



44  
2ej  
Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

MEDIO DE CULTIVO ENRIQUECIDO Y  
SELECTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE  
Neisseria gonorrhoeae A BASE DE PULQUE

T E S I S

Que para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a:

Ma. Sandra Silva Castillo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## CONTENIDO .

1)	Introducción.....	pág. 1
2)	Generalidades.....	5
3)	Informe breve sobre el pulque.....	13
4)	Fundamentación de la elección del tema.....	17
5)	Planteamiento del problema.....	18
6)	Objetivos.....	19
7)	Hipótesis.....	20
8)	Material y equipo .....	21
9)	Metodología.....	23
10)	Resultados.....	28
11)	Análisis de Resultados.....	38
12)	Conclusiones.....	41
13)	Bibliografía.....	43

## 1) INTRODUCCION .

Las llamadas enfermedades infectocontagiosas han alcanzado una baja prevalencia en las naciones desarrolladas o industrializadas; sin embargo, las adquiridas por transmisión sexual representan en la actualidad un problema importante de salud pública. En los países en vías de desarrollo, las enfermedades venéreas, consideradas como tropicales o exóticas, han mostrado un aumento sostenido semejante al observado en las grandes urbes mundiales.

Entre las infecciones transmitidas por contacto sexual, la gonorrea es el prototipo de las enfermedades venéreas clásicas; a su vez, es la infección que ha sido estudiada con mayor atención en los últimos veinte años en sus aspectos clínicos, metodologías diagnósticas y diversos ángulos de la relación huésped-parasito. (1)

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA

La Organización Mundial de la Salud calcula en aproximadamente 100 millones las infecciones gonorreicas anuales en el mundo.

Tan sólo en los Estados Unidos se estima que en 1975 --considerado un año "promedio"--, se registraron dos millones y medio de casos de gonorrea, además de un número desconocido de casos que --suelen pasar inadvertidos y contribuyen a formar el "reservorio" silencioso de esta infección.

En todas las enfermedades venéreas -- y la gonorrea no es la excepción-- las estadísticas adolecen de una subestimación muy importante, originada en la renuencia del médico tratante para comunicar el caso a las autoridades sanitarias. En una encuesta realizada en los Estados Unidos se encontró que se registra un caso de gonorrea por cada seis enfermos tratados.

El riesgo de transmisión de gonorrea de una mujer infectada a un hombre --durante un sólo contacto sexual-- se estima en aproximadamente el 15%, en tanto que el de un hombre infectado a una mujer puede ser hasta del 90%.

### 1.2 PATOGENIA

Neisseria gonorrhoeae es una bacteria extraordinariamente -- sensible a los cambios de temperatura, pH y humedad. Fuera de su hábitat muere rápidamente, de tal manera que la transmisión de una persona infectada a otra susceptible suele ocurrir durante el contacto físico interno, que permite y facilita que la bacteria pase de su sitio de infección en un huésped hacia la superficie mucosa de un nuevo huésped susceptible. El sitio más frecuente de coloni-

zación es la mucosa genital y uretral; sin embargo, en relaciones sexuales no habituales puede colonizarse la mucosa rectal, faríngea y conjuntival. (2)

En los varones la uretra es la primeramente afectada, originando uretritis purulenta y participación de las glándulas uretrales en el proceso. La difusión directa de la infección puede originar prostatitis, epididimitis o vesiculitis seminal. Por su parte, durante el proceso de curación es posible la producción de estenosis.

Algunos autores afirman que la virulencia del gonococo está en relación directa con la presencia del pili, pues estos apéndices facilitarían la adhesión del microorganismo al epitelio uretral. Este proceso es importante, en su caso, para la patogenicidad, pues la adhesión a la pared impide el arrastre mecánico por la micción. En este particular, el gonococo es habitualmente clasificado en cuatro tipos coloniales -- los T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, y T<sub>4</sub>; de los cuales los dos primeros poseen filamentos en su superficie y son, coincidentemente, los más virulentos. Por su parte, los tipos 3 y 4, estando desprovistos de este mecanismo de adhesión, resultan avirulentos y no infectantes.

El gonococo no puede atravesar el epitelio plano estratificado, pero atraviesa e infecta fácilmente el epitelio cilíndrico y el de transición. En un principio las lesiones son de tipo inflamatorio, observándose básicamente la característica dilatación de los capilares y el consecuente aumento de la permeabilidad y aflujido de polimorfonucleares; justamente, los tipos de gonococo 1 y 2, supuestamente los más virulentos, son los más resistentes a la fagocitosis. En el hombre, la descarga purulenta que constituye uno de los signos clínicos cardinales está integrada por leucocitos - polimorfonucleares que han fagocitado a los gonococos, células epiteliales descamadas y suero.

La diseminación a partir del sitio primario en la mucosa se lleva a cabo fundamentalmente por dos vías, la linfática y la sanguínea. La primera transporta al gonococo a la próstata, epidídimo, glándulas de Skene, Bartholin y de Cowper; a las trompas, al peritoneo y por contiguidad al espacio perihepático. También por vía linfática las bacterias pueden llegar a la piel del área genital. Por su parte, la diseminación por vía sanguínea es la responsable de la eventual aparición de endocarditis, artritis, meningitis y dermatitis.

Agu vez, la infección en la faringe por gonococo es frecuente y resulta del contacto bucogenital. La infección de esta naturaleza se demuestra hasta en la quinta parte de los varones homosexuales y de las mujeres que practican relaciones sexuales orogenitales y que tienen infección por gonococo en otro sitio. En el 3 ó 4% de estos pacientes sólo los cultivos faríngeos suelen ser positivos para el microorganismo. La faringitis gonocócica puede localizarse únicamente en las amígdalas, con o sin linfadenopatía regional.

Quando no se disponía de antimicrobianos eficaces y los procedimientos de prevención no tenían carta de naturalidad en la práctica diaria, la conjuntivitis constituía la manifestación más frecuente de enfermedad gonocócica en el lactante. Esta inflamación conjuntival produce abundante secreción purulenta, ulcerándose el epitelio y la córnea. En ocasiones puede llegarse a la panoftalmía y a la celulitis orbitaria.

### 1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El período de incubación de la uretritis gonocócica en el hombre suele ser de dos a ocho días. En algunos pocos casos el cuadro clínico puede aparecer al siguiente día del contacto infectante y en otra proporción pequeña los síntomas pueden aparecer hasta semana y media después.

El comienzo suele ser brusco, con disuria, urgencia y frecuencia de orinar, acompañadas de exudación uretral mucóide que rápidamente se vuelve purulenta y profusa, de color blanco amarillento. En la mayoría de los casos -- y si no se establece un tratamiento oportuno y adecuado--, el proceso inflamatorio se localiza de una a dos semanas en la uretra anterior, no existiendo manifestaciones de ataque al estado general. En efecto, la uretritis gonocócica no suele causar fiebre, pero este fenómeno frecuentemente acompaña a la prostatitis, la vesiculitis seminal o la próstata puede originar retención urinaria aguda. Por su lado, el examen rectal demuestra hipersensibilidad de la próstata o la vesícula seminal afectada y la epididimitis produce dolor intenso e hipersensibilidad de este conducto.

La gonorrea no tratada cede en unas semanas pero puede seguir apareciendo durante algunos meses --principalmente en las mañanas-- una pequeña cantidad de exudación mucóide por la uretra. Es posible la persistencia del gonococo, generalmente en la próstata.

Algunos autores aseguran que casi el 10% de los hombres infectados cursan asintomáticos pero infectantes. Ya que no se instituye tratamiento, es evidente que este grupo es el más peligroso para la propagación de la infección y para la diseminación extragenital del gonococo.

La estenosis uretral es secuela de la uretritis no tratada, especialmente después de infecciones repetidas. Por su parte, la epididimitis es causa común de esterilidad. (3)

Los síntomas de infección gonocócica no complicada en la mujer puede ser: leucorrea, proctitis o molestias anorrectales, uretritis con disuria, poliuria, piuria y en ocasiones hematuria. Toda paciente joven con estos signos y síntomas deben estudiarse para identificar una posible infección gonocócica. La infección asintomática en la mujer involucra el endocervix, uretra, canal anal y faringe, en orden decreciente en frecuencia.

En la paciente la infección gonocócica puede causar complicaciones tales como enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) en aproximadamente 15% de los casos (salpingitis, parametritis, peritonitis localizada) y 50% desarrollan anomalías anormales que pueden requerir hospitalización; las complicaciones a largo plazo incluyen abscesos tubovéricos, infertilidad y dolor pélvico crónico.

El tratamiento temprano con antibióticos antes de la aparición de masas anexiales casi siempre restituye la función tubárica normal y la fertilidad; si se presentan masas anexiales antes de iniciar el tratamiento, en 15 a 25% de las veces se encontrará disfunción tubárica bilateral.

Otras complicaciones de infección son abscesos en las glándulas de Bartholin, peritonitis o síndrome de Fitzhugh-Curtis, así como la extensión hacia la parte alta del abdomen, produciendo adherencias del hígado con la pared abdominal por peritonitis localizada. En ocasiones está asociada con alteración transitoria de la función de vesícula biliar y anomalías de la función hepática.

Para diagnóstico de gonorrea en la mujer el frotis de secreción del cuello uterino es de utilidad mínima, ya que no es lo suficientemente sensible y suele interpretarse en forma errónea.

## 2) GENERALIDADES.

Neisseria gonorrhoeae es un coco gram-negativo, que en las tinciones de preparados se presentan característicos en pares, con los lados adyacentes aplanados. Existen semejanzas morfológicas - entre otras, entre los géneros Neisseria, Moraxella y Acinetobacter, todos los cuales están taxonómicamente incluidos en la familia Neisseriaceae. Por tal motivo, la observación de diplococos gram-negativos reniformes en los preparados de materiales clínicos teñidos mediante la técnica de Gram, no puede utilizarse como único criterio para la identificación de Neisserias.

