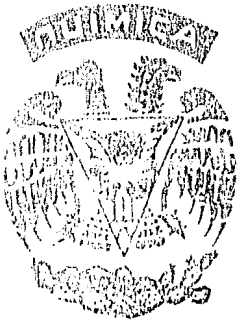


77
2.5.85



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO BIOQUIMICO Y SEROLOGICO DE ENTEROBACTERIA-
CEAS LACTOSA POSITIVA QUE COMPARTEN ANTIGENOS
SOMATICOS, AISLADAS DE GASTROENTERITIS EN UN
MEDIO HOSPITALARIO.

T E S I S

MA. MAGDALENA GARCIA ZUÑIGA

QUIMICO

FARMACEUTICO

BIOLOGO

1985



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 está 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.

CONTENIDO

	Página
I.- INTRODUCCION	1
II.- CAPITULO I GENERALIDADES	2
III.- CAPITULO II MATERIAL Y METODOS	24
IV.- CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION	30
V.- CAPITULO IV RESUMEN Y CONCLUSIONES	38
VI.- BIBLIOGRAFIA	41
VII.- APENDICE	45

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

Desde 1957 se hizo evidente un problema de suma importancia en el medio hospitalario, relacionado con la presencia de microorganismos atípicos patógenos de la familia Enterobacteriaceae, no tomados en cuenta hasta entonces por los laboratorios de bacteriología, porque se les confundía fácilmente con otras bacterias de la flora normal (Escherichia coli, Citrobacter freundii).

En la búsqueda rutinaria de enterobacterias en coprocultivos se investigan por lo general los microorganismos no fermentadores de lactosa (Salmonella y Shigella), ignorando las infecciones debidas a salmonelas fermentadoras de lactosa, las cuales ya han sido reportadas por varios autores (1-7). Aún cuando esta característica de fermentar o no la lactosa es de interés para una primera discriminación entre patógenos entéricos y no patógenos, no debe tomarse como una prueba definitiva, de ahí que sea necesario establecer la presencia o no de esta variedad de salmonelas por medio de pruebas bioquímicas específicas que permitan su clasificación genérica. En México no ha habido reportes de ninguna índole en lo que se refiere a salmonelas fermentadoras de lactosa, tal vez por haber pasado inadvertidas o haber sido reportadas como Citrobacter freundii, -- constituyendo esto un serio problema para la bacteriología diagnóstica. El carácter atípico de lactosa (+) no corresponde únicamente al género Salmonella, -- ya que se hace también referencia a otros géneros dentro de la misma familia -- Enterobacteriaceae (8). Por las razones expuestas y siendo el objetivo principal de este trabajo, se ha considerado necesario investigar la presencia de salmonelas fermentadoras de lactosa en materia fecal y en otros materiales biológicos provenientes de niños que asisten a la consulta hospitalaria por problemas de gastroenteritis, así como obtener su clasificación serológica en género y especie.

CAPITULO I
GENERALIDADES

Considerando la amplia variedad de géneros y especies que caen dentro de la familia Enterobacteriaceae, Ewing en 1963 propuso una clasificación y un sistema de nomenclatura para las mismas, basandose en estudios comparativos de reacciones bioquímicas y características morfológicas, así como en diferencias antigénicas y en susceptibilidad a bacteriófagos o a bacteriocinas, aunque algunas veces se presentan características que pueden no ser un criterio satisfactorio para distinguir y clasificar géneros y especies en detalle (9).

El sistema de Kauffman para la clasificación de Enterobacteriaceas difiere taxonómicamente y en su nomenclatura del establecido por Ewing, y en la actualidad este último parece ser el más útil (10).

En el sistema de Ewing (9,11) la familia Enterobacteriaceae se divide primeramente en seis tribus; los géneros, principales subdivisiones de las tribus, se dividen en especies, pero estas a su vez se subdividen, con fines epidemiológicos, en base a métodos serológicos y por la susceptibilidad a bacteriófagos según Bergey (12).

FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE:

TRIBU I	ESCHERICHIEAE	(Bergey, Breed y Murray)
GENERO I	Escherichia	(Castellani y Chalmers)
	1.-Escherichia coli	(Migula, Castellani y Chalmers)
GENERO II	Shigella	
	1.-Shigella dysenteriae	(Shiga, Castellani y Chalmers)
	2.-Shigella flexneri	(Castellani y Chalmers)
	3.-Shigella boydii	(Ewing)
	4.-Shigella sonnei	(Levin y Weldin)
TRIBU II	EDWARDSIELLEAE	(Ewing y Mc Whorter)
GENERO I	Edwardsiella	(Ewing y Mc Whorter)
	1.-Edwardsiella tarda	(Ewing y Mc Whorter)

TRIBU	III	SALMONELLEAE	(Bergey, Breed y Murray)
GENERO	I	Salmonella	(Lignieres)
		1.-Salmonella cholerae-suis	(Smith, Weldin)
		2.-Salmonella typhi	(Schroeter, Warren y Scott)
		3.-Salmonella enteritidis	(Gaertner, Castellani y Chalmers)
GENERO	II	Arizona	(Ewing y Fife)
		1.-Arizona hinshawii	(Ewing y Fife)
GENERO	III	Citrobacter	(Werkman y Gillen)
		1.-Citrobacter freundii	(Braak, Werkman y Gillen)
		2.-Citrobacter diversus	
		3.-Citrobacter amalonaticus	
TRIBU	IV	KLEBSIELLEAE	(Trevisan)
GENERO	I	Klebsiella	(Trevisan)
		1.-Klebsiella pneumoniae	(Schroeter, Trevisan)
		2.-Klebsiella oxytoca	
		3.-Klebsiella ozonae	(Abel, Bergey, Beer y Murray)
		4.-Klebsiella rhinoschleromatis	(Trevisan)
GENERO	II	Enterobacter	(Hormaeche y Edwards)
		1.-Enterobacter cloacae	(Jordan, Hormaeche y Edwards)
		2.-Enterobacter aerogenes	(Krusa, Hormaeche y Edwards)
		3.-Enterobacter agglomerans	
		4.-Enterobacter gergoviae	
		5.-Enterobacter sakasakii	
GENERO	III	Hafnia	
		1.-Hafnia alvei	
GENERO	IV	Serratia	(Bizio)
		1.-Serratia marcescens	(Bizio)

2.- *Serratia liquefaciens*

3.- *Serratia rubicida*

TRIBU V

PROTEACEAE

(Castellani y Castellani)

GENERO I

Morganella

1.- *Morganella morganii*

GENERO II

Proteus

(Hauser)

1.- *Proteus vulgaris*

(Hauser)

2.- *Proteus mirabilis*

(Hauser)

3.- *Proteus myxofaciens*

GENERO III

Providencia

(Ewing)

1.- *Providencia alcalifaciens* (De Salles Gómez, Ewing)

2.- *Providencia rettgeri*

3.- *Providencia stuartii* (Buttiaux et al., Ewing)

TRIBU VI

YERSINIEAE

GENERO I

Yersinia

1.- *Yersinia enterocolitica*

2.- *Yersinia pestis*

3.- *Yersinia pseudotuberculosis*

4.- *Yersinia ruckeri*

CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE:

Son bacilos pequeños gram negativos, que pueden ser móviles merced a sus flagelos peritricos o bien no móviles (atricos), aunque también hay dentro de las especies móviles cepas no móviles; los hay tanto esporulados como no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Los miembros de esta familia también se caracterizan por su crecimiento rápido en medios de cultivo (extracto de carne), pero algunos necesitan requerimientos nutritivos característicos. Desarrollan un metabolismo fermentativo y respiratorio; además de usar la glucosa fer-

mentativamente, utilizan también otros carbohidratos y alcoholes con producción de ácido o bien ácido y gas. Excepto un serotipo de *Shigella*, dan la prueba de catalasa positiva y la oxidasa negativa. Los nitratos son reducidos a nitritos, con excepción de algunas cepas de *Enterobacter agglomerans* y *Yersinia enterocolitica*, el alginato y el pectato no son licuados (9,11-13).

