

Recobrado de *Salmonella sp.* conservada por método simple a temperatura ambiente

Zulia Weng Alemán, Inalvis Álvarez Molina, Olvido Esther Díaz Rosa, María Caridad Rodríguez Salazar

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Ciudad de La Habana, CUBA. E-mail: weng@infomed.sld.cu

Con el objetivo de verificar la viabilidad y el mantenimiento de las propiedades fenotípicas de cepas ambientales originalmente preservadas en el medio semisólido de conservación desde finales de 1980, se estudiaron 30 cepas de *Salmonella sp.* mantenidas como patrones de referencia secundarios en la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. El 96,7% de las cepas se hallaron viables, demostrando sobrevivencia por más de 12 años con adecuados niveles de viabilidad (10^6 - 10^8 ufc/mL) y 95,2% de preservación de las características fisiológicas. El medio permitió la conservación con buenos resultados de las cepas de *Salmonella sp.*, lo que sugiere su empleo como método simple en los laboratorios con limitados recursos.

Palabras claves: *Salmonella*, temperatura ambiente, medio semisólido de conservación, viabilidad

Introducción

Salmonella sp. es un género de la familia *Enterobacteriaceae* (1), que agrupa a los bacilos gramnegativos; móviles (con pocas excepciones), aerobios y anaerobios facultativos; catalasa positivo, oxidasa negativo. Atacan los azúcares por fermentación con producción de gas; usualmente citrato de Simmons positivo (*S. typhi* es una excepción importante que no produce gas y es citrato de Simmons negativo); KCN negativo (excepto subgénero IV); lisina decarboxilasa usualmente positiva (con excepción de *S. paratyphi* A) (2). Su amplia distribución en el ambiente se debe a la existencia de numerosos reservorios a partir de los cuales se pueden contaminar los alimentos y el agua. Este microorganismo es el agente causal de varias enfermedades infecciosas entre las que se encuentran las fiebres entéricas, gastroenteritis, toxiinfecciones alimentarias y la fiebre tifoidea.

Por la importancia epidemiológica de este patógeno bacteriano, su aislamiento y caracterización es una de las tareas principales del sistema de vigilancia de la calidad del agua y los alimentos en el país. En los laboratorios de Microbiología Sanitaria del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Cuba (INHEM), se han mantenido réplicas de aislados ambientales para su utilización como muestras de ensayo en la evaluación de productos y tecnologías,

control de la calidad de medios de cultivos y reactivos, montaje de técnicas de laboratorio, entre otras, desde hace más de una década. Para el mantenimiento de los cultivos a temperatura ambiente, ha sido empleado un medio de fácil preparación, manipulación y costo, el medio semisólido de conservación (MSC). Convertido en el método básico de transporte y preservación de las cepas de la colección de cultivos microbianos del centro (CCINHEM), al no disponer de las técnicas de elección, liofilización y criopreservación (3,4), para su conservación a largo plazo. Transcurridos más de 10 años desde su introducción a la práctica y al constatar que el medio mantenía su apariencia, consistencia e hidratación, se decidió verificar la viabilidad y el mantenimiento de las propiedades fisiológicas de los primeros aislados de *Salmonella sp.* mantenidas como patrones secundarios de referencia en el aseguramiento de la calidad en Microbiología Sanitaria.

Materiales y Métodos

Cepas de ensayo

Fueron conservadas en medio semisólido de conservación a temperatura ambiente, 30 cepas de *Salmonella sp.* (1) aisladas de muestras de lodo de ribera en el período de 1986 a 1988; después de su estudio se mantuvieron en este medio hasta mediados del 2001, fecha en que se verificó nuevamente su viabilidad y clasificación. Para el trabajo con los

cultivos se utilizó la codificación S_x, donde x corresponde al número de orden de la conservación.

Composición, elaboración y método de siembra del medio de conservación

Composición

Caldo corazón	7,5g
Agar No. 3	1,5g
Agua destilada csp.	300 mL

Elaboración

Pesar las cantidades exactas indicadas y calentar los ingredientes hasta lograr su total disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. Distribuir asépticamente 3 mL del medio en tubos de 90 x 10 mm (bacilo) y tapar con tapón de goma previamente esterilizados (tubos y tapones por separado).

