

2 E No. 113



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

# TESIS

**“Estudio Comparativo de Aislamientos de  
SALMONELLA, SHIGELLA y otras Enterobacterias”.**

**José Renato Urbina Guerrero**

*Químico Farmacéutico Biólogo*

1984.



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 esta 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.

## I N D I C E

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>GENERALIDADES</b>	<b>4</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>DISCUSION DE LOS RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>63</b>

## I N T R O D U C C I O N

Las infecciones gastrointestinales han acompañado al hombre desde tiempos remotos, algunas de éstas ya han desaparecido y otras han perdurado hasta nuestros días, siendo difícil establecer una comparación entre las infecciones diarreicas de antaño con las de ahora, debido principalmente a que los conceptos y términos usados entonces difieren con los empleados en la actualidad. No obstante, encontramos en algunos pasajes de la Biblia y en escritos de personajes como Hipócrates y Galeno, entre otros, testimonios de la existencia e importancia de los trastornos económicos y sanitarios que en tonces ocasionaban las enfermedades diarreicas. (8, 11)

En nuestro país, la gastroenteritis así como otras enfermedades diarreicas, actualmente ocupan el primer lugar dentro de las enfermedades infecciosas oficialmente notificadas. (11) La susceptibilidad de la población hacia éstas, es general: Las deficientes condiciones sanitarias existentes, hacen que este tipo de infecciones esté muy extendido, sobre todo en los niveles socio-económicos bajos. (3, 11)

El síndrome gastroentérico, o diarrea infecciosa aguda, puede ser causado por agentes etiológicos diversos como: bacterias, virus, parásitos y, en menor proporción, por agentes micóticos. (11, 16)

Actualmente ha habido un gran avance en el conocimiento de la etiopatología de las enfermedades diarreicas que, aunado al desarrollo e implantación de nuevas técnicas para el estudio de las diarreas, han ocasionado cambios en los conceptos relacionados con la frecuencia y distribución de los agentes infecciosos causantes de las diarreas. (16)

Es importante señalar que los avances en la identificación de agentes virales y bacterias toxigénicas e invasoras, junto con las técnicas tradicionales de coprocultivo y coproparasitoscopia principalmente, han permitido identificar un gran porcentaje de los agentes etiológicos. (16)

Desafortunadamente, la mayoría de los laboratorios no tienen aún acceso a las nuevas técnicas, por lo que es importante evaluar la participación etiológica de los agentes patógenos detectados por las técnicas tradicionales, en este caso el coprocultivo.

La diarrea, definida como una alteración en los hábitos normales de defecación del hombre, se manifiesta por un aumento en la frecuencia de las evacuaciones y en la consistencia líquida de la materia fecal (15); involucra, según Fordtran(15), cuatro mecanismos que son:

1. Interrupción en los procesos de transporte de la mucosa intestinal.
2. Trastornos en la permeabilidad intestinal.
3. Presencia de sustancias osmóticamente activas no absorbidas en la luz intestinal.
4. Motilidad intestinal, cuyo origen radica en anomalías estructurales o secundarias.

Por otro lado, Phillippe define fisiopatológicamente a la diarrea como un síndrome de mala absorción de agua. (15)

## OBJETIVOS

Evaluar la frecuencia de aislamientos de Salmonella sp. y Shigella sp. en mil muestras de heces de personas adultas de nivel socio-económico medio, que presentan trastornos gastrointestinales.

En los casos de aislamientos negativos para los dos microorganismos mencionados anteriormente, establecer cuáles otras bacterias, además de Pseudomonas sp. y levaduras, predominan en el coprocultivo.

Encontrar un valor significativo de aislamientos de Shigella sp. y Salmonella sp., coincidente con el cuadro gastroentérico.

Enfatizar la importancia del estudio de otros agentes causantes de gastroenteritis para establecer como rutinario el aislamiento de bacterias como Campylobacter fetus, Yersinia enterocolitica y cepas enteroinvasivas o enterotoxigénicas.

Conocer la frecuencia de otras enterobacterias diferentes a las consideradas tradicionalmente patógenas, lo cual podría usarse para establecer el verdadero papel etiológico de éstas en los cuadros gastroentéricos.

## GENERALIDADES

### Etiología del síndrome diarreico

Las bacterias causantes de cuadros diarreicos que más se han estudiado son las siguientes:

1. Shigella sp. Todas las especies de este género son patógenas para el hombre, no existiendo huésped intermediario, la susceptibilidad a estas bacterias es universal y se ha observado que la capacidad antigénica postinfección es de poca duración. Son pocos los casos bien documentados de enfermedad por este agente en lactantes menores de 6 meses de edad. Sh. flexneri es, en nuestro medio la especie más frecuente, existen trece serotipos. Sh. dysenteriae, el clásico bacilo de Shiga que produce la disentería bacilar, no es muy frecuente, y se le relaciona con brotes epidémicos de gravedad variable, posee diez serotipos. Sh. sonnei, es considerado por algunos autores como el segundo en frecuencia, no se ha descubierto ningún serotipo. Sh. boydii, ocupa quizás el tercer lugar en importancia dentro de este género, posee quince serotipos. (3, 23) En total, la participación de este género en la diarrea aguda, es de aproximadamente el trece por ciento. (16)
2. Salmonella sp. Todos los grupos son patógenos para el hombre. S. typhi, S. paratyphi A y S. paratyphi B sólo afectan al ser humano, es decir no hay huésped intermediario y el contagio se efectúa de persona a persona; el resto de los serotipos causan zoonosis en las que el hombre puede intervenir en la cadena de transmisión. (3) La participación etiológica del género Salmonella en las diarreas representa aproximadamente el doce por ciento. (16)

Estos dos grupos (Salmonella y Shigella) serán tratados ampliamente más adelante, en capítulos separados.

3. Escherichia coli. Fué descubierto por Escherich en 1885.

La asociación de este microorganismo en los trastornos diarrreicos, fué hecha por John Bray, cuando en Inglaterra aisló un tipo de E. coli serológicamente idéntico, en un noventa por ciento de los niños con "diarrea estival" o gastroenteritis inespecífica. Posteriormente, al estudiarse muchas epidemias, principalmente surgidas en guarderías, pudo establecerse la relación de ellas con ciertas cepas antigénicamente diferentes; de tal manera que se han descubierto unos veinte serotipos en esta clase de trastornos diarrreicos, a los que se les ha denominado como E. coli enteropatógenas (ECEP); aún cuando el mecanismo por el cual producen las diarreas sólo ha sido explicado hasta ahora. (20, 30) La mayor parte de las ECEP estudiadas en el pasado, correspondían a epidemias, principalmente en guarderías, o casos aislados de lactantes menores de un año de edad. (20)

La principal vía de transmisión parece ser la fecal-oral, aunque también se piensa en la vía respiratoria, pues se ha aislado ECEP en nasofaringe. Las madres y el personal de las guarderías, como portadores sanos, pueden también actuar como transmisores. (20)

Gracias a las técnicas de inmunofluorescencia que permiten identificar los serotipos de E. coli sospechosos de ser enteropatógenos, junto con la determinación de los mecanismos por los cuales causaban las diarreas y las técnicas para detectar las propiedades toxigénicas e invasoras de ciertas cepas, se pueden agrupar a cepas de E. coli extraídas de las heces y que son causantes de diarreas en:

- a) Enteropatógenas. (ECEP).
- b) Enterotoxigénicas. (ECET).
- c) Enteroinvasivas. (ECI).

(20, 30)



Las distintas cepas de E. coli pueden presentar las tres, dos, una o ninguna de las características anteriores. Además se ha sugerido que el factor de adherencia pudiera estar relacionado con su carácter patógeno. (20, 30)

Las cepas invasivas se detectan en el laboratorio por su capacidad de producir conjuntivitis en el cobayo inoculado intraocularmente (Prueba de Sereny) o por su capacidad de penetrar en las células HEP-2 en cultivos tisulares. (30)

Las cepas toxigénicas a las que se les ha identificado los dos tipos de enterotoxinas, termolábil y termoestable (aunque este descubrimiento no ha conducido aún a conclusiones de tipo práctico), se pueden identificar usando el método del asa ligada del intestino de conejo. Más recientemente se ha utilizado las técnicas de hibridación de DNA. (20,30)

Es importante señalar que muchas cepas toxigénicas e invasivas responsables de gastroenteritis, se han quedado sin evaluar en el pasado por el desconocimiento de éstas, ya que los estudios se limitaban a la búsqueda de cepas enteropatógenas y, en el presente, por que la mayoría de los laboratorios no tienen acceso a las técnicas para identificarlas, puesto que los sueros comerciales sólo son adecuados para las cepas enteropatógenas. (20)

4. Yersinia enterocolitica. Aunque se aisló por primera vez en Nueva York en 1923, fué en los países escandinavos donde por primera vez se relacionó como causante de cuadros intestinales y extraintestinales, tanto en el niño como en el adulto. (20) Esta bacteria se aisló en el hombre y en animales como el puerco, la chinchilla y la liebre, por lo que se piensa que la vía de transmisión es del animal al hombre, también se ha emitido la hipótesis de una contaminación a partir del agua. Yersinia enterocolitica se ha designado antes con nombre como Bacterium enterocolitica,

Pasteurella pseudotuberculosis tipo B, Pasteurella X, Germen X, y aunque no constituye una entidad completamente homogénea, puede diferenciarse entre sí por varias características. (22)

Yersinia enterocolitica es un bacilo Gramnegativo, que se encuentra agrupado en cadenas cortas o racimos, o bien en forma aislada, la cocoide predomina en los cultivos incubados entre los 22 y 25º C. Muestra una marcada tendencia al pleomorfismo en los cultivos viejos, principalmente en aquellos desarrollados a 37º C o en medios selectivos como el agar SS, agar de citrato desoxicolato, agar LSU y agar ENDO. El tamaño de esta bacteria es variable, dependiendo del biotipo. Los estudios hechos con microscopio electrónico revelan la presencia de flagelos peritricos para todos los tipos bioquímicos y serológicos, el número de flagelos fluctúa, según la especie, de uno a dieciocho. (5, 22)

Aún cuando la yersiniasis puede declararse en cualquier época del año, parece ser más frecuente en la época invernal. La enfermedad tiene un período de incubación de cuatro a diez días; y parece ser más frecuente en el hombre que en la mujer. (5, 22)

Los síndromes más frecuentes son la gastroenteritis aguda, la cual es más frecuente en niños menores de cuatro años y el síndrome pseudoapendicular, que conduce en la mayoría de los casos a la apendicectomía. Debe señalarse que Yersinia también se ha aislado a partir de los ganglios linfáticos mesentéricos, sangre, líquido cefalorraquídeo, así como de algunas heridas. (20, 22) En la gastroenteritis aguda, las heces pueden ser sanguinolentas y contener moco y neutrófilos polimorfonucleares, se acompaña muchas veces de dolor abdominal, vómito y fiebre. Generalmente su curación es espontánea, de tres días a tres semanas, aunque en algunos casos puede persistir una diarrea crónica. (20, 22)

En el diagnóstico, es muy importante advertir al laboratorio que se sospecha la presencia de este microorganismo, ya que aunque es fácilmente cultivable en los medios habituales, existe cierta semejanza con enterobacterias como Proteus por lo que se requiere una incubación más prolongada a temperatura ambiente o enriquecimiento en frío. Los medios selectivos desarrollados para Yersinia aún están en estudio y no se pueden adquirir fácilmente en el mercado. En lo que se refiere a las pruebas serológicas, sólo se utilizan habitualmente en Escandinavia. (10, 20, 22, 23)

5. Vibrio parahaemolyticus. Este bacilo Gramnegativo, fué inicialmente aislado en 1953, durante una epidemia de diarrea de origen alimentario en Japón, posteriormente se le ha encontrado en otros países, pero siempre relacionado con la ingestión de pescados y mariscos; por ejemplo, por el consumo de cangrejos en Maryland y por ingestión de gambas en Louisiana. (5, 20)

Este microorganismo es patógeno tanto para el hombre como para algunas especies marinas. Da origen a una gastroenteritis aguda que puede confundirse con salmonelosis o shigelosis. El período de incubación es de dos a cuarenta y ocho horas, y su curación es espontánea después de unas setenta y dos horas, pudiendo prolongarse en algunos casos hasta durante diez días. La intensidad de la diarrea sugiere la presencia de una enterotoxina, mientras que la presencia de moco y sangre en las heces, hace pensar en un proceso invasivo de la mucosa del intestino delgado. También se ha descrito la existencia de coagulación intravascular diseminada asociada a lesiones de los tejidos blandos de la piel. (20, 23)

Para el diagnóstico, al igual que en Y. enterocolitica, es necesario advertir que se sospecha de Vibrio parahaemolyticus.