### 2.1 TOMA DE MUESTRA

Los sitios apropiados de toma dependen de la edad, sexo, preferencias sexuales del individuo y presentación de la infección. Es importante hacer notar que para la lubricación del instrumento utilizado (espejo vaginal o anoscopio) debe usarse sólo agua caliente, pues otras sustancias pueden ser tóxicas para el gonococo. Si se utilizan hisopos, hay que asegurarse que el algodón no contenga ácidos grasos insaturados que también tienen acción inhibitoria. De preferencia, la muestra debe ser sembrada inmediatamente en los medios de cultivo apropiado o enviada al laboratorio en medios de transporte que contengan carbón activado para absorber las sustancias inhibitorias. Las fuentes de toma habitual son:

a) Endocervix. Deben tomarse muestras de esta región tanto en infecciones sintomáticas como asintomáticas. Para ello se introduce un espejo vaginal, a continuación se elimina el moco cervical y con un hisopo se raspa el canal endocervical, evitando al máximo la contaminación con flora vaginal.

b) Uretra. El exudado uretral de hombres sintomáticos y de mujeres que presentan secreción, se toman al menos una hora después de haber orinado. La descarga purulenta se recoge directamente en un hisopo; si no la hay, se usa una gasa estéril introducida en la parte anterior de la uretra.

c) Muestra anorrectal. Es necesaria la obtención de este tipo de muestras en pacientes con infección gonocócica diseminada (IGD): hombres homosexuales, mujeres con síntomas urogenitales y mujeres asintomáticas con alto riesgo de contraer la infección (es decir, contactos de hombres infectados). En ocasiones, principalmente si el cultivo endocervical es negativo, después de aplicar terapéutica antimicrobiana se recurre al cultivo del material obtenido de -



la mucosa anal.

d) Crofaringa. Generalmente la infección en esta zona es asintomática, se presenta de preferencia entre hombres homosexuales y en mujeres que practican el sexo oral.

e) Conjuntiva. A los niños ( el grupo más afectado) que presenten conjuntivitis se les toman muestras para tinción de Gram y cultivo del exudado.

f) Glándulas de Bartholin. Cuando haya drenaje de pus, se recoge directamente con un hisopo. Si se trata de un absceso cerrado es necesario aspirar con jeringa y considerar la posibilidad de que se trate de una infección mixta, involucrando gonococo y anaerobios.

g) Sangre. El hemocultivo se practica en cualquier caso sospechoso de infección gonocócica diseminada (IGD). Si no se tiene la posibilidad de sembrar inmediatamente en un medio de cultivo apropiado, puede hacerse en tubo estéril que contenga sulfonato de polianetol.

h) Líquido de articulaciones. En pacientes con IGD se hace una punción de las articulaciones probablemente infectadas. El líquido así obtenido se tiñe y cultiva a la mayor brevedad posible.

i) Lesiones cutáneas. Aunque pudiera obtenerse material por aspiración, es preferible efectuar una biopsia depositando el tejido en una placa de agar chocolate o en un recipiente que evite la desecación durante el transporte.(2)

## 2.2 TRANSPORTE DE LA MUESTRA.

Se ha mencionado la alta susceptibilidad del gonococo a las condiciones ambientales adversas. Si a ello añadimos que con frecuencia hay una pequeña cantidad de bacterias en la muestra clínica, se comprenderá entonces, la importancia de manejarla adecuadamente para preservar la viabilidad de la población que contenga. Las opciones son:

a) Siembra directa. Sin lugar a dudas éste es el procedimiento de elección. Son dos los medios más convenientes: Thayer Martin Modificado (TMM) y el denominado New York City (NYC). Una vez inoculados se incuban de inmediato a 35-37°C en una atmósfera de 3 a 10% de CO<sub>2</sub> y en condiciones que preservan la humedad.

b) Medio de transporte no nutritivo. El medio de Stewart mantiene la viabilidad del gonococo durante 6 a 12 horas siempre que no se encuentre a temperaturas muy altas o bajas; después de este período disminuye la eficiencia de recuperación a tal grado, que a las 24 horas habrá una pequeña porción sobreviviente de la población original.

c) Sistemas de transporte nutritivos. En Estados Unidos de Norteamérica, se han ideado dos sistemas en los que se combina las características de un medio selectivo de crecimiento y las condiciones ambientales (principalmente concentraciones de CO<sub>2</sub>), factores que tienen como propósito favorecer el crecimiento de N. gonorrhoeae. Uno consiste en botellas que contienen TMM adicionado con 10% de CO<sub>2</sub> en su interior. El otro sistema es una cámara, consiste de una placa rectangular de poliestireno, con cubierta removible y un orificio interno conteniendo una tableta generadora de CO<sub>2</sub> (hecha de bicarbonato de sodio y ácido cítrico). Puede contener TMM y NYC (JEMBEC). (2)

## 2.3 MEDIOS DE CULTIVO

El cultivo del gonococo ha sido difícil por las exigencias nutricionales del microorganismo y por su susceptibilidad a las condiciones ambientales, por lo que se han tenido que diseñar medios de cultivo complicados desde el punto de vista nutricional que permitan el desarrollo del microorganismo.

En los últimos años, el medio de Thayer y Martin se ha hecho necesario para el aislamiento de Neisseria gonorrhoeae a partir de procesos infecciosos. Este medio es prácticamente selectivo y consiste en una base de gelosa GC, adicionada en caliente de sangre de carnero (gelosa chocolate), complementada con algunos productos antimicrobianos: vancomicina (3ug/ml), colistina (7.5ug/ml), nistatina (12.5 ug/ml) y trimetoprim (5ug/ml), este último con el fin de inhibir el desarrollo de posibles Proteus contaminantes. Los otros productos se utilizan con el objeto de prevenir el crecimiento de bacterias y hongos encontrados por lo general de los especímenes obtenidos del aparato genitourinario que puedan impedir o enmascarar el crecimiento del gonococo.

En el transcurso del tiempo, el interés se ha enfocado sobre otros aspectos relacionados con la biología del gonococo y no sólo en aquellos implicados con la infección.

Un problema que se había presentado con los cultivos de Neisseria era asegurar su sobrevivencia después del crecimiento, lo cual dificultó el hacer estudios de la bacteria, tales como completar el diagnóstico de la infección o lograr su identificación. En un camino tendiente a salvar estos obstáculos, Hafiz y McEntegart (13) diseñaron un medio líquido que permite el crecimiento del gonococo y después su supervivencia hasta por tres semanas, lo cual representa una ventaja en la investigación del microorganismo. Por otra parte, se han diseñado una serie de medios de cultivo sintéticos y algunas condiciones de cultivo que permiten el crecimiento abundante de la bacteria, lo cual puede ser útil para

hacer estudios bioquímicos, genéticos e inmunológicos del gonococo.

Se describió un medio de cultivo sintético preparado a base de sales minerales, aminoácidos y un suplemento de vitaminas que facilitó el establecimiento de algunas características de auxotrofia de Neisseria gonorrhoeae así como el efecto de algunos aminoácidos y la influencia de diferentes concentraciones de ácido glutámico sobre el crecimiento. (14).

Se ha delineado también un medio de cultivo sintético que de acuerdo con los autores, (15), tiene la ventaja de ser transparente y permitir la diferenciación de los diversos tipos coloniales.

Otro aspecto que se ha estudiado es el efecto del pH sobre el crecimiento del gonococo en un medio a base de peptona y en cultivos continuos representan una ventaja sobre los cultivos por lote en matriz, en los que se pueden observar una serie de variaciones morfológicas o rendimientos celulares variables. (17,18) Bg cigalupi y Lawson (31) usaron un medio de cultivo sintético diferente que permite el crecimiento abundante del gonococo. Cuando al medio se le agregó penicilina a una concentración de 10 U/ml, adicionando además polivinilpirrolidona al 5%, se provocó la aparición de formas "L" del microorganismo, un hecho que "in vitro" se ha implicado como uno de los responsables de las fallas del tratamiento de la gonorrea con penicilina.

Catlin (20) diseñó un medio de cultivo sintético complejo que contiene otras substancias: aminoácidos, bases púricas y pirimidicas, carbohidratos y sus derivados, vitaminas y cofactores, sales minerales, etc. Este medio le permitió hacer estudios de los requerimientos nutricionales del gonococo (auxotipificación).

Al utilizar el medio antes descrito, se hizo la diferenciación de cepas de Neisseria gonorrhoeae de origen clínico variando la composición del medio y con base en la respuesta del crecimiento de dichas cepas. (21) Los autores advierten que la reproducción de los datos y la variedad de lo que ellos llaman auxotipos, indican el valor potencial del sistema de auxotipificación descrito y su posible valor epidemiológico.

Se han descrito estudios de crecimiento, estabilidad de la morfología colonial y transformación genética del gonococo, utilizando un medio de cultivo sintético (Gonococcal Genetic Medium, -GGM) (22,23) este medio contiene sales minerales, ocho aminoácidos dos bases nitrogenadas, vitaminas, intermediarios metabólicos y otros compuestos.

En un trabajo, (24) se hizo un estudio comparativo de la composición y utilidad de cuatro medios de cultivo para el gonococo, entre ellos los dos últimos descritos.

En otro un poco más reciente (25) se describió un medio de cultivo (GB) que, excepto la hemina, no contiene derivados de la sangre, los autores hicieron la comparación de su medio con otros medios de cultivo en cuanto a su capacidad de promover el crecimiento de varias cepas de Neisseria gonorrhoeae. En este medio GB crecieron todas las cepas probadas, mientras que otros medios el porcentaje de cepas que pudieron ser recuperadas varió del 32 al 80%. Los autores probaron la influencia del pH y de diferentes productos antimicrobianos sobre el crecimiento del gonococo. El medio se informa como barato y fácil de preparar.