Método de siembra

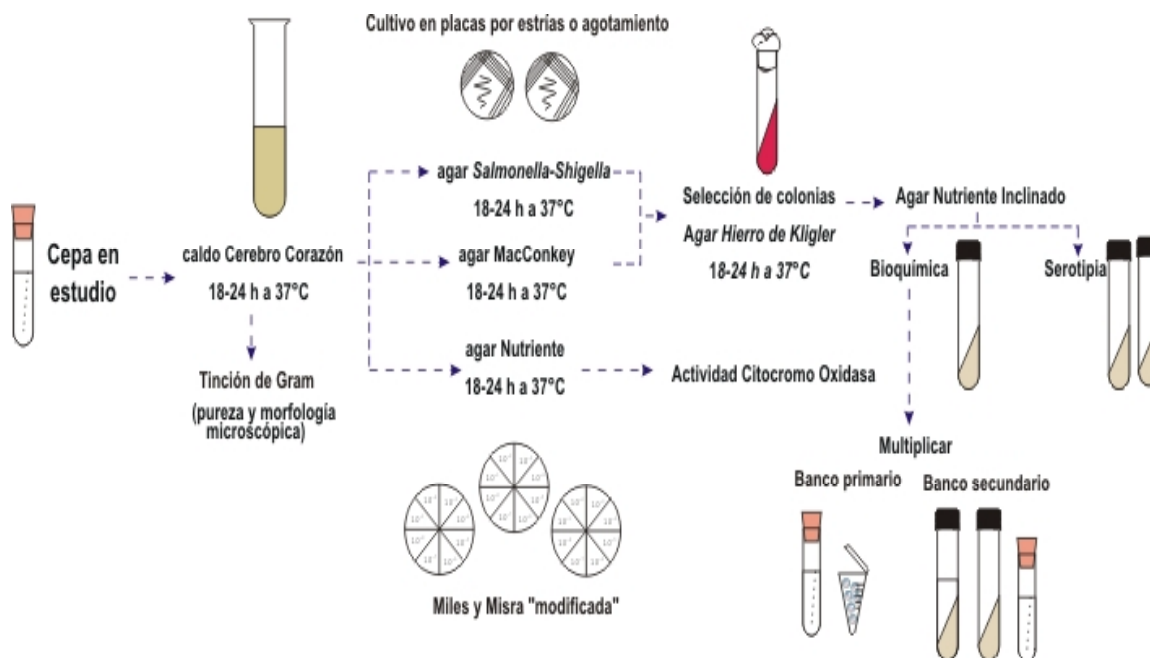
Se tomaron inóculos de las cepas cultivadas, previa comprobación de pureza, se sembró en el medio con

aguja de nicrón hasta mitad del tubo; se incubó por 18-24 h a 37 °C y posteriormente se mantuvo a temperatura ambiente.

Chequeo de la viabilidad

Las cepas conservadas en MSC se sembraron en caldo Cerebro Corazón, incubándose a 37 °C por 18-24 h. A los cultivos viables se les realizaron los tests de Tinción de Gram, evaluación de la viabilidad en medios sólidos mediante los métodos de cultivo en placa por agotamiento (5) y la técnica de Miles y Misra "modificada" (6); así como, el chequeo de las propiedades bioquímicas por el método convencional de los tubos de ensayo, según lo que reporta la literatura de consulta (2,7). Además, se verificó el mantenimiento de las características antigénicas mediante la técnica de aglutinación en lámina portaobjetos según el esquema de Kauffman-White (8), para lo que se utilizaron antiseros comerciales (Wellcome). La Figura 1 ilustra la marcha técnica seguida para el desarrollo del trabajo.

Figura 1. Procedimiento de trabajo; INHEM, 2001-2002.



Durante este estudio fueron utilizados medios de cultivo BIOCEN (9) y reactivos MERCK (10) con la calidad certificada y los resultados obtenidos referente

a la caracterización bioquímica fueron comparados con los datos del estudio inicial correspondiente a la fecha de conservación de las cepas.

