

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS (BIOCEN)

Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica

Lic. Anabel Durán Vila,¹ Ing. Raisa Zhurbenko² y Lic. Diana R. Viera Oramas³

RESUMEN

Se propuso obtener un producto óptimo, donde se incrementara la velocidad de crecimiento y la diferenciación de los microorganismos en el medio, como resultado de la combinación adecuada de los nutrientes. La rapidez en la identificación y caracterización de un agente infeccioso contribuye a aplicar al paciente una terapia adecuada. El *agar manitol salado* es un medio altamente selectivo para el aislamiento primario de estafilococos patógenos, cuya composición incluye el alcohol polihidroxílico (manitol). Este sustrato permite la identificación de estafilococos coagulasa-positivos pertenecientes fundamentalmente a la especie *Staphylococcus aureus*, por su capacidad de fermentar el manitol, característica que ha sido considerada como un índice de patogenicidad. Se realizaron modificaciones en la formulación del medio agar manitol salado, obteniéndose un producto similar al medio de referencia, con características físico-químicas y microbiológicas superiores, sin presentar diferencias significativas ($p > 0,05$) en comparación con el producto de referencia utilizado.

Palabras clave: *Staphylococcus*, identificación, aislamiento, medio de cultivo.

Los medios de cultivo desempeñan un papel primordial en el diagnóstico clínico de enfermedades y en la higiene alimentaria. Los nuevos microorganismos reconocidos como agentes patógenos exigen mayores requisitos respecto a la especificidad y sensibilidad de diagnóstico, por lo que se hace difícil lograr un producto para la caracterización rápida e identificación de estos. Es esencial, por ello, el uso de medios de cultivo primarios adecuados y de respuesta rápida, para lograr así el aislamiento óptimo de los microorganismos.¹

El agar manitol salado es un medio selectivo usado para el aislamiento de estafilococos patógenos, especialmente *Staphylococcus aureus*, considerado un patógeno bacteriano serio desde

que desarrolló resistencia a la penicilina en 1950.¹ El agar manitol salado ha sido empleado también en estudios de resistencia a antibióticos, en los cuales ha demostrado una especificidad de 98,1 % y una sensibilidad de 95,1 % con cepas de *Staphylococcus oxacillina* resistentes.²

El agar manitol salado incluye en su composición el indicador de pH: rojo fenol. Este indicador es de color rojo a pH 8,2 y cambia a amarillo a pH por debajo de 6,8. Cuando se desarrollan las colonias de *Staphylococcus aureus* fermentadoras de manitol, se produce ácido en el medio, el cual reacciona con el indicador y forma las áreas de color amarillo alrededor de las colonias, reacción característica de los estafilococos patógenos.³

¹ Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada.

² Ingeniera Tecnóloga. Investigadora Titular.

³ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Agregada.

Sin embargo, la alta concentración del indicador puede afectar la calidad del medio de cultivo porque la mayoría de estos indicadores son tóxicos para los microorganismos. Además, la cantidad excesiva de indicador sulfoftaleínico (como el rojo fenol) proporciona al medio de cultivo una capacidad de *buffer* adicional y disminuye la difusión de los ácidos metabólicos. Por otra parte es necesario que el medio de cultivo posea una adecuada composición de bases nutritivas para contrarrestar el efecto inhibitorio de la alta concentración de cloruro de sodio y lograr una rápida y eficiente recuperación de estafilococos.

Por todo lo anterior mencionado y en respuesta a las exigencias actuales del diagnóstico microbiológico, se decidió realizar modificaciones a la formulación original del medio agar manitol salado, buscando mayor velocidad en la identificación.

MÉTODOS

Las variables para la optimización de la formulación del medio fueron la composición de bases nutritivas y la concentración de colorante.

Para realizar las diferentes variantes a escala experimental se emplearon bases nutritivas obtenidas en BioCen (Cuba) e ingredientes de QueLab (Canadá) (D-manitol, cloruro de sodio, rojo fenol, agar), además del medio de referencia: agar manitol salado QueLab (lote: 23181743) y agar para conteo en placa QueLab (lote: 21071742). Se evaluaron 5 variantes experimentales (tabla 1).