## 2.4 REQUERIMIENTOS DE CO<sub>2</sub> DE Neisseria gonorrhoeae.

Se ha descrito el CO<sub>2</sub> que requieren las diferentes cepas de Neisseria gonorrhoeae. La atmósfera adecuada se puede lograr mediante la jarra de extinción (26) en la cual se logra una mayor tensión de CO<sub>2</sub> con la eliminación parcial del O<sub>2</sub> por lo que podría pensarse que las condiciones relativamente anaerobias fueran las que favorecieran el crecimiento. Diversos autores han demostrado que este no es el caso. (26,27,28). El medio GGM debe incubarse en una atmósfera de CO<sub>2</sub> las 12 horas previas a la incubación, para lograr un buen crecimiento. (22).

Los cultivos hechos en medio de Catlin no requieren incubación en CO<sub>2</sub> previa a la inoculación, para poder crecer, (20) se propone que el gas disuelto en los matraces permite el desarrollo microbiano y que el propio crecimiento ayuda al mantenimiento de las condiciones adecuadas de la atmósfera de tal gas.

## 2.5 REQUERIMIENTOS DE HIERRO DEL GONOCOCCO.

Durante mucho tiempo no fue descrita la existencia de sideróforos en Neisseria pero, evidentemente, el Fe<sup>+3</sup> tiene importancia en el desarrollo y fisiología del gonococo así como en la enfermedad producida, entonces, es claro que la bacteria pone en juego algún mecanismo o mecanismos que le permitan satisfacer sus necesidades del metal.

Se ha descubierto que el Fe<sup>+3</sup> tiene cierta influencia sobre la morfología colonial de Neisseria gonorrhoeae. Odugbemi y Dean determinaron el contenido de hierro en las colonias de diferentes tipos de gonococo.

Que el hierro cause modificaciones en la morfología colonial de Neisseria gonorrhoeae podría ser indicativo de modificaciones en la superficie celular bacteriana. Cuando de un cultivo de Neisseria se eliminó hierro por la adición de un agente "quelante" el desferal (desferrioxamina B), se produjo un desarrollo bacteriano más lento que el obtenido en presencia del metal. Si al cultivo con el agente "quelante" se le agrega un exceso de hierro y el crecimiento continua por varias generaciones, las bandas extra de proteínas desaparecen. Estos fenómenos son independientes del tipo colonial. (5,6).

## 2.6 IDENTIFICACION

Después de incubar durante 24 horas, las colonias de Neiss-

Las gonocorreas son de 0.5 a 1.0 mm de diámetro, de color blanco grisáceo, opacas, elevadas y brillantes ( se observan mejor con un microscopio estereoscópico). Kellogg y colaboradores observaron microscópicamente las colonias del gonococo crecidas en un medio transparente e iluminadas con luz transmitida.

Las T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> predominan en aislamientos clínicos recientes, están formadas por células piliadas y virulentas, Si se hacen re siembras seleccionando estos tipos de cepa se conserva virulenta; de lo contrario, los pasas sucesivos hacen aparecer los tipos T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> compuestas por bacterias no piliadas, avirulentas. Si la cepa ha crecido en un medio opaco como gelosa chocolate o medio- - TMM la luz incidente revela las siguientes características: las colonias T<sub>1</sub> son pequeñas y elevadas; las T<sub>2</sub> son abombadas, ligeramente más grandes, ambas son brillantes y húmedas. Las colonias T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> son más grandes, más delgadas y no reflejan la luz. Los cuatro tipos de colonia se observan también en las cepas atípicas (AHU), que tienen requerimientos de arginina, hipoxantina y uracilo para crecer en medios químicamente definidos. Las colonias son un poco más pequeñas y crecen con mayor lentitud. En cualquier caso el período de incubación no debe exceder de 48 horas para evitar la autólisis del cultivo. Si se quiere preservar por 2 ó 3 días es mejor guardarlo a temperatura ambiente en un frasco con vela.

Las pruebas básicas iniciales para la identificación son, - en primer lugar, la bacterioscopia para tinción de Gram y, en segundo, la prueba de la oxidasa. Para ello se colocan en papel filtro, dos o tres gotas de una solución al 1% de cloruro de tetra o dimetil-parafenilendiamina, se toma una asada de las colonias y se deposita en la porción del papel filtro humedecida con el reactivo. La reacción se considera positiva cuando hay aparición de un color morado oscuro antes de 10 segundos, o un cambio de rosa a negro antes de 20 seg. según emplee tetra o dimetil- - respectivamente. Los diplococos gram-negativos oxidasa positivos se identifican presuntivamente como Neisseria gonorrhoeae. Deben hacerse ambas pruebas para evitar confusiones con bacilos oxidasa positivos como Eikenella y Kingella cuyas colonias son parecidas a las de los gonococos y pueden llegar a crecer en los medios selectivos, en especial cuando no tienen la suficiente humedad o han permanecido en incubación por más de 48 horas. La identificación definitiva se hace por pruebas de fermentación de carbohidratos o por métodos serológicos. (2)

## 2.7 FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

Es la técnica más usada para identificar los gonococos, y - consiste en investigar la degradación de diversos carbohidratos: adicionados a un medio base que contiene cisteína (medio CTA). Se prueban soluciones al 1 ó 2% de glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y fructosa, esterilizadas por filtración y añadidas al medio semisólido CTA. Para obtener buenos resultados es necesario depositar un inóculo grueso obtenido de una resiembra en gelosa

chocolate; no se recomienda utilizar las placas de primoincubación por el peligro de arrastrar contaminantes y la posible baja viabilidad de los gonococos después de haber crecido en un medio selectivo. Los tubos se incuban a 35-37°C en una estufa - estandar durante 24 horas ( si se colocan en atmósfera de CO<sub>2</sub> - este puede disolverse y formar ácido carbónico dando reacciones falsamente positivas). Es típico de los gonococos producir solamente ácido de glucosa.

Se han descrito pruebas de fermentación rápidas en que los resultados no dependen del crecimiento de la cepa, sino de las enzimas presentes en colonias bien crecidas. Se realizan en soluciones de carbohidratos conteniendo rojo de fenol, a las que se agrega un inóculo muy denso de la cepa; se incuba en baño María a 37°C y los resultados se observan de 15 min. a 4 horas.

## 2.8 METODO MINITEK (BBL).

Utilizado en la identificación de enterobacterias también es útil para diferenciar *Neisseria*; el período de incubación se estima de 4 a 24 horas. Otra alternativa es un método más sensible que las pruebas de fermentación: sistema BACTER. Consiste de tres viales que contienen glucosa, maltosa y fructosa marcadas en <sup>14</sup>C. Después de sembrarse con la cepa a probar, se incuban por 3 horas a 35°C y se investiga si hay desprendimiento de CO<sub>2</sub>.

## 2.9 METODOS SEROLOGICOS

Con ello se confirma la identidad de las colonias sospechosas de *Neisseria gonorrhoea*. El que se utiliza para anticuerpos fluorescentes es rápido y requiere un pequeño inóculo; sin embargo se necesita equipo especializado y hay reacciones falsas positivas con *S. aureus* y meningococo. Con la coaglutinación es necesario emplear un control negativo del reactivo coaglutinante. La sensibilidad de la prueba aumenta si los gonococos se lisan desprendiendo el lipopolisacárido con un agente quelante. (2)

## 2.10 VIABILIDAD Y ESTABILIDAD DEL GONOCOCCO.

Elms y col. estudiaron la influencia de varios agentes químicos sobre viabilidad y estabilidad del gonococo, entre ellos, el pH, la acción del Cu<sup>2+</sup>, la espermina, la polivinilpirrolidona, etc. Las determinaciones se hicieron con células del

tipo colonial 4. Los autores apuntan que los fenómenos de pérdida de viabilidad y estabilidad fueron causadas por procesos de autólisis y que los agentes probados tuvieron influencia sobre las propias enzimas autolíticas.

Se ha determinado la influencia de la glucosa y la fuente de nitrógeno sobre la velocidad de autólisis del gonococo, la cual se vio aumentada en condiciones limitantes del carbohidrato; en cambio, los cultivos probados en condiciones limitantes de nitrógeno o en presencia de cloranfenicol o rifampicina, no fueron susceptibles a la autólisis.

La gonorrea es hoy día la infección quizá más común entre los humanos. Un problema para hacer un diagnóstico es la fragilidad de la bacteria causada por la autólisis. (5,6)

## 2.11 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Las cepas de Neisseria gonorrhoea, productoras de penicilinasa se pueden detectar utilizando un disco de 10 unidades de penicilina para pruebas de susceptibilidad, colocando en una placa de agar chocolate inoculada por el método de Kirby-Bauer. Zonas de inhibición de menos de 20mm de diámetro sugieren una cepa productora de penicilinasa. De otro modo, la prueba de susceptibilidad por el método de difusión de Kirby-Bauer no se debe utilizar para gonococos, ya que la técnica no ha sido estandarizada para estos organismos. (4)

### 3) INFORME BREVE SOBRE EL PULQUE.

#### 3.1 DEFINICION

El pulque es un líquido blanco, viscoso, dulce, con bajo contenido alcohólico y con cierto sabor ácido, obtenido por la fermentación del aguamiel, el cual es el jugo que se obtiene del maguey.

#### 3.2 IMPORTANCIA

Esta bebida posee importancia desde varios puntos de vista como son: geográfico, económico, bioquímico y sanitario.