Es de importancia mencionar que no todos los miembros de esta familia son parásitos intestinales, además que no todos son patógenos para sus huéspedes. La patogenicidad no está referida sólo al hombre sino que se presenta en plantas y animales, siendo la causa común de enfermedades y hasta de severas pérdidas económicas en cualquier parte del mundo. Se ha logrado determinar con gran precisión el origen o causa de las epidemias o epizootias mediante la caracterización de las cepas (14).

Desde el punto de vista de su cultivo e identificación, se presenta con frecuencia, desde años atrás, el problema de como aislar miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y de como hacer la diferenciación correcta de los integrantes de los géneros y especies. En los laboratorios de Bacteriología muchos investigadores han propuesto diferentes métodos para detectar la presencia de *Salmonella*, de un caso activo de shigelosis o de una gastroenteritis causada por un serotipo de *Escherichia coli* u otros agentes (no de la familia *Enterobacteriaceae*) involucrados recientemente en este tipo de enfermedad (15). Es muy importante mencionar las condiciones de los especímenes y la manipulación de los mismos, ya que en una disentería bacilar los especímenes fecales deberan sembrarse en medios adecuados y medios de enriquecimiento inmediatamente después de su recolección (9).

Tan Broeck y Norburg en 1916 y Floyd en 1954, sugirieron y demostraron el valor que tiene repetir cultivos de especímenes múltiples; los laxantes contribuyen al aumento en el aislamiento de patógenos como *Salmonella typhi* y *Vibrio*

cholerae. Se considera que el estado agudo de la enfermedad es el momento más adecuado para efectuar el cultivo, ya que los agentes etiológicos se encuentran en gran número; de no ser así se corre el riesgo de no aislarlos (9).

Cuando no se cultivan las muestras de inmediato, se colocan en soluciones de transporte con el objeto de mantener una población bacteriana constante. Las más comúnmente usadas son: a) solución salina-glicerol amortiguada a pH 7.4 (descrita por Feague y Clarman en 1946 y modificada por Sachs en 1939), b) medio semisólido de Stuart con agar y amortiguador, c) medio de transporte Cary y Blair que contiene tioglicolato de sodio, amortiguador y agar; este medio ha sido modificado por varios autores (9).

Se han utilizado soluciones preservativas que, en comparación con las antes mencionadas, duplicaron el número de aislamientos de Shigella y Salmonella. Hajna (1955), haciendo uso de la sal sódica del ácido etilendiamino-tetracético (EDTA), logró también la preservación de coliformes. Por otra parte, Ewing y col. (9) en 1965 llevaron a cabo una serie de estudios comparativos sobre la efectividad de estos dos medios de transporte: Solución salina-glicerol amortiguada a pH 7.4 y solución salina glicerol-EDTA. Es bien sabido que para el cultivo de Enterobacteriaceas se ha recomendado el empleo de medios de aislamiento, selectivos o no, y de enriquecimiento.

El método utilizado generalmente en investigación (porque en cultivos de rutina se ignora el germen que se va a aislar) para el cultivo de diversas especies de salmonelas, consiste en emplear el medio de enriquecimiento verde brillante-tetracionato, aunque no es conveniente cuando se trata de Salmonella typhi, Salmonella cholerae-suis y Salmonella enteritidis bioserotipo paratyphi A. A continuación se mencionarán los medios de enriquecimiento ampliamente usados y recomendados para uso general. De acuerdo a Edwards y Ewing (9) los más comunes son:

- 1.- Caldo tetracionato de Mueller y caldo selenito F de Leifson.
- 2.- Caldo tetracionato bilis-verde-brillante (modificado del primer medio por Kauffman en 1930). Este último, al igual que el de Leifson, ha sido formulado para el enriquecimiento de *Salmonella* y no para *Shigella*. Sin embargo, -- existe uno ligeramente modificado para el aislamiento de *Shigella sonnei*. -- No obstante, algunos investigadores han encontrado que ambos, selenito y tetracionato, son tóxicos para *Salmonella cholerae-suis* y *Salmonella enteritidis ser abortus-ovis*; el tetracionato verde-brillante inhibe *Salmonella enteritidis bioserotipo paratyphi A*.
- 3.- Para el aislamiento de *Salmonella* se ha utilizado el medio de selenito adicionado de materia fecal estéril o extracto de millorganito, sobre todo -- cuando se sospecha que la muestra contiene una pequeña cantidad de *Salmonella* (portadores).
- 4.- Medio de caldo GN (Hajna), que además de usarse como medio preservativo, se ha utilizado como medio de enriquecimiento en muestras tratadas con EDTA.
- 5.- El medio de verde malaquita-cloruro de magnesio de Rappaport, ha mostrado mejores resultados en comparación con los obtenidos con selenito y tetracionato.
- 6.- Caldo nutritivo ordinario útil para *Salmonella* y *Shigella* (6).

Conforme a la propiedad de las enterobacterias de fermentar o no la lactosa han sido formulados medios selectivos que permiten diferenciar a los miembros de esta familia. Desde 1886 se reportó que *Escherichia coli* fermentaba la lactosa mientras que el bacilo de la tifoidea no lo hacía. En base a esto Wurtz desarrolló medios de cultivo con lactosa y un indicador como el tornasol. En 1925 Wilson y Blair utilizaron agar sulfito de bismuto con el objeto de diferenciar los patógenos lactosa negativa. A partir de esa fecha se han formulado medios -- que puedan ser divididos según su selectividad en:

- 1.- Medios diferenciales no inhibitorios: agar lactosa-azúl de bromotimol (BTB-L) y agar lactosa-rojo de fenol (PRL).
- 2.- Medios diferenciales con poca selectividad: agar Mc Conkey (Mac C), eosina azúl de metileno (EMB) y agar desoxicolato (LD).
- 3.- Medios diferenciales moderadamente selectivos: agar SS (Salmonella-Shigella), citrato-desoxicolato (DC), agar Entero-Hekton (HE) y agar XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato).
- 4.- Medios altamente selectivos ; incluye agar sulfito de bismuto (Wilson-Blair) y agar verde brillante.