Este microorganismo es halófilo y crece bien en concentraciones relativamente altas de cloruro de sodio, substancia que le es indispensable para su desarrollo. También se puede estudiar un posible efecto beta hemolítico, así como el serotipo, aún cuando estas características no se han asociado a su acción patógena en el hombre. (4, 20, 23)

6. Vibrio cholerae. Bacilo Gramnegativo, en forma de coma en cultivos jóvenes y en la materia fecal. Es el agente causal del cólera, enfermedad que se presenta en regiones como la India y Pakistán y que, sin embargo, se disemina periódicamente, de tal manera que la última pandemia llegó hasta Europa, aunque en pequeña escala. (3)

El mecanismo patogénico de V. cholerae es indistinguible del de la toxina TL de E. coli, aunque en el cólera es mayor la alteración metabólica del agua. (3)

La enfermedad es muy contagiosa y produce un cuadro de deshidratación que cursa en cuatro formas: Forma grave (cólera clásico) con una pérdida de líquidos hasta de 20 litros al día. Formas moderadas o intermedias. Formas leves con pérdida de 1 a 2 litros diarios y formas inaparentes. (5)

La diarrea ocurre sin dolor abdominal, ni fiebre, los vómitos son tardíos y sin ningún esfuerzo. La pérdida cuantiosa de líquidos, por la profusa diarrea, produce concentración plasmática, ocasionando acidosis por pérdida de bicarbonato. También puede dar lugar a alteraciones cardíacas por pérdida de potasio. (14)

La transmisión es a través de las heces y por vía orofecal siendo la principal vía de contagio el agua contaminada con las heces o vómitos de los enfermos. (3)

El diagnóstico clínico debe ser confirmado, ya sea por el aislamiento del microorganismo, o por demostración de anticuerpos específicos en la sangre; pues el peligro de una propagación así lo amerita. (23)

Es importante señalar que existen otros vibrios semejantes al colérico, pero que no aglutinan el suero específico, por lo que se les denomina vibrios no coléricos (NCV). (3)

7. Campylobacter fetus. El género Campylobacter ha adquirido una gran importancia médica, desde que Skirrow, en 1977, definió una "nueva enfermedad" entérica causada por esta especie. (26)

Los estudios realizados acerca de la frecuencia de aislamientos de Campylobacter, en las heces de pacientes con enfermedades gastroentéricas, han demostrado que en algunos es semejante y aún superior a los de Shigella, Salmonella y E. coli enteropatógena. (29) En nuestro país los estudios que se han realizado son muy pocos.

Campylobacter es un bacilo Gramnegativo, que generalmente adopta la forma de espirales largas, forma de "S", o bien la forma de alas de gaviota. (23) Es un microorganismo microaerofílico que crece mejor en una atmósfera con 5% de oxígeno y hasta en la presencia del 21% de éste, siempre y cuando se use la mezcla adecuada con CO<sub>2</sub>, hidrógeno y nitrógeno. Algunas cepas pueden desarrollarse en condiciones anaerobias. (18)

Campylobacter fetus es el miembro más importante de este género, sin embargo otros como C. jejuni y C. coli pueden causar diarreas. (7, 23)

8. Staphylococcus aureus. Este microorganismo es causante de intoxicaciones alimentarias, gracias a una enterotoxina, de cuyo mecanismo patogénico se sabe sólo que lesiona las mitocondrias y afecta la respiración intracelular. La bacteria, como tal, no tiene ninguna participación en estos casos.

La intoxicación se manifiesta por vómitos y diarreas que pueden conducir a la deshidratación. No existe fiebre, pues como ya se dijo, no hay participación bacteriana.

El clásico período de incubación es de aproximadamente cuatro horas después de haber ingerido la comida sospechosa. Por lo regular la bacteria se multiplica y produce su enterotoxina en el alimento contaminado antes de ser ingerido. No es transmisible de una persona a otra.

Además de la intoxicación, Staphylococcus aureus, puede ocasionar sobreinfecciones, principalmente en personas que han recibido, por un período prolongado, antibióticos de amplio espectro; éstas se caracterizan por una gastroenteritis aguda o colitis pseudomembranosa, cuadro que inicialmente fué asociado a diversas condiciones graves del tubo digestivo y, posteriormente, a la administración indiscriminada de tetraciclinas y demás antibióticos comúnmente recetados. El cuadro clínico, el cual no es muy característico, presenta diarrea, fiebre, dolor abdominal, deshidratación y leucocitosis; la rectosigmoidoscopia revela placas superficiales de color amarillo a nivel del colon y del sigmoides principalmente, con un aspecto que hace recordar a la pseudomembrana diftérica. Cuando se sospecha de esto, sobre todo en pacientes que estén en tratamiento con antibióticos, la demostración por medio del frotis de las evacuaciones de cantidades notables de cocos Grampositivos puede ayudar en el diagnóstico; aunque de cualquier manera se requiere la confirmación con el cultivo. (5, 23)

La determinación de Staphylococcus aureus en las intoxicaciones alimentarias es difícil, pues debemos mencionar que otras bacterias como Clostridium perfringens, Clostridium botulinum y Bacillus cereus (algunas de ellas habitantes normales del intestino) pueden producir intoxicaciones alimentarias. (5, 23)

Otras bacterias, además de las mencionadas, ocasionalmente pueden ser causantes de diarreas, aunque su participación es controvertida y difícil de evaluar:

- Pseudomonas sp.
- Edwardsiella sp.
- Enterobacter sp.
- Klebsiella sp.
- Proteus sp.
- Clostridium difficile.

Los parásitos también se consideran como agentes causales de diarreas, siendo Entamoeba histolytica y Giardia lamblia los más importantes. Podemos agruparlos de la siguiente manera:

1. Protozoarios.

- Entamoeba histolytica.
- Giardia lamblia.
- Balantidium coli.

2. Nemátodos.

- Ascaris lumbricoides.
- Trichuris trichiura.
- Necator americanus.
- Ancylostoma duodenale.
- Trichinella spiralis.

3. Céstodos.

- Taenia solium.
- Taenia saginata.
- Hymenolepis nana.
- Hymenolepis diminuta.

## Participación viral en la gastroenteritis.

A finales de los años cuarenta varios autores demostraron que podían producir diarreas en voluntarios sanos a partir de heces de pacientes con diarrea cuyo filtrado no contenía bacterias. Aún cuando ya se sospechaba del posible papel de los virus, no podía descartarse del todo la hipótesis de que el filtrado contuviese enterotoxinas, principalmente de Escherichia coli. (20)

Con el perfeccionamiento de los cultivos tisulares se pudo poner de manifiesto la existencia de un gran número de agentes virales y, concretamente, de virus responsables de las diarreas (11, 16, 20), entre los que se incluyen:

- Rotavirus.
- Astrovirus.
- Calicivirus.
- Coronavirus.
- Reovirus.
- Enterovirus.
- Adenovirus.
- Parvovirus.
- Agente de Norwalk.

Además de los agentes mencionados, se ha informado del papel de las levaduras del género Candida como causante de gastroenteritis, sobre todo en pacientes con alteraciones inmunológicas o tratados con antibióticos. (11)



## Mecanismos de patogenicidad

De acuerdo al mecanismo patogénico por el que se producen las diarreas, las bacterias responsables pueden dividirse en dos grupos:

### 1. Patógenas no invasivas.

Estas se multiplican en el intestino, pero sin invadir la mucosa; es decir no causan el daño por este mecanismo, si no por la producción de enterotoxinas que promueven la sa lida de líquidos, en una cantidad tal, que no pueden ser reabsorbidos por el colon. Dentro de este grupo podemos citar las cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli, las cuales pueden producir dos tipos de enterotoxinas: una termolábil y otra termoestable. La primera tiene un meca nismo de acción semejante a la de Vibrio cholerae, pues ejerce su efecto patógeno estimulando la adenilciclase de las células epiteliales del intestino delgado y, como efec to directo, un aumento en la concentración intracelular de AMP cíclico y finalmente, inhibición de la absorción de sodio e incremento en la secreción de cloruros, bicarbonato, potasio y agua hacia la luz del intestino delgado; todo ello sin alteraciones histopatológicas de la mucosa intestinal. De la toxina termoestable, se sabe que actúa con rapidez a nivel del íleon terminal, no es antigénica, y la antitoxina de E. coli o de V. cholerae no la neutralizan. No se ha observado que tenga actividad sobre el AMP cíclico, ni que se inactive por calentamiento durante 30 minutos.

La información para sintetizar estas enterotoxinas reside en plásmidos o episomas, los cuales pueden adquirirse, perderse o transferirse con gran facilidad. Debido a la transferencia de los plásmidos para sintetizar enterotoxinas por conjugación sexual, se han encontrado cepas de

Klebsiella y Proteus y Pseudomonas capaces de producir diarreas por este mecanismo.

Recientemente se descubrió otro factor de patogenicidad en diversas cepas de E. coli, conocido como factor de colonización, que permite a las bacterias adherirse a la mucosa intestinal, además de multiplicarse, paso que en la actualidad se considera muy importante o, al menos, coadyuvante en la enteropatogenicidad de las bacterias de este grupo. Este factor también es regulado por plásmidos y determina la formación de estructuras conocidas como "pili" o "fimbria". (11, 17)

## 2. Patógenas invasivas.

Su mecanismo de acción radica en la invasión de los tejidos, provocando una reacción inflamatoria. Algunas especies del género Shigella y algunas cepas de E. coli no productoras de enterotoxinas, lesionan inicialmente el intestino delgado y posteriormente el colon, en donde causan inflamación y ulceración del epitelio mucoso. Shigella dysenteriae produce además un enterotoxina citotóxica para las células del endotelio capilar, también algunas cepas de E. coli producen una toxina similar.

Las diversas especies del género Salmonella atraviesan el epitelio llegando hasta la lámina propia, en donde producen una respuesta inflamatoria en los tejidos submucosos, siendo esta reacción de tipo polinuclear, estimula la producción de prostaglandinas, que incrementan la actividad de la adenilciclase, desencadenando finalmente el proceso ya descrito y que conduce al desencadenamiento de la diarrea. (11, 16)

## Mecanismos de defensa intestinal

El organismo humano posee una serie de mecanismos y barreras en contra de sustancias agresivas, como microorganismos, alergenos, toxinas y enzimas. Estos mecanismos, que se encuentran a lo largo del aparato digestivo, evitan la penetración, implantación o multiplicación de los agentes nocivos. Es importante señalar que es necesaria la participación de todos y cada uno de dichos mecanismos, pues la disminución de alguno de ellos puede traducirse en daños localizados o generalizados de las estructuras intestinales. Los mecanismos de defensa intestinal pueden clasificarse en:

### 1. Mecanismos no inmunitarios.

Se encuentran dentro de la luz intestinal y a lo largo de la superficie mucosa, su función consiste en controlar el desarrollo bacteriano en la luz intestinal, disminuir o dificultar el contacto y la adherencia de los microorganismos patógenos y disminuir por dispersión la masa del alergeno. (3, 16) Entre estos tenemos:

a) Flora intestinal.- Se establece desde el nacimiento y va modificándose durante el crecimiento, influenciada por factores tales como la alimentación, los hábitos de higiene, la zona geográfica, etc. En condiciones de equilibrio, la flora normal impide el desarrollo de microorganismos patógenos, por competencia metabólica de los nutrientes requeridos, por alteración del pH, de los potenciales de oxidorreducción o por producción de bacteriolisinas. La importancia del equilibrio en la flora habitual, se observa en aquellas personas en quienes se ha modificado, por ejemplo, por tratamiento prolongado con antibióticos. (3, 16)