Desde el punto de vista geográfico tiene importancia el hecho de que esta planta vive con poca cantidad de agua anual, esto es, - el maguey se desarrolla en zonas semidesérticas de la antiplanicie mexicana donde no se cuenta con suficiente agua. Evita el desgaste de las tierras inhibiendo la erosión al mantenerse las plantaciones en buen estado todo el tiempo. Ligado a esto está el lado económico del maguey.

El pulque posee múltiples sustancias como vitaminas, sales minerales, aminoácidos esenciales, y una pequeña cantidad de proteínas, que son requeridas para la dieta del ser humano, por lo que - al proporcionar estas sustancias al organismo, éste podría ser menos susceptible a diversas enfermedades como: la anemia por deficiencia de ácido fólico y de hierro, proporcionando mayor estabilidad en las reacciones corporales.

#### 3.3 ORIGEN DEL PULQUE

Antes del descubrimiento de América, los habitantes del centro de la República ya aprovechaban el maguey de diferentes formas tales como en la elaboración de sus chozas, fabricación de hilos, tejidos, escudos, sandalias.

El principal producto que se obtenía de ésta era el pulque - que se les daba a los reyes y personas de gran autoridad, pues su consumo no era permitido para todos. En la sociedad de los indígenas, había grandes castigos que se aplicaban a la gente que negociara clandestinamente con este líquido.

Con la llegada de los españoles, el consumo del pulque se extendió ampliamente y se reglamentó su comercio.



Las autoridades españolas intentaron varias veces restringir el comercio de éste y hasta prohibirlo entre los indios, pero al no lograrlo crearon nuevas reglamentaciones para su comercio.

El origen etimológico de la palabra pulque tiene varias posibles raíces. El nombre de pulque entre los mexicanos era "Itzacotli" o sea vino blanco y cuando se descomponía se le conocía como "octli-poliuqui", y como esto sucedía fácilmente se piensa que los que lo vendían pronunciaban la palabra poliuiqui, derivándose de ésta la palabra pulque que en la actualidad se maneja.

Por otro lado se propuso que dicha palabra es voz araucana derivada del pulqui, una bebida preparada de algerroba mientras que muchos piensan que es de origen antillano.

En el siglo pasado el pulque despertó interés para su investigación, por el hecho de que se obtenía de un jugo natural de los magueyes llamado aguamiel y que fermentaba por sí solo con microorganismos autóctonos. Aparte de ser un líquido embriagante se le conocía propiedades nutritivas en la alimentación mexicana.

Desde 1964 se iniciaron las primeras investigaciones micro biológicas continuando en 1919 con un análisis químico y bromatológico.(7,8,9)

#### 3.4 COMPOSICION DEL PULQUE

La composición química y bromatológica del pulque varía dependiendo del lugar donde se encuentre, sea tinacal, aduana, ó pulquería, aunque para la realización de los estudios se hace una media de tales variables por lo que las siguientes tablas presentan de manera general la composición del mismo.

##### Análisis del pulque.(7)

	Contenido en 100 g.	
Calcio	0.007	g
Carbohidratos	1.1	g
Energía	43.0	Kcal
Grasas	- - -	-
Hierro	0.0002	g
Niacina	0.004	g
Proteína	0.4	g
Riboflavina	0.0002	g
Tiamina	0.0002	g

Composición química del pulque (10,11).

Acidez total en ácido láctico	0.39	%
Agua	94.0	%
Cenizas	0.3	%
Densidad a 15°C	0.992	%
Extracto seco a 10°C	1.65	%
Glúcidos	9.5	%
Gomas	0.66	%
Grado de alcohol	7.9	%
Nitrógeno de aminoácidos	0.12	%
Nitrógeno de aminoácidos aromáticos	0.001	%
Nitrógeno proteico	0.172	%
Proteínas totales	0.345	%
Sacarosa	0.04	%
Sales minerales	0.32	%
Vitamina B	25-30	UI/ml
Vitamina C	6.5	UI/ml

Análisis microbiológico (7).

	Tinacal	Aduana	Pulqueria
Bacterias x 10 <sup>6</sup> /ml	64	36	15
Levaduras x 10 <sup>6</sup> /ml	166	115	61
Coliformes fecales ,% en el total de muestras analizadas.	22.2	32	5.3

Contenido de aminoácidos en el pulque (8,12).

	Cantidad en 100 g.
Arginina	2.32 mg
Fenilalanina	2.38 mg
Histidina	1.0 mg
Leucina	2.23 mg
Lisina	3.43 mg
Metionina	0.15 mg
Treonina	1.36 mg
Triptofano	0.57 mg
Valina	1.40 mg

Análisis químico (8)

	TINACAL	ADUANA	PULQUERIA
Alcohol % en vol °GL	5.56	7.16	6.33
pH	3.98	3.73	3.84
Sacarosa mg/100ml	114.4	97.33	85.36
Viscosidad en centipoises	9.12	13.83	3.075

Constituyentes nutritivos del pulque (7,10,11).

Componentes y factores nutritivos	Cont. en 100g
Calcio	0.01 g
Carbohidratos totales	1.08 g
Caroteno (pro-vit A)	- - -
Canizas	0.37 g
Hierro	0.0007 g
Fosforo	0.006 g
Niacina	0.035 g
Proteínas	0.37 g
Rivoflavina (vit. B <sub>2</sub> )	0.003 g
Tiamina (vit. B <sub>1</sub> )	0.002 g
Vitamina C	0.0051 g

#### 4) FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.

Las infecciones genitourinarias de tipo venéreo han aumentado en gran escala en los últimos años. Estas infecciones son producidas principalmente por Neisseria gonorrhoeae, Trachoma pallidum, Gardnerella vaginalis, etc., que son microorganismos muy exigentes para su crecimiento "in vitro" y, por lo tanto, no tan fáciles de diagnosticar en el laboratorio.

La gonorrea (gono-semen, rhea-flujo), principalmente una enfermedad infecciosa del tracto urogenital, ha alcanzado proporción epidémica en la sociedad moderna. El hombre es el único huésped natural de Neisseria gonorrhoeae y la enfermedad se transmite casi exclusivamente por contacto sexual; por lo tanto, la afección no tiene límites sociales o geográficos. Su incidencia actual es particularmente elevada entre adolescentes sexualmente activos y adultos jóvenes. (4)

Si bien la enfermedad puede involucrar las mucosas del cérvix uterino o la uretra, puede haber desarrollo de salpingitis y bartolinitis en mujeres, o epididimitis y abscesos periuretrales en hombres por diseminación local de las bacterias.

Neisseria gonorrhoeae puede también infectar otras membranas mucosas, como la del canal anal, orofaringe y conjuntiva. Menos comúnmente se produce las infecciones gonocócicas diseminadas, que se manifiestan como artritis, lesiones cutáneas y septicemias. Son raras las endocarditis, meningitis y hepatitis causadas por Neisseria gonorrhoeae. (5,6)

Las infecciones gonocócicas no siempre son sintomáticas, y tanto hombres como mujeres pueden servir como portadores. Esto hace la erradicación de la enfermedad virtualmente imposible. Por lo tanto, es necesario obtener cultivos de individuos sanos y asintomáticos, al igual que de los incluidos dentro de los grupos de alta incidencia, a fin de que las medidas de control epidemiológico resulten efectivas.

Los gonococos son microorganismos que requieren de muchos nutrientes para su multiplicación "in vitro". El pulque posee múltiples sustancias nutritivas y reductoras tales como: vitaminas (Tiamina, Riboflavina, Vitamina C); sales minerales (cálcio, fósforo, hierro), aminoácidos (lisina, triptofano, histidina, fenilalanina, leucina, metionina, valina, arginina); proteínas, carbohidratos, ácido ascórbico y niacina, sustancias que le dan sus propiedades características, por lo que puede ser utilizado como un medio de cultivo adecuado para bacterias anaerobias. El empleo de este medio de cultivo reduciría los costos debido a que el pulque es un producto netamente mexicano, se encuentra en abundancia en casi toda la República Mexicana y es barato en comparación con los medios de cultivo comerciales.

5) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los gonococos son microorganismos que requieren de un medio de cultivo muy enriquecido para su multiplicación "in vitro", como son: el Thayer-Martin o el agar chocolate, medios con una base que contiene muchos componentes como: aminoácidos, pirimidinas, vitaminas y una fuente de hierro, lo que hace que su costo sea muy elevado.

En el presente trabajo se pretende elaborar un medio de cultivo enriquecido a base de pulque, que posee todos esos nutrientes; y a la vez añadirle algunos inhibidores para hacerlo selectivo para Neisseria gonorrhoeae.

6) O B J E T I V O S.

- A) Formular un medio de cultivo enriquecido y selectivo para Neisseria gonorrhoeae utilizando pulque como nutriente.
- B) Disminuir los costos para el diagnóstico de infecciones genitourinarias producidas por este microorganismo.
- C) Obtener un aumento en el margen de seguridad del diagnóstico de infecciones por gonococos.
- D) Realizar un estudio comparativo entre el medio de cultivo formulado y los medios usuales.

7) HIPOTESIS.

- a) Si Neisseria gonorrhoeae es una bacteria muy exigente para su crecimiento y necesita de un medio muy enriquecido y el pulque es una bebida cuya composición posee una gran cantidad de sustancias que pueden ser empleadas como nutrientes, entonces, al formular un medio de cultivo con pulque obtendremos un medio en donde crecerá fácilmente éstos microorganismos.
- b) Si a este medio de cultivo enriquecido se le añade (n) alguna (s) sustancia (s) inhibidora (s) de bacterias contaminantes, entonces obtendremos un medio de cultivo enriquecido y selectivo para Neisseria gonorrhoeae.

6) MATERIAL Y EQUIPO.

