

PLONE  
\$500-

### FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha, tópe para ser devuelto este libro.

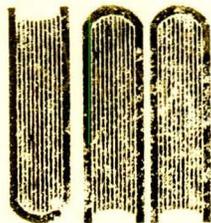
El lector pagará ~~\$5.00~~ pesos por cada día que pase ~~una~~ <sup>\$40</sup> semana después del vencimiento.

~~16 OCT. 1987~~ *J*

~~18 MAY 1990~~ *J*

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY

ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNOS MEDIOS  
DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO  
DE SALMONELAS

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL

P R E S E N T A

*BLANCA LILIA DE LA GARZA LOZANO*

EN OPCION AL TITULO DE  
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD  
EN ANALISIS CLINICOS

**BIBLIOTECA**  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

MONTERREY, N. L.

NOVIEMBRE DE 1976

040.54  
G245 ea  
1976

800254

A DIOS NUESTRO SEÑOR

A MIS QUERIDOS PADRES  
Por su gran apoyo y ayuda

Blanca Silvia Garza de Amador

A MI MAESTRA ASESOR

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

# I N D I C E

		<u>PAGINA</u>
1	INTRODUCCION.....	1
2	MATERIAL Y METODOS.....	9
3	RESULTADOS.....	11
4	DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	14
5	RESUMEN.....	19
6	BIBLIOGRAFIA.....	20

## INTRODUCCION

<sup>la F.T. feideca</sup>  
(~~Salmon~~elosis es una infección causada por especies del género Salmonella.)

<sup>F.T.</sup>  
(La ~~salmon~~elosis se transmite principalmente por la contaminación de los alimentos causada por un convaleciente o portador crónico. El agua de bebida, lagos, ríos y piscinas puede ser contaminada por animales o por el hombre. La carne de las aves y sus huevos pueden estar infectados.) Las ratas y ratones, que con frecuencia llevan Salmonella en sus heces y orina, son fuentes peligrosas de infección; ya que pueden contaminar los alimentos antes o después de su cocción. (Los bacilos son llevados también mecánicamente desde las heces a los alimentos, por las moscas.) La transmisión por contaminación del agua y leche -- casi ha sido eliminada por los métodos sanitarios de cloración del agua y pasterización de la leche. Quizá la -- fuente más común de salmonelosis es el portador humano. --  
(1), (2)

~~no~~ <sup>X</sup> Es muy difícil eliminar la salmonelosis por estar tan ampliamente distribuidos en la naturaleza los microorganismos del grupo Salmonella. <sup>X</sup> (2)

(La probabilidad de que al consumir un alimento que contiene Salmonella se padezca una infección depende de numerosas circunstancias, entre las que se encuentran; la

resistencia del consumidor, la virulencia de la cepa de --  
Salmonella y el número de microorganismos ingeridos.) (3)

Hay dos tipos de enfermedad causadas por Salmonella: una es la gastroenteritis aguda y la otra es la fiebre tifoidea o fiebre continua. La fiebre continua, es causada por: Salmonella typhi, Sal. paratyphi A, Sal paratyphi B y eventualmente la causa Sal. paratyphi C. La gastroenteritis aguda es causada por: Sal. typhimurium, Sal. enteritidis, Sal. cholerae suis etc. y algunos casos son causados por Sal. paratyphi B. La gastroenteritis aguda puede evolucionar hasta septicemia grave cuando el agente infeccioso es Sal. cholerae suis y Sal. paratyphi C. (4)

Los portadores tienen una gran importancia ya que - constituyen focos semipermanentes de infección; cuando manipulan alimentos, pueden ser causa de pequeñas epidemias. (4)

Una tercera parte de los individuos que han tenido infecciones por Salmonella eliminan bacilos tres semanas después del comienzo de la enfermedad, y un 10%, durante - 8-10 semanas; éstos se conocen como portadores convalecientes. (4)

Los pacientes que excretan bacilos durante el ter--

cero al dudécimo mes son llamados portadores temporales; -  
aquellos que siguen eliminándolos por más de un año son --  
los portadores crónicos. Algunos de éstos que eliminan --  
bacilos con intervalos irregulares son llamados portadores  
intermitentes y plantean un problema real y muy difícil --  
para el epidemiólogo que investiga casos esporádicos en --  
una región limitada o en una institución. (2)

No se sabe por qué las mujeres son más frecuentemen  
te portadoras que los hombres. En la serie estudiada por  
Ames y Roobins (4), 2.1% de los varones llegaban a ser por  
tadores crónicos, en comparación con 3.8% de mujeres. - -  
(4)