- b) **Secreciones.**- Las glucoproteínas del moco (mucinas) y los polímeros de la saliva, impiden el contacto y la adherencia de los microorganismos a la superficie epitelial de la boca, posteriormente el aseo los arrastrará. Las glucoproteínas y los glucolípidos localizados a lo largo del intestino y que poseen una estructura similar a la superficie de las células epiteliales, actúan como receptores de los microorganismos; mientras que las mucinas se adhieren a los sitios donde el epitelio puede ser penetrado. La acción de estas sustancias se ejerce no sólo sobre las bacterias, sino también sobre los virus, toxinas y alérgenos. (3, 16)
- c) **Motilidad intestinal.**- Se refiere a los movimientos peristálticos intestinales que son, quizás, el recurso más importante para contener la proliferación bacteriana en el intestino, pues impide la adherencia de los microorganismos además de eliminarlos. (3, 16)
- d) **Barrera gástrica.**- Formada por el ácido clorhídrico y la pepsina principalmente, los cuales son factores limitantes del paso de los microorganismos y material antigénico que se haya digerido. Cuando esta función se altera, se ha observado proliferación de bacterias en el intestino delgado, principalmente Gramnegativas, con un aumento de infecciones gastrointestinales. (3, 16)
- e) **Barrera hepática.**- Es importante el sistema reticuloendotelial hepático para la eliminación de las toxinas y demás sustancias nocivas absorbidas de la luz intestinal por la circulación porta. Las sales biliares constituyen en sí otro medio de control bacteriano, pues inhiben el desarrollo de algunos tipos de bacterias. (3, 16)

## 2. Mecanismos inmunitarios.

Están representados por la inmunoglobulina A secretora principalmente, la IgM secretora como recurso supletorio y por la respuesta celular de las placas de Peyer del íleon. (3, 16)

a) IgA secretora.- Tiene como ventaja su gran resistencia a la acción proteolítica de enzimas como la tripsina y la quimotripsina, sus características más conocidas son:

- i) Controlar la proliferación bacteriana en la luz intestinal.
  - ii) Producir lisis bacteriana, fijar el complemento por el sistema de properdina y utilizar la izoenzima del jugo entérico para la lisis de bacterias, principalmente E. coli.
  - iii) Mejorar o aumentar el índice opsonocitofágico.
  - iv) Producir neutralización viral en la superficie epitelial del intestino.
  - v) Presentar acción específica contra algunos agentes patógenos intestinales o generales.
- (3, 16)

b) IgM secretora.- Considerada como un recurso supletorio, cuando hay cierto déficit de la IgA secretora, es menos eficiente que ésta. (3, 16)

c) Inmunidad celular.- Representada por las subpoblaciones de linfocitos existentes, en las placas de Peyer del íleon, son capaces de responder a los antígenos presentes en la luz intestinal. (3, 16)

## S a l m o n e l o s i s

Salmonelosis es el nombre que se da a cualquiera de los cuatro síndromes clínicos provocados por el género Salmonella.

(12, 14)

El género Salmonella se encuentra ubicado en la tribu III Salmonelleae de la familia Enterobacteriaceae de acuerdo a Ewing, y en la parte VIII según el Manual Bergey. (2, 9, 18)

Son bacilos cortos, Gramnegativos, facultativos, generalmente móviles, no esporulados, que producen ácido sulfhídrico, no producen ureasa, crecen en el Citrato de Simmons (excepto S. typhi) no fermentan la sacarosa, la salicina, ni la rafinosa, en cambio fermentan la glucosa con producción de ácido y gas; resisten las sales biliares y descarboxilan la ornitina y la lisina. Resisten bajas temperaturas, pero se destruyen por calentamiento a 60°C durante 15 ó 20 minutos. (2, 14, 16, 18)

El esquema antigénico de este género es muy complejo y comprende tres antígenos que son:

### 1. Antígenos somáticos (O).

Se encuentran en el cuerpo del microorganismo, son responsables de la microaglutinación, resisten el alcohol y el ácido fénico. Pueden extraerse con ácido tricloroacético, por digestión trípica o por solubilización con dietilenglicol. Son termoestables. (5)

Químicamente están formados por un poliósido fosforilado, por un lípido A conjugado a una proteína y por un lípido fácilmente extraíble. (5)

La especificidad radica en el azúcar terminal del poliósido el cual también determina la fórmula antigénica de cada serotipo; puesto que muchos se repiten, es posible que exista una antigenicidad cruzada. (5)

## 2. Antígenos Vi.

Denominados así porque se pensó que de ellos dependía la virulencia. Pueden extraerse por el método de Boivin con acetato de uranio. Son similares al antígeno K de E. coli y están constituidos por polímeros de ácido aminohexurónico. Según la riqueza de este antígeno, las cepas pueden ser V (ricas), W (pobres) o VW (intermedias). Del género, sólo S. typhi y S. paratyphi lo poseen, aunque también es posible encontrarlo en otros géneros distintos a Salmonella, como por ejemplo Citrobacter y Escherichia. Puede enmascarar o inhibir completamente la reacción antígeno somático-anticuerpo. (5, 19)

## 3. Antígenos flagelares H.

Responsables de la aglutinación flocculenta que se desintegra por agitación. Existen sólo en las formas móviles, por lo que se encuentra en mayor cantidad en los cultivos líquidos. Pueden ser de dos tipos intercambiables, se clasifican como fase 1 designada por letras, o como fase 2 designada por números. Una bacteria puede estar en alguna de estas fases y, sin embargo, toda la colonia puede ser una mezcla de ambas. Los antígenos H son termolábiles y los destruye el alcohol; sin embargo, resisten el formol que destruye a los antígenos O. (5, 17)

Otros antígenos menos importantes son el M de las cepas capsuladas y el R de las cepas desprovistas del antígeno O. (5)

### Variaciones antigénicas.

Entre las más frecuentes se encuentran:

- Las cepas móviles pueden convertirse en inmóviles por la pérdida de flagelos.
- La variación de las formas lisas o S con antígeno O, a formas R con pérdida de aquél, lo cual se demuestra con la aglutinación espontánea en solución fisiológica. Para evitar esto se debe dar el menor número de pases.
- Existen también variaciones en cuanto al antígeno Vi y los antígenos H.

Desde el punto de vista clínico, pueden agruparse según los serotipos en tres grandes divisiones ecológicas:

1. Especies de Salmonella adaptadas al hombre.

Entre éstas, Salmonella typhi o bacilo de Eberth, y los serotipos paratyphi A, paratyphi C y sendai de la especie Salmonella enteritidis, todos éstos no tienen huésped intermediario y raras veces infectan a los animales. Poseen las siguientes características: un número relativamente pequeño de bacterias (un millón o menos) pueden producir el padecimiento; el período de incubación es prolongado (10 a 20 días) predominan los cuadros tifoídicos en comparación con los de gastroenteritis y tienden a dejar portadores permanentes, y a ser endémicas. (3, 15)

2. Especies de Salmonella adaptadas a los animales.

Entre las que se incluyen: Salmonella cholerae-suis en el cerdo; S. enteritidis serotipos pullorum y gallinarum en las aves, el serotipo dublin en los rumiantes, el serotipo abortus-equi en los caballos y el serotipo abortus-ovis en las cabras. Son característicos los cuadros clínicos de tipo septicémico con localizaciones extraintestinales cuando afectan al hombre, y producen elevada mortalidad en los niños. (3, 15)

3. Especies de Salmonella no adaptadas a ningún huésped en particular.

Infectan a los animales y al hombre por igual, se incluyen los 1,800 o más serotipos de S. enteritidis, siendo 50 de ellos los responsables de más del 90% de las afecciones y 10, de más de las 2/3 partes de los casos.

Sus principales características son: es necesario un gran número de microorganismos para producir la enfermedad, la cual casi siempre es gastroenteritis; el período de incubación es corto y son raras las localizaciones extraintestinales. (15)



## Patogenia.

Aún cuando los microorganismos del género Salmonella presentan una gran heterogenicidad en cuanto a su patogenia, podemos generalizar lo siguiente:

Penetran por vía oral, por ejemplo, por haber ingerido comida contaminada, y dependiendo de la dosis de microorganismos (mínimo un millón), de la virulencia de la cepa y de la predisposición del huésped (factores necesarios para producir la enfermedad), los microorganismos atraviesan la lámina propia provocando una reacción inflamatoria de los tejidos submucosos y una estimulación en la producción de prostaglandinas, con lo que se desencadena el proceso ya descrito y que conduce a la producción de diarrea. (14, 15, 16)

La mayoría de las cepas de Salmonella, producen al mismo tiempo una respuesta de leucocitos polimorfonucleares que son capaces de ingerir y destruir los microorganismos, por lo que en estos casos la infección es de tipo autolimitado y de curación espontánea; pero en otras ocasiones, se multiplican y pasan a la circulación general, y si no son captados por el sistema reticuloendotelial, causan lesiones metastásicas en órganos distantes. Por ejemplo, Salmonella typhi que desencadena una reacción de células mononucleares en la lámina propia, se disemina al torrente vascular. Cuando el torrente sanguíneo ha sido invadido por los bacilos tifoídicos, y también no tifoídicos, éstos llegan a órganos distantes donde se multiplican; con lo que pueden causar endocarditis, meningitis, neumonía, osteomielitis o pielonefritis. No ha sido posible la demostración de que Salmonella produzca una enterotoxina semejante a la de V. cholerae o de E. coli. (14, 15)

La existencia de anticuerpos específicos, puede proteger en la etapa inicial de la enfermedad, pero si es superada ésta, la progresión, el cuadro clínico e histopatológico y la evolución, son semejantes a los casos en que no había anticuerpos inicialmente. (15)

## Cuadro clínico.

Todas las especies del género Salmonella, incluyendo su gran número de serotipos, son potencialmente patógenas para el hombre, en el cual producen diversas manifestaciones clínicas, que pueden agruparse en cuatro categorías:

1. Gastroenteritis.
2. Septicemia, con o sin localizaciones focales.
3. Cuadro tifoídico.
4. Estado de portador subclínico, convaleciente o crónico.

Como se observa, el cuadro clínico es muy variable, así tenemos desde las formas subclínicas hasta las septicemias fulminantes. Los síndromes mencionados pueden presentarse en forma individual, consecutiva o a veces simultánea, aunque existe una marcada tendencia hacia una sola de las formas clínicas, las cuales se describirán a continuación. (15)

### 1. Gastroenteritis.

Es la manifestación clínica más común producida en la enfermedad por Salmonella. El período de incubación es muy variable, entre 6 y 48 horas. Se caracteriza por la triada sintomática de fiebre, dolor abdominal y diarrea, el cuadro puede durar de tres a cinco días y la intensidad puede ir de la forma benigna a la muy grave. Inicialmente aparece náusea y vómito, acompañados de dolor abdominal y diarrea de intensidad variable, algunos pacientes tienen evacuaciones ligeras y otros presentan cuadros explosivos, aparatosos en frecuencia y cantidad. Las heces pueden también contener moco y sangre; y en estos casos no es posible distinguirla de la disentería bacilar. Esta forma es muy común en los niños pequeños, pero es rara entre los adultos. La temperatura varía de febrícula a fiebres de 38 a 40°C. Aproximadamente en el 50% de los casos la temperatura se normaliza en uno o dos días.

En la exploración física se encuentra aumentado el peristaltismo intestinal, molestia y dolor franco a la palpación. La enfermedad dura en promedio cinco días, pero no es rara la diarrea recurrente o prolongada. (3, 14)

## 2. Septicemia con o sin localizaciones.

Está caracterizada por fiebres intermitentes acompañadas de escalofríos, sudoración, anorexia y pérdida de peso, pero no se observan los signos característicos de las fiebres tifoidea y paratifoidea como son las manifestaciones gastrointestinales, roseola o leucopenia. Además las descargas de microorganismos de los tejidos linfoides intestinales a la sangre son intermitentes. (14)

Los coprocultivos son negativos, sin embargo, el hemocultivo en la mayoría de los casos resulta positivo. Además el 25% de los enfermos con septicemia, presentan manifestaciones localizadas de infección. Los procesos focales pueden estar conectados directa o indirectamente con el sistema gastrointestinal, como en los casos de apendicitis o peritonitis; o bien pueden ser resultado de una propagación por vía hematógena, como neumonía, meningitis, osteomielitis o endocarditis. (14, 15)

## 3. Fiebres tifoídicas

Definidas por Janbon como "una adenolinfoiditis mesentérica específica, con bacteremia, poco rica en microorganismos circulantes y con intoxicación del S. N. vegetativo, que es, en lo esencial, provocada por la endotoxina puesta en libertad en el tejido adenoideo, por la lisis de los bacilos". (5)

El tiempo de incubación es de catorce días, en los primeros siete días los síntomas son insidiosos. No es rara una bronquitis y molestias intestinales, es más frecuente el estreñimiento que la diarrea, existe meteorismo y una

insinuada esplenomegalia; puede haber leucopenia. En resumen, al principio puede contar con manifestaciones intestinales, bronquiales, meníngeas, etc., para la segunda mitad del período de incubación, la fiebre llega ya a 40°C y si es que aún no existe tratamiento, el pulso es disociado y dicrótico. El enfermo permanece postrado e indiferente, aunque cada vez es más raro este clásico cuadro, lo mismo que la roseola. Actualmente con el tratamiento adecuado, los casos de muerte son escasos. (5, 14)

#### 4. Estado de portador subclínico, convaleciente o crónico.

Acerca de este estado, sólo se hará mención de que es de difícil evaluación, ya que muchos casos no llegan al conocimiento de los médicos o de las autoridades sanitarias. El estado de portador desaparece espontáneamente o puede persistir durante años. El uso de antimicrobianos no ha dado buenos resultados.