De ahí que al observar la validéz de los requerimientos indispensables en el cultivo de los especímenes e igualmente tomando en cuenta las dificultades que se presentan desde la siembra de los productos hasta la identificación de los organismos presentes, se ha establecido el procedimiento del cultivo de los mismos teniendo especial cuidado para la búsqueda de patógenos en los diferentes medios de cultivo.

En las pruebas en placa, tanto de siembras directas como de medios de enriquecimiento inoculados con heces, se buscan primeramente los bacilos entéricos-patógenos como son Salmonella, Shigella y Escherichia coli; aún cuando estos organismos producen generalmente colonias típicas, a veces no sucede así debido al crecimiento con otros microorganismos que alteran la morfología original, por lo cual es aconsejable seleccionar por lo menos dos colonias con características morfológicas diferentes o fermentadoras de lactosa. Al picar las colonias debe tenerse la precaución de no tocar otras presentes en los medios selectivos.

Con las colonias seleccionadas se procede a la diferenciación primaria, para lo cual las bacterias deben ser inoculadas a diferentes medios de cultivo para investigar:

- 1.- Formación de ácido sulfhídrico.

- 2.- Producción de indol a partir de triptofano.
- 3.- Prueba de motilidad.
- 4.- Presencia de catalasa y oxidasa.
- 5.- Capacidad para utilizar malonato de sodio como fuente de carbono.
- 6.- Presencia de ureasa.
- 7.- Prueba de fenil-alanina-deaminasa.
- 8.- Capacidad para utilizar citrato como única fuente de carbono.
- 9.- Producción de acetil-metil-carbinol (prueba de Voges-Proskauer).
- 10.- Liberación de ácido como producto final de la fermentación de glucosa (prueba del rojo de metilo).
- 11.- Reducción de nitratos a nitritos.
- 12.- Capacidad de crecimiento en presencia de KCN.
- 13.- Presencia de enzimas proteolíticas (prueba de gelatina).
- 14.- Decarboxilación de lisina, ornitina y arginina.
- 15.- Fermentación de carbohidratos: glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, xilosa, trehalosa. empleando un medio basal que indica la producción de ácido o ácido y gas (9-13). Estas reacciones bioquímicas han permitido la diferenciación de los géneros y especies de las Enterobacteriaceas. Sin embargo, en - muchos casos no es necesario realizar todas las pruebas antes mencionadas.

GENERO SALMONELLA.- Este género, según Kauffman, se subdivide en cuatro subgéneros que son: Subgénero I, II, III y IV. Cada uno es identificado en base a pequeñas diferencias bioquímicas (10, 12).

El subgénero I comprende la mayoría de las especies consideradas como tipo;- los subgéneros II y IV agrupan aquellas que se diferencian en ciertas pruebas - bioquímicas; el subgénero III comprende las especies de Salmonelas que por razones históricas son generalmente colocadas en el grupo Arizona, esto es, aquellas que se alejan de las condiciones bioquímicas establecidas para ser consideradas.

radas como *Salmonella*.

Las reglas usuales de nomenclatura no fueron utilizadas para dar nombres a las salmonelas. Debido a su papel patógeno, las primeras salmonelas fueron nombradas conforme a la especie animal de la cual fueron aisladas, o la enfermedad que producían (*Salmonella abortus-ovis*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* etc.). Más tarde se les dió el nombre del pueblo región o país donde se aisló la primera cepa (*Salmonella london*, *Salmonella panama* etc.) (10, 12).

Ninguno de los presentes sistemas de nomenclatura para salmonelas es satisfactorio desde el punto de vista científico. Sin embargo, se han subdividido en serotipos según el esquema de Kauffman-White; estos serotipos se subdividen a su vez en biotipos conforme a patrones de fermentación de azúcares como son: -- arabinosa, dulcitol, inositol, ramnosa, trealosa, xilosa etc., presentes en cepas del mismo serotipo o también mediante la sensibilidad a bacteriosinas o resistencia a los antiobióticos y resistencia a los factores de transferencia (10-12).

Actualmente se reconocen únicamente tres especies en el género *Salmonella*: -- *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*. Esta última ha recibido ese nombre debido a que el trabajo más antiguo, publicado en 1888, la designa como tal. El nombre de *Salmonella enteritidis* no puede ser utilizado solo, ya que se conocen mas de mil cuatrocientos serotipos y bioserotipos dentro de la misma especie; así, tenemos que *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi A*, se designan como *Salmonella enteritidis ser typhimurium* y *Salmonella enteritidis bioserotipo paratyphi A* respectivamente, debiendose tener cuidado en todos los casos de describir a la especie con su nombre completo.

Se considera que un microorganismo pertenece al género *Salmonella* si presenta las siguientes características: a) Producción abundante de H₂S, con muy poca

excepción; b) Movilidad; c) No producen indol en presencia de triptofano; d) No produce la enzima ureasa ni enzimas proteolíticas; e) No utilizan malonato de sodio como fuente de carbono; f) es incapaz de crecer en medio con KCN; g) Descarboxila la lisina, ornitina y arginina; h) fermenta el dulcitol y el inositol (algunas cepas no lo fermentan); i) No fermenta azúcares como lactosa, sacarosa, salicina, rafinosa y adonitol; j) La reacción del rojo de metilo es positiva; k) La prueba de Voges-Proskauer es negativa; l) No produce fenil-alanina--daminasa; m) Produce gas en la fermentación de carbohidratos (glucosa, manitol, trealosa, xilosa etc.) con pocas excepciones; n) No hidroliza la esculina o) No producen Beta-galactosidasa (prueba de orto-nitro-fenil-galactopiranosido= ONPG) en caso de Salmonelas lactosa negativa ya que Salmonelas lactosa positiva sí producen la enzima Beta-galactosidasa; p) Usa algunos ácidos orgánicos como fuente de carbono (citrato, D-tartrato y mucato); q) Es capaz de reducir los nitratos a nitritos; r) No produce oxidasa.

Los medios de ácidos orgánicos de Kauffman y Petersen, la prueba de ONPG y la prueba de KCN, proporcionan datos de valor en la diferenciación de cultivos de Salmonella, Arizona y Citrobacter.

Dada la considerable cantidad de microorganismos que pertenecen al género -- Salmonella, no es posible clasificarlos conforme a bases morfológicas y bioquímicas exclusivamente, sino que es necesario para su mejor identificación considerar las variaciones antigénicas, lográndose así la clasificación serológica de las salmonelas. Esta clasificación tipifica las especies según sus antígenos somáticos (O), sus antígenos flagelares (H), según la fase en que se encuentran y el antígeno Vi o de virulencia.

Los diferentes antígenos somáticos han sido designados mediante números arábigos que van del uno al sesenta y cuatro, excluyendo los números 29, 31, 32, -- 33, 49, 52 y 63 por compartir esos antígenos con miembros del género Escheri---

chia y Arizona:

Los antígenos H de Salmonella pueden ser específicos y no específicos. Los específicos (fase 1) se designan con letras del alfabeto de la "a" a la "z", - excepto la "j" por ser una fase inducida de Salmonella typhi. Sin embargo en - ocasiones se utilizan letras seguidas de un subíndice para indicar antígenos - diferentes (z₁, z₂, z₃.....z₅₉); los antígenos de la fase 2 se de-- signan con números arábigos del 1 al 12. Los antígenos 3, 4 y 8 al 12 no son - expresados en el esquema antigénico.

