Tratado de Microbiología. Vi-
gésima Ed. Interamericana. México. 400 pp.
- 5.- Frobisher, M. 1962.- Fundamentals of Microbio-
logy. 7th. ed. W. B. Saunders Company. Philadel-
phia. 449 pp.
- 6.- Ordóñez, M. T., Tesis. "Aislamiento de Neisseria
Gonorrhoeae en mujeres Asintomaticas". De La -
Universidad Autónoma de Puebla. 1966.
- 7.- Rodríguez, M. A. 1976.- Microbiología Médica. -
Manual de Laboratorio. Facultad de Medicina - -
UANTL. Monterrey, N. L..

- 8.- Smith, D. T., Conant, N. F. & Overman, J. R. -
1964.- Zinsser Microbiology. 13th. Ed. Apleton, -
Century Crofts. Division of Meredith Publishing
Company. New York. 456 pp.
- 9.- Stuart, R. D. 1959. Transport medium for speci-
mens in public health bacteriology. Pub. Hlth. -
Repts. 74:431-438.
- 10.- Anónimo, "Cuidado con esta cepa de gonococo". -
Actualidades Médicas. Volumen VIII. No. 9 Junio
1977.

800900