#### Epidemiología.

Las salmonelas son bacterias cuyo hábitat natural es el tubo digestivo del hombre y los animales, siendo estos los más importantes como reservorios.

La fuente de infección más importante son las heces de personas enfermas o de portadores asintomáticos. El mecanismo de transmisión es a través del agua o de alimentos contaminados. también es posible la transmisión directa a través de las manos. Los alimentos más frecuentemente contaminados son aquellos de origen animal, como la carne, los huevos y la leche y sus derivados. (16)

Aunque las enfermedades por Salmonella pueden aparecer en cualquier época del año, se ha observado que son más frecuentes durante los meses de verano. Las personas de todas las edades son susceptibles, pero son más frecuentes en los niños menores de 10 años, la frecuencia disminuye conforme aumenta la edad. (14)

También se ha observado que la distribución según el sexo, está vinculada con la edad. Así durante los primeros 20 años, es más frecuente la infección en los varones, después de los 20 años la relación se invierte. (14)

#### Diagnóstico.

En los casos de fiebre tifoidea y de septicemia, puesto que el cuadro clínico es inespecífico, es necesario el aislamiento del microorganismo causal y las reacciones serológicas (Reacción de Widal). Los aislamientos pueden hacerse tanto en sangre como en heces u orina. (15)

El hemocultivo, usado para el diagnóstico precoz de la tifoidea, debe hacerse antes de la administración de antibióticos, siendo positivo en el 90% de los casos durante la primera semana y en el 75% en la segunda semana.

El coprocultivo tiene mayor posibilidad de ser positivo a finales de la segunda semana.

Para el diagnóstico de la gastroenteritis, se debe también proceder al aislamiento del agente etiológico, para diferenciarla de la enteritis viral, de la intoxicación alimentaria y de las disenterías bacilar y amibiana. (14, 16)

Otros estudios complementarios de laboratorio también pueden ser útiles, sobre todo para un diagnóstico presuntivo rápido, entre estos tenemos (15, 16):

- Biometría hemática, generalmente normal, en ocasiones leucocitosis moderada con neutrofilia.
- Frotis de materia fecal, con presencia moderada de moco.
- Reacción de Widal, títulos altos (más de 1:160).

## S h i g e l o s i s

Shigelosis es el nombre que se da a la enfermedad producida por las diversas especies del género Shigella, caracterizada por diarrea, fiebre, dolor abdominal, tenesmo y evacuaciones que pueden contener sangre, moco y pus. (14)

En 1856, Shiga aisló un bacilo inmóvil Gramnegativo, en enfermos de disentería durante una epidemia en Japón, posteriormente probó que este microorganismo era el agente causal, que recibió su nombre. (14)

Cuatro años después, Flexner encuentra un bacilo semejante al de Shiga, al estudiar unos casos de disentería en Filipinas.

El género Shigella se encuentra, según Ewing, en la tribu Escherichiae de la familia Enterobacteriaceae, y de acuerdo a la clasificación del Manual de Bergey en la parte VIII.  
(2, 5, 9)

Antigénicamente y basados en los antígenos somáticos O exclusivamente (puesto que al no haber flagelos, no se implican los antígenos de estos), pueden distinguirse cuatro grupos:

Subgrupo A : S. dysenteriae con serotipos del 1 al 10.

Subgrupo B : S. flexneri con serotipos del 1 al 6.

Subgrupo C : S. boydii con serotipos del 1 al 15.

Subgrupo D : S. sonnei no posee serotipos.

Los microorganismos del género Shigella son bacilos cortos, Gramnegativos, inmóviles, no esporulados. No producen ácido sulfhídrico ni ureasa, no crecen utilizando el citrato como única fuente de carbono, no fermentan la lactosa, fermentan

la glucosa sin producción de gas, resisten las sales biliares, son sensibles a los cambios físicos como el pH, el calor o la desecación; no descarboxilan la lisina. (2, 4, 5, 18)

#### Patogenia.

Las shigelas que se han fijado al epitelio intestinal atraviesan las células de la mucosa y se multiplican en su interior con tendencia a permanecer ahí; los casos de migración con producción de septicemia son raros. La penetración e infección de las células vecinas provoca la destrucción de éstas, con formación de úlceras características en la mucosa intestinal. La hemorragia presentada a este nivel es la causa de que las heces presenten sangre, lo que es característico en la enteritis por Shigella. (14, 15)

Es importante la presencia de E. coli y la demás flora normal para el control de la infección por Shigella. Esto se demuestra al infectar un cobayo amicrobiano y a otro criado en medios habituales; el primero muere a las 48 horas, en tanto que el segundo no presenta ninguna alteración. Asimismo, los cobayos amicrobianos, si son contaminados con E. coli, no son lesionados por la inoculación de Shigella flexneri. Puesto que el efecto protector no es mediado por colisinas, se ha propuesto un estímulo morfogénico, por parte de E. coli y otras bacterias, que madura el sistema linfoide y altera la estructura intestinal, lo que contribuye a una mayor capacidad defensiva contra la penetración de las bacterias. (15)

#### Cuadro clínico.

En este caso, también es posible distinguir cuatro cuadros clínicos, que son:

##### 1. Síndrome disenteriforme.

Con un período de incubación de uno a tres días, presenta

evacuaciones escasas, muy frecuentes, que contienen moco, sangre y ocasionalmente pus. Fiebre de 38.5 a 40°C y dolor tipo cólico. La curación es espontánea, aproximadamente a los cinco días de haberse iniciado el cuadro. No es frecuente este cuadro en niños menores de seis meses de edad. (3)

## 2. Diarrea profusa disenteriforme.

Con un período de incubación de dos a cuatro días, presenta dolor abdominal, cólicos, evacuaciones líquidas (dos a cuatro por día) y fiebre de 38 a 39°C. Dos días después del inicio de este cuadro aumenta la cantidad en las evacuaciones y ahora presentan sangre en pequeñas cantidades, lo cual puede ser resultado de una enterotoxina semejante a la de E. coli. (3)

## 3. Diarrea profusa.

En este caso las evacuaciones se inician dos días después de la ingestión de los microorganismos ( $10^2$  a  $10^4$  bacterias) puede no existir fiebre y las evacuaciones van en aumento, tanto en frecuencia como en cantidad, y tienen alguna semejanza con las del cólera y las originadas por la TL de E. coli, por lo que es necesario aislar al bacilo para establecer el diagnóstico. Su duración es de tres a cinco días. (3)

## 4. Cuadros atípicos.

Tal vez debido a una enterotoxina neurotóxica, a las manifestaciones anteriores se le añaden signos nerviosos. El líquido cefalorraquídeo es normal. La evolución clínica tiende a la curación total. (3)



## Epidemiología.

Existe en todas partes del mundo, pero en especial en las zonas subdesarrolladas, por las inadecuadas condiciones sanitarias.

El reservorio es el hombre, y la transmisión puede ser por alimentos contaminados y directamente por vía ano-oral, pues basta un mínimo de 180 a 200 bacterias para producir la enfermedad. La propagación pasiva a causa de las moscas también es frecuente. (5, 6)

De los tres grupos enteropatógenos clásicos (Salmonella, Shigella y E. coli enteropatógena), es el más frecuente y ampliamente distribuido. Afecta a los adultos y a los niños mayores de seis meses, es raro en los recién nacidos, posiblemente por la protección adquirida a partir de los anticuerpos maternos. (16, 23)

En México es más frecuente Shigella flexneri, seguida de S. sonnei, S. boydii y S. dysenteriae. Los fenómenos epidemiológicos que establecen este orden se desconocen, pero se ha observado, por ejemplo, que Shigella flexneri predomina en los estratos socio-económicos bajos y que conforme mejoran las condiciones de vida, las demás especies empiezan a ser más comunes. (6, 23)

## Diagnóstico.

Cuando la enfermedad se presenta en la forma típica, con fiebre y diarreas sanguinolentas, éste no resulta tan difícil; pero en los casos benignos con diarrea acuosa y signos generales nulos, o en los casos graves con comienzo atípico, el diagnóstico se comprueba con el cultivo de Shigella a partir de las heces o material obtenido del recto o sigmoides. El hemocultivo muy rara vez resulta positivo. (14)

Aunque el diagnóstico final se basa en el aislamiento del bacilo, otras pruebas de laboratorio pueden ser importantes:

- Biometría, con leucocitosis, neutrofilia y bandemia.
- El frotis de materia fecal muestra gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares.
- La rectosigmoidoscopia muestra inflamación intensa de la mucosa, que sangra fácilmente, puede haber membrana fibrinosa y zonas grises de necrosis o úlceras.
- Las alteraciones de los electrolitos dependen de la intensidad del vómito y la diarrea.

(6, 14)

Todos estos datos son importantes si se toma en cuenta que el coprocultivo es positivo en un 30-60% de los casos, mientras que el hemocultivo sólo lo es en un 0.5%.

Actualmente se está probando la identificación rápida de Shigella en los frotis de heces usando sueros específicos marcados con fluoresceína, aunque su empleo no ha sido generalizado aún por razones prácticas. (6)

Por todo lo anterior, el coprocultivo sigue siendo el más empleado para confirmar el agente etiológico.

## PARTE EXPERIMENTAL

### a) Material y Equipo:

Asas y porta-asas

Estufa bacteriológica

Mechero

Microscopio óptico compuesto

Cajas Petri

Tubos de ensayo

### b) Soluciones y reactivos:

Alcohol-acetona

Reactivo de Kovacs

Solución de cristal violeta

Solución de safranina

Solución de yodo para el caldo tetracionato

Solución de rojo de metilo

Solución de rojo de fenol

Solución yodada de Gram

Solución de NaOH al 40%

Creatinina

c) Medios de cultivo:

Placas con medio de agar Shigella-Salmonella (SS)

Placas con medio de agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato(XLD)

Tubos de 13 x 100 con medio de Kligler

Tubos de 13 x 100 con medio de Citrato de Simmons

Tubos de 13 x 100 con medio de SIM

Tubos de 13 x 100 con medio MR - VP

Tubos de 13 x 100 con caldo Urea

Tubos de 16 x 150 con caldo de Tetracionato

Tubos de 16 x 150 con solución salina glicerizada amortiguada.

d) Sueros antiespecie:

Suero polivalente anti-Salmonella de los grupos A hasta el I más VI.

Suero polivalente anti-Shigella grupo A (S. dysenteriae)

Suero polivalente anti-Shigella grupo B (S. flexneri)

Suero polivalente anti-Shigella grupo C (S. boydii)

Suero polivalente anti-Shigella grupo D (S. sonnei)

e) Otros:

Sensidiscos para pruebas de sensibilidad a los antibióticos.

## M E T O D O

Se trabajaron mil muestras de heces de personas adultas, de nivel socio-económico medio y que, debido al cuadro de gastroenteritis establecido por su médico, fueron remitidas al Laboratorio de Bioquímica Especializada para la elaboración de un coprocultivo. Las muestras de aspecto normal se descartaron.

También se incluyeron en el estudio 50 muestras de heces con aspecto normal de personas adultas de nivel socio-económico medio, sin cuadro clínico gastroentérico, como control de la flora normal.