A) MATERIAL BIOLÓGICO

- i) Cepa de *Neisseria gonorrhoeae* (\*\*\*)  
Cepa de *Streptococcus sp.*  
Cepa de *Staphylococcus sp.*  
Cepa de *Escherichia coli.*  
Cepa de *Proteus sp.*  
Cepa de *Pseudomonas sp.*  
Cepa de *Candida albicans.*

(\*\*\*) Cepa tipificada por el Depto. de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología.

ii) Muestras Clínicas de exudados vaginales, uretrales y muestras rectales.

iii) Sangre estéril y defibrinada de carnero, res y humana.

B) EQUIPO

- Balanza analítica Meter modelo H-89.
- Balanza granataria CHAUS, modelo Florham-Park.
- Incubadora MAPSA, modelo EC-334
- Microscopio AMERICAN OPTICAL, modelo One-ten.
- Refrigerador Mabe, modelo Space line.
- Potenciómetro.

C) MATERIAL DE VIDRIO.

- Cajas de petri
- Vasos de precipitado de diferente capacidad
- Pipetas graduadas
- Tubos de ensaye
- Portaobjetos
- Probetas de diferente capacidad
- Varillas de vidrio
- Recipiente para anaerobiosis

D) COLORANTES.

- Cristal Violeta, Lugol, Safranina



**E) SOLVENTES.**

- Agua, pulque, acetona y etanol al 96%.

**F) SOLUCIONES Y REACTIVOS**

- Hidróxido de sodio 2N, Acido clorhídrico 1N, Lauril Sulfato de Sodio, Dimetil Sulfoxido.

**G) MEDIOS DE CULTIVO Y ENRIQUECEDORES.**

- Extracto de levadura
- Almidón
- Peptona de caseína
- Hemoglobina
- Polienriquecimiento (Bioxon liofilizado, No. Cat. 304).
- Mezcla inhibidora VCN (Bioxon VCN: Vancomicina 300mcg/ml, Colistina 750 mcg/ml, Nistatina 1250 U/ml).
- Agar-Agar.
- Base de Agar Sangre
- Base de Agar GC.

## 9) METODOLOGIA .

Las etapas que se realizaron en la metodología fueron las siguientes:

- 1.- Soporte de Crecimiento
- 2.- Selectividad
- 3.- Estabilidad
- 4.- Pruebas con muestras clínicas

La parte experimental fué realizada por ensayo y error. Cabe mencionar que los medios expresados en el presente trabajo escrito son un resumen de lo realizado en la parte experimental.

### 1.- PRIMERA PARTE: Formulación del soporte de crecimiento.

Se desarrollaron los primeros ensayos para la obtención de un soporte de crecimiento. La preparación de los medios es como sigue:

Se procede a ajustar el pulque con hidróxido de sodio 2N hasta pH 7.5, posteriormente se agregan las substancias participantes, mezclando homogéneamente y dejar en reposo unos 10 min. (para que se hidraten bien las partículas de agar). Calentar con suavidad agitando frecuentemente, hervir por un minuto y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 min.

Enfriar la solución a unos 50°C y mezclar perfectamente evitando que se formen burbujas. Agregar la sangre y la solución VCN (Vancomicina, Nistatina y Colistina), y mezcle uniformemente.

Vertir en cajas de Petri o en tubos de ensayo de 150 x 20 mm con tapa de rosca. A estos últimos deje solidificar en posición inclinada.

### PULQUE CENTRIFUGADO:

Para los medios que lo requieran, éste se obtiene de la siguiente manera: Se procede a centrifugar el pulque completo a 3000 rpm durante 5 minutos y se utiliza el sobrenadante de dicho centrifugado. La preparación del medio es idéntica a la metodología antes mencionada.

El primer ensayo consiste en seleccionar la cantidad de agar necesario para la obtención de una consistencia aceptable en el agar.

**TABLA 1.- Consistencia del medio. Variación de Agar-Agar.**

Medio	1	2	3	4
agar-agar	1.0%	1.5%	1.0%	1.5%
H <sub>2</sub> O c.b.p.	100 ml	100 ml	- -	- -
pulque completo c.b.p.	- -	- -	100 ml	100 ml

**TABLA 2.- Variación de Peptona de Caseína; conc. de agar 1.5%**

Medio	5	6	7	8
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
peptona de caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
pulque completo c.b.p.	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

**TABLA 3.- Variación de extracto de levadura con conc. de agar de 1.5% y peptona de caseína de 1.5%.**

Medio	9	10	11	12
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
extracto de levadura	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
pulque completo c.b.p.	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

**TABLA 4.- Variación de almidón con conc. de agar 1.5% y peptona de caseína de 15%.**

Medio	13	14	15	16	17	18
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
almidón	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%	0.15%	0.2%
pulque completo c.b.p.	100ml	100ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

**TABLA 5.- Variando la conc. de sangre y el tipo de sangre**

Medio	19	20	21
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%
peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%
sangre de borrego desfibrinada y estéril (***)	2%	5%	7%
pulque completo c.b.p.	100 ml	100 ml	100 ml

(\*\*\*) Además se uso sangre de res y humana a las mismas concentraciones.

TABLA 6.- Variando peptona de caseína y usando concs. de sangre de borrego al 5%.

Medio	22	23	24	25
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
peptona de caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
sangre de borrego	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%
pulque completo cbp.	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

TABLA 7.- Medios con hemoglobina, pulque y peptona de caseína a diferentes concentraciones.

Medio	26	27	28	29
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
hemoglobina (***)	2%	2%	2%	2%
peptona de caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
pulque completo cbp	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

(\*\*\*) La hemoglobina se disuelve con pulque y no con agua destilada, pero ésta se precipita después de la esterilización.

TABLA 8.- Medios con hemoglobina, pulque centrifugado y peptona de caseína a diferentes concentraciones.

Medio	30	31	32	33
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
peptona de caseína	1.5%	1.0%	0.5%	0.0%
hemoglobina (***)	2%	2%	2%	2%
pulque centrifugado (parte líquida)	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

(\*\*\*) La hemoglobina no se disolvió después de la esterilización.

TABLA 9.- Variando peptona de caseína y manteniendo constante sangre de borrego y pulque centrifugado.

Medio	34	35	36	37
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
sangre (***)	5%	5%	5%	5%
peptona de caseína	0.0%	0.5%	1.0%	1.5%
pulque centrifugado	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

(\*\*\*) Se utilizó sangre de borrego, res y humana (medios 38-45).

MEDIO DE SOPORTE DE CRECIMIENTO FINAL

MEDIO BASE ( S/A)

Agar-Agar	1.5%
Peptona de caseína	1.5%
Sangre desfibrinada y estéril(*)	5%
Pulque centrifugado	100 ml

(\*) Se utilizó sangre humana, de res y de borrego.

TABLA 10.- Usando inhibidor lauril sulfato de sodio

MEDIO	46	47	48	49	50	51
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
sangre de borrego	5%	5%	5%	-	-	-
sangre de res	-	-	-	5%	5%	5%
peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
lauril sulfato de sodio	0.0%	0.005%	0.01%	0.0%	0.005%	0.01%
pulque centrifugado	100ml	100ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

TABLA 11.- Usando inhibidor Dimetil Sulfonido

MEDIO	52	53	54	55	56
agar-agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
sangre (***)	5%	5%	5%	5%	5%
dimetil sulfoxido - -	-	4%	5%	6%	10%
pulque centrifugado	100 ml	100ml	100 ml	100 ml	100 ml

(\*\*\*) Se preparó con sangre de borrego, res y humana.

TABLA 12.- Usando inhibidor VCN( Antibióticos: Vancomicina 300-  
mcg/ml, Colistina 750 mcg/ml, Nistatina 1250 U/ml).

MEDIOS EXPERIMENTALES	MEDIO BASE S/A	MEDIO SELECTIVO C/A
agar-agar	1.5%	1.5%
peptona de caseína	1.5%	1.5%
sangre desfibrinada y estéril(***)	5%	5%
inhibidor VCN	- -	1%
pulque centrifugado	100 ml	100 ml

(\*\*\*).- Se utilizó sangre humana, res y borrego.

#### MEDIOS COMERCIALES

	Thayer-Martin	Agar-Chocolate
base de agar GC	3.6 g	3.6 g
hemoglobina	1%	1%
polienriquecimiento	1%	1%
antibióticos VCN	1%	- -
agua destilada c.b.p.	100 ml	100 ml

10.- R E S U L T A D O S .

CLAVES DEL CRECIMIENTO.

-	negativo
+	escaso desarrollo
+	moderado desarrollo
++	buen desarrollo
+++	excelente desarrollo

TABLA 1.- Consistencia del medio

Medio	1 (S)	2(S)	3(S)	4(S)
<u>Neisseria gonorrhoea</u>	-	-	-	±
<u>Streptococcus sp.</u>	-	-	+	+
<u>Staphylococcus sp.</u>	-	-	++	+
<u>Escherichia coli</u>	-	-	+	+

Nota: (S)--sólido

TABLA 2.- Variación de peptona de caseína; concs. de agar de 1.5%

Medio	5	6	7	8
<u>Neisseria gonorrhoea</u>	-	-	-	+
<u>Streptococcus sp.</u>	++	+	+	++
<u>Staphylococcus sp.</u>	++	++	+	++
<u>Escherichia coli</u>	++	++	+	++
<u>Proteus sp.</u>	++	+	+	++

TABLA 3.- Variación de extracto de levadura con conc. de agar de 1.5% y peptona de caseína de 1.5%.

Medio	9	10	11	12
<u>Neisseria gonorrhoea</u>	-	-	+	±
<u>Streptococcus sp.</u>	++	+	++	+++
<u>Staphylococcus sp.</u>	++	+	++	+++
<u>Escherichia coli</u>	++	+	++	+++
<u>Proteus sp.</u>	++	±	++	+++

TABLA 4.- Variación de Almidón con conc. de agar 1.5% y peptona de caseína 1.5%.

