

Sustitución de sales biliares por bilis de buey fresca en el medio de cultivo Caldo Tetrionato. CPHEM, 2009.

Replacement of bile salts by fresh ox bile in the culture medium Tetrionate Broth. CPHEM, 2009.

Autores: Dr. Idalberto Creagh Bandera¹; Lic. Lourdes M. Expósito Boué² y Lic. Inés María Creagh Banderas³ Dra Aracelis García Pérez

Formación profesional: Especialista en Medicina General Integral ¹; Master en Enfermedades Infecciosas, Profesor Asistente² y Msc. Enfermedades Infecciosas y Pedagogía, Profesor Auxiliar³. Especialista Segundo Grado en Fisiología Normal y Patológica. Profesor Auxiliar⁴

Centro de Trabajo: Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas de Guantánamo⁴.

Teléfono: 32-6454².

Resumen.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del CPHEM de Guantánamo, con el objetivo de sustituir las sales biliares por bilis de buey fresca en el medio de cultivo Caldo Tetrionato (CT), utilizado para el diagnóstico microbiológico de *Salmonella* en productos cárnicos, por el insuficiente suministro de este producto. Se confeccionó el medio de cultivo utilizando las sales biliares y bilis de buey la fresca obtenida de la vesícula biliar del buey, utilizándose de forma concurrente en la siembra de 30 muestras de productos cárnicos, obteniendo idénticos resultados con ambos medios, también se realizó control de calidad con cepas normadas a los diferentes lotes. Se realizaron 182 investigaciones de cárnicos, aislándose 13 *Salmonella*. Se concluye que es posible la sustitución de las sales biliares por bilis de buey fresca, obteniendo buen rendimiento del medio de cultivo.

Palabras clave: sales biliares, bilis de buey fresca, Caldo Tetrionato, control de calidad.

Abstract.

The study was conducted at the Laboratory of Microbiology CPHEM Guantánamo with the aim of replacing the bile salts in bile fresh

beef in the broth culture medium Tetrionate (CT), used for the microbiological diagnosis of *Salmonella* in meat products, by the insufficient supply of this product. He drafted the culture medium using bile salts and bile obtained from fresh ox gall bladder of the ox, used concurrently in the planting of 30 samples of meat products, obtaining identical results with both media, we also performed control normed quality strains for different batches. 182 investigations were made of meat, 13 *Salmonella* isolated. Concluded that it is possible to replace bile salts by fresh ox bile, achieving good yield from the culture medium.

Keywords: bile salts, fresh ox bile, broth Tetrionate, quality control.

Introducción.

Las sales biliares son un componente del medio de cultivo Caldo Tetrionato (CT), utilizado en Bacteriología Sanitaria para el diagnóstico de *Salmonella*, indicador de la calidad microbiológica de los cárnicos. Ocasionalmente este producto (sales biliares) no es suministrado, afectando el diagnóstico de *Salmonella* en cárnicos.

La determinación de *Salmonella* en alimentos utilizados para el consumo humano es importante, ya que estos microorganismos producen cuadros clínicos como gastroenteritis, bacteriemia o septicemia, fiebre tifoidea y el estado de portador.

La *Salmonella* es responsable de enfermedades de transmisión digestiva, que son consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como uno de los problemas de la salud pública más extendidos en los países en vías de desarrollo.

La bilis es una sustancia líquida, viscosa, de color verde amarillento, ácida, neutra o ligeramente alcalina, segregada por el hígado y vertida en la vesícula biliar, donde es almacenada. Está constituida por ácidos biliares, electrolitos, bilirrubina, colesterol, y fosfolípidos. En los medios de cultivo la bilis de buey, al igual que las sales biliares, son utilizadas como agente selectivo e inhibitorio de la flora Gran positiva, permitiendo el crecimiento de coliformes.

Partiendo de esta situación problema, se desarrolló el presente estudio, con el objetivo de sustituir las sales biliares por bilis de buey fresca en el medio de cultivo CT y disponer de un producto natural que ofrezca igual resultado que el producto manufacturado de referencia, manteniendo el rendimiento del medio de cultivo.

Materiales y métodos.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene de Guantánamo.