En las muestras patológicas, se buscó la presencia de Salmonella y Shigella. En los casos negativos para éstas, se identificaron las enterobacterias más abundantes en las heces, además de Pseudomonas y levaduras, cuando predominaron sobre los demás microorganismos.

En los controles también se identificaron los microorganismos más abundantes evidenciados por el coprocultivo.

Para el aislamiento de Salmonella y Shigella, se usó agar XLD y agar SS antes y después del enriquecimiento en caldo de tetracionato.

Para aislar a las bacterias más abundantes en los casos negativos para Salmonella y Shigella y en los controles, se usó solamente el primocultivo en agar XLD, ya que el agar SS, siendo más selectivo, podría haber inhibido el crecimiento de algunas bacterias. El enriquecimiento en caldo tetracionato tampoco fué considerado para estos casos ya que también altera la relación de enterobacterias en las heces, pues favorece el crecimiento de algunas bacterias patógenas inhibiendo a otras coliformes.

Se dispuso de otras pruebas bioquímicas, además de las que se mencionan, para los casos en que pudiera ser difícil es-

tablecer la identificación, sin embargo esto no fué necesario.

También se empleo la tinción de Gram para las colonias cuya morfología no correspondía a la mostrada por enterobacterias, principalmente, en el caso de levaduras.

La técnica general empleada se detallará más adelante.

Se usaron dos métodos para obtener las muestras:

- a) Raspado rectal con hisopo, conservando éste en solución salina glicerizada amortiguada.
- b) Materia fecal evacuada recientemente, recogida en un frasco estéril de boca ancha. Las muestras que no se trabajaron inmediatamente fueron conservadas en solución salina glicerizada amortiguada.

Procedimiento.

- a) Con un hisopo estéril se tomó una parte de la muestra y se inoculó en un extremo de las placas de agar XLD y agar SS, para posteriormente con el asa flameada efectuar estrías cruzadas para facilitar el aislamiento. Se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas.

De las colonias desarrolladas después de ese tiempo, se escogieron las que, por sus características culturales, fueron sospechosas de ser de Salmonella o Shigella; con ellas se inoculó en tubos de agar de hierro de Kligler, agar Citrato de Simmons, medio SIM, caldo Urea y en dos tubos con medio MR-VP, siguiendo los procedimientos habituales, con el objeto de observar las pruebas de fermentación de la glucosa y la lactosa, producción de ácido sulfhídrico, utilización del citrato, producción de indol y

las pruebas de rojo de metilo y Voges-Proskauer.

En los casos requeridos se procedió a efectuar estudios serológicos con los sueros antiespecie correspondientes siguiendo las instrucciones del fabricante.

- b) Con otra parte de la muestra, se inoculó el caldo tetrationato al cual se le agregaron 3 ó 4 gotas de la solución de yodo antes de ser incubado a 37°C durante 16-18 horas.

Después de este tiempo se resembró en placas de agar XLD y agar SS, siguiendo posteriormente todos los pasos del párrafo a).

- c) En los casos en que el coprocultivo fué negativo para Salmonella y para Shigella, se escogieron dos de las colonias más abundantes que desarrollaron en las placas de agar XLD del paso mencionado en el inciso a), para efectuar con ellas pruebas de actividad bioquímica, inoculándolas en los medios apropiados ya descritos.

Para las muestras de control, sóloamente se inoculó en agar XLD, prosiguiéndose con los pasos descritos en el inciso c).

En este trabajo, la elección del método fué originada por factores como las condiciones técnicas y económicas del laboratorio, así como la naturaleza de las bacterias que se iban a aislar, además de la experiencia personal; sin embargo se debe mencionar la existencia de diversos métodos como los recomendados por Edwards y Ewing y por la Asociación Americana de Microbiología.

## RESULTADOS

Resultados de los coprocultivos realizados en 1,000 muestras de heces de personas adultas de nivel socio-económico medio que presentaban cuadro gastroentérico y que fueron enviadas para la elaboración de dicho estudio al Laboratorio de Bio - química Especializada por su médico.

Nº de Muestras	Positivos	Negativos*
1,000	211	789

- \* Tomándose como negativos todos los casos en los que no se encontró Salmonella ni Shigella, sino únicamente flora habitual.



Microorganismos aislados de coprocultivo a partir de 1,000 muestras.

Microorganismos	Nº de Aislamientos	%
<u>Escherichia coli</u>	642	64.2
<u>Klebsiella sp.</u>	61	6.1
<u>Citrobacter sp.</u>	50	5.0
<u>Enterobacter sp.</u>	42	4.2
<u>Proteus sp.</u>	87	8.7
<u>Proteus morgani</u>	37	
<u>Proteus mirabilis</u>	30	
<u>Proteus rettgeri</u>	15	
<u>Proteus vulgaris</u>	5	
<u>Providencia</u>	2	0.2
<u>Hafnia</u>	1	0.1
<u>Salmonella sp.</u>	99	9.9
<u>Shigella sp.</u>	112	11.2
<u>Shigella flexneri</u>	42	
<u>Shigella sonnei</u>	35	
<u>Shigella boydii</u>	19	
<u>Shigella dysenteriae</u>	16	
<u>Alcaligenes</u>	8	0.8
<u>Pseudomonas sp.</u>	8	0.8
<u>Levaduras</u>	12	1.2

En las 50 muestras de control de personas sanas, en todas se aisló Escherichia coli en forma abundante, a excepción de dos casos en los cuales compartía este predominio con Klebsiella y Alcaligenes respectivamente.

Microorganismos que se encontraron combinados en los coprocultivos.

Microorganismos	Nº de Aislamientos	%
<u>Citrobacter sp.</u> - <u>Alcaligenes sp.</u>	1	0.1
<u>Citrobacter sp.</u> - <u>Escherichia coli</u>	20	2.0
<u>Citrobacter sp.</u> - <u>Klebsiella sp.</u>	3	0.3
<u>Citrobacter sp.</u> - <u>Proteus morgani</u>	1	0.1
<u>Citrobacter sp.</u> - <u>Enterobacter sp.</u>	1	0.1
<u>Citrobacter sp.</u> - <u>Proteus rettgeri</u>	1	0.1
<u>Citrobacter sp.</u> - Levaduras	2	0.2
<u>Pseudomonas sp.</u> - <u>Escherichia coli</u>	1	0.1
<u>Pseudomonas sp.</u> - <u>Proteus morgani</u>	1	0.1
<u>Pseudomonas sp.</u> - <u>Klebsiella sp.</u>	1	0.1
<u>Proteus mirabilis</u> - <u>Escherichia coli</u>	5	0.5
<u>Proteus mirabilis</u> - <u>Proteus rettgeri</u>	2	0.2
<u>Proteus rettgeri</u> - <u>Escherichia coli</u>	4	0.4
<u>Proteus rettgeri</u> - <u>Klebsiella sp.</u>	1	0.1
<u>Proteus rettgeri</u> - Levaduras	1	0.1
<u>Proteus vulgaris</u> - <u>Klebsiella sp.</u>	1	0.1
<u>Proteus vulgaris</u> - <u>Escherichia coli</u>	1	0.1
Levaduras - <u>Escherichia coli</u>	5	0.5
Levaduras - <u>Proteus morgani</u>	1	0.1

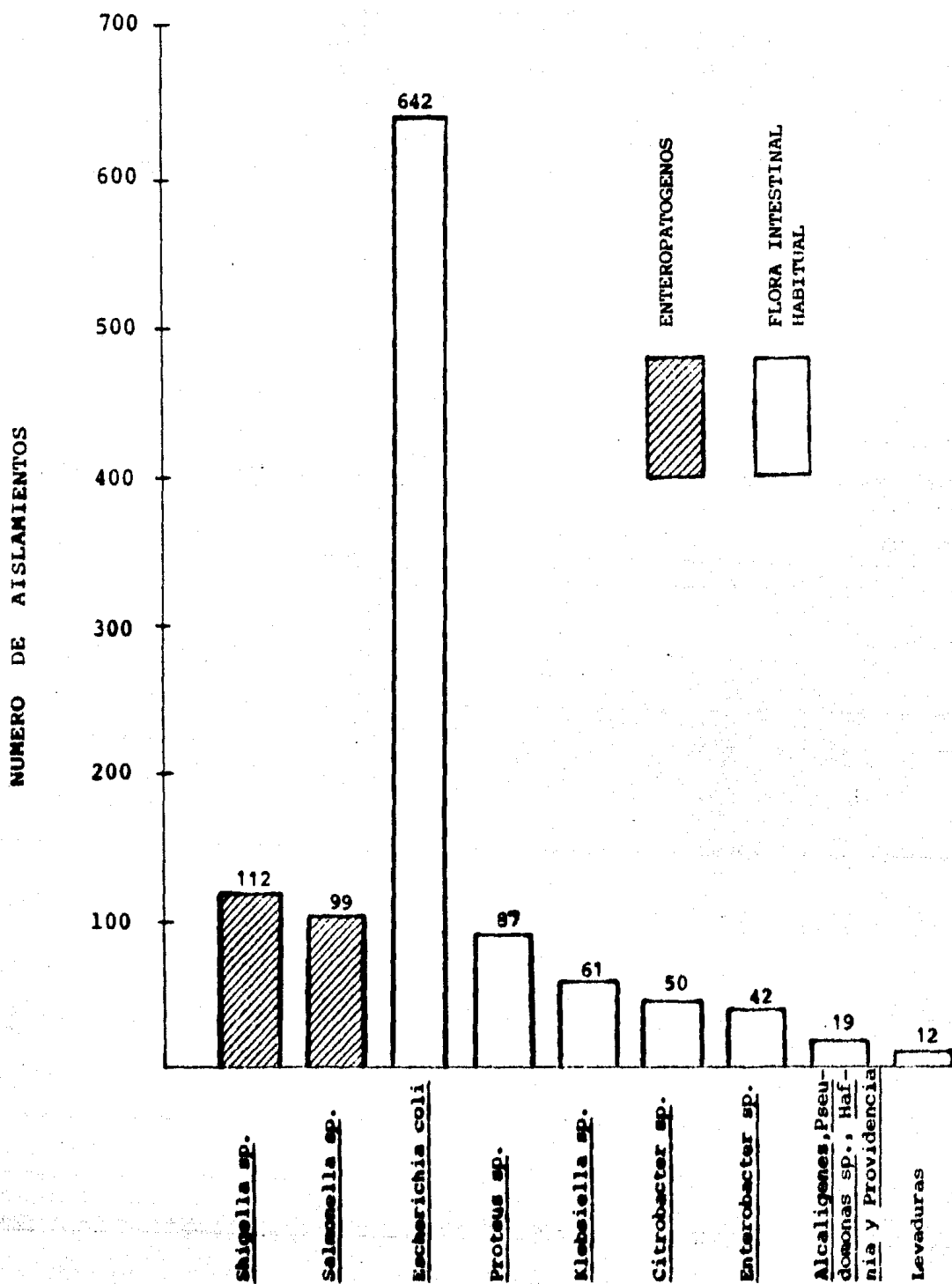
NUMERO DE MUESTRAS TRABAJADAS DE ACUERDO AL SEXO.