Medio	13	14	15	16	17	18
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Streptococcus sp.</u>	**	**	**	**	***	***
<u>Staphylococcus sp.</u>	**	**	**	**	***	***
<u>Escherichia coli</u>	**	**	**	**	***	***
<u>Protéus sp.</u>	**	**	**	**	***	***

TABLA 5.- Variando la conc. de sangre y el tipo de sangre.

Medio	19	20	21
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	+	**	**
<u>Streptococcus sp.</u>	***	***	***
<u>Staphylococcus sp.</u>	***	***	***
<u>Escherichia coli</u>	***	***	***
<u>Protéus sp.</u>	***	***	***

\*\*\* Los medios con sangre de res y humana se obtuvieron los mismos resultados.

TABLA 6.- Variando peptona de caseína y usando concs. de sangre de borrego al 5%.

Medio	22	23	24	25
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	±	±	+	**
<u>Streptococcus sp.</u>	***	***	***	***
<u>Staphylococcus sp.</u>	***	***	***	***
<u>Escherichia coli</u>	***	***	***	***
<u>Protéus sp.</u>	***	***	***	***



TABLA 7.- Medios con hemoglobina, pulque y peptona de caseína a diferentes concentraciones.

Medio	26	27	28	29
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	-	-	-	-
<u>Streptococcus sp.</u>	++	++	++	++
<u>Staphylococcus sp.</u>	++	++	++	++
<u>Escherichia coli</u>	++	++	++	++
<u>Proteus sp.</u>	++	++	++	++

TABLA 8.- Medios con hemoglobina, pulque centrifugado y peptona de caseína a diferentes concentraciones.

Medio	30	31	32	33
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	-	-	-	-
<u>Streptococcus sp.</u>	++	++	++	++
<u>Staphylococcus sp.</u>	++	++	++	++
<u>Escherichia coli</u>	++	++	++	++
<u>Proteus sp.</u>	++	++	++	++

TABLA 9.- Variando peptona de caseína y manteniendo constante sangre y pulque centrifugado.

Medio	34	35	36	37
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	+	+	++	+++
<u>Streptococcus sp.</u>	+++	+++	+++	+++
<u>Staphylococcus sp.</u>	+++	+++	+++	+++
<u>Escherichia coli</u>	+++	+++	+++	+++
<u>Proteus sp.</u>	+++	+++	+++	+++

(\*\*\*) En los medios 38-45 se observó los mismos resultados de la tabla anterior.

TABLA 10.- Usando inhibidor Lauril sulfato de sodio.

Medio	46	47	48	49	50	51
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Streptococcus sp.</u>	+++	+++	+++	++	+	+
<u>Staphylococcus sp.</u>	+++	+++	+++	+	+	+
<u>Escherichia coli</u>	+++	+++	+++	++	+	+
<u>Proteus sp.</u>	+++	+++	+++	+++	++	++

TABLA 11.- Usando inhibidor Dimetil Sulfóxido.

Medio	52	53	54	55	56
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	+++	+	=	-	-
<u>Streptococcus sp.</u>	+++	+++	++	++	-
<u>Staphylococcus sp.</u>	+++	+++	+++	++	++
<u>Escherichia coli</u>	+++	++	+	±	-
<u>Proteus sp.</u>	+++	-	-	-	-

TABLA 12.- Usando inhibidor VCN (Bioxon)

Medio	MEDIO BASE S/A	MEDIO SELECTIVO C/A
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	+++	+++
<u>Streptococcus sp.</u>	+++	-
<u>Staphylococcus sp.</u>	+++	±
<u>Escherichia coli</u>	+++	±
<u>Proteus sp.</u>	+++	±
<u>Candida albicans</u>	+++	±

VCN: Antibióticos - vancomicina 300 mcg/ml, colistina 750 mcg/ml y nistatina 1250 U/ml.

NOTAS:

- Positivo: diplococos gram negativos con caras adyacentes planas
- intra: células intracelulares.
- extra: células extracelulares.
- PMN: polimorfonucleares

MEDIOS DE CULTIVO:

- TM: Thayer-Martin } MEDIOS COMERCIALES.
- CH: Agar Chocolate }
- S/A: Medio experimental de soporte de crecimiento final, sin antibiotico.
- C/A: Medio experimental enriquecido y selectivo para Neisseria gonorrhoeae.
- P.BQS.: Pruebas bioquímicas-- positivo únicamente a la fermentación del carbohidrato Dextrosa.
- (-) no se obtuvo un crecimiento con morfología colonial típica de Neisseria gonorrhoeae.
- ... no se realizó
- M: masculino; F: femenino.
- pos: positivo

CLAVES DEL CRECIMIENTO:

- negativo
- ± escaso desarrollo
- + moderado desarrollo
- ++ buen desarrollo
- +++ excelente desarrollo.

## RESULTADOS OBTENIDOS DE MUESTRAS CLINICAS.

#	PROTIS DIRECTO	MEDIOS DE CULTIVO				OXIDASA	P.BOS.	RESULTADO	SEXO	SITIO DE OBTENCION
		TM	CH	S/A	C/A					
1	Positivo; intra(+), extra(+++), PMN(+++)	++	++	++	++	POSITIVO	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado Uretral
2	Negativo	-	-	-	-	...	...	Bacilos difteroides	F	Exudado vaginal
3	No se tomó	++	+	+	++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
4	Positivo; intra(++), extra(+++), PMN(+++)	++	+++	+++	+++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
5	Positivo; intra(++), extra(+++), PMN(+++)	+++	++	++	+++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado Uretral
6	Negativo; PMN(++)	-	-	-	-	...	...	cocos gram-positivos	M	Exudado uretral
7	Positivo; intra(+), extra(++), PMN(+++)	+	+	+	+	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
8	No se tomó	+	±	±	+	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral (control).
9	Positivo; intra(+), extra(++), PMN(+++)	++	++	++	++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
10	Positivo; intra(+), extra(++), PMN(+++)	±	+	+	±	Se pierde la cepa		Possible <u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado Uretral
11	No hay secreción	±	±	±	±	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
12	Sin secreción	-	-	-	-	...	...	cocos gram pos. y cocos bacilos gram neg.	M	Exudado uretral
13	Negativo	-	-	-	-	...	...	sin desarrollo	M	Exudado uretral
14	Positivo; intra(++), extra(+++), PMN(++)	++	++	++	++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral

#	FROTIS DIRECTO	MEDIOS DE CULTIVO				OXIDASA	P. BQS.	RESULTADO	SEXO	SITIO DE OBTENCION
		TM	CH	S/A	C/A					
15	Negativo	-	-	-	-	...	...	Bacilos difteroides	M	Exudado vaginal
16	Positivo; intra(+), extra(++), PMN(++)	+++	+++	+++	+++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
17	Negativo	-	-	-	-	...	...	cocos gram positivos	M	Exudado uretral
18	Negativo	-	-	-	-	...	...	cocos gram positivos	M	Exudado uretral
19	Negativo	-	-	-	-	...	...	bacilos gram-neg. y co- cos gram-pos.	F	Exudado vaginal
20	Negativo	-	-	-	-	...	...	levaduras	F	Exudado vaginal
21	Negativo	-	-	-	-	...	...	cocos gram-pos.	F	Exudado vaginal
22	Positivo; intra(++ extra(++), PMN(++))	±	+	+	±	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> y cocos gram-pos.	M	Exudado uretral
23	Negativo	-	-	-	--	...	...	Bacilos difteroides	F	Exudado vaginal
24	Positivo; intra(+) extra(++), PMN(++)	±	+	±	±	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
25	No se tomó	-	-	-	-	...	...	Negativo	M	Exudado uretral (control)
26	No se tomó	-	-	-	-	...	...	cocos gram-pos.	M	Exudado uretral
27	Negativo	-	-	-	-	...	...	levaduras	F	Exudado vaginal
28	Positivo; intra(++ extra(+), PMN(++))	+++	++	++	++	POS.	POS.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
29	Positivo; intra(+), extra(++), PMN(++).	++	+	+	+	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	RECTAL
30	Negativo	-	-	-	-	...	...	Bacilos difteroides	F	Exudado vaginal

#	PROTIS DIRECTO	MEDIOS DE CULTIVO				OXIDASA	F.BQS.	RESULTADO	SEXO	SITIO DE OBTENCION
		TA	CH	S/A	C/A					
31	Negativo	-	-	-	-	...	...	Negativo	M	CX. uretral(contr.
32	Positivo;intra(+), extra(+),PMN(++).	±	±	+	+	pos.	pos.	<del>Neisseria gonorrhoeae</del>	M	Exudado uretral
33	Positivo;intra(+), extra(++),PMN (+++)	±	±	±	±	Se pierde la cepa		Possible <del>Neisseria gonorrhoeae</del>	M	Exudado uretral
34	Positivo;intra(++), extra(+++),PMN(++).	±	+	+	±	pos.	pos.	<del>Neisseria gonorrhoeae</del>	M	Exudado uretral
35	Negativo	-	-	-	-	...	...	cocos gram-pos.	M	Exudado uretral
36	Negativo	-	-	-	-	...	...	levaduras	F	Exudado vaginal
37	Negativo	-	-	-	-	...	...	Bacilos difteroides y levaduras	F	Exudado vaginal
38	Negativo	-	-	-	-	...	...	Bacilos difteroides	F	Exudado vaginal
39	Negativo	-	-	-	-	...	...	Bacilos difteroides	F	Exudado vaginal
40	Negativo	-	-	-	-	...	...	<del>Trichomonas vaginalis</del> y Bacilos difteroides	F	Exudado vaginal
41	Negativo	-	-	-	-	...	...	<del>Proteus sp.</del>	F	Exudado vaginal
42	Negativo	-	-	-	-	...	...	Bacilos difteroides	F	Exudado vaginal
43	Negativo	-	-	-	-	...	...	levaduras	F	Exudado vaginal
44	Positivo;intra(+), extra(no hay), PMN (+++).	+	+	+	+	Se pierde la cepa		Possible <del>Neisseria gonorrhoeae</del> .	M	Exudado uretral
45	Negativo	-	-	-	-	...	...	<del>Proteus sp.</del>	F	Exudado vaginal