Se realizó un análisis de la composición del medio CT y se propone:

| Base Caldo Tetrionato con sales biliares | | Base Caldo Tetrionato con bilis de buey fresca | |
|--|------|--|---------------|
| Composición | g/l | Composición | g/l |
| Peptona de caseína | 2,5 | Peptona de caseína | 2,5 |
| Peptona de carne | 2,5 | Peptona de carne | 2,5 |
| Sales biliares | 1,0 | Bilis de buey fresca | 12 mililitros |
| Carbonato de calcio | 10,0 | Carbonato de calcio | 10,0 |
| Tiosulfato de sodio | 30,0 | Tiosulfato de sodio | 30,0 |

Descripción: el CT es utilizado como caldo de enriquecimiento selectivo para el aislamiento de *Salmonella* de diferentes muestras. El tetrionato no forma parte de la formulación del medio de cultivo, este se sintetiza por la reacción de oxidación que ocurre entre el tiosulfato y el yodo adicionado antes de usar el medio. El tetrionato es extremadamente termolábil, por lo que el medio no debe ser sobrecalentado una vez que el yodo es adicionado. Los productos ácidos formados por la descomposición del tetrionato son neutralizados por el carbonato de calcio. Los

microorganismos tales como *Salmonella* y *Proteus* que poseen la enzima tetratonato reductasa crecen en el medio, *Escherichia coli* y *Shigella* no la poseen por lo que no crecen. Las sales biliares inhiben a los microorganismos que no viven usualmente en el intestino como los Gram positivos.

Para realizar la sustitución de las sales biliares por bilis fresca, se partió de que la bilis contiene sales biliares, además, un gramo bilis deshidratada, equivale aproximadamente de 10-12 mililitros de bilis de buey fresca. Se tomó la proporción de un gramo de bilis deshidratada equivale a 12 mililitros de bilis fresca, por lo que se adicionó 12 mililitros de bilis fresca a un litro de CT.

La base de CT se puede preparar y guardarla durante varias semanas a 4°C, se le agrega la solución de iodo-ioduro a la cantidad el medio a utilizar. Se debe utilizar todo el medio una vez que se ha adicionado el yodo, porque el tetratonato se forma en el momento de la adición del yodo y es extremadamente termolábil.

Solución de iodo-ioduro.

Yodo.....6 gramos.
Ioduro de potasio.....5 gramos.
Agua destilada..... 20 mililitros.

Obtención de la bilis de buey fresca.

Se realizó un convenio con el matadero de la ciudad para la obtención de la bilis fresca. En un frasco estéril se vertió en contenido de una vesícula biliar de buey, en condiciones asépticas, trasladándose al laboratorio donde se procedió a:

- Se realizó control de esterilidad de la bilis fresca en los medios de Agar Sangre y Medio de Tioglicolato e incubando a 37°C durante 72 horas.
- Se distribuyó la bilis fresca en tubos de cultivo 125 por 20 milímetros con tapa de rosca en alícuotas de 12 mililitros, para su conservación de 2 a 8°C y con periodicidad semanal confeccionar nuevos lotes de los medios de cultivo para determinar cuanto tiempo puede ser conservada en refrigeración manteniendo sus propiedades inhibitoras.
- Se confeccionó el medio de cultivo con las sales biliares y la bilis conservada en refrigeración (fresca) y se utilizaron de forma concurrente en la siembra de 30 muestras de cárnicos.
- Se realizó control biológico con las cepas normadas (*Salmonella thyphimurium*, control positivo y *Escherichia coli*, control negativo), para verificar su rendimiento, a cada lote de CT confeccionado con sales biliares y bilis fresca, con intervalos de 7 días, para determinar cuanto tiempo podía ser conservada la bilis fresca en refrigeración.

Resultados y discusión.

Como resultados de la parte experimental se obtuvo:

El control de la esterilidad de la bilis de buey obtenida directamente de la vesícula biliar del buey, en el matadero, en condiciones de esterilidad, en todos los casos fue

satisfactorio, es decir no se obtuvo crecimiento de microorganismos, lo que informa sobre la esterilidad del producto y asegura que no introdujo contaminantes en el CT.

La bilis fresca, distribuida en tubos de cultivo en alícuotas de 12 mililitros, mantuvo durante el tiempo de almacenaje en refrigeración, sus propiedades visuales de ser un líquido viscoso y color verde amarillo. A los 25 días en refrigeración se comenzó a notar la presencia de grumos, los cuales al confeccionar el medio aportaron turbidez al mismo.