El serogrupo de Salmonella está definido por antígenos o grupos de antígenos somáticos, por ejemplo: El serogrupo A comprende antígenos somáticos 1,2, 12; el serogrupo B, los antígenos somáticos 1,4,5,12 y 27.

La existencia de cepas de Salmonella que tienen la capacidad de fermentar la lactosa es conocida desde hace tiempo, como lo señala Kauffman para Salmonella anatum, Salmonella newington, Salmonella paratyphi B y Salmonella typhimurium (4,5). Recientemente se han reportado en humanos las especies Salmonella-tennessee, Salmonella newport, Salmonella tuebingen, S. typhi, S. softenberq, S. oranienburg; en terneras, S. typhimurium y, en pavos S. indiana (5).

Falcow y Baron (17) publicaron en 1963 el hallazgo de cepas de Salmonella-typhi con la propiedad de utilizar la lactosa y con la capacidad de poder --- transmitir esta propiedad, por el fenómeno genético de conjugación, a diversas especies de la familia Enterobacteriaceae.

Posteriormente, estos investigadores identificaron un elemento extracromosómico causante de esta característica lactosa positiva, y lo denominaron "Plásmido". Este elemento, designado como Fo-lac, se transmite como parte integral de un factor sexual extracromosómico.

En algunos aspectos dicho elemento es similar al factor F-lac que se encuentra en Escherichia coli K12; sin embargo aquel es incapaz de promover la transferencia de genes del cromosoma del huésped.

Las cepas que poseen este elemento presentan sensibilidad al fago específico masculino y además sintetizan pili sexual necesario para llevar a cabo la transferencia de caracteres; este factor del sexo no es lisado por el fago F-isométrico (8,15,17).

Esta propiedad lactosa positiva no está limitada a las especies anteriormente mencionadas, puesto que observaciones hechas en especies de Proteus, Klebsiella, Serratia, Shigella y Vibrio demostraron la presencia de un elemento infeccioso asociado al carácter lactosa, que en el caso de Proteus es designado como P-lac por sus semejanzas con F-lac y Fo-lac; al plásmido que aumenta la actividad de la Beta-galactosidasa de la Klebsiella es FK-lac (4,5,6,15).

A raíz de estos estudios surgieron nuevas investigaciones y descubrimientos de infecciones causadas por especies del género Salmonella fermentadoras de lactosa, así como de otras enterobacterias lactosa positiva atípicas (5).

En 1955, Kunz y Ewing reportaron un caso de infección en un empleado de laboratorio, cuyas manifestaciones clínicas semejaban las típicas reacciones de la fiebre tifoidea. De la sangre y de la orina se aisló un bacilo gram negativo con la capacidad de fermentar la lactosa; haciendo uso de pruebas bioquímicas y mediante el empleo de antisueros frente a Salmonella se concluyó que se trataba de Salmonella typhi lactosa positiva (1). Esta cepa provenía del mismo laboratorio, como resultado de un experimento de conjugación o apareamiento de una cepa de Salmonella typhi con otra de la misma especie, aislada de la naturaleza pero con la peculiaridad de fermentar la lactosa. La sensibilidad a los fagos específicos demostró que la cepa aislada era susceptible al fago D6 ligeramente degradado, al igual que la usada en el experimento original. En el mismo año Bulmash y col. reportaron la misma observación (fermentación de la lactosa) en una cepa de Salmonella tennessee, que tenía la particularidad de que en cultivos subsecuentes presentaba la característica de dos tipos de colonias esto es fermentadores rápidos y fermentadores lentos de lactosa (2).

González reportó en 1965 una cepa de Salmonella tennessee lactosa positiva, aislada de hemocultivo y de útero y que había sido considerada como Citrobacter freundii, al llevarse a cabo estudios bioquímicos se observaron diferencias en la presencia de lisina-descarboxilasa (Citrobacter freundii es lisina descarboxilasa negativa, mientras que Salmonella es positiva), y además la cepa aglutinaba con suero específico para antígeno somático del grupo C (3).

Easterling y colaboradores (4) en 1969 aislaron de material clínico siete cepas de Salmonella lactosa positiva, y encontraron que seis de ellas podían transferir el carácter de fermentar la lactosa por conjugación a Salmonella --

typhi WA4204; además observaron que esta última podía transferir a su vez dicho carácter a Salmonella typhimurium WR500, a Proteus mirabilis y a algunas cepas de Escherichia coli K12. Aunque en baja frecuencia, Salmonella typhimurium fué capaz de promover la transferencia de genes cromosómicos a Salmonella typhi WA4204. Esto comprobó que el carácter lactosa positiva era transmitido como parte integral de un factor sexual extracromosómico (18,19). Estos factores extracromosómicos pueden o no integrarse al cromosoma bacteriano.

De 1971 a 1973 en Sao Pablo Brasil, se presentó una epidemia de gastroenteritis causada por cepas de Salmonella typhimurium y Salmonella oranienburg lactosa positiva, Le Minor (5) aisló tales cepas de evacuaciones, orina y L.C.R. de lactantes y escolares. Las pruebas bioquímicas resultaron ser semejantes a las de Citrobacter freundii o sea fermentación de glucosa y lactosa además de producción de ácido sulfhídrico y gas. El estudio bioquímico más amplio y completo demostró que las cepas aisladas correspondían a salmonelas fermentadoras de lactosa.

Visto el posible error que se puede cometer al hacer un diagnóstico bacteriológico equivocado, algunos autores recomiendan el uso de medios especiales y pruebas bioquímicas completas para todas las bacterias encontradas, tanto lactosa negativa como lactosa positiva con el objeto de encontrar cepas patógenas con características diferentes a las usuales, especialmente durante las epidemias (3,5).

Mediante el estudio epidemiológico de casos ocurridos en un mismo hospital durante el período de diciembre de 1972 a febrero de 1973, en los que se aisló Salmonella typhimurium y Salmonella oranienburg en el mismo coprocultivo de tres pacientes, Le Minor y colaboradores reportaron que la variabilidad en la capacidad para fermentar la lactosa quizá sucede "in vivo" mas frecuentemente que "in vitro", y que el carácter atípico no es transferido espontáneamente

por conjugación; la transferencia se realiza si dicho carácter está unido a un plásmido que confiere resistencia a la kanamicina y producción de colicinas -- tipo Ib (Km-col Ib), (20-22).