En la evaluación microbiológica de las variantes experimentales se usaron cepas certificadas de la *American Type Culture Collection* (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922) y, además una cepa salvaje de *Staphylococcus saprophyticus*. Los métodos de inoculación empleados fueron el de estría en ángulo recto e inundación de la superficie. Las diluciones empleadas en la inoculación del medio fueron: 10^{-6} para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*, y 10^{-5} para *Staphylococcus epidermidis*.^{4,5}

Se analizó el crecimiento de los microorganismos en el tiempo midiendo la densidad óptica, por el método espectrofotométrico a 640 nm.⁶⁻⁸

El número de bacterias en las suspensiones inoculadas fue determinado mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas en las placas. Para el análisis estadístico se empleó la prueba de rangos múltiples con un nivel de confianza de 95 %, para comparar la diferencia entre las medias de los recuentos microbianos.

El paquete de programas utilizado para el análisis de los resultados obtenidos fue STATISTICA (versión 4.2; Copyright, Statsoft, Inc. 1993) y Statgraphics (versión 2.1, 1994-96).

Para evaluar la capacidad del medio de promover el crecimiento se determinó el *índice relativo de crecimiento* (IRC) para los microorganismos de control positivo por la relación siguiente:

$$\text{IRC} = \frac{\text{Recuento obtenido en el medio experimental (UFC)}}{\text{Recuento obtenido en el medio control (UFC)}} \times 100$$

Método analítico: determinación espectrofotométrica de la concentración óptima del colorante rojo fenol en el medio agar manitol salado.

TABLA 1. Composición de las diferentes variantes experimentales de bases nutritivas

Ingredientes	Composición (g/L)				
	V1	V2	V3	V4	V5
Peptona Z	10,0	6,5	4,0	4,0	4,0
Triptona	-	6,5	4,0	4,0	4,0
Extracto de levadura	-	2,0	2,0	2,0	2,0
Extracto de carne	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Peptona de sangre	-	-	5,0	-	-
Peptona pancreática de corazón I	-	-	-	5,0	-
Peptona pancreática de corazón II	-	-	-	-	5,0
Cloruro de sodio	75,0	70,0	70,0	70,0	70,0

Los valores de absorbancia fueron medidos a 430 nm, lo que corresponde al valor máximo de absorbancia para el colorante estudiado. Como blanco se utilizó el medio líquido (sin agar y sin colorante) manitol salado. La concentración óptima del indicador de pH fue seleccionada a partir de diferentes variantes del medio agar manitol salado líquido utilizando las concentraciones de rojo fenol siguientes: 0,005 g/L; 0,15 g/L; 0,025 g/L; 0,035 g/L y 0,050 g/L.

A escala piloto se produjo un lote de 1 kg, utilizando la formulación de la variante V4. Al producto final y al medio de referencia de QueLab se le determinaron diferentes índices organolépticos y físico-químicos, como el contenido de nitrógeno total por el método de *Kjeldahl*,⁹ nitrógeno amínico por el método de valoración potenciométrica con formol, pérdida por desecación por el método gravimétrico, pH por el método potenciométrico y características organolépticas por apreciación visual.¹⁰⁻¹²

La evaluación microbiológica incluyó los ensayos de promoción del crecimiento empleando cepas certificadas mediante el método de inoculación por estría en ángulo recto

e inundación de la superficie. Las cepas de trabajo fueron preparadas partiendo de cultivos puros de 18 a 24 h en cuña de un medio de propósito general (agar nutriente, agar triptona soya) y activadas en caldo triptona soya antes de ser utilizadas. Se prepararon suspensiones de los microorganismos con solución salina estéril a 0,85 % y estandarizadas hasta 50 % de transmitancia, que equivale aproximadamente a $3,0 \times 10^8$ células/mL.

RESULTADOS

Con la ayuda de las variantes experimentales se obtuvo el valor óptimo del indicador rojo fenol (0,0083 g/L). Paralelamente se realizaron las curvas de crecimiento de 5 variantes de mezclas de bases nutritivas para lograr definir aquella que proporciona la mayor cantidad de nutrientes y permite la rápida recuperación de las cepas de interés (*Staphylococcus*). El análisis estadístico realizado a los valores de absorbancia obtenidos en las curvas (figs. 1 y 2) arrojó que la mejor variante fue la variante 4.