Resultados y discusión

De las 30 cepas evaluadas, el 96,67% se mantuvo viable por más de 12 años de conservación. El 3,33% que no evidenció crecimiento pudiera deberse a que el cultivo originalmente fuera preservado con una baja viabilidad ($<10^5$ ufc/mL) o a la influencia de factores externos como la luz, humedad, temperatura y condiciones de almacenamiento que condicionaron la no sobrevivencia del cultivo.

Durante la comprobación de la pureza y la morfología microscópica por Tinción de Gram se obtuvo que el 93,1% de los cultivos viables permaneció puro y las cepas de *Salmonella sp* conservaron sus características morfológicas y tintoriales frente a esta prueba. Además, se constató que la morfología microscópica resultó ser algo variable debido a la existencia de bacilos cortos gramnegativos explicables por el tiempo de conservación que tienen las cepas durante el cual han permanecido inactivas y sometidas a condiciones de estrés. Las dos conservaciones contaminadas (presencia de cocos grampositivos) fueron reaisladas a partir de una colonia presuntiva, la que se pasó a un nuevo tubo de caldo Cerebro Corazón siguiendo la metodología de la Figura 1, pero fue imposible su recuperación. El uso del tapón de goma en los tubos bacilos, las condiciones de esterilidad necesarias para la distribución del medio de conservación y la limpieza de los tubos son las causas posibles atribuibles a la contaminación.

Con relación al recobrado en los medios sólidos donde se realizó la siembra en placa por agotamiento (agar MacConkey y agar *Salmonella-Shigella*), los cultivos mostraron en general un buen comportamiento ilustrado porque la totalidad de las cepas evidenció crecimiento hasta la última estría realizada. Por su parte, durante la cuantificación de las ufc/ml en agar nutriente se obtuvieron niveles de viabilidad (10^6 - 10^8 ufc/mL) considerados como muy buenos para el tiempo de vida de las cepas, dato que sugiere que su conservación se efectuó a partir de cultivos en óptimas condiciones de crecimiento, es decir fase exponencial (Tabla 1). Este resultado, al igual que los obtenidos por Aulet de Saab, *et al* (11), contribuye a enriquecer la evidencia de que la probabilidad de obtener resultados satisfactorios de recobrado es mayor cuando se realiza

la preservación de los microorganismos partiendo de cultivos con niveles de viabilidad elevados ($>10^{10}$).

Tabla 1. Recobrado de los cultivos bacterianos conservados en MSC.

Código de cepas de ensayo	No. de cultivos viables en agar Nutriente (ufc/mL)
S ₁	7×10^6
S ₂	18×10^8
S ₃	3×10^8
S ₄	10×10^6
S ₆	11×10^8
S ₈	20×10^8
S ₉	10×10^8
S ₁₀	17×10^7
S ₁₃	16×10^8
S ₁₄	5×10^7
S ₁₅	1×10^8
S ₁₆	17×10^8
S ₁₉	3×10^7
S ₂₀	10×10^7
S ₂₁	7×10^7
S ₂₂	6×10^7
S ₂₅	20×10^6
S ₂₆	10×10^8
S ₂₇	23×10^8
S ₂₈	10×10^8
S ₃₀	13×10^8
S ₃₁	1×10^7

Se evaluaron 34 pruebas bioquímicas, de las cuales un total de 16 resultaron pruebas comunes en ambos estudios (estudio inicial y estudio actual) para las que se realizó la comparación de los datos (Tabla 2). Del análisis de la Tabla se obtuvo que el promedio de coincidencia de las respuestas bioquímicas es de un 95,2%, apreciable por la reproducibilidad de los datos. Además de la comparación de los datos obtenidos en el comportamiento bioquímico de cada uno de los microorganismos con los valores de las tablas de identificación de Barrow & Feltham (2) y Weissfeld, *et al* (7), se aprecia que ambas caracterizaciones son válidas (estudio inicial y estudio actual) no existiendo

errores en la identificación de los microorganismos. Las diferencias encontradas en los datos obtenidos para las propiedades evaluadas se encuentran en el

rango permisible según las tablas de referencia, cuyos valores expresan los porcentajes de reacciones positivas después de dos días de incubación a 36 °C.