Una exhaustiva revisión de la literatura no reporta casos de *Salmonella* lactosa positiva, sino hasta 1976 en que fueron encontrados en 47,546 cultivos, -- sólo dos lactosa positiva correspondiente a *Salmonella senftenberg* y *Salmonella bokjara*. En 1977, *Salmonella indiana* lactosa positiva fué obtenida de víceras de pavos, aislándose también durante todo el año de 1976. Experimentos posteriores demostraron un carácter no transferible (6). Forschen en California -- obtuvo de un caso de septicemia utilizando lisina-hierro-agar y sulfito de bismuto agar, una cepa de *Salmonella enteritidis* serotipo typhimurium variedad -- copenhagen de un caso de septicemia y endarteritis, probablemente adquirida durante su estancia del paciente en Brasil (24).

Anand en un artículo más reciente señala el aislamiento de este tipo de microorganismos como raros y muy esporádicos aunque responsables de brotes de -- gastroenteritis en instituciones como el de Alberta-Canadá, recomendando estos mismos autores para su detección, el empleo de medios selectivos que no contengan lactosa o que no pongan de manifiesto la fermentación de este azúcar, -- transferible por conjugación (23). Recientemente en Sambia se presentó un brote en el comedor de la escuela de enfermería por *Salmonella tuebingen* lactosa positiva, señalando la importancia de utilizar el medio de lisina-hierro-agar, como es sugerido por Anand, que no contiene lactosa (7).

La comprobación de que el factor extracromosómico responsable de la fermentación de lactosa (6,22), tiene naturaleza de ácido nucléico, fué llevado a cabo por Sinenki y col (18), quienes determinaron el peso molecular de la molécula de ADN proveniente de las diferentes salmonelas aisladas por Easterling.

El análisis realizado permitió conocer la concentración de guanina y citosina

en el ADN circular del elemento responsable de la fermentación de la lactosa. - Experimentos efectuados con ADN marcado con tritio, demostraron un número de cópias del factor lactosa positiva por cromosoma, entre 1.4 y 3.7 dependiendo de la bacteria en que se encontraba. El hecho de que ninguno de los seis elementos lactosa positiva fueran sensibles al fago masculino R-17 o al femenino II, sugiere que estos plásmidos son diferentes a los factores F y que pertenecen probablemente a la misma clase que los factores sexuales. No obstante, esto sólo podrá ser demostrado mediante un estudio sobre la homología de la secuencia de los nucleótidos en el ADN de los diferentes elementos lactosa positiva.

En 1950 fué descrito el fenómeno genético del apareamiento bacteriano y se interpretó en un principio como indicador de sexualidad entre bacterias no pudiendo en ese entonces ser explicado, posteriormente empezaron a aparecer en la literatura fenómenos como la transformación y transducción bacterianas y no pasó mucho tiempo para que por medio de experimentos de recombinación genética se conociera la conjugación bacteriana, la cual consiste en que el material genético se transfiere unilateralmente de una bacteria donadora a otra receptora. El material genético transferible se denominó factor del sexo o factor de fertilidad "F" que confiere a la bacteria el papel de donador y se transmite independientemente de los genes del cromosoma.

La fertilidad de las bacterias fué estudiada primeramente por Lederberg (15) en Wisconsin y por Hayes (25) en Inglaterra. En base a observaciones de recombinación, las bacterias fueron clasificadas como "F+" las que poseen el factor de fertilidad y como "F-" las que no pueden producir recombinantes por ausencia del factor.

La fertilidad es una propiedad hereditaria de la cepa. La diferencia genética entre cepas "F-" y F+ puede ser analizada genéticamente por medio de entrecruzamientos; así, se tiene que: 1.- Todos los recombinantes de F+ y F- son F+; 2.-

La fertilidad es infecciosa, esto es, cuando cepas F+ y F- son mezcladas, las células F- se convierten en F+ 3.- El tratamiento con acridina, iones de cobalto, rayos X, convierten algunas bacterias F+ en F- irreversiblemente. Así pues las diferencias entre células F+ y F- son determinadas por el factor F presente en cepas F+ y no en F-.

Esta transferencia de información genética sólo se efectuaba por medio de contacto o acoplamiento físico entre donador y receptor. En un principio se pensó que esta unión era debida a una fusión, pero estudios de microscopía con contraste de fases y cultivos en caldo y agar permitieron dilucidar que no se trataba de tal fusión.

Las bacterias con factor sexual F+ poseen un nuevo antígeno llamado Pili - que parece ser indispensable para que se lleve a cabo la transmisión de material genético. Se observan además, apéndices diferentes de los flagelos denominándoseles de acuerdo a la función que desempeñen. Así, los que intervienen en el fenómeno genético de la conjugación recibieron el nombre de pelo sexual mientras que al resto que no interviene en este proceso se las llamó pelos comunes o Fimbrias (15,17,22,25).

Los pelos sexuales se distinguen de acuerdo a su morfología, estructura antigénica y habilidad para adsorber fagos específicos isométricos; son más cortos y pequeños, su longitud depende de la cepa que los posee y de las condiciones de cultivo. Su número, además de ser limitado, varía en cada célula. La composición química de los pelos sexuales parece ser que está constituida preferentemente por proteínas, con algunos lípidos y no encontrándose polisacáridos.

La cantidad presente en cada bacteria está estrechamente correlacionada con habilidad donadora en la conjugación. Queda así establecida la importancia del pelo en esta forma de recombinación. La conjugación puede ser inhibi-

da por medio de anticuerpos específicos a las proteínas del pelo sexual o por la adsorción de fagos isométricos. Cada factor tiene un pelo sexual específico; por todo lo anterior el pelo sexual es esencial para la conjugación pero se desconoce cual es su función precisa.

La unión entre pares de células ha sido demostrada con microscopía de luz y electrónica. El hallazgo de células F- que nunca han entrado en contacto directo con donadores durante todo el periodo de cruzamiento, apoya la idea de que el pelo sexual sea el único canal necesario para la donación del ADN, aunque este no ha sido encontrado dentro del mismo.

El pili F o pelo sexual tiene una estructura similar a la cola del fago es to es, un tubo hueco de 20-25 Å de diámetro, el cual está debidamente adaptado para conducir el ADN. Si ese conducto se pierda, ya sea por corte mecánico o por envejecimiento del cultivo, la habilidad donadora desaparece.

Jacob y colaboradores (17) dieron el nombre de "Episomas" a la estructura genética que pasa de una bacteria donadora a otra receptora formando o no parte del cromosoma bacteriano, esto es, en estado integrado o bien presente en el citoplasma como estado autónomo. Se designan como "Episomas" a: 1) bacteriófagos temperantes, 2) factor del sexo, 3) factores colicinogénicos y 4) factor de transferencia de resistencia múltiple. Estos elementos genéticos adquiridos por conjugación o transducción, son considerados no esenciales y por lo tanto pueden estar ausentes de la célula (17,25-26). A estas unidades genéticas se les han descrito las siguientes características: A) cuando están ausentes, el episoma sólo podrá adquirirse de una fuente externa, B) si están presentes, los elementos episómicos se encuentran en un estado autónomo o integrado, C) el comportamiento de un episoma en estado autónomo y las características fenotípicas del mismo se atribuyen específicamente a dicho episoma, D) cuando están en estado integrado, los episomas se encuentran colocados en

el cromosoma bacteriano pero no forman parte de su estructura, E) los episomas pueden alterar el estado integrado y autónomo, F) los estados autónomo e integrado parecen, en general, ser naturalmente excluyentes, G) el episoma en estado integrado puede unirse genéticamente con segmentos cromosomales de la bacteria.