SEXO MASCULINO .....	352
SEXO FEMENINO .....	436
SIN DATOS .....	212
T O T A L .....	1,000

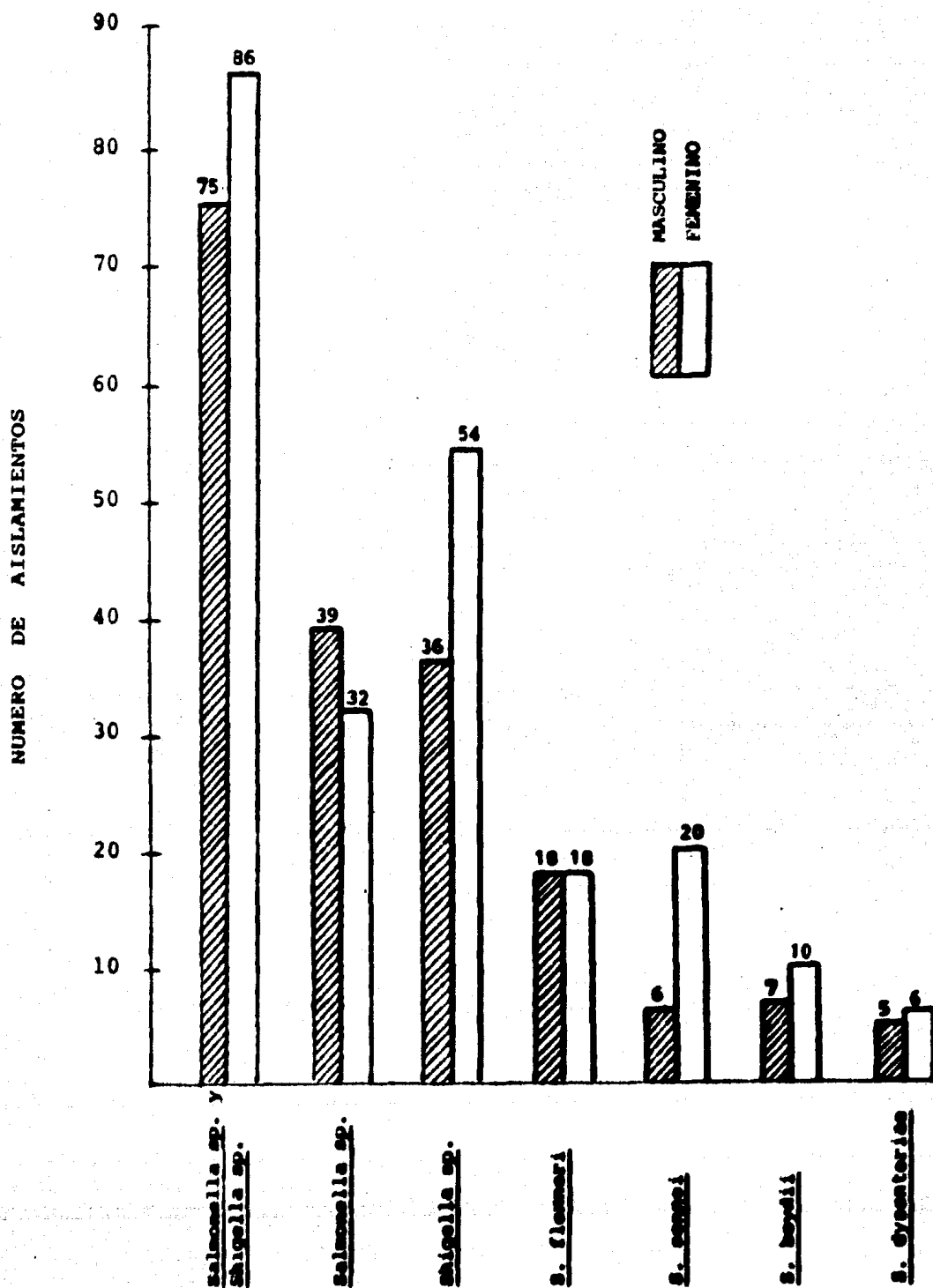
FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS ENTEROPATOGENOS AISLADOS DE 788 MUESTRAS DE ACUERDO AL SEXO.

	Aislamientos				
	Totales	Masculino	%	Femenino	%
<u>Salmonella sp.</u>	71	39	54.9	32	45.1
<u>Shigella sp.</u>	90	36	40.0	54	60.0
<u>S. flexneri</u>	36	18	50.0	18	50.0
<u>S. sonnei</u>	26	6	23.1	20	76.9
<u>S. boydii</u>	17	7	41.2	10	58.8
<u>S. dysenteriae</u>	11	5	45.4	6	54.6
<u>Total de Salmonella</u> <u>sp. y Shigella sp.</u>	161	75	46.6	86	53.4

MICROORGANISMOS AISLADOS A PARTIR DE 1,000 MUESTRAS POR MEDIO DEL COPROCULTIVO.



MICROORGANISMOS ENTEROPATOGENOS AISLADOS POR MEDIO DEL COPRO-  
CULTIVO EN 788 MUESTRAS DE ACUERDO AL SEXO.



## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

De las mil muestras analizadas, 211 fueron positivas para Salmonella sp. y Shigella sp., lo que representa el 21.1% del total de los coprocultivos; el resto (789), es decir el 78.9% resultaron negativas. Estos valores ya se habían previsto y nos dejan ver que un gran porcentaje de casos de gastroenteritis pueden corresponder a etiologías diferentes a las analizadas en este estudio (Salmonella sp. y Shigella sp.).

Se aislaron 99 casos de Salmonella (9.9%) y 112 de Shigella (11.2%) de estos últimos corresponden a S. flexneri: 42 casos (4.2%), S. sonnei: 35 (3.5%), S. boydii: 19 (1.9%) y S. dysenteriae: 16 (1.6%). Estas cifras son muy parecidas a las reportadas por varios autores. S. flexneri sigue siendo la más frecuente en nuestro medio, seguida de S. sonnei.

Respecto a las bacterias más abundantes en los cultivos negativos para Salmonella sp. y Shigella sp., se encontró lo siguiente:

Escherichia coli fué la más frecuente, aunque su evaluación se dificulta, ya que también se aisló casi siempre en los controles; sin embargo, ya se han mencionado las cepas invasivas y toxigénicas de este género, por lo que su frecuencia amerita la implantación y desarrollo de técnicas sencillas para la detección de esas propiedades patógenas, sobre todo en las muestras procedentes de niños entre 0 y 2 años de edad.

El segundo lugar le corresponde a las especies de Proteus, aunque se ha reportado la existencia de cepas toxigénicas, en este estudio se encontró que los porcentajes de las diversas especies por separado son muy bajas, posiblemente se deba considerar a Proteusmorganii con 37 aislamientos (3.7%) y a Proteus mirabilis con 30 aislamientos (3%) como posibles agentes etiológicos en las diarreas.

En tercer, cuarto y quinto lugar respectivamente, encontramos a Klebsiella sp. con 61 aislamientos (6.1%), Citrobacter sp. con 50 aislamientos (5%) y a Enterobacter sp. con 42 (4.2%). De estas bacterias se han encontrado cepas toxigénicas y la frecuencia relativamente alta de ellas hace pensar que es necesario valorar su participación como agentes etiológicos en las diarreas.

El sexto lugar le corresponde a las levaduras con 12 aislamientos (1.2%) y el séptimo a Pseudomonas sp. Aunque la frecuencia de estos dos microorganismos es muy baja, ya se se han mencionado anteriormente como causantes de sobreinfecciones en personas inmunodeficientes o en tratamiento prolongado con antibióticos de amplio espectro, por lo que no debe descartárseles como posibles agentes causales. Por último tenemos a Alcaligenes sp., a Providencia y a Hafnia, con una frecuencia tan baja, que podrían descartarse como causantes de diarrea.

Se encontraron combinadas, posiblemente teniendo un efecto sinérgico, las siguientes bacterias: Citrobacter sp.-Escherichia coli en 20 ocasiones (2%), Proteus mirabilis-Escherichia coli en 5 ocasiones (0,5%), Levaduras-Escherichia coli en 4 (0.4%) y algunas otras combinaciones menos frecuentes.

Se puede observar que una cantidad ligeramente superior de muestras trabajadas correspondía a mujeres. En la presente década, la incidencia de enfermedades gastroentéricas ha aumentado considerablemente en las mujeres, ya que cada vez son más las que trabajan fuera del hogar y ahora, al igual que los hombres, el comer fuera de la casa se traduce en mayor posibilidad de adquirir enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, esta cifra ligeramente superior en las mujeres, también podría deberse a que los hombres tienden a ir menos al médico, por lo que muchos casos no son reportados.

También se observó un ligero predominio de Salmonella en los hombres (54.9%) y de Shigella en las mujeres (60%).

Shigella flexneri se encontró con igual frecuencia en ambos sexos.

Shigella sonnei tiene un marcado predominio en las mujeres (76.9%) y en Shigella dysenteriae éste es menos notorio (54.6%).



## CONCLUSIONES

El número relativamente bajo (21.1%) de aislamientos positivos para Salmonella y Shigella, de las muestras analizadas en este estudio, pudiera explicarse por las siguientes causas:

1. A la existencia de bacterias enteropatógenas, diferentes a las estudiadas aquí, y que aunque en otros países se estudian con más profundidad rutinariamente, en el nuestro el estudio de su frecuencia y participación etiológica en las gastroenteritis apenas se inicia, por ejemplo, Campylobacter sp. y Yersinia sp.
  2. A que en enterobacterias tradicionalmente no patógenas, algunas de sus cepas hubieran podido adquirir información para producir enterotoxinas u otras características que les permitieran producir enfermedades diarreicas por cualquiera de los mecanismos previamente descritos.
  3. A una participación muy importante de los agentes virales.
  4. A procesos no infecciosos tales como: tensiones, trastornos fisiológicos o metabólicos, etc.
- Aunque el porcentaje total de aislamientos de Salmonella y Shigella (21.1%), así como los valores individuales (Shigella 11.2%, Salmonella 9.9%) corresponden, con poca variación, a los reportados por varios autores (3, 9, 24) no es posible establecer una comparación, pues se trata de poblaciones diferentes y en este estudio se trabajó exclusivamente con muestras de personas adultas de nivel socio-económico medio.

- El encontrar abundancia de un microorganismo en el coprocultivo de pacientes con padecimientos diarreicos, puede no ser algo casual, sino que puede ser causa o efecto en el proceso diarreico. Sin embargo, este hecho no indica por sí mismo la enteropatogenicidad de esas bacterias, pues es necesario establecer claramente su participación haciendo uso de los postulados de Koch y, mejor aún, estableciendo el mecanismo por el cual se produce la enfermedad.
  
- En este estudio, se encontraron con cierta frecuencia y en forma abundante Proteus sp., Klebsiella sp., Citrobacter sp. y Enterobacter sp., en ese orden de importancia, por lo que estas bacterias merecen un estudio más profundo para determinar su posible papel etiológico en las diarreas.
  
- En la actualidad se han encontrado cepas de estos microorganismos que poseen propiedades enterotoxigénicas, sin embargo no debería descartarse la posibilidad de que produjeran las diarreas por otros mecanismos, como el invasivo o haciendo uso del factor de colonización ya mencionado, que aunado a la proliferación y gran cantidad de productos del metabolismo pudieran causar trastornos gastrointestinales.

## ANEXO A

### FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

#### Definición.

De acuerdo a Edwards y a Ewing (9), se caracteriza por estar constituida por bacilos Gramnegativos, que crecen bien en los medios de cultivo ordinarios; son aerobios o anaerobios facultativos, con especies inmóviles o móviles por flagelos peritricos; no esporulados son catalasa positivos y oxidasa negativos, fermentan una gran variedad de hidratos de carbono, entre ellos la glucosa, la cual utilizan fermentativamente con producción de ácido o ácido y gas, reducen los nitratos a nitritos, no licuan el alginato y el pectato sólo es licuado por el género Pectobacterium.

Esta familia comprende bacterias patógenas y no patógenas. Entre las patógenas se puede mencionar a Salmonella, Shigella, Arizona y algunos serotipos de Escherichia.

El género Edwardsiella, que posee una sola especie: Edwardsiella tarda, ha sido asociada con la producción de diarreas.

Entre las no patógenas generalmente se menciona a Citrobacter, Serratia, Proteus, Klebsiella, Enterobacter y Providencia. Sin embargo, ocasionalmente estos últimos pueden estar asociados con casos o brotes de enfermedad y, naturalmente, pueden desempeñar un papel más activo cuando se localizan fuera del tracto intestinal, que es su hábitat natural. Por ejemplo, en el tracto genitourinario, en líquido cefalorraquídeo, o en la cavidad peritoneal.

CLASIFICACIONES.