Al realizar control de calidad a los diferentes lotes de los medios de cultivo CT, confeccionados con la bilis fresca y a los 8, 15, 22 y 29 días de almacenada en refrigeración, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla No. 1. Resultados del control de calidad del medio Caldo Tetratonato con bilis de buey fresca conservada en refrigeración.

| Lotes de bilis de buey | Cepas normadas de control de calidad | | Aspecto visual de la bilis conservada en refrigeración |
|----------------------------------|---|-------------------------|--|
| | <i>Salmonella thyphimurium</i> | <i>Escherichia coli</i> | |
| Bilis fresca (recién tomada) | Crecimiento excelente, colonias de color rojo | Crecimiento inhibido | Líquido viscoso, verde amarillento |
| Bilis conservada por 7 días | | | |
| Bilis conservada por 15 días | | | |
| Bilis conservada por 22 días | | | |
| Bilis conservada durante 29 días | Crecimiento excelente, colonias de color rojo | Crecimiento inhibido | Líquido muy viscoso, con abundantes grumos |

Se decide trabajar con la bilis de buey almacenada en refrigeración hasta 22 días, por no formar grumos que puedan interferir en la lectura y en el rendimiento del medio.

Los resultados de las siembras concurrentes en los medios CT confeccionados con sales biliares y bilis fresca fueron idénticos, lo que indica la capacidad de la bilis de buey fresca en la inhibición de los microorganismos Gram positivos, al igual que la sales biliares, lo que constituye una alternativa que permite mantener el diagnóstico de *Salmonella* en productos cárnicos, ante el déficit de sales biliares.

Luego de obtenidos estos resultados se procedió a la utilización del medio CT confeccionado con bilis fresca, en la siembre de 182 muestras, aislándose 13

Salmonella de jamonadas, lo que resulta un indicador de que el proceso de elaboración o de almacenamiento no ha sido efectivo.

Tabla No. 2. Aislamientos de *Salmonella* de productos cárnicos.

| Investigaciones | Positivas | Negativas | Total |
|---|-----------|-----------|-------|
| <i>Salmonella</i> en productos cárnicos | 13 | 169 | 182 |

Conclusiones.

Las sales biliares pueden ser sustituidas por bilis de buey fresca, obteniéndose buen rendimiento del medio de cultivo CT en el diagnóstico *Salmonella* en productos cárnicos. Se debe conservar en refrigeración y utilizarla solo hasta 22 días de refrigerada para mantener la calidad del diagnóstico.

La aplicación de esta sustitución desde 1994, constituye una alternativa que ha permitido mantener el diagnóstico de *Salmonella* en cárnicos.

Bibliografía.

- Bridson EY. The Oxoid Manual. (1998). Inglaterra: OXOID. *Merk. Handbook of Microbiology*. (1980). Federal Republic of Germany: E. Merck Darmstadt.
- Control de los principales patógenos en alimentos. (2009). Recuperado de: <http://www.madrimasd.org/blogs/>
- Apao, J. [et. al.]. (2008). *Introducción a la salud pública*. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas.
- Balsalobre, V. (2003). Frecuencia y serotipos de "Salmonella entérica" en alimentos de distinta naturaleza. *Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, (344), p. 11-16. Recuperado de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=621043>
- Llop, A.; Valdés, V. & Suazo, J. L. (2001). *Microbiología y parasitología médicas*. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas.
- Jawetz, E.; Melnick, J. L. & Adelberg, E.A. (2008). *Manual de Microbiología Médica*. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas.
- Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica. (1993). Ginebra, Suiza: OMS.
- Pruebas bioquímicas y fundamentos de microbiología. (2008). Recuperado de: www.scribd.com/.../pruebas-bioquimicas-fundamentos-microbiologia.
- Rodríguez, C. & Zhurbenko, R. (2001). *Manual de Medios de Cultivo*. La Habana: Centro Nacional de Biopreparados (BioCen).
- Weng, Z. [et. al.]. (2011). Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencias. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 42(1). Recuperado de: http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol42_1_04/hie04104.htm

Fecha de recibido: 23 may. 2011
Fecha de aprobado: 20 jul. 2011