#	PROTIS DIRECTO	MEDIOS DE CULTIVO				OXIDASA	P. BQS.	RESULTADO	SEXO	SITIO DE OBTENCION
		TM	CH	S/A	C/A					
46	Positivo: intra(++), extra(+), PMN(+).	+++	+++	+++	++++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
47	Positivo: intra(+), extra(+++), PMN(+++).	++	+++	+++	++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
48	Negativo	++	±	±	++	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	F	Exudado vaginal
49	Negativo	-	-	-	-	...	...	cocos gram-pos.	M	Exudado uretral
50	Positivo: intra(+), extra(+), PMN(+++).	+	+	+	+	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	M	Exudado uretral
51	Negativo	-	-	-	-	...	...	cocos gram positivo	M	Exudado uretral
52	Positivo: intra(+), extra(+++), PMN(+). cocos gram-pos.	±	+	+	±	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> Y cocos gram-positivos	M	Exudado uretral
53	Positivo: intra(++), extra(+++), PMN(+++), levaduras	±	+	+	±	pos.	pos.	<u>Neisseria gonorrhoeae</u> y levaduras	F	Exudado vaginal

ANÁLISIS DE COSTOS.

MEDIO	PRECIO/CANTIDAD	PRECIO/LITRO DE MEDIO
Agar-Agar	\$ 298,000.00/450g	\$ 9,933.33 (1 lt. al 1.5)
Peptona de Caseína	\$ 270,410.00/250g	\$ 16,225.60 (1 lt. al 1.5%)
Sangre de Carnero	\$ 12,000.00/20ml	\$ 30,000.00 (1 lt. al 1.5%)
Pulque	\$ 800.00/lt	\$ 800.00/lt.
Base de Agar-Sangre	\$ 159,211.00/450 g	\$ 14,152.08 (40g en 1 lt.)
Base de Agar-GC	\$ 138,130.00/250 g	\$ 19,890.72 (36 g en 1 lt.)
Hemoglobina	\$ 266,790.00/10 g	\$266,790.00 (1 lt.)
Antibióticos VCN	\$ 326,800.00/16 viales	\$102,125.00 (5 viales/lt.)
Polienuqueamiento	\$ 434,200.00/16 viales	\$135,687.50 (5 viales/lt.)

MEDIO S/A.....\$ 56,957.93/lt; utilizando sangre de carnero  
 \$ 26,957.93/lt, sin sangre de carnero

MEDIO C/A.....\$ 159,082.93/lt, utilizando sangre de carnero  
 \$ 129,082.93/lt. sin sangre de carnero

MEDIO AGAR CHOCOLATE.....Base de agar GC más sangre de carnero=  
 \$ 49,890.72/lt.

Base de agar GC más hemoglobina, más polienuqueamiento.....= \$422,368.00/lt.

MEDIO THAYER-MARTIN.....Base de agar GC, sangre, antibióticos VCN y polienuqueamiento.....\$ 287,703.00/lt.

Base de agar GC, hemoglobina, antibióticos VCN y polienuqueamiento....= \$ 554,493.00/lt.

LISTA DE PRECIOS DE PRODUCTOS MERCK, S.A.; VIGENTES AGOSTO/1989.



## 11.- ANALISIS DE RESULTADOS.

### ETAPA I. SOPORTE DE CRECIMIENTO.

Comprende las tablas 1-9. En esta etapa se pretendía obtener la formulación idónea para el crecimiento de Neisseria gonorrhoeae empleando el pulque como fuente nutritiva.

En la tabla número uno, se procedió a variar la concentración de agar para obtener un medio lo suficientemente sólido y así poder estriar en él, quedando mejor con 1.5% de agar en cuanto a consistencia y crecimiento. Se observa escaso crecimiento de todas las bacterias probadas por lo que esto nos sirvió también como pauta para considerar la necesidad de suplementar el pulque - esperando obtener un mejor crecimiento. De esta manera en las tablas 2-4, se emplearon como enriquecedores: peptona de caseína, extracto de levadura y almidón en diferentes concentraciones observándose que la peptona de caseína mejoró un poco el crecimiento de Neisseria gonorrhoeae en concentraciones de 1.5%. El extracto de levadura más peptona de caseína no mejoró el desarrollo de Neisseria gonorrhoeae y si perjudicó aumentando el crecimiento de las bacterias contaminantes. El almidón no permitió observar a Neisseria gonorrhoeae en el medio de cultivo y si un excelente crecimiento de las otras bacterias. Por lo anterior se eliminó el extracto de levadura y almidón como enriquecedores quedando únicamente la peptona de caseína en concentraciones de 1.5%.

Otra alternativa fue emplear hemoglobina como fuente nutritiva pero esta se precipitó después de ser esterilizada con el pulque.

Un excelente nutriente para Neisseria gonorrhoeae fue la sangre completa, no importando el tipo o lugar de donde se obtuviera. La concentración más idónea fue al 5% en donde se permitió un buen crecimiento de Neisseria sin que las bacterias contaminantes la inhibieran.

En la tabla número nueve se optó por usar pulque centrifugado (sobrenadante del pulque al centrifugarse), debido a que se obtuvo un mejor crecimiento; y, porque cuando se utiliza pulque completo en el frotis de Gram aparecen levaduras y escasas cadenas de bacilos delgados y largos como contaminantes del pulque. Ambos microorganismos se mueren por la esterilización del pulque pero puede prestarse a confusiones en un observador poco experimentado en este tipo de medios.

Por todo lo anterior se quedó como medio de soporte de crecimiento final al medio de la tabla 12 (S/A), cuya composición es:

#### MEDIO BASE

Agar-Agar	1.5%
Peptona de caseína	1.5%
Sangre desfibrinada y estéril (*)	5%
Pulque centrifugado c.b.p.	100 ml

(\*) Se utilizó sangre humana, res y borrego.

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

## ETAPA II. SELECTIVIDAD:

Para esta etapa se emplearon una serie de inhibidores químicos, no muy potentes como: Lauril Sulfato de Sodio y Dimetil Sulfóxido; debido a que Neisseria gonorrhoeae es una bacteria muy lábil en ese aspecto, no obteniéndose buenos resultados pues a concentraciones no muy altas de estos inhibidores la Neisseria sí se inhibe y las bacterias contaminantes no.

También se le realizaron pruebas de susceptibilidad "in vitro" con antibióticos resultando ser sensible a todos los probados, los cuales se describen a continuación: eritromicina, cefalosporina, ampicilina, furadantina, cefotaxima, sulfametoxazol, penicilina, ác. nalidixico, cloranfenicol, tetraciclina, colimicina, gentamicina, carbenicilina, ampicilina, ác. oxolínico.

Por todo esto se tuvo que proceder al empleo de los antibióticos de rutina (Nistatina 1250 U/ml, Colistina 750 mcg/ml, Vancomicina 300 mcg/ml).

El medio de pulque adicionado con antibióticos esta constituido como sigue:

### MEDIO SELECTIVO (C/A)

Agar-Agar	1.5%
Peptona de caseína	1.5%
Sangre desfibrinada y estéril	5%
Pulque centrifugado c.b.p.	100 ml
Inhibidor VCN	1%

### ACLARACIONES:

- La formación de burbujas debe ser evitada.
- En todo transcurso de la elaboración del medio problema se comparo con los medios comerciales: Agar Chocolate y Thayer Martin y además se empleo cepas identificadas.
- Cada medio experimental se probó mínimo tres veces (repetitividad).

## ETAPA III. ESTABILIDAD.

Se preparó un lote de 24 cajas; se guardaron 12 en una bolsa de polietileno y en refrigeración (GRUPO A); las 12 restantes sólo en refrigeración (GRUPO B) De estas cajas se sacaron 4 de ellas cada 15 días (dos de cada grupo) y se sembraron con la misma cepa de Neisseria gonorrhoeae; esto se hizo durante tres meses. Los resultados fueron los siguientes:

### D I A S

	0	15	30	45	60	75	90
GRUPO A	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
GRUPO B	+++	++	+	±	-	-	-

Las cajas del grupo B rápidamente se fueron deshidratando y algunas contaminando, afectando por lo tanto el crecimiento de Neisseria gonorrhoeae.

#### ETAPA IV. PRUEBA CON MUESTRAS CLINICAS.

**METODOLOGIA:** Se realizó por el método de Siembra Directa. Se utilizó dos medios comerciales (Thayer Martín y Agar Chocolate), y dos medios experimentales (Medio experimental de soporte de crecimiento final S/A y medio experimental enriquecido y selectivo C/A).

Una vez inoculados se incuban de inmediato a 35-37°C en una atmósfera de tres al 10% de CO<sub>2</sub> y en condiciones que preservan la humedad.

Se observó, tanto en los medios comerciales como en los experimentales, que la cantidad de crecimiento dependía de cual medio se descargaba primero el hisopo con la muestra clínica.

Además cuando se probó con muestras clínicas se observó que la utilidad del frotis teñido con Gram es máxima cuando se aplica en población masculina sintomático, ya que se obtiene cifras muy altas tanto de sensibilidad como de especificidad.