Lederberg describe el término "Plásmido" como estructuras extranucleares capaces de producirse independientemente del cromosoma. Los plásmidos intervienen en la transferencia de una variedad de determinantes genéticos como el factor de resistencia a los antibióticos, la síntesis de hemoglobina y de enterotoxinas, la colicinogenia, la tolerancia a metales pesados, la resistencia a los rayos ultravioleta. Estos plásmidos, importantes en medicina como en agricultura, también pueden proporcionar un beneficio, ya que capacitan a especies de *Rhizobium* para fijar nitrógeno en los nódulos de las plantas leguminosas -- (25,5,19).

Estudios sobre episomas bacterianos demostraron que poseen propiedades genéticas comunes: Transferencia por medio de la conjugación cromosómica del huésped, replicación y transferibilidad sexual, las cuales permiten diferenciar un episoma de un bacteriófago, ya que estos tienen propiedades infectivas o de virulencia en el huésped. Algunos determinantes de colicinogenia (aquellos para colicinas E_1 y E_2), así como algunos plásmidos de *Staphylococcus*, proceden de una forma anormal de herencia extranuclear, como los plásmidos R intransferibles (no tienen poder de transmisibilidad independiente y son diferentes de los episomas). Aunque no son infecciosos por ellos mismos, se pueden transferir independientemente en presencia de factores de transferencia como R, F y determinantes colicina (col Ib). (21) Hayes (25) opina que esos factores y los plásmidos de *Staphylococcus* pertenecen a la misma categoría general independientemente de su forma de expresión o de transmisibilidad. En base a esto pro

pone el término "Plásmido" en vez de "Episoma".

Mitsuhashi (20) diferencia ambos términos diciendo que los plásmidos no tienen habilidad para transmisión independiente, por lo tanto es un elemento extracromosómico que no se transfiere por conjugación. Los episomas favorecen a los microorganismos aumentando su capacidad para poder sobrevivir a las circunstancias adversas del medio. Esas variaciones genéticas se ponen de manifiesto en la bacteria misma, aunque esto no ha sido aceptado.

Los episomas mejor estudiados son los de las Enterobacterias, haciendo referencia específicamente el género *Salmonella*, las cuales poseen características bioquímicas y mecanismos de defensa diferentes a las de las bacterias habituales.

Entre los diferentes episomas o plásmidos aislados de las bacterias, cabe señalar su importancia al que confiere la resistencia a los antibióticos. Desde 1955 en Japón se observó en cepas de *Shigella* un incremento en la resistencia bacteriana hacia diferentes antimicrobianos. Akiba en 1959 explicó esta múltiple resistencia diciendo que el factor que la confiere puede ser transferido de *Escherichia coli* intestinal a *Shigella* por el fenómeno de conjugación (30).

Anderson y Datta (31) en 1955 estudiaron el paso de agentes R de *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* K12 y viceversa. Experimentos de conjugación con cepas donadoras resistentes a ampicilina, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas indicaron la transferencia de este factor R a cepas receptoras, sin que su presencia interfiera con la expresión de algún agente F. Los estudios de transferencia de caracteres de resistencia a estreptomycin, ampicilina y tetraciclina demostraron no solamente dependencia en las diferentes determinantes sino también en los factores de transferencia, dependiendo del periodo de contacto entre donador y receptor.

Actualmente los plásmidos constituyen un elemento indispensable en la investigación en genética microbiana, ya que es posible añadir o eliminar segmentos de ADN mediante el empleo de enzimas restrictivas y otros procedimientos.

Se sabe, además, que las bacterias estudiadas contienen comúnmente dos o más diferentes plásmidos, los cuales pueden coexistir o no en una sola bacteria, recibiendo el nombre de compatibles e incompatibles respectivamente. Si observamos, son varios los criterios que se pueden seguir para hacer un estudio muy amplio con lo que respecta a estos elementos extracromosómicos (32).

CAPITULO II
MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron como material de estudio 52 cepas obtenidas de 1547 coprocultivos, aislados durante los meses de julio a octubre de 1975, los cuales correspondieron a 26 pacientes que tenían el mismo germen desde el punto de vista serológico, glucosa positiva, ácido sulfhídrico positivo e indol negativo presentando la característica de fermentar o no la lactosa, designándose como Salmonella lactosa negativa y Salmonella lactosa positiva.

EQUIPO UTILIZADO:

- Microscopio Carl Zeiss Mod. 4752147
- Microscopio estereoscópico Carl Zeiss Mod. 4773074
- Balanza analítica Kern
- Potenciómetro Corning Mod. 7
- Agitador Vortex
- Centrífuga Optima II para 7000 RPM
- Congelador Nieto a -25°C
- Horno a 200°C
- Autoclave a 121°C
- Incubadora a 37°C
- Baño de agua a 50°C
- Material de vidrio y diverso.

METODOLOGIA

Las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron estudiadas bioquímica y serológicamente. Desde el punto de vista bioquímico fueron sometidas a la investigación de: Producción de fenil-alanina-deaminasa; producción de enzimas como ureasa, catalasa, oxidasa, beta-galactosidasa y enzimas proteolíticas; utilización de malonato de sodio como fuente de carbono; formación de acetil-metil-carbinol y ácido a partir de caldo peptonado; reducción de nitratos a nitritos, capacidad de crecimiento en presencia de cianuro de potasio; uso de sales de algunos ácidos orgánicos como tartrato, citrato y mucato; decarboxilación de los aminoácidos lisina, ornitina y arginina; fermentación de glicerol y de azúcares como glucosa, lactosa, sorbitol, dulcitol, manitol, salicina, sucrosa, inositol arabinosa, ramnosa, trealosa, xilosa, maltosa, adonitol y rafinosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, todas aquellas colonias sospechosas de características de Salmonella fueron sometidas al procedimiento de la confirmación serológica de este género. La serología se hizo según lo establecido por Ewing, determinando los antígenos somáticos y flagelares de todas las cepas (9, 11).

Una vez realizado el estudio bioquímico y serológico las cepas fueron analizadas según su susceptibilidad o resistencia a diferentes antibióticos.

INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS:

Prueba de fenil-alanina-deaminasa: El medio se sembró por estría, después de la incubación se agregó cloruro férrico al 10%; cuando la prueba es positiva se observa un color verde en la superficie.

Prueba de ureasa: Este medio se sembró también por estría; esta enzima se manifiesta por el vire del medio a un color rosa mexicano.

Prueba de Voges-Proskauer: El caldo de Clark y Lubs se sembró e incubó por 48 horas. A una porción del cultivo se le adicionan 12 gotas de alfa-naftol y 3 cc

cas de KOH al 40%. La formación de un anillo rojo en un lapso de 10 a 20 minutos, se debe a la formación de acetil-metil-carbinol, considerándose así como prueba positiva.