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas	Respuestas coincidentes (% de postividad)	Respuestas no coincidentes (% de positividad)
Oxidasa	100	-
<i>Reacción en medio de Kligler</i>		
Glucosa	100	-
Lactosa	100	-
Gas	100	-
H ₂ S	100	-
<i>Descarboxilación en medio de Moeller</i>		
Control	100	-
Lisina	91	9
Arginina	75	25
Ornitina	91	9
<i>Pruebas misceláneas</i>		
Indol	100	-
Urea	100	-
Citrato	100	-
Movilidad	100	-
<i>Fermentación de carbohidratos</i>		
Salicina		
Sorbitol	91	9
Manitol	85	15
	90	10

Las pruebas bioquímicas restantes fueron consideradas como datos auxiliares en la caracterización de los cultivos evaluados, por no poderse comparar los datos anteriores al ser indistintamente evaluadas en el primer estudio.

En el estudio de las propiedades antigénicas se verificó que todas las cepas corresponden a serovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (8) y, aunque algunas mantienen su nombre original otras han

adquirido uno nuevo (Tabla 3), lo que demuestra una vez más que la nomenclatura de estas bacterias ha cambiado muchas veces y todavía no es estable (12), debido a la aparición de nuevas estructuras antigénicas. De las 27 cepas identificadas, se reporta que el 63% de los cultivos (17) se identificaron hasta el nivel de grupo al no disponer de una batería completa de antisueros flagelares, el 33,3% (9 cepas) hasta el nivel de serogrupo y sólo una cepa resultó no tipable (3,7%).

Tabla 3. Nomenclatura y estructura antigénica de las cepas de *Salmonella* sp. estudiadas

Código	Nomenclatura original	Nomenclatura actual	Fórmula antigénica
S ₁	<i>Salmonella anatum</i>	<i>Salmonella stormont</i>	3,10:d:1,2
S ₂	<i>Salmonella mission</i>	<i>Salmonella</i> C ₁	6,7:gms
S ₃	<i>Salmonella montevideo</i>	<i>Salmonella</i> C ₁	6,7:gms
S ₄	<i>Salmonella stanleyville</i>	<i>Salmonella</i> B	O:4
S ₆	<i>Salmonella senptemberg</i>	<i>Salmonella</i> E ₄	O:15,19
S ₈	<i>Salmonella bredeney</i>	<i>Salmonella</i> B	O:4
S ₉	<i>Salmonella muenchen</i>	<i>Salmonella muenchen</i>	6,8:d:1,2
S ₁₀	<i>Salmonella ndolo</i>	<i>Salmonella ndolo</i>	1,9,12:d:1,5
S ₁₁	<i>Salmonella agona</i>	<i>Salmonella</i> B	O:4
S ₁₃	<i>Salmonella</i> B	<i>Salmonella</i> B	O:4
S ₁₄	<i>Salmonella</i> C	<i>Salmonella</i> C ₂	O:8
S ₁₅	<i>Salmonella ser</i>	<i>Salmonella</i> B	O:4
S ₁₆	<i>Salmonella braenderly</i>	<i>Salmonella</i> C ₁	6,7:eh
S ₁₉	<i>Salmonella sinstorf</i>	<i>Salmonella larochelle</i>	6,7:eh:1,2
S ₂₀	<i>Salmonella kentucky</i>	<i>Salmonella</i> E ₁	3,10,15:eh
S ₂₁	<i>Salmonella binza</i>	<i>Salmonella</i> E ₁	3,10,15:y
S ₂₂	<i>Salmonella otmarschen</i>	<i>Salmonella otmarschen</i>	6,7,14:gmt:-
S ₂₅	<i>Salmonella infantis</i>	<i>Salmonella lomita</i>	6,7:eh:1,5
S ₂₆	<i>Salmonella minnesota</i>	<i>Salmonella</i> C	6,7:mt
S ₂₇	<i>Salmonella oranienburg</i>	<i>Salmonella oranienburg</i>	6,7,14:mt:Z ₅₇
S ₂₈	<i>Salmonella havana</i>	<i>Salmonella oranienburg</i>	6,7,14:mt:Z ₅₇
S ₃₀	<i>Salmonella albany</i>	<i>Salmonella</i> C ₂	6,7
S ₃₁	<i>Salmonella alachun</i>	<i>Salmonella</i> no tipable	-
S ₃₂	<i>Salmonella allenton</i>	<i>Salmonella</i> E	3,10:eh
S ₃₃	<i>Salmonella tennessee</i>	<i>Salmonella</i> C ₁	O:6,7
S ₃₄	<i>Salmonella soahanina</i>	<i>Salmonella</i> C ₁	6,7:enx
S _a	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	1,4,12:i:1,2