La situación es diferente cuando se trata de pacientes portadores masculinos asintomáticos, en los cuales se encuentra mucho menor cantidad de Neisseria gonorrhoeae y no hay descarga uretral ni polimorfonucleares. Esto es todavía más importante cuando se trata de gonorrea en la mujer, ya que en ella el frotis es aún menos confiable. La limitación de este recurso metodológico en el material procedente del endocervix radica en la posibilidad de confundir con diplococos gramnegativos otros miembros de su abundante flora normal, como los cocos gram-positivos decolorados en exceso y cocobacilos gram-negativos agrupados en pares. Además existen variaciones muy grandes en la concentración de Neisseria gonorrhoeae en la secreción cervicovaginal, desde  $4 \times 10^7$  hasta  $1.8 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias.

En general, tanto el médico como el personal de laboratorio deben estar concientes que el hallazgo de cocos gram-negativos en pares no constituye necesariamente un diagnóstico de gonorrea. Las bacterias sospechosas deben tener, obligadamente, la apariencia típica del gonococo. Aunado a estas características, hay que considerar la signología y sintomatología clínica. Así pues el método de elección para comprobar el diagnóstico de gonorrea es el aislamiento de medios selectivos de cultivo de Neisseria gonorrhoeae.

## 12.- C O N C L U S I O N E S .

El medio de soporte de crecimiento final esta constituido compsi- que:

	MEDIO BASE (S/A)
Agar-agar	1.5%
Peptona de caseína	1.5%
Sangre desfibrinada y estéril (*)	5%
Pulque centrifugado	100 <sup>4</sup> ml

El medio de pulque adicionado con antibioticos y cuya composición es:

	MEDIO SELECTIVO (C/A)
Agar-agar	1.5%
Peptona de caseína	1.5%
Sangre desfibrinada y estéril (*)	5%
Pulque centrifugado c.b.p.	100 ml
Inhibidor VCN	1%

(\*) Se utilizó sangre humana, de res y de borrego.

Neisseria gonorrhoeae es un microorganismo exigente para su crecimiento "in vitro". En el presente trabajo se obtuvo la formulación de un medio de cultivo cuya base nutritiva principal es el "pulque centrifugado" (sobrenadante del pulque al centrifugarse)-adicionado de peptona de caseína como fuente de proteínas y sangre al 5% con resultados similares a los obtenidos con el medio comercial Thayer-Martin.

Con este nuevo medio se abarató el costo del análisis, aunque se emplearon los mismos antibioticos.

En el desarrollo de las colonias, la morfología macroscópica no cambia, tampoco la morfología microscópica. Además la cantidad de crecimiento de las cepas problema es similar al de los medios comerciales: Thayer-Martin y Agar-Chocolate.

Este medio tiene la misma desventaja que los medios comerciales debido a que ya existen cepas resistentes a los antibioticos empleados.

Los medios de cultivo selectivos cuentan en su composición a sustancias que inhiben el desarrollo de un gran número de bacterias, pero no de las de interés para el microbiólogo. De este modo, al medio base se le añaden antibioticos, sales, colorantes, etc. y según su variedad y cantidad, los medios que los contienen se subclasifican en cuanto a su grado de selectividad.

Un ejemplo típico de medio de baja selectividad es el agar de MacConkey que sólo inhibe a las bacterias gram-positivas y algunas gram-negativas muy exigentes.

Un medio de selectividad intermedia es el agar *milosa-lisina-desoxicolato* (XLD) que interfieren a todas las bacterias gram-positivas y la mayoría de las gram-negativas, a excepción de *Salmonella* y *Shigella*.

Un medio de alta selectividad como el agar sulfito de bismuto prácticamente sólo permite el crecimiento de Salmonella y el agar manitol el de Staphylococcus aureus.

En nuestro caso Thayer-Martin esta considerado como un medio de alta selectividad y al añadirle a nuestro medio experimental los mismos antibióticos empleados en el Thayer-Martin, consideramos a éste último como un medio de alta selectividad. Por otro lado, en la parte experimental observamos que ambos medios nos inhiben en gran medida las bacterias no deseadas, sin embargo esta selectividad no fue al 100%. No obstante ambos medios nos permiten observar el desarrollo de Neisseria gonorrhoeae sin que las bacterias patógenas y comensales obstruyan el crecimiento de dicha bacteria.

En conclusión se formuló un medio de cultivo enriquecido y selectivo para Neisseria gonorrhoeae utilizando pulque como nutriente. Además se disminuyó los costos para el diagnóstico de infecciones genitourinarias producidas por éste microorganismo.

**PROPUESTA:** Se sugiere realizar una investigación más a fondo debido a que este medio también se podría utilizar para la identificación de otros microorganismos que producen infecciones genitourinarias.

13.- B I B L I O G R A F I A .

- 1.- De la Cruz Glz. R. y cols. Utilidad del Examen Microscopico para el Diagnóstico de gonorrea, Salud Publ. Méx.;(1978);29(3): 190.
- 2.- Caiderón, E. y De la Cruz Glz. R. "Avances en el conocimiento de la gonorrea". Infectología;(19);(1):41-49.
- 3.- Productos Winthrop, S.A. "Blenorragia en el hombre".
- 4.- Koneman, Allen, Dowell y Sommers; Diagnóstico Microbiológico; Ed. Médica Panamericana; Buenos Aires, Argentina;(1985): 315-323.
- 5.- Martínez Ramos, A. Gonococo 1a. parte; Infectología; (1987); 7(2):71-75.
- 6.- Martínez Ramos, A. Gonococo 2a. parte; Infectología;(1987);7 (3):103-107.
- 7.- Baguet, F. Aspectos Científicos actuales del pulque en México; Tesis del Instituto de Biología; México;(1967):20-32.
- 8.- Marton, G. Balance de nitrógeno en la elaboración del pulque; Tesis del Instituto de Biología; México; (1976).
- 9.- Rojo García L., Formulación de un medio de cultivo para bacterias anaerobias a base de pulque; Tesis ENEP-Zaragoza; México; (1987):18-27.
- 10.- Hernández, M. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos; Publicaciones de la División de Nutrición Mexicana; (1977).
- 11.- Monroy, M. Valor nutritivo del Xistle; IPN; México;(1967): 203-214.
- 12.- Massieu, S. Determination of some essential aminoacids in several uncooked Mexican Foodstuffs; J. Nutrition;(1970);28:293-294.
- 13.- Hafiz, S. y McEntergart, M. Prolonged Survival of Neisseria gonorrhoeae in a New Liquid Medium; Br. J. Vener. Dis. 52:381-383.
- 14.- Hunter K Mc I Mc Veigh; Development of a Chemically Defined - Medium for Growth of Neisseria gonorrhoeae; Antonievan Leeuwenhoek. J. Microbiol and Serol;(1970);36:305-316.
- 15.- Kenny, CP. Diena, BB. Wallace, R. y Greenberg, L. Cultivation and Properties of Neisseria sp. Grown in Chemically Defined Media. Can. J. Microbiol.(1972):18:1083-1090.
- 16.- Chan, K. y Wisseman, G.M. A New Colony Type of Neisseria gonorrhoeae. Br. J. Vener. Dis.(1975);51:251.
- 17.- Brookes, R. y Heden, G.C. Dense Cultures of Neisseria gonorrhoeae in Liquid Medium. Appl. Microbiol.(1967a);15:219-223.

- 18.- Brookes, R. y Sikyta, B. Influence of pH on the Growth Characteristics of Neisseria gonorrhoeae in Continuous Culture. Appl. Microbiol.(1967b);15:224-227.
- 19.- Bacigalupi, Ba. y Lawson, J.W. Defined Physiological Conditions for the Induction of L-Forms of N. gonorrhoeae. J. Bacteriol.(1973);116:778-784.
- 20.- Catlin, B.W. Nutritional Profiles on Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis and Neisseria lactamica in Chemically Defined Media and the Use of Growth requirements for Gonococcal Typing. J.Infect. Dis. (1973);128:178-194.
- 21.- Carifo, K. y Catlin, B.W. Neisseria gonorrhoeae Auxotyping: Differentiation in Clinical Isolates Based on Growth Responses on Chemically Defined Medium. Appl. Microbiol.(1973);26: 223-230.
- 22.- La Scolea, L.J. y Young, F.E. Development of a Defined Medium for the Growth of Neisseria gonorrhoeae. Appl. Microbiol. (1974);28:70-76.
- 23.- La Scolea, L.J, Dul, M.J. y Young, F.E. Stability of Pathogenic Colony Types of Neisseria gonorrhoeae in Liquid Culture by Using the Parameters of Colonial Morphology and Dioxynucleic Acid Transformation. J. Clin. Microbiol.(1974);11:165-170.
- 24.- Catlin, B.W. Nutritional Requirements and Auxotyping. En Roberts R.B. The Gonococcus. John Wiley and Sons. Ed. N.Y.(1977); 91-210.
- 25.- Soltesz, L.V. y Madh, P.A. Serum Free Liquid Medium for Neisseria gonorrhoeae. Current Microbiology.(1980);4:45-49.
- 26.- James-Holmquest A.N., Wende, R.D., Mudd, R.L. y Williams, R. F.; Comparison of Atmospheric Conditions for Culture of Clinical Specimens of Neisseria gonorrhoeae. Appl. Microbiol.(1973); 26:466-469.
- 27.- Morse, S.A., Miller, R.D. y Hebel, B.D.; Physiology and Metabolism of Neisseria gonorrhoeae. En Roberts. B.D. The Gonococcus; John Wiley and Sons; N.Y.;(1977);197-212.
- 28.- Williams, R.F. y Wende, R.D.; "Anaerobic" Growth of Gonococci and the Candle Jar.; JAMA;(1972);212-222.