Clasificación según Kauffman (13). Comprende tres tribus:

1. Escherichieae, con cuatro géneros:

Escherichia

Citrobacter

Salmonella

Shigella

2. Klebsiellae, con cuatro géneros:

Klebsiella

Enterobacter

Hafnia

Serratia

3. Proteae, con cuatro géneros:

Proteus

Morganella

Rettgella

Providencia

Clasificación según Ewing (9). Comprende seis tribus y trece géneros con sus correspondientes especies:

Familia:		<u>Enterobacteriaceae</u>
Tribu	I	<u>Eschericheae</u>
Género	1	<u>Escherichia</u>
Especie		<u>Escherichia coli</u>
Género	2	<u>Shigella</u>
Especies		<u>Shigella dysenteriae</u>
		<u>Shigella flexneri</u>
		<u>Shigella boydii</u>
		<u>Shigella sonnei</u>
Tribu	II	<u>Edwardsiellae</u>
Género	1	<u>Edwardsiella</u>
Especie		<u>Edwardsiella tarda</u>

Tribu III	<u>Salmonelleae</u>
Género 1	<u>Salmonella</u>
Especies	<u>Salmonella cholerae-suis</u> <u>Salmonella typhi</u> <u>Salmonella enteritidis</u>
Género 2	<u>Arizona</u>
Especie	<u>Arizona hihsawii</u>
Género 3	<u>Citrobacter</u>
Especies	<u>Citrobacter diversus</u> <u>Citrobacter freundii</u>
Tribu IV	<u>Klebsielleae</u>
Género 1	<u>Klebsiella</u>
Especies	<u>Klebsiella pneumoniae</u> <u>Klebsiella ozaenae</u> <u>Klebsiella rhinoschleromatis</u>
Género 2	<u>Enterobacter</u>
Especies	<u>Enterobacter cloacae</u> <u>Enterobacter aerogenes</u> <u>Enterobacter hafniae</u> <u>Enterobacter agglomerans</u>
Género 3	<u>Serratia</u>
Especies	<u>Serratia marcescens</u> <u>Serratia liquefaciens</u> <u>Serratia rubidaea</u>
Tribu V	<u>Proteeae</u>
Género 1	<u>Proteus</u>
Especies	<u>Proteus vulgaris</u> <u>Proteus mirabilis</u> <u>Proteus morgani</u> <u>Proteus rettgeri</u>
Género 2	<u>Providencia</u>
Especies	<u>Providencia alcalifaciens</u> <u>Providencia stuartii</u>
Tribu VI	<u>Erwinieae</u>
Género 1	<u>Erwinia</u>
Especie	<u>Erwinia amylovora</u>
Género 2	<u>Pectobacterium</u>
Especie	<u>Pectobacterium carotovorum</u>

Clasificación según Bergey (2). Incluye cinco tribus agrupadas de la siguiente manera:

TRIBUS	GENEROS Y ESPECIES
<u>Escherichieae</u>	<u>Escherichia</u> <u>Edwardsiella</u> <u>Citrobacter</u> <u>Salmonella</u> <u>Shigella</u>
<u>Klebsielleae</u>	<u>Klebsiella</u> <u>Enterobacter</u> <u>Hafnia</u> <u>Serratia</u>
<u>Proteae</u>	<u>Proteus vulgaris</u> <u>Proteus mirabilis</u> <u>Proteus morganii</u> <u>Proteus rettgeri</u> <u>Providencia</u>
<u>Yersinieae</u>	<u>Yersinia pestis</u> <u>Yersinia pseudotuberculosis</u> <u>Yersinia enterocolitica</u>
<u>Erwinieae</u>	<u>Erwinia amylovora</u> <u>Erwinia herbicola</u> <u>Erwinia carotovora</u>

Las tribus y géneros propuestos por Ewing corresponden parcialmente a los propuestos en la clasificación del Manual Bergey, en la primera no se incluye a la tribu Yersinieae y se admiten las tribus Salmonelleae y Edwardsielleae.

**PRUEBAS COMUNES PARA EL ESTUDIO DE LA FAMILIA  
ENTEROBACTERIACEAE. (1,2,4,5,17,18)**

En la actualidad se han diseñado algunos medios diferenciales con el objeto de observar simultáneamente dos o más pruebas en un mismo tubo, entre los más útiles están: el medio TSI (Agar Hierro Triple Azúcar) y el Agar de Hierro de Kligler, que contienen glucosa, sacarosa, lactosa y un indicador de pH, en estos medios se puede apreciar la producción de acidez debida a la fermentación de los carbohidratos y la producción de ácido sulfhídrico, así como la producción de gas a partir de la glucosa.

El medio LIA (Agar Lisina Hierro) contiene lisina, sal de hierro y un indicador de pH, para observar descarboxilación y desaminación oxidativa de la lisina, producción de ácido sulfhídrico y gas a partir de la glucosa.

El medio MIO, es un medio semisólido que contiene tripticasa L-ornitina y un indicador, es útil para observar la movilidad, descarboxilación de la ornitina y producción de indol.

Por la combinación de los resultados en los tres medios descritos, puede hacerse en algunas enterobacterias, una diferenciación presuntiva hasta género o especie.

A continuación se analizará con más detalle el fundamento de la mayoría de las pruebas más usuales:

**1. Prueba del Indol.**

Esta prueba se basa en la facultad de oxidar el triptofano a metilindol (escatol), y éste a indol. El indol y el escatol con el reactivo de prueba, (reactivo de Kovacs o de Ehrlich) producen un compuesto rosado muy soluble en alcohol.

## 2. Reacción del Rojo de Metilo.

Esta prueba se basa en la producción de ácido a partir de la glucosa, en cantidad suficiente como para vencer el efecto neutralizador del amortiguador, dando una reacción ácida, lo cual hace que el indicador (rojo de metilo) vire a rojo; si sólo se produce una pequeña cantidad de ácido, éste será neutralizado por el amortiguador.

## 3. Reacción de Voges-Proskauer.

Voges y Proskauer descubrieron en 1898 una coloración roja fluorescente que aparecía en ciertos cultivos, al agregarles unas gotas de solución KOH. Más tarde se supo que esto era debido a la oxidación del acetilmetilcarbinol (2,3-butilenglicol) que pasaba a diacetilo, el cual a su vez reaccionaba con la peptona del medio, dando una coloración roja. La reacción completa es la siguiente:

glucosa----> acetilmetilcarbinol----> diacetilo  
diacetilo + KOH + O + arginina ----> eosina (color rosado)

Nota: La mayoría de las enterobacterias dan reacciones de RM y VP opuestas, ya que el aumento de la alcalinidad (reacción RM negativa) se debe a la producción de acetoína (reacción VP positiva).

## 4. Reacción de Citrato.

Esta prueba se basa en la facultad que tienen algunas bacterias de utilizar el citrato como única fuente de carbono. Los métodos más empleados son:

- Reacción de Koser, cuyo mecanismo se basa en la turbidez del caldo de cultivo, debida al desarrollo bacteriano.
- Prueba en Agar Citrato de Simmons, el mecanismo se basa en que la utilización del citrato deja un residuo de sodio; como el medio tiene azul de bromotimol como indicador, la alcalinidad resultante hace que el medio vire de verde a azul.



- Reacción de sangre citratada, en este caso el empleo (depleción) del citrato permitirá la coagulación de la sangre.

5. Producción de Acido Sulfhídrico.

Esta prueba se basa en la facultad que tienen algunas bacterias de reducir los aminoácidos sulfurados a  $H_2S$ . En los medios especiales que tienen ya incorporada la sal de un metal, las colonias o el medio presentan un color negro por la formación de sulfuro del metal correspondiente: sulfuro de Fe, Bi, etc.

Pueden utilizarse tiras de papel impregnadas.

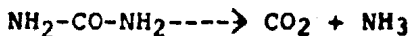
6. Prueba de movilidad.

Las enterobacterias móviles poseen flagelos peritricos, los cuales están constituidos por una proteína contráctil denominada flagelina. Esta proteína es antigénica y constituye el antígeno H (termolábil y específico). Son sintetizadas por un ribosoma especial, el flagelosoma.

Es importante utilizar cultivos jóvenes, ya que a menudo la movilidad se pierde con la edad.

7. Reacción de la Ureasa.

Esta prueba se basa en la facultad de hidrolizar la urea, la reacción efectuada es la siguiente:



Un álcali produce color rojo debido al indicador rojo de fenol.

8. Pruebas de fermentación de los Hidratos de Carbono.

Estas pruebas se basan en la detección de los productos resultantes de la fermentación o utilización de los hidratos de carbono, polihidroalcoholes, glucósidos o sales de ácidos orgánicos, denominados comúnmente carbohidratos.

El ácido resultante de la fermentación o el álcali liberado por la utilización de los hidratos de carbono, da como resultado un cambio en el pH.

Los medios usados para estas pruebas, clásicamente constan de agua peptonada enriquecida con 1% de hidratos de carbono. Para estudios de fermentación u oxidación, se añade un indicador (frecuentemente rojo de fenol). El cambio de color indica producción de ácido. Mediante tubos de Durham invertidos, se puede recoger el gas producido; las burbujas en la parte alta de estos tubos indican producción de gas.

El metabolismo de los carbohidratos por las bacterias puede producir distintas sustancias, que incluyen gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ ), alcoholes y ácidos grasos.

Para la identificación preliminar de Enterobacteriaceae, se emplean medios dobles de azúcar, basados en el medio de Russel con lactosa y glucosa. Estos medios se vierten en tubos inclinados y se inoculan a partir de colonias aisladas únicas, haciendo una estría sobre la superficie y una picadura en el fondo del tubo. Un microorganismo que fermenta ambos azúcares volverá ácidos el fondo y la superficie, de modo que el indicador (rojo de fenol) se torne amarillo. La producción de gas agrieta el agar, o lo hace subir por el tubo. Con un microorganismo que fermenta la glucosa, pero no la lactosa, el fondo del tubo donde no hay oxígeno se vuelve amarillo, pero la superficie se vuelve roja de nuevo, por inversión de la reacción en condiciones aerobias con utilización de la glucosa. Si no hay fermentación de ninguno de los azúcares, el color sigue rojo en todo el medio.

En estas preparaciones es importante no utilizar tapones de rosca, sino tubos tapados solamente con torundas de algodón. Se pueden citar como medios similares el agar de Krunwiede, con tres azúcares (lactosa, sacarosa y glucosa),

el agar de Kligler, que contiene hierro (ferroso) además de glucosa y lactosa y el agar TSI que contiene lactosa, sacarosa, glucosa y una sal ferrosa.

Si se utiliza peptona como fuente de nitrógeno, puede ser atacada para producir amoníaco suficiente como para neutralizar el ácido de la fermentación. Es mejor utilizar las sales de amoníaco como fuente de nitrógeno, ya que sólo se descompone la cantidad suficiente para ser utilizada en la síntesis celular.

#### 9. Utilización del Acetato.

Esta prueba se basa en la facultad del microorganismo de utilizar el acetato como única fuente de carbono. La utilización del acetato deja un residuo de sodio:



Como el medio tiene azul de bromotimol como indicador, la alcalinidad resultante hace que el medio tome un color azul.

#### 10. Reacción de KCN (Prueba de Braun).

Esta prueba se basa en la facultad de crecimiento en cianuro de potasio (KCN) muy diluido. La turbiedad visible indica el crecimiento (el sistema respiratorio no es bloqueado por el KCN).

#### 11. Utilización del Malonato.

Esta prueba se basa en que la utilización del malonato de sodio deja como residuo sodio (Na):



Esto produce un color azul en el medio, debido al indicador de bromotimol.

#### 12. Reacción del Gluconato.

Esta prueba se basa en la facultad de convertir el ácido

glucónico en 2-ceto-gluconato, y la detección de éste como sustancia reductora.

### 13. Descarboxilación de la Ornitina.

Esta prueba se basa en la facultad de descarboxilar el aminoácido ornitina para dar la amina putresceína, liberando  $\text{CO}_2$  y alcalinizando el medio. Los medios que se usan en los métodos de Falkow y Møller o en el medio MIO, tienen incorporados el indicador púrpura de bromocresol; las enterobacterias inicialmente hacen virar el medio a amarillo (ácido) por la fermentación de la glucosa pero finalmente la descarboxilación devuelve al medio el color púrpura (alcalino).

### 14. Descarboxilación de la lisina.

Esta prueba se basa en la facultad de descarboxilar el aminoácido lisina para dar la amina cadaverina, liberando  $\text{CO}_2$  y alcalinizando el medio. En los medios usados en los métodos de Falkow y Møller, así como el agar con lisina y hierro y el caldo de lisina y descarboxilasa, entre otros, se utiliza el púrpura de bromocresol como indicador, por lo que el mecanismo para estos medios, es similar al de la descarboxilación de la ornitina. El método de Carlquist utiliza ninhidrina, la cual reacciona con la cadaverina (producto de la descarboxilación) dando un compuesto de color rosado a púrpura.