Prueba del rojo de metilo: Al resto del cultivo anterior se le agregan 4 o 5 gotas de solución de rojo de metilo. En una reacción positiva se observa un color rojo, en tanto que un color amarillo constituye la prueba negativa.

Prueba de malonato, tartrato y citrato de Simmons: Permitieron conocer si la cepa estudiada utiliza estos medios como única fuente de carbono, mediante el virre de los mismos a un color azul.

Prueba de nitratos: La reducción de nitratos a nitritos, después de 24 horas de inoculado el medio, se puso de manifiesto por la adición de los reactivos A y B en proporción 1:1, formándose un color rojo marrón.

Prueba de cianuro de potasio: Después de 24 horas de incubación se observa la capacidad de crecimiento por la presencia de turbidez.

Prueba de gelatina nutritiva: Este medio se sembró por picadura; la licuefacción después de 10 a 15 días fué considerada como positiva indicando la producción de enzimas proteolíticas.

Prueba de catalasa: Sobre un portaobjetos se coloca una pequeña cantidad de inóculo y una gota de agua oxigenada al 3%, el desprendimiento de burbujas manifiesta la presencia de esta enzima.

Prueba de la oxidasa: Para detectar esta enzima, se coloca una pequeña cantidad de inóculo sobre la superficie del disco taxo N. Cuando la enzima está presente el reactivo del disco (dimetil-p-fenilén-diamina) forma un compuesto colorido, el indofenol, de color morado o negro.

Prueba de la descarboxilasa y dehidrolasa: Se inoculan los medios que contienen los aminoácidos lisina, ornitina y arginina, cada uno por separado, se sellan con aceña mineral (nujol) estéril. A las 96 horas de incubación, si el medio -

presenta un color morado en base a un testigo, la enzima está presente.

Prueba de la Beta-galactosidasa: Se colocan 5 gotas de solución salina estéril en tubos igualmente estériles, se inoculan y agregan 3 gotas de tolueno agitando perfectamente; finalmente se agregan 5 gotas de ONPG e incuban a baño maría a 37°C durante 24 horas. Si hay coloración amarilla en base a un testigo positivo y un negativo, indica prueba positiva para la enzima.

Prueba de fermentación de azúcares: El medio base con el azúcar correspondiente y su tubo de Durham, se inocula e incuba durante 24 horas; si el indicador contenido (indicador de Andrade) vira a un color uva, la fermentación del azúcar es positiva, y el gas puede observarse en la campana de Durham.

Prueba de sensibilidad:

Para la prueba de sensibilidad a los antibióticos se empleó el método de dilución en placa de agar (33). Los antimicrobianos usados para esta prueba fueron: Estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, ampicilina, Kanamicina y clo-ranfenicol. Se prepararon soluciones estandar de cada antibiótico en concentraciones de 1000 microgramos/ml de acuerdo con los solventes para cada uno de ellos.

Se prepararon diluciones de los antimicrobianos con objeto de tener concentraciones variables que van desde 2000 microgramos por mililitro hasta 1.9 microgramos por mililitro. A la serie de tubos con 18 ml de agar Mueller-Hinton se les agregó 2 ml de la dilución del antibiótico correspondiente, para un total de 20 ml; se mezclan perfectamente y se vierte en las cajas petri estériles, obteniéndose las concentraciones adecuadas; así, en las placas para clo-ranfenicol, estreptomicina y tetraciclina fueron desde 100 microgramos/ml hasta 0.19 microgramos/ml con diluciones al doble (50, 25, 12 etc.); para ampicilina, gentamicina y kanamicina las placas contenían concentraciones de 50 microgramos por mililitro hasta 0.09 microgramos/ml también con dilución al do-

ble. Una vez preparadas las placas, se cuadrícularon y etiquetaron las bases de las mismas, numerándose cada uno de los cuadros en los que se inculó diferente cepa de Salmonella.

El cultivo de las cepas utilizadas fué hecho en caldo de Mueller-Hinton e incubado a 37°C durante 18 horas. De este cultivo se hizo una suspensión bacteriana con el mismo caldo para tener una dilución 1:10 y se incubó a 37°C por 3 horas. Las placas de los diferentes antibióticos y sus diluciones se inocularon con hisopos estériles sumergidos en el cultivo de 3 horas, se incubaron a 37°C por 24 horas.

La resistencia o sensibilidad se interpretó en base al crecimiento o falta de él. La menor dilución en el cual se observó crecimiento fué considerada como concentración mínima inhibitoria.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS:

Las cepas con características bioquímicas de producción de ácido sulfhídrico, y no producción de indol, ureasa, fenil-alanina deaminasa, que posiblemente fueran *Salmonella lactosa* positiva y *lactosa* negativa, se obtuvieron de 26 coprocultivos de los 420 en que fué reportada *Salmonella* sp. El total de coprocultivos recibidos en el laboratorio de Bacteriología durante el lapso mencionado, fué de 1547; el número es pequeño ya que únicamente en estos 26 fué donde se encontró las dos variedades de posible *Salmonella* en el mismo coprocultivo. Los resultados de las diferentes pruebas bioquímicas efectuadas se observan en el cuadro número 1, tanto para posible *Salmonella lactosa* positiva como *lactosa* negativa, donde se comparan dichos resultados con los obtenidos por Edwards y Ewing en un estudio de 371 cultivos, correspondientes a las tres especies de *Salmonella*: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi* y *Salmonella cholerae-suis*. Aunque se presentan variaciones en algunos de ellos, son satisfactorios, ya que previamente se hicieron las pruebas serológicas de los pares de *Salmonella* siendo esta bastante confiable, se obtuvieron: 34 cepas que aglutinaron con el suero antigropo B, 17 *lactosa* positiva y 17 *lactosa* negativa; 10 con suero antigropo C₁, 5 *lactosa* positiva y 5 *lactosa* negativa; con el antigropo C₂ aglutinaron 4, 2 *lactosa* positiva y 2 *lactosa* negativa. Finalmente, con el grupo anti E dieron 4, 2 *lactosa* positiva y 2 *lactosa* negativa. Estos datos se observan en el cuadro número 2.