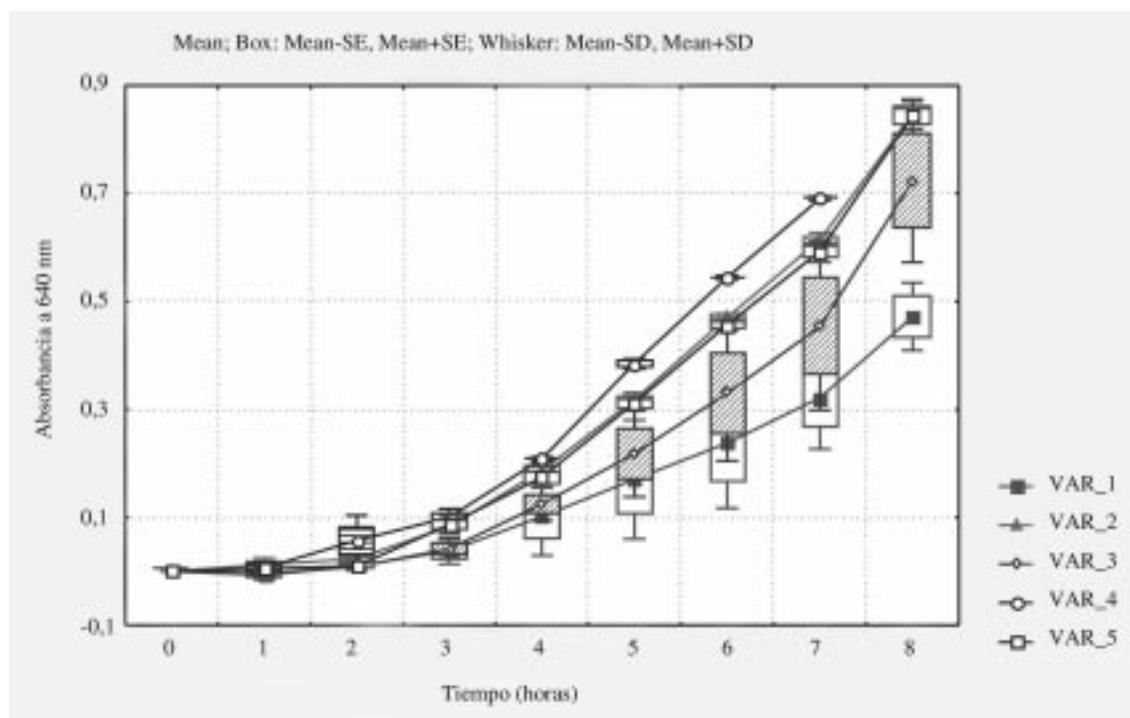


Fig. 1. Curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en las diferentes mezclas de bases nutritivas.

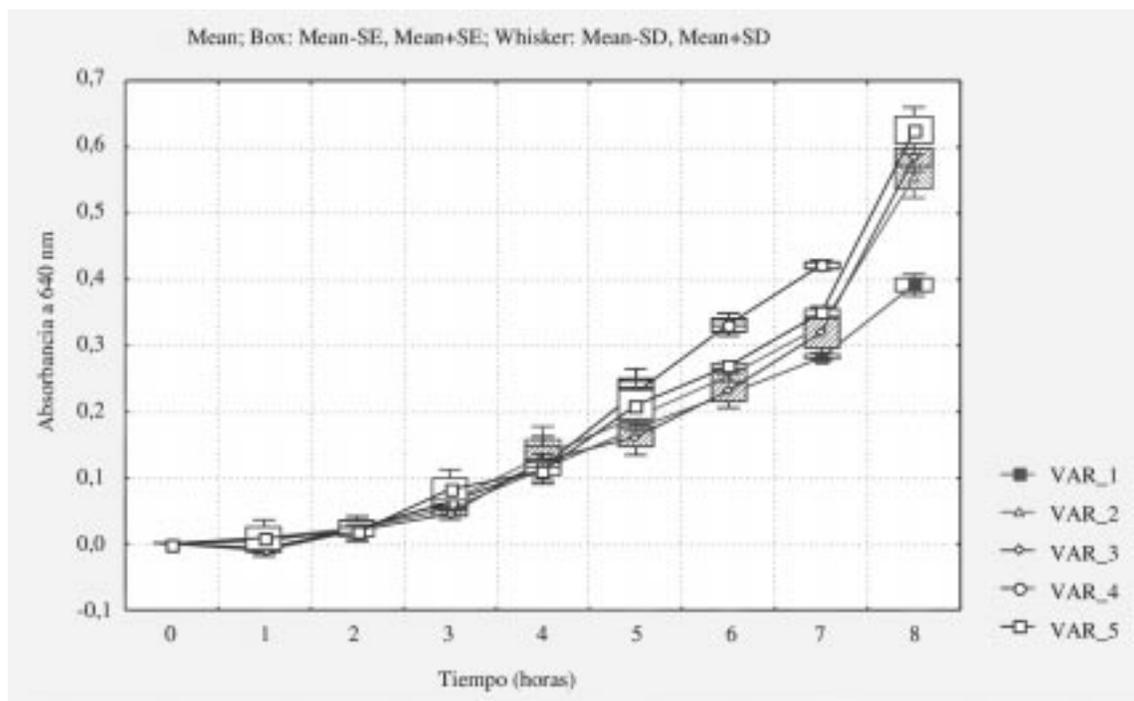


Fig. 2. Curvas de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 en las diferentes mezclas de bases nutritivas.

Teniendo en cuenta la composición de la variante 4 y la cantidad de rojo fenol óptima, se elaboró un lote a escala piloto (9P1) de 1 kg. La evaluación fisicoquímica, organoléptica y microbiológica realizada al nuevo producto utilizando como elemento comparativo el lote 8P1 existente y el medio de referencia de la firma Quelab (lote 23181743) resultó satisfactoria y confirmó el éxito obtenido en el desarrollo de la nueva variante (tablas 2 y 3). El nuevo producto cumple con los requisitos de la calidad establecidos.

Los índices relativos de crecimiento de las variantes nueva y la anterior del agar manitol salado de BioCen respecto al medio de referencia, fueron determinados para una comparación más representativa de las medias de los valores obtenidos de la cantidad total de colonias recuperadas (tabla 3) al inocular los medios de cultivo estudiados. Los IRC de la cepa *S. aureus* ATCC 25923 respecto a un medio de cultivo de propósito general, agar para conteo en placa, fueron 123 % para la formulación existente de agar manitol salado de BioCen y 246 % para la variante optimizada. En caso de *S. saprophyticus* los ICR resultaron 81 y 95 %, y para *S. epidermidis* de 92 y 105 %, respectivamente.

DISCUSIÓN

Entre los numerosos temas de investigación y desarrollo, o ambos, los relacionados con la modificación o mejora de un diagnosticador están entre los más abordados. La realización de este trabajo, es decir, los cambios realizados a la formulación del medio agar manitol salado utilizando en el estudio diferentes cepas de la colección y aisladas permitieron caracterizar y enfatizar en el objetivo de diseño del producto, el cual es ampliamente empleado en la identificación de estafilococos patógenos. El diagnosticador modificado posee cualidades superiores, como rapidez en la visibilidad de las reacciones (cambio del color del medio a amarillo) de degradación del manitol a ácido y menor toxicidad para los microorganismos, pues el valor final del contenido del indicador de pH utilizado resultó ser 3 veces menor que el anteriormente utilizado en el agar manitol salado (BioCen, 8P1). Además, teniendo en cuenta el precio elevado de los colorantes en el mercado internacional, la nueva formulación resulta ser más beneficiosa en cuanto a su costo de producción.

Se debe señalar también el elevado contenido nutricional del nuevo producto, el cual posee los

TABLA 2. Resultados de la evaluación fisicoquímica y organoléptica del agar manitol salado

Característica	Var.	Resultado	Requisitos
Características organolépticas	BioCen (8P1)	Responde (color beige rosado)	Color: beige a beige rosado Apariencia: polvo fino, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles
	BioCen (9P1)	Responde (color beige)	Color: beige a beige rosado Apariencia: polvo fino, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles
	QueLab (medio de referencia)	Responde (color beige)	Color: beige a beige rosado Apariencia: polvo fino, homogéneo, fluido, sin presencia de grumos o partículas extrañas insolubles
Pérdida por desecación	BioCen (8P1)	2,99	< 7,0
	BioCen (9P1)	1,81	
	QueLab (medio de referencia)	-	
Nitrógeno total	BioCen (8P1)	1,46	-
	BioCen (9P1)	1,64	
	QueLab (Referencia)	1,61	
Nitrógeno amínico	BioCen (8P1)	0,48	-
	BioCen (9P1)	0,63	
	QueLab (Referencia)	0,74	
pH	BioCen (8P1)	7,13	7,4 ± 0,2
	BioCen (9P1)	7,44	
	QueLab (Medio de referencia)	7,22	

TABLA 3. Resultados obtenidos de la evaluación microbiológica de los medios agar manitol salado existente (8P1), modificado (9P1) y el agar para conteo en placa

Microorganismo	Medio de cultivo	Cantidad de UFC/mL (Media ± DE)	Tamaño de las colonias
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	BioCen 8P1*	80 ± 40,0	0,8 mm
	BioCen 9P1*	160 ± 15,0	1,0 mm
	APCP *	63 ± 22,5	2,0 mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	BioCen 8P1	790 ± 41,0	0,6 mm
	BioCen 9P1	900 ± 21,5	0,9 mm
	APCP	855 ± 160,5	1,0 mm
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (salvaje)	BioCen 8P1	165 ± 23,5	0,8 mm
	BioCen 9P1	200 ± 36,0	1,0 mm
	APCP	205 ± 35,5	1,5 mm

DE: desviación estándar, APCP: agar para conteo en placa, *: existen diferencias significativas entre las variantes ($p > 0,05$).

valores de contenido de nitrógeno amínico y total significativamente superiores que el análogo anterior. Por otra parte, no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en valores de estos

parámetros entre la variante 9P1 y el medio de referencia de Quelab. Igualmente se observó que tanto el tamaño de las colonias como la formación del halo de fermentación a su alrededor fueron

mayores en el agar manitol salado optimizado (9P1) en comparación con la formulación ya existente (tabla 3).

A los valores de la media y la desviación estándar obtenidos a partir de la cantidad total de colonias desarrolladas al inocular las diluciones altas de microorganismos en diferentes variantes evaluadas, se les aplicó la prueba de rangos múltiples, la cual comprobó que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la recuperación de *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*; sin embargo, para *S. aureus* sí se observa diferencia en los medios evaluados. El valor de la media de UFC/mL de la variante 9P1 es mayor tanto en comparación con la 8P1 como con el medio agar para conteo en placa (tabla 3).

En conclusión se puede decir que la modificación de un diagnosticador, aun cuando sea una investigación costosa, permite ofrecer un producto con una calidad superior y brinda seguridad al cliente en cuanto al propósito diagnóstico del medio de cultivo.

SUMMARY

It was recommended to obtain an optimal product, where the growth speed and the differentiation of the microorganisms in the medium would increase, as a result of the adequate combination of the nutrients. The celerity in the identification and characterization of an infectious agent contribute to apply a suitable therapy to the patient. The Mannitol Salt Agar is a highly selective medium for the isolation of pathogenic staphylococci, that includes the mannitol polihidroxyl alcohol in its composition. This substrate allows the identification of coagulase positive staphylococci belonging mainly to the *S. aureus* species, due to their capacity to ferment mannitol. This characteristic has been considered as a pathogenicity index. Modifications were carried out in the formulation of the Mannitol Salt Agar, getting a product similar to the reference medium, with superior physical-chemical and microbiological

characteristics, and without significant differences ($p > 0.05$) in comparison with the reference product used.

Key words: *Staphylococcus*, identification, isolation, culture medium.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Introduction to microbiology. En: Winter R, ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994. p. 296-300.
2. Kampf G, Lecke C, Cimbal AK, Weist K, Ruden H. Evaluation of mannitol salt agar for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion and agar screening. J Clin Microbiol 1998;36(8):2254-7.
3. Nicoletti G, Nicoletti VM. Diccionario de Bacteriología Humana. Centro Documentación Científica Menarini, 1990.
4. Mach PA, Hesselroth KE, Adams CA, Schwab DL, inventors; Minnesota Mining and Manufacturing Company, assignee. Culture medium for rapid count of coliform bacteria. US patent 5723308, 1998 March 3.
5. NCCLS. Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media-Second Edition. Approved Standard. M22-A. Vol. 10 No.14, 1996.
6. Jenkins RO. BIOTOL (Biotecnología by Open Learning). In Vitro Cultivation of Micro-organisms. London: ed. Butterworth Heinemann; 1992. p. 53-78.
7. Manual SIGMA. Biochemicals and Reagents for Life Science Research, Microbial Media. St. Luis: Sigma-Aldrich Co; 1998:1594.
8. Jawetz E, Melnick JL and Adelberg EA. Manual de Microbiología médica. En: Mendosa AG, ed. La Habana: Instituto Cubano del Libro, 1984: 87-97 (Edición revolucionaria).
9. Determination of Kjeldahl nitrogen content with Kjeltac System 1026. Application Note 10; Höganäs, Suecia: Tecator AB; 1987.
10. Manual Difco de bacteriología. 10ma. Ed. EE. UU.: Difco Laboratories, 1984:1031-1037.
11. Ministerio de Salud Pública. Procedimientos metodológicos del control físico-químico de los medios de cultivo. Moscú: Moscú; 1977.
12. NC 57-94. Métodos y medios auxiliares clínicos. Medios de cultivo. Especificaciones generales de calidad.

Recibido: 16 de marzo de 2004. Aprobado: 8 de octubre de 2004.
Lic. *Anabel Durán Vila*. Centro Nacional de Biopreparados, Apartado 6048, Habana 6, Cuba. Teléf.: 81-7024, 84-7133, Fax: (537) 338439. Correo electrónico: claudio@biocen.colombus.cu