(Los microorganismos del género Salmonella son baci-  
los gram-negativos, muy parecidos a las bacterias colifor-  
mes. Se tiñen fácilmente con los colorantes ordinarios. -  
Son móviles debido a sus flagelos peritricos siendo excep-  
ciones Sal. gallinarum y Sal. pullorum que son inmóviles. -  
No forman cápsulas ni esporas.) (4)

↓ pertenecen a la familia  
Enterobacteriaceae y de  
la tribu Escheri-  
chiace

(Las bacterias de éste grupo son aerobias, pero tam-  
bién anaerobias facultativas. Se desarrollan en un inter-  
valo de PH de 6-8 en los medios usuales de laboratorio. --  
La temperatura óptima es de 37°C.) pero hay desarrollo con  
siderable a temperatura ambiente. Tienen necesidades nu-  
tritivas simples, desarrollándose con facilidad en los me-

dios comunes. La gran mayoría de cepas no requieren vitaminas bacterianas ni aminoácidos, pero algunas cepas de -- bacilos de la tifoidea requieren la adición de triptófano. (2), (4)

→ (Las colonias de Salmonella son pequeñas e incoloras en Desoxicolato Lactosa agar, McConkey agar, Eosina Azul -- de Metileno agar, Xilosa Lisina Desoxicolato agar y Salmonella Shigella agar y negras o verde obscuro en Sulfito -- Bismuto agar.) (5)

(El grupo se caracteriza bioquímicamente por no fermentar lactosa ni sacarosa. Algunas cepas fermentan rápidamente la xilosa, otras lo hacen lentamente o no lo hacen. No licuan la gelatina ni producen indol. Estas dos últimas características tienen excepciones ya que algunas cepas de Salmonella producen indol y licuan la gelatina. -- No hidrolizan la urea y la utilización en citrato es variable lo mismo que la producción de  $H_2S$ .) (1), (2), (4)

En años recientes se han reportado cepas de Sal. -- typhi fermentadoras de lactosa. (5)

La identificación final para Salmonella es serológica por aglutinación en portaobjetos. Los tipos de Salmonella se caracterizan por la identificación de sus antígenos somático "O" y flagelares "H".

Un antígeno de cubierta termolábil conocido como -- Vi, se encuentra usualmente en cepas recién aisladas de -- Sal. typhi y Sal. paratyphi C, y es de gran ayuda para la identificación de estos tipos. (4), (7)

Las cepas que se piense son de Sal. typhi deben enviarse a un laboratorio de referencia para la tipificación con el bacteriófago. Sal. paratyphi B, Sal. typhimurium, Sal. enteritidis y Sal. thompson pueden también ser tipificadas por fagos. (6)

El diagnóstico de laboratorio de Salmonella se puede hacer por los siguientes métodos:

- a).- Demostrando la presencia de Salmonella en la sangre; heces u orina del paciente.
- b).- Demostrando la presencia de cantidades crecientes de anticuerpos específicos (aglutininas) en la sangre -- del paciente.

Los cultivos de sangre se hacen inoculando 5 ml. o más de sangre del paciente, directamente en un medio líquido e incubándose durante 24 horas. Si el cultivo se -- hace de un paciente con tifoidea, durante las primeras etapas de la enfermedad, generalmente se producirá un cultivo puro de Sal. typhi. Los cultivos de heces se hacen sembrando por estrías parte de heces diluidas en varias pla--

cas utilizando medios selectivos y diferenciales ya que el crecimiento puede fallar en un medio, pero desarrollarse en otro. El medio de bilis Sal de McConkey, el medio de Sulfito bismuto, el medio Salmonella Shigella, el de Desoxicalto y el medio de Eosina Azul de Metileno son los más usados. (1)

El aislamiento de Salmonella de la sangre es sencillo, pues habitualmente es el único microorganismo presente, pero no en materias fecales. El aislamiento de esta bacteria de materias fecales, ofrece un problema más serio porque hay otras bacterias no fermentadoras de la lactosa, que con frecuencia se encuentran en intestino (Proteus, Pseudomonas etc.) que nos ~~harían~~ pensar erróneamente en Salmonella y esto nos obligaría a usar una serie de pruebas bioquímicas diferenciadoras para separar Salmonella de Proteus o Pseudomona a los que no se les atribuye patogenicidad en intestino. (8)

Para obtener mejores resultados en el aislamiento de Salmonella son recomendados los caldos de enriquecimiento antes de la siembra en placa. Los caldos de enriquecimiento más utilizados son el GN (Hajna), el caldo de Selenito de Leifson y el caldo de Tetracionato de Mueller. (5), (9).