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que el medio semisólido de conservación resultó apropiado para el mantenimiento de las cepas de *Salmonella* sp. durante más de 12 años, al permitir la conservación de los cultivos con un 96,7% de viabilidad del orden de 10⁶⁻⁸, la pureza en un 93,1% y la estabilidad de las propiedades fisiológicas en un 95,2%. Este hecho unido a las ventajas de fácil elaboración, manipulación y condiciones de almacenamiento del medio, sugiere su utilización como método simple de conservación en los laboratorios con limitados recursos.

Referencias

- Garrity GM, Winters M, Searles DB. Taxonomic outline of the procaryotic genera. En: Garrity GM, Winters M, Searles DB. (eds). 2nd ed. Bergey Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer Verlag; 2001:13-4.
- Barrow GI, Feltham RKA. Characters of Gramnegative bacteria. En: Barrow GI & Feltham RKA (eds). Cowan & Steel's manual for identification of medical bacteria. 3rd ed. Chapter 7th. Cambridge: University Press; 1999:94-164.
- Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. *Revista Argentina de Microbiología*; 1998; 30:42-51.

4. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*; 2000; 30:12-6.
5. Washington JA. Principle of diagnosis. En: Baron S *et al* (eds). *Medical microbiology*. 4th ed. Washington, DC: Library of the Congress, 1996:134-43.
6. López N. Manual de procedimientos del área de control de la calidad. Segunda edición. Ciudad Habana: INHEM; 1998:10.
7. Weissfeld AS, McNamara AM, Tesh VL, Howard BJ. *Enterobacteriaceae*. En: Howard BJ *et al* (eds). *Clinical and pathogenic microbiology*. 2nd ed. Washington: Mosby Year Book, Inc; 1994:299-336.
8. Popov YM. Antigenic formules of the *Salmonella* serovars. 8th rev. WHO Collaborating Center for reference and research on *Salmonella*. Paris: Institute Pasteur; 2001:151.
9. Centro Nacional de Biopreparados. Manual de medios de cultivo. Segunda edición. La Habana: BIOCEN; 2001:200.
10. Merck E. Microbiology manual. Darmstat: Merck KGAA; 2000:407.
11. Aulet de Saab OC, de Castillo MC, de Ruiz Holgado AP, de Nader OM. A comparative study of preservation and storage of *haemophilus influenzae*. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*; 2001; 96(4):583-6.
12. Euzéby JP. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kkauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Poppof 1987 sp. Nov., nom. Rev. As the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved list 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1984) Weldin 1927 (approved list 1980), conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved list 1980). Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Bacteriology*; 1999; 49:927-30.

Recovery of *Salmonella sp.* preserved by a simple method at room temperature

Abstract

Thirty environmental strains of *Salmonella sp.*, maintained as secondary reference strains in the Microbial Culture Collection of the National Institute of Hygiene, Epidemiology and Microbiology of Cuba, were studied in order to verify their viability and phenotypic characteristics after preservation in semisolid media since 1980. Of these strains, 96,7% were found viable, showing a survival of more than 12 years with good viability levels (10^6 - 10^8 ufc/mL) and 95,2% of their physiological properties preserved. This media allowed the preservation of *Salmonella sp.* strains with good results, suggesting its use as a simple method in laboratories with limited resources.

Key words: *Salmonella*, room temperature, semisolid conservation media, viability.