### 15. Arginina Dihidrolasa.

El principio de esta prueba es el siguiente: la arginina es sometida a desaminación hidrolítica y descarboxilación dando ornitina,  $\text{CO}_2$  y  $2\text{NH}_3$ ; el amoníaco al disolverse con el agua da una reacción alcalina. esto origina un color púrpura en el medio (caldo de Møller y Falkow).

## 16. Reacción DNasa.

Se basa en la facultad de producir la enzima desoxirribonucleasa. En los casos positivos, aparece una zona clara alrededor de la colonia (por haberse destruido el DNA) cuando se revela con HCl 1 N. En el caso negativo no se advierte zona clara. También se puede revelar con azul de toluidina al 0.1%; en el caso negativo no se advierte cambio de color, permanece azul, en el positivo cambia a color rosa.

Esta prueba se usa principalmente para diferenciar el *Estafilococo patógeno* (+) de los saprófitos (-). También se usa para la diferenciación de *Serratia* (+) de *Enterobacter* (-).

## 17. Reacción ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido).

La lactosa es un disacárido formado por una molécula de glucosa y una de galactosa, unidas por un enlace de tipo  $\beta$ -galactósido. La fermentación de la lactosa requiere dos enzimas; una permeasa, que regula la entrada de lactosa a la bacteria, y una  $\beta$ -D-galactosidasa para el metabolismo de la lactosa. Parece que una tardanza en la fermentación de la lactosa se debe generalmente a la falta de permeasa. Por lo tanto la búsqueda de galactosidasa debe indicar rápidamente si el microorganismo puede fermentar la lactosa. El orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido es una sustancia incolora que, al romperse el enlace galactósido que contiene, da lugar a un compuesto amarillo, el o-nitrofenol; este compuesto actúa como indicador de la actividad de galactosidasa.

Nota: El cultivo sometido a prueba debe ser hecho en un medio que contenga lactosa, para asegurarse que el microorganismo ha tenido estímulo para producir lactasa.

#### 18. Desaminación de la Fenilalanina.

Esta prueba se basa en la capacidad de transformar la fenilalanina por desaminación oxidativa, en ácido fenilpirúvico. Este reacciona con el cloruro férrico, produciendo un color verde. Proteus y Providence son las únicas enterobacterias que dan positiva la reacción A.F.P.

#### 19. Licuefacción de la Gelatina.

Esta prueba se basa en la facultad de descomponer la gelatina, hasta aminoácidos. Como la gelatinasa no es una enzima proteolítica propiamente dicha, esta reacción no puede ser reemplazada por las de proteólisis.

- Método de picadura en gelatina: El medio no gelifica sino que es descompuesta la gelatina.
- Método de Frazier, modificado: Precipitación de la gelatina no digerida.
- Método de la película de rayos X: Extracción visible de la capa de gelatina.

#### 20. Reducción del Nitrato.

Se basa en la facultad de reducir el nitrato ( $\text{NO}_3$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2$ ). Algunas bacterias reducen el  $\text{NO}_2$  a  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ .

La reducción del nitrato es un proceso anaerobio.

- Método standard: La reacción en busca de presencia de nitrito.
- Método de la placa: En presencia de  $\text{NO}_2$ , la hemoglobina es oxidada a metahemoglobina.

ANEXO C

PREPARACION DE REACTIVOS

1. Alcohol - acetona.

Alcohol etílico de 95º ..... 250 ml

Acetona ..... 250 ml

Mezclar y conservar en frasco con tapón esmerilado.

2. Cristal violeta.

Solución A:

Cristal violeta ..... 2 g

Alcohol etílico de 95º ..... 20 ml

Mezclar y disolver.

Solución B:

Oxalato de amonio ..... 0.8 g

Agua destilada ..... 80 ml

Mezclar y disolver.

Para su empleo:

1. Agregar la solución A a la solución B.

2. Reposar durante 24 horas.

3. Filtrar antes de su empleo.

3. Solución yodada de Gram.

Cristales de yodo ..... 1 g

Yoduro de potasio ..... 2 g

Agua destilada ..... 300 ml

a) Moler las sustancias sólidas en unos 20 ml de agua destilada.

b) Agregar el resto del líquido.

c) Filtrar en un frasco color caramelo.

d) Guardar a resguardo de la luz; desecharlo cuando el color comienza a aclararse.

4. Solución de safranina.

Solución concentrada de safranina:

Safranina O ..... 2.5 g  
Alcohol etílico de 95%C ..... 100 ml  
Mezclar y conservar en frasco de cristal.

Solución de trabajo:

Diluir 1:10 con agua destilada. Guardar en frasco con tapón esmerilado.

5. Solución salina glicerinada amortiguada.

Cloruro de sodio ..... 4.2 g  
 $K^2HPO_4$  anhidro ..... 3.1 g  
 $K_2PO_4$  anhidro ..... 1.0 g  
Glicerina ..... 300 ml  
Agua destilada ..... c.b.p.1000 ml

El cloruro y los fosfatos se disuelven en el agua, se añade la glicerina y se afora a un litro con agua. Se divide en volúmenes de 10 ml en tubos de 16 x 150 y se añaden cuatro gotas de rojo de fenol. La solución debe tener un color rosado (alcalina).

6. Solución de rojo de fenol.

Rojo de fenol ..... 0.1 g  
Hidróxido de sodio 0.01 N .....28.2 ml  
Agua destilada, hervida y enfriada .....c.b.p. 250 ml  
Se disuelve el rojo de fenol en el hidróxido de sodio y se afora a 250 ml con agua destilada.

7. Solución de rojo de metilo.

Rojo de metilo ..... 0.1 g  
Alcohol etílico de 95% ..... 300 ml  
Agua destilada ..... 200 ml  
Disolver el rojo de metilo en el alcohol y adicionar el agua destilada.



8. Solución de yodo (para el caldo de tetracionato).

Yodo en cristales .....	6 g
Yoduro de potasio .....	5 g
Agua destilada .....	20 ml

Moler las sustancias sólidas en unos mililitros de agua y después agregar el resto.

## B I B L I O G R A F I A

1. Branson, D. (1974). Métodos en Clínica Bacteriológica. Editorial Médica Panamericana. p: 17-72.
2. Buchanan, R.E. y N.E. Gibbons. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
3. Calderón Jaimes, E. (1980). Conceptos Clínicos de Infectología. 7a. edición. Editorial Francisco Méndez Cervantes. p: 241-261.
4. Cowan, S.T. (1974). Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 2nd. edition. Cambridge University Press. London, England.
5. Del Rey Calero, J. (1976). Microbiología e Inmunología de de las Enfermedades Infecciosas. 1a. edición. Editorial Marbán. p: 228-237, 251-254, 297-325, 339-344.
6. De la Torre, J.A. (1983). Shigelosis. En: Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición. p:185-204.
7. Doyle, M.P. y D.J. Roman. (1982). Recovery of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from Inoculated Foods by Selective Enrichment. Appl. and Env. Microbiol. 43 (6) p: 1343-1353.
8. Dulanto, E. (1983). Conceptos Históricos. En: Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición. p: 1-15.
9. Edwards, P.R. y W.A. Ewing. (1972). Identification of Enterobacteriaceae . 3rd. edition. Burgess Publish Minnesota, Minneapolis.
10. Eiss, J. (1975). Selective Culturing of Yersinia enterocolitica at a Low Temperature. Scand. Journal Infect. Dis. 7 p: 249-251.

## B I B L I O G R A F I A

1. Branson, D. (1974). Métodos en Clínica Bacteriológica. Editorial Médica Panamericana. p: 17-72.
2. Buchanan, R.E. y N.E. Gibbons. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
3. Calderón Jaimes, E. (1980). Conceptos Clínicos de Infectología. 7a. edición. Editorial Francisco Méndez Cervantes. p: 241-261.
4. Cowan, S.T. (1974). Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria. 2nd. edition. Cambridge University Press. London, England.
5. Del Rey Calero, J. (1976). Microbiología e Inmunología de las Enfermedades Infecciosas. 1a. edición. Editorial Marbán. p: 228-237, 251-254, 297-325, 339-344.
6. De la Torre, J.A. (1983). Shigelosis. En: Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición. p:185-204.
7. Doyle, M.P. y D.J. Roman. (1982). Recovery of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from Inoculated Foods by Selective Enrichment. Appl. and Env. Microbiol. 43 (6) p: 1343-1353.
8. Dulanto, E. (1983). Conceptos Históricos. En: Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición. p: 1-15.
9. Edwards, P.R. y W.A. Ewing. (1972). Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. edition. Burgess Publish Minnesota, Minneapolis.
10. Eiss, J. (1975). Selective Culturing of Yersinia enterocolitica at a Low Temperature. Scand. Journal Infect. Dis. 7 p: 249-251.

11. Gómez Barreto, D., N. González y J.C. Pérez. (1984). Gastroenteritis. En: Infectología Clínica. Editorial Trillas. 1a. edición. p: 148-176.
12. Informe del Comité de Enfermedades Infecciosas. (1974). Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 1a. edición en Español. p: 51-53, 200-203, 209-210.
13. Kauffman, F. (1966). The Bacteriology of Enterobacteriaceae. Manksgaard Edit. Copenhagen.
14. Krugman, S., R. Ward, S.L. Katz. (1979). Enfermedades Infecciosas. 6a. edición. Editorial Interamericana. p: 64-76, 267-280.
15. Kumate, J. et. al. (1983). Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición p: 61-73, 75-86, 151-158, 205-219.
16. Kumate, J. y G. Gutiérrez. (1983). Manual de Infectología. 9a. edición. Editorial Francisco Méndez Cervantes. p:14-26, 34-36, 47-57, 371-386.
17. Lynch, M.J., S.S. Raphael, L.D. Mellor, P.D. Spare Y M.J.H. Inwood. (1972). Métodos de Laboratorio. 2a. edición. Editorial Interamericana. p: 916-919, 953-964.
18. Manual de Laboratorio de Bacteriología Médica. (1979). Departamento de Microbiología. Esc. Nal. de Ciencias Biológicas. 3a. edición. p: 1-46.
19. Mata, L., E. Mohs y F. Hernández. (1983). Etiología Viral de las Diarreas. En: Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición. p: 111-119.
20. Nahmias, A.J., J. Gómez Barreto, S. Kohl, J. Oleske y F. Flax. (1983). Identificación de Nuevos Agentes Microbianos en las Diarreas. Trib. Med. Mayo (29). p: 7-13.
21. Niléhn, B. (1969). Electro Microscopic Studies of Flagellation in Different Strains of Yersinia enterocolitica. Acta. Path. Microbiol. Scand. 77. p: 527-541.

22. Niléhn, B. (1969). Studies of Yersinia enterocolitica with Special Reference to Bacterial Diagnosis and Accurance in Human Acute Enteric Disease. Acta. Path. Microbiol. Scand. Supplement 206.
23. Olarte, J. et. al. (1983). Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición. p: 45-60, 87-100.
24. Peredo, M.A. y N. González. (1984). Fiebre Tifoidea. En: Infectología Clínica. 1a.edición. Editorial Trillas. p: 179-192.
25. Shayegani, M., I. DeForge, D.M. Maglynn y T. Root. (1981). Characteristics of Yersinia enterocolitica and Related Species Isolated from Human, Animal and Enviromental Sources. J. Clin. Microbiol. 14 (3) p: 304-312.
26. Skirrow, M.B. (1977). Campylobacter enteritis: A "New" Disease. Br. Med. Journal. 2 (July). p: 9-11.
27. Taylor, W.I. (1965). Isolation of Shigellae. I. Xylose Lysine Agars; New Media for Isolation of Enteric Pathogens. Am. J. Clin. Path. 44 (4). p: 471-475.
28. Taylor, W.I. y B. Harris. (1965). Isolation of Shigellae. II. Comparison of Plating Media and Enrichment Broths. Am. J. Clin. Path. 44 (4). p: 476-479.
29. Tilse, M.H. y T.V. McAllister. (1981). Isolation of Campylobacter fetus from Blood Cultures. Med. J. Austral. (October). p: 337-338.
30. Torregrosa, L. (1983). Diarrea por E. coli. En: Enfermedades Diarreicas en el Niño. Eds. Meds. del Hospital Infantil de México. 8a. edición. p: 221-232.