Las colonias de Salmonella se pueden reconocer con

mayor o menor facilidad en los medios de placa diferencial y Selectivos, después de incubarlos durante la noche. Las colonias sospechosas son tomadas (evitando tomar colonias coli) inoculando después en agar con tres azúcares y hierro (TSI). Después de incubación los cultivos en TSI que muestren superficie alcalina y fondo ácido se seleccionan para estudio ulterior, ya que de ésta manera se logran cultivos puros. Entonces se llevan a cabo los procedimientos de identificación por pruebas de aglutinación con antisue-ros conocidos. (1)

Los cultivos deben ser probados primero con el antisuero polivalente. La identificación serológica se hace - más precisa tipificando con sueros monoespecíficos O y H. (4)

Las pruebas de aglutinación se efectúan mezclando - cultivos conocidos de Salmonella con suero del paciente y observando las preparaciones para ver si los bacilos se -- aglutinan (Reacción de Widal).

Para aglutinias O: los títulos significativos son los superiores a 1:50.

Para aglutinas H: títulos de 1:80, o más altos, parecen tener cierta significación.

Para aglutinina Vi: los títulos son siempre bajos pero específicos. (2)

Como resultado de la infección por Salmonella el --  
paciente forma anticuerpos de inmunidad específica; el --  
diagnóstico de tifoidea y fiebres tíficas pueden hacerse --  
por aglutinación de organismos conocidos con el suero del  
paciente. Sin embargo en casos de gastroenteritis aguda --  
el paciente ya se encuentra bien antes de que los anticuer  
pos aparezcan en el suero. (2)

El objeto de éste trabajo es probar diferentes me--  
dios de cultivo para ver en cual puede aislarse Salmonella  
con mayor seguridad y/o facilidad.

Para éste trabajo se ha escogido un caldo de enri--  
quecimiento, el Selenito cystina, que inhibe el crecimien  
to de bacilos coliformes por un tiempo debido a las sales  
de selenio que contiene y además favorece el crecimiento  
de microorganismos de difícil cultivo. Se han escogido --  
cuatro medios de agar en placa estos son: un medio lige--  
ramente selectivo y diferenciador como lo es el Desoxicola  
to Lactosa agar, dos medios moderadamente selectivos como lo  
son Salmonella Shigella agar y Xilosa Lisina Desoxicolato  
agar y un medio altamente selectivo como lo es el Sulfito  
Bismuto agar. Se han escogido también las pruebas más us--  
uales de identificación tales como: fermentación de --  
carbohidratos, utilización de citrato, hidrólisis de urea  
y producción de: indol, ácido sulfhídrico,, ácido y acet--  
til metil carbinol. Para la identificación definitiva se  
han utilizado pruebas de aglutinación.

## MATERIAL Y METODOS

Las muestras se obtuvieron de pacientes que asistieron al Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida UDEM, que llevaron sus muestras para examen parasitológico.

Aproximadamente un gramo de la muestra, se inoculó en 10 ml. de caldo de enriquecimiento, Selenito-F\*, con la adición de L-cystina\*, el cual se incubó por espacio de 8 horas a 35° C.

Un hispo estéril de algodón se introdujo en el caldo de cultivo, y se sembró por estrías en cada uno de los siguientes medios: Desoxicolato Lastosa\* agar, Salmonella Shigella\* agar, Xilosa Lisina Desoxicolato\* agar y Sulfito Bismuto\* agar. Se incubaron 24 horas a 35° C. excepto las placas de Sulfito Bismuto agar que fueron incubadas 24 horas más.

---

\* Selenite F broth, (BBL)

\* L-cystin, (MERCK)

\* Desoxicholate Lactosa agar, (MERCK)

\* Salmonella Shigella agar, (MERCK)

\* XLD-agar, (BBL)

\* Bismuth Sulfite agar, (DIFCO)

Las colonias sospechosas crecidas en los diferentes medios fueron escogidas para su identificación. Se procuró tocar con el asa de platino el centro de la colonia y se inoculó después en caldo Hajna\* el cual se incubó por espacio de 6-16 horas. Posteriormente de éste caldo se sembró a medios de cultivo para efectuar las reacciones bioquímicas.

Se utilizó la prueba de aglutinación en portaobjetos disponiéndose de dos antisueros: a).- Antisero Polivalente "O"\*, b).- Antisero "Vi"\*.