En base al análisis hecho por Kauffman según el comportamiento frente a ciertos azúcares, utilización de ácidos orgánicos y licuefacción de gelatina, el cuadro número 3 muestra los resultados obtenidos con las cepas que aglutinaron con el grupo B comparados con los encontrados por Kauffman para diferentes especies; estas fueron escogidas por ser las más frecuentes en México. Observemos la semejanza que guardan las cepas estudiadas en su comportamiento bioquímico -

CUADRO No. 1

PRUEBAS Y MEDIOS DE CULTIVO DE UTILIDAD
PARA LA DIFERENCIACION DE SALMONELAS

PRUEBA O SUSTRATO	RESULTADO	EDWARDS	SALMONELLA LAC NEG. % +	SALMONELLA LAC POS. % +
Ureasa	-	0	15	11
Indol	-	1.1	0	0
Rojo de metilo	+	100	100	100
Voges Proskauer	--	0	0	0
Citrato (Simmons)	v	80.1	100	100
Gelatina (22°)	-	1.1	0	0
Movilidad	+	94.6	100	100
Lis-decarboxilasa	+	94.6	69	23
Orn-decarboxilasa	+	92.7	69	23
Arg-dehidrolasa	+	58.5	84	88
Fenil-ala-deaminasa	-	0	0	0
Glucosa (gas)	+	91.9	100	96
Lactosa	-	0.8	0	100
Sacarosa	-	0.5	23	61
Manitol	+	99.7	96	96
Dulcitol	v	86.5	76	26
Salicina	-	0	0	3.8
Inositol	v	34.5	46	50
Sorbitol	+	94	88	92
Arabinosa	+	89.2	100	100
Rhamnosa	+	90.3	100	100
Malonato	-	0.5	0	0
Mucato	v	73.6	96	92
Maltosa	+	96	96	96
Xilosa	+	94	88	84
Trehalosa	+	93.5	100	100
Glicerol	v	4.5	100	100
Oxidasa	-	0	0	0
Lactosa	-	0	0	100
β-galactosidasa	-	0	3.8	96
KCN	-	0.3	100	100

Nota: Debe considerarse que los resultados del presente cuadro estan representados del mismo modo como fué hecho por -- Edwards y Ewing en su Manual Identificación de Enterobac terias.

DISTRIBUCION CONFORME A LA RESPUESTA CON ANTISUEROS
SOMATICOS DE SALMONELLA DE LAS CEPAS LAC+ Y LAC-.

GRUPO	L A C T O S A		TOTAL
	POSITIVA	NEGATIVA	
B	17	17	34
C ₁	5	5	10
C ₂	2	2	4
E	2	2	4
TOTAL	26	26	52

COMPARACION DE LAS REACCIONES BIOQUIMICAS SEGUN KAUFFMAN PARA
 DIFERENTES ESPECIES DE SALMONELLA DEL GRUPO B Y SALMONELAS
 LAC+ Y LAC- AISLADAS DE POBLACION INFANTIL.

CEPAS AISLADAS Y LAS MAS COMU NES EN MEXICO	ARAB	DULC	INOS	RHAM	TREH	XIL	GLI	H ₂ S	GEL	CIT	MUC
LAC +	+	d	d	+	+	d	+	+	-	+	+
LAC -	+	d	d	+	+	d	+	+	-	+	+
<i>S. typhimurium</i>	+	d	d	d	d	d	d	+	-	+	+
<i>S. bradenay</i>	+	+	d	+	+	+	+	+	-	d	+
<i>S. reading</i>	+	+	d	d	+	+	d	+	-	+	+
<i>S. stanley</i>	+	+	-	+	+	+	d	+	-	+	+
<i>S. derby</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>S. hato</i>	+	+	d	+	+	d	+	+	-	+	+

Nota: De arabinosa a xilosa (+) = positiva a las 24 hrs.
 (-) = negativa despues de 4 dias.
 (d) = variable.
 Glicerol (+) = positiva despues de 24 hrs.
 (-) = negativa despues de 24 hrs.

Gelatina (+) = digerida des-
 pués de 15 d.
 Ac. orga. (-) = negativa des-
 pués de 4 dias

COMPARACION DE LAS REACCIONES BIOQUIMICAS SEGUN KAUFFMAN PARA
 DIFERENTES ESPECIES DE SALMONELLA DEL GRUPO C₁ Y SALMONELAS
 LAC+ Y LAC- AISLADAS DE POBLACION INFANTIL.

CEPAS AISLADAS Y LAS MAS COMU NES EN MEXICO	ARAB	DULC	INOS	RHAM	TREH	XIL	GLIC	H ₂ S	GEL	CIT	MUC
LAC +	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LAC -	+	d	d	+	+	+	+	+	-	+	+
S. oranienburg	+	+	-	+	+	+	d	+	-	+	+
S. thompson	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. tennessee	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. bredeney	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. larochelle	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. montevideo	+	+	d	+	+	+	+	+	-	+	+

Nota: De arabinosa a xilosa {
 (+) = positiva a las 24 hrs.
 (-) = negativa despues de 4 dias.
 (d) = variable.
 Glicerol {
 (+) = positiva despues de 24 hrs.
 (-) = negativa despues de 24 hrs.

Gelatina (+) = digerida despues
 de 15 dias.
 Ac. Orgn. (-) = negativa despues
 de 4 dias

con estas especies.

El cuadro 4 comprende las cepas lactosa positiva y lactosa negativa que aglutinaron con el suero antigrupeo C_1 , las diferencias observadas en las distintas pruebas realizadas, así como las especies frecuentes en México y sus características bioquímicas según Kauffman. Vemos en dicho cuadro que el dulcitol no fué fermentado por las cepas lactosa positiva, en tanto que lo fué ocasionalmente por las cepas lactosa negativa; la fermentación del inositol fué también variable por las cepas lactosa negativa y siempre positiva por las salmonelas lactosa positiva. Como se puede ver al analizar el mismo cuadro, nuestras cepas lactosa resultaron idénticas en sus reacciones bioquímicas a *Salmonella larochelle* y las lactosa negativa podrían corresponder a las otras especies si consideramos la variabilidad en las pruebas con dulcitol e inositol. Debe tomarse en cuenta que aún en otras pruebas bioquímicas y otras bacterias independientemente del género a que corresponda, no encajan exactamente en el cuadro de pruebas.

En el cuadro 5 correspondiente a *Salmonellas* lactosa positiva y lactosa negativa del grupo C_2 puede observarse que en la fermentación de los azúcares inositol y dulcitol los resultados fueron variables; sin embargo, existe correspondencia posible entre nuestras cepas lactosa positiva y las especies muenchen y manhatan.

Las fermentaciones de azúcares de cepas de salmonelas lactosa positiva y salmonelas lactosa negativa del grupo E, y las especies del mismo grupo más comunes en México, se encuentran en el cuadro 6. Los resultados muestran que no hubo diferencias entre las salmonelas lactosa positiva y lactosa negativa aisladas por nosotros, y que corresponden a las especies muenster y london del esquema de Kauffman.

Las pruebas de sensibilidad hacia los diferentes antibióticos se presentan en el cuadro número 7, en el cual se encuentran las proporciones de cepas sensi-

COMPARACION DE LAS REACCIONES BIOQUIMICAS SEGUN KAUFFMAN PARA
 DIFERENTES ESPECIES DE SALMONELLA DEL GRUPO C₂ Y SALMONELAS
 LAC + Y LAC- AISLADAS DE POBLACION INFANTIL.

CEPAS AISLADAS Y LAS MAS COMUNES EN MEXICO	ARAB	DULC	INOS	RHAM	TREH	XIL	GLIC	H ₂ S	GEL	CIT	MUC
LAC +	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LAC -	+	d	-	+	+	+	+	+	-	+	+
S. muenchen	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. newport	+	d	-	+	+	d	+	+	-	+	+
S. manchester	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
S. manhatan	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Nota: De arabinosa a xilosa { + = positiva a las 24 hrs.
 { - = negativa despues de 4 dias.
 { d = variable.
 Glicerol { + = positiva despues de 24 hrs.
 { - = negