

Sección de "Patología Clínica"

a cargo de la Sociedad Cubana de Medicina
Laboratorios Clínicos

Las sustancias inhibidoras de la flora gram
negativa en bacteriología clínica. Revisión

Por el Dr. Angel Guerra Charau

Es bien conocido que el crecimiento de los gérmenes gram negativos, particularmente de las enterobacterias en las muestras remitidas al laboratorio para examen bacteriológico resulta en ocasiones muy profuso, en especial de géneros como el *Proteus*, interfiriendo así con el aislamiento de los patógenos responsables de una infección.

En Bacteriología Clínica la necesidad de inhibir la flora gram negativa se presenta usualmente en los siguientes casos: 1) en el coprocultivo, con la finalidad de que crezca el grupo *Salmonella-Shigella*, sobre *Proteus* y colibacilos principalmente; 2) en las infecciones mixtas por gérmenes gram positivos y gram negativos, como en los exudados de heridas, peritoneal, pélvico, fracturas abiertas, escaras de decúbito, exudado ótico y otros; 3) en las siembras o resiembras de orina, esputos u otro material, en los cuales por accidentes en la recolección de la muestra o en su manipulación, puede producirse una contaminación o sobre-crecimiento de un organismo gram negativo que enmascara los gérmenes gram positivos que pueden observarse en el examen directo.

Diversas técnicas, la mayoría basadas en el empleo de distintas sustancias inhibidoras, se han utilizado con el fin de menguar el sobrecrecimiento de la flora gram negativa, siendo utilizadas según la preferencia del investigador unas sustancias más que otras.

Aunque se han empleado los antibióticos con este fin, particularmente la estreptomina, ha sido más bien en el aislamiento de virus y del bacilo tuberculoso pero no se utilizan usualmente en los cultivos de gérmenes corrientes, por lo que nos limitaremos en esta revisión a otras sustancias que no se basan en el fenómeno de antibiosis.

Sobre la base de su acción predominante sobre distintos tipos de flora, dividimos a estas sustancias en cuatro grupos: a) inhibidoras de la flora intestinal normal; b) inhibidoras del grupo coliforme; c) inhibidoras del grupo *Proteus*; d) inhibidoras de la flora gram negativa in toto.

Inhibidoras de la flora intestinal normal.—Incluye sustancias muy útiles los

coliformes en el llamado período hiben a los gérmenes considerados como habituales del intestino, incluyendo gram positivos y negativos, pero no muestran efecto sobre el grupo Salmonella-Shigella.⁶ Entre ellas se encuentran el verde brillante y las sales de selenio.

Verda brillante.—Este colorante perteneciente al grupo diaminotriphenilmetano es fuertemente básico,¹ reconociéndose como particularmente útil para inhibir organismos gram positivos^{2,3}.

Sin embargo, en concentraciones apropiadas también resulta inhibitorio sobre todo la flora intestinal, exceptuando los patógenos, y aprovechando esta propiedad, fue utilizado por primera vez por Kristensen y col.⁴ en un medio especial de aislamiento que permitía, no obstante, crecer al grupo Salmonella. Kaufmann también usa un medio parecido utilizando este colorante, que es una modificación del de Kristensen; él lo utiliza en concentraciones al 1:100.000.⁵ El colorante es también utilizado en la composición de los medios llamados S.S. agar y Bismuto Sulfito agar.³

Sales de selenio.—Handel y Theodor fueron los primeros en señalar según Guth⁶ que los colibacilos eran mucho más susceptibles a la acción tóxica del selenito de sodio que el bacilo tífico. Leifson⁷ basado en estas observaciones, desarrolló un medio de enriquecimiento con esta sal en concentración al 0.4%, el cual es usado hoy con ligeras modificaciones por muchos investigadores. Se afirma que en este medio el crecimiento de los bacilos tíficos o paratíficos es mayor que el de en el coprocultivo diagnóstico.

Ellas in tiempo de incubación el número total precoz de incubación, pero a mayor de coliformes puede exceder al de Salmonella, de manera que hace más difícil la separación, aunque el aislamiento puede tener éxito aún después de 48 horas⁸. Sin embargo, sobre este hecho, Curbelo y Márquez⁹ han realizado una observación interesante que resulta contraria, pues “cuando decidimos hacer resiembras periódicas hasta 10 días, nuestra proporción de aislamientos ha sido mayor y con regularidad no³ parece que la flora patógena (Salmonella) predomina sobre la colibacilar que llega, en muchos casos a desaparecer cuando empiezan a aparecer colonias de patógenos”. Ellos obtuvieron de esta manera el 40% de sus aislamientos de Salmonella de las 120 horas en adelante y recomiendan así hacer resiembras diarias hasta los 10 días.

Weil y Saphra han mencionado también que el medio de Leifson con selenito aventaja a otros medios de enriquecimiento en su sencillez de preparación y en que también favorece el crecimiento de Shigella,¹⁰ aunque sobre estos gérmenes algunos afirman que es en parte inhibitorio.

Aunque algunos no consideran al selenito como inhibidor del Proteus y del piocianico,³ Nevo¹¹ estima que algún efecto ejerce sobre el Proteus, considerando este hecho como una ventaja sobre otros medios, como el de tetratoato, que sí lo deja crecer.¹¹

Inhibidoras del grupo coliforme.—Un segundo grupo de sustancias actúan inhibiendo al grupo coliforme, favoreciendo así el crecimiento de los patógenos. Entre ellos tenemos:

Tetratoato de sodio.—El crédito por el descubrimiento de la acción inhibitoria de los tetratoatos se da a Mueller¹², quien demostró claramente que inhibían a los organismos coliformes,

⁶ Debe señalarse que modernamente, gérmenes considerados como habituales del intestino son patógenos en ciertas condiciones: colibacilos con caracteres serológicos definidos, principalmente de los tipos 055 y 0111 y los micrococcos de las enteritis graves observadas después de antibioterapia intensa son buenos ejemplos.

permitiendo el crecimiento sin restricciones de los grupos tífico y paratífico. Los tetratonatos son sustancias que se originan por la acción del yodo naciente o la solución yodo-yodurada sobre los hiposulfitos, de acuerdo a la siguiente reacción esquemática: $2 \text{S}_{2}\text{O}_{3}\text{Na}_{2} + \text{I}_{2} = 2 \text{INA} + \text{S}_{4}\text{O}_{6}\text{Na}_{2}$. Los tetratonatos de potasio, amonio, magnesio y calcio dieron a Mueller el mismo resultado inhibitorio; y él demostró también que su acción dependía del compuesto tiónico y no del yodurado. Tienen el inconveniente de que hay que añadir el yodo al momento de usarlos. El más empleado es el preparado a partir de hiposulfito de sodio. En Bacteriología intestinal es posible reforzar la acción del tetratonato con otras sustancias como sales biliares³ o el propio verde brillante al 1:100.000 y 5% de bilis, además del caldo tetratonato. En la práctica, los tetratonatos no se comportan como muy efectivos en la inhibición del *Proteus*,¹³ de ahí que se recomiende este medio modificado de Kauffman o el uso de inhibidores en los medios sólidos en que se realizan las resiembras. Weil y Saphra¹⁰ lo recomiendan usando una base de tetratonato a la cual se añade verde brillante, pero sin añadir bilis como Kauffmann. El tetratonato no parece ser tan efectivo en el aislamiento de *Shigella* como en el de *Salmonella*.

Citrato de sodio.—Esta sal es mencionada por Morgan¹⁴ en el grupo de agentes que inhiben coliformes favoreciendo el crecimiento de *Salmonella*. Ella es utilizada particularmente asociada al desoxicolato de sodio en el medio de Leifson¹⁵—distinto del de selenito de este autor, ya mencionado—usándose en proporción aproximada de 0.2%. Asociado así al desoxicolato no sólo inhibe coliformes, sino también a los *Proteus* y gram positivos. El citrato de sodio es también usado

en el S.S. agar junto a las sales biliares y el verde brillante.

Inhibidores del grupo Proteus.—Es el más difícil de inhibir en la práctica. Diversas sustancias se han propuesto:

Suero anti-proteus.—Se ha recomendado el uso de este suero inmune, producido en conejos mediante estimulación antigénica con diversas razas de *Proteus*, particularmente el *P. inorganii* y el *P. vulgaris* en forma H, o sea móviles. La cantidad de 0.05 c.c. por placa de medio sólido será suficiente para que estos gérmenes crezcan en forma O.¹⁶

Bromo-cresol-púrpura. — Este colorante indicador del grupo fenol-taleínico es recomendado por Névot en concentración al 0.0025%, como buen inhibidor del *Proteus* en los medios de cultivo¹¹.

Alcohol etílico.—Névot¹¹ también ha recomendado el uso del alcohol como inhibidor del *Proteus*, pero no incorporándolo directamente al medio, sino procediendo de la siguiente manera: se colocan algunas gotas de alcohol en la tapa de una placa de Petri con medio sólido no sembrado y se deja en la estufa a 37°C con la tapa hacia abajo durante 10 minutos; después se cambia la tapa por otra y entonces se practica la siembra en la superficie del medio así tratado. La sustancia inhibitoria se formaría por la acción del alcohol vaporizado sobre el medio sólido.

Hidrato de clorál.—Se ha recomendado esta sustancia al 0.1% en medio sólido para inhibir la diseminación del *Proteus*. No muestra efecto apreciable sobre otros gram negativos ni sobre gérmenes gram positivos¹⁷.

Otras sustancias. — Wilson¹³ reporta el éxito obtenido en suprimir la diseminación del *Proteus* por la cacotelina o la hidroquinona, añadidas al caldo de verde brillante, observación primero realizada por Jones y Handley (1945);

así como también la observación de Dimitrijevic-Speth de que el reactivo de Esbach (ácido pícrico al 1% y ácido cítrico al 1,2%) inhiere el sobre-crecimiento del *Proteus*, por lo cual Ruys lo incorporó en su medio, al 2% en caldo de verde brillante.

Inhibidoras de la flora gram negativa in toto.—Hay un grupo de sustancias que actúan sobre toda la flora gram negativa en general. Son de particular uso en las infecciones mixtas, en donde se trata de identificar más de un patógeno y en material que se suponga contaminado con gram negativos, con fines de resiembra.

Eter sulfúrico.—Esta sustancia inhibe a los gram negativos, cuando se añade a partes iguales a un medio líquido que muestre crecimiento mixto. Hemos usado este procedimiento del éter con éxito y con ese fin, desde que los aprendimos de Miss Marión E. Lamb, del Boston City Hospital; después lo hemos visto referido como procedimiento de Pearce.¹¹ Buttiaux recomienda mezclar aspirando muchas veces con la pipeta que ha servido para añadir el éter, introducida en el medio líquido y practicar en seguida el aislamiento en medio sólido

Alcohol fenil-etílico.—Fue introducido por Brewer y Lilley⁸, usándose el alcohol beta-fenil-etih'co en concentración al 0.25% en medio sólido. Inhibe a los Gram negativos en las siembras mixtas de gérmenes y aunque aquellos pueden crecer formando colonias visibles, lo hacen en número y tamaño inferiores a los observados en otros medios y también quita el crecimiento diseminado del *Proteus*. Lo hemos empleado con éxito para aislar estafilococos de muestras de heces de casos en que se ha sospechado la enteritis micrococcica, entidad señalada modernamente desde la introducción de la terapia antibiótica.

Acida sódica.—Esta sustancia, clasificada como agente oxidante lento, parece haber sido utilizada por primera vez, como inhibidor de la flora gram negativa por Edwards en un medio líquido.¹⁸ Lichstein y Soule encontraron que era bacteriostática para prácticamente todas las bacterias gram negativas, para bacilos esporógenos aeróbicos y para unas pocas bacterias gram positivas, pero no para estreptococos, neumococos y anaeróbicos¹⁹. Se utiliza generalmente en concentración al 0.01% o 0.02%. Puede utilizarse en medios con sangre para observar al mismo tiempo la acción hemolítica de los gram positivos no inhibidos. Es empleada en la práctica particularmente en el aislamiento de estreptococos responsables de la mastitis del ganado y también de enterococos a partir de heces fecales, aguas de manantial, alcantarillado y piscinas.

Tioglicolato de sodio.—El tioglicolato, introducido por Brewer en 1940²⁰ se usa generalmente en concentraciones al 0.05%. En los medios así preparados los bacilos gram positivos mueren de 48 a 72 horas. Tiene la ventaja de que se usa rutinariamente por muchos en la investigación del material purulento, buscando gérmenes anaeróbicos, porque sirve así a una doble función. Schaub y Foley han reportado que es particularmente útil para inhibir *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus*¹⁷.

Telurito de potasio.—Esta sal puede usarse en concentración al 0.008% en medios sólidos o líquidos. Inhibe a la mayoría de los gérmenes gram negativos, con excepción de *Pseudomonas aeruginosa* y algunas cepas de *Proteus*, mientras no muestra acción sobre los gram positivos.¹⁷

SUMARIO

Se señalan las principales ocasiones en que se hace necesario inhibir la flora gram negativa en la Bacteriología Clínica.

Sigue una clasificación de las sustancias inhibidoras de acuerdo a su acción predominante sobre distintos tipos de flora en cuatro grupos. Se describen las principales sustancias utilizadas con ese fin, insistiendo

sobre la concentración usada, acción antibacteriana principal y los medios que en la práctica utilizan más frecuentemente cada una de ellas.

BIBLIOGRAFIA

1. *Salle, A.J.*, 1954, Fundamental principles of Bacteriology, 4th ed., McGraw-Hill Book Company. Inc., P. 39.
2. *Smith, D.T., Martin. DJS.*, 1948, Zins- ser's Textbook of Bacteriology, 9th ed., Appleton-Century-Crofts, Inc., p. 90.
3. *Difeo Manual*, 1953, 9th ed., Difeo Laboratories Inc,
4. *Kristensen y Col.*, 1925, *Biit. J. Exp. Path.*, 6, p. 291.
5. *Kauffmtm, F.*, 1951, Enterobacteriaceae, Ejnar Mnnkagaard Publisher, Copenha-, gen.
6. *Guth*, 1916, *Centr. Bakt. I Abt. Orig.*, 77, p. 487.
7. *Leifson*, 1936, *Am. J. Hyg.*, 34 p. 423.
8. *BBL Products*, 1953, 3rded., Baltimore. Biological Laboratories, Inc.
9. *Curbelo, A., Márquez, V.*, 1952, El uso correcto del medio de Leifson (Selenito F) en la mayor sensibilidad del Copro- cultivo, *Rev. Cubana de Laboratorio Clínico VI*, p. 433.
10. *Weil, A. J., Sapbra, I.*, 1953, *Salmonellae and Shigellae*, Charles C. Thomas Publisher.
11. *Nénot, A.*, 1954, *Le Diagnostic Bacterio- logique en Pratique Médicale*, Masson et Cié, Eds.
12. *Mueller*, 1923, *Compt. rend. Soc. Biol.* 89, p. 434.
13. *Wilson, G. S., Miles, A. A.*, 1948. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, 3rd. edition. Edward Ard- nold & Co.
14. *Morgan, HJ?.*, en *Dubos' Bacterial and Mycotic Infections of Man*, 1952, 2nd ed., J.B. Lippincott Co., p. 431.
15. *Leifson*, 1935, *J. Path. & Bact.*, 40, p. 5811.
16. *Curbelo, A., Márquez, V.*, 1951, _ El Coprocultivo, *Boletín del Colegio Médico de La Habana, II*, p. 417.
17. *Schaud, I.G., Foley, M. K.*, 1947, *Diag nostic. Bacteriology*, 3rd ed-, The C. V. Mosby Company.
18. *Edwards*, 1933, *J. Comp. Path. Therap.*, 46, p. 211.
19. *Porter, J.R.*, 1948, *Bacterial Chemistry anp Physiology*, John Wiley & Sons, Inc., p. 332.
20. *Brewer*, 1940, *J. Am. Med. Assoc.*, 115. p. 598.