Los cultivos a probar se tomaron del TSI\*. Se hizo primero la prueba con el antiserio Polivalente "O"; si el resultado fue positivo se probó después con el Antisero "Vi". Si fue negativo se probó con el Antisero "Vi" y después se calentó y se probó de nuevo con el Antisero Polivalente "O".

Se llevó un control positivo de Sal. typhi y uno negativo de Escherichia coli.

---

\* Hajna broth, (DIFCO)

\* Salmonella-O-Antiserum Poly A-1, (DIFCO)

\* Salmonella-Vi-Antiserum, (BBL)

\* Triple Sugar Iron agar, (DIFCO)

## R E S U L T A D O S

En siete de las setenta muestras examinadas se aislaron salmonelas. (Tabla 1)

La tabla dos presenta el porcentaje de aislamiento en cada uno de los medios utilizados.

La tabla tres indica en que medios de cultivo se -- aislaron salmonelas en cada uno de los siete casos positivos.

TABLA 1

Muestras examinadas.	Muestras positivas.	Porcentaje
70	7	10

TABLA 2

Medios de cultivo.	No. de muestras	Salmonelas aisladas en c/u - de los medios.	Porcentajes de aislamiento.
D-L	70	2	2.85
S-S	70	4	5.71
XLD	51	1	1.9
S-B	70	2	2.85

TABLA 13

Casos Positivos	Medios de cultivo probados			
	D-L	S-S	XLD	S-B
1	+			
2		+		
3		+		
4		+		
5		+		+
6			+	+
7	+			

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las muestras no se obtuvieron en condiciones asépticas ya que éste trabajo no fué de diagnóstico.

Las características de las muestras de las cuales se aisló Salmonella fueron: una sólida, tres semisólidas, dos semisólidas mucosas y una diarréica mucosa.

Burrows (4), recomienda incubar la muestra inoculada en caldo de enriquecimiento de 8-12 horas. BBL (7), -- recomienda un período de incubación de 12-24 horas. El -- tiempo que yo consideré necesario fué de 8 horas resultando suficiente para obtener aislamientos positivos.

En relación a las características de los medios de cultivo se observó lo siguiente: en Desoxicolato Lactosa agar un mayor crecimiento de bacterias fermentadoras, y un número reducido de colonias no fermentadoras; ésto era -- lógico esperarlo ya que es un medio ligeramente selectivo y diferenciador. En Salmonella Shigella agar el número de colonias fermentadoras fué moderado y en ocasiones de solo una o dos colonias, obteniéndose en éste medio mayor número de colonias no fermentadoras. En Xilosa Lisina Desoxicolato agar sucedió lo mismo que en Desoxicolato Lactosa -- agar, ya que sólo crecieron unas cuantas colonias no fermentadoras y un número mayor de colonias fermentadoras. -- En Sulfito Bismuto agar se obtuvo poco crecimiento de co--

lonias. En éste medio no se pudo distinguir entre colonias fermentadoras y no fermentadoras debido a que el medio tiene como azúcar fermentable la glucosa, pero se observó un solo tipo de colonias en los casos en los que se aisló Salmonella.

Se encontró un mayor porcentaje de aislamiento en Salmonella Shigella agar, donde las colonias de Salmonella fueron observadas en mayor número así como distinguidas de las demás. En Desoxicolato Lactosa agar y Xilosa Lisina Desoxicolato agar, las colonias también fueron distinguidas pero se necesitó una observación cuidadosa para no pasarlas desapercibidas ya que se encontraron en pequeño número ((3 o 4 aisladas). Las salmonelas que producen colonias verde oscuro en Sulfito Bismuto agar pueden ser confundidas con colonias de otras enterobacterias ya que hay algunos microorganismos de ésta familia que producen también colonias verde oscuro.

En Sulfito Bismuto agar se requiere un inóculo mayor, ya que en dos ocasiones hubo crecimiento de Salmonella en Salmonella Shigella agar y no lo hubo en éste medio.

Se tomó con el asa de platino el centro de la colonia y se pasó a caldo Hajna incubandolo de 6-16 horas para inocular posteriormente los demás medios que se utilizaron para reacciones bioquímicas.

Fu  conveniente observar los tubos de TSI aproximadamente a las 8 a 10 horas, ya que las bacterias fermentadoras rápidas de la lactosa desdoblan éste carbohidrato en ese tiempo aproximadamente, por lo cual si los tubos son dejados incubando de 18-24 horas sin haberlos observado -- anteriormente, para ese tiempo el ácido láctico ya ha sido metabolizado y la superficie ya no permanecera ácida sino alcalina por lo que se puede confundir la identificación.

En el comienzo del muestreo, se hicieron reacciones bioquímicas a todas las colonias fermentadoras y no fermentadoras para obtener así práctica en su identificación; -- ésto se hizo en las primeras 35 muestras y posteriormente se identificaron tan sólo las colonias no fermentadoras -- (sospechosas). En el comienzo de la identificación se -- utilizaron sólo las pruebas de: fermentación de carbohidratos, utilización de citrato, hidrólisis de urea, movilidad y producción de H<sub>2</sub>S e indol. Como éstas reacciones -- no daban un completo reconocimiento de algunos microorganismos se agregó la prueba de producción de acetyl methyl carbinol y posteriormente para una identificación más completa se agregó la prueba de producción de ácido, identificándose de nuevo todas las colonias sospechosas que se -- habían conservado.

Burrows (4), menciona la existencia de cepas de -- Salmonella productoras de indol. De siete cepas de Sal-

monella identificadas por aglutinación con Antisuero Polivalente tres fueron indol positivo. El encontrar una cepa indol positivo podría pensarse en que fuera una Shigella y no una Salmonella, pero una gran diferencia entre éstos dos microorganismos, es la movilidad de Salmonella y la inmovilidad de Shigella por lo que la Shigella fué descartada. Podría también ser un microorganismo del grupo Providencia, pero éste microorganismo, deutiliza el citrato y las salmonelas encontradas con indol positivo no lo utilizaron, ya que hay salmonelas que no lo utilizan. Edwardsiella también se le parece bastante pero difiere en el ácido sulfhídrico ya que ésta si lo produce y las salmonelas encontradas fueron ácido sulfhídrico negativo.

El medio de Xilosa Lisina Desoxicolato agar sólo se utilizó hasta la muestra 51 debido a la terminación de éste medio.

El caldo de Selenito cystina dió un buen resultado en cuanto a multiplicación del microorganismo que fué el fin de su uso.

En el medio de cultivo Salmonella Shigella agar se obtuvo un mayor porcentaje de aislamiento, resultando éste medio útil para aislar Salmonella en comparación con los demás medios de cultivo utilizados.

Las pruebas de acetyl metil carbinol y ácido fueron

también útiles ya que ayudaron en su identificación.

Es imprescindible el uso del antisuero Polivante para la identificación del género Salmonella.

9

## R E S U M E N

Se utilizó un caldo de enriquecimiento y cuatro diferentes medios de cultivo para aislar salmonelas identificándolas con reacciones bioquímicas y serológicas.

De setenta muestras siete fueron positivas.

El mejor medio para aislar Salmonella fué el de Salmonella Shigella agar.

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

- 1.- Burdon, K.L. y Williams, R.P. 1974.- Microbiología. Publicaciones Cultural, S.A. México. 830 pp.
- 2.- Smith, D.T., Conant, N.F., Willett, H.P. 1971.- Microbiología de Zinsser. 4ta. ed. Hispano Americana. - México. 1551. pp.
- 3.- Frazier, W.C. 1972.- Microbiología de los Alimentos. 2da. ed. Acribia. Zaragoza España. 512 pp.
- 4.- Burrows, W. 1975.- Tratado de Microbiología. Vigésima ed. Interamericana. México. 901 pp.
- 5.- Bailey, R.W. and Scott, G.E. 1974.- Diagnostic Microbiology. 4th. ed. The C.V. Mosby Company Saint Louis 414 pp.
- 6.- Collins, C.H. 1969.- Métodos Microbiológicos Acribia. Zaragoza España. 410 pp.
- 7.- Rohde, P.A. 1974.- B.B.L. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos. Versión Española, de la redacción Beckton, Dickinson de México, S.A. de C.V. Editores Asociados, S.A. México. 213 pp.
- 8.- Rodríguez, M.A. 1976.- Microbiología Médica. Manual de Laboratorio. Facultad de Medicina UANL. Monterrey, N.L.

- 9.- Bauer, J.D., Ackermann, P.C., Toro, G. 1974.- Clinical laboratory methods. 8th. ed. The C. V. Mosby - Company. Saint Louis. 947 pp.

800254

## FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará 1.00 peso por cada día que pase.

Plata 153,314

~~17 AGO. 1977~~

~~9 SET. 1977~~

18 NOV. 1977

25 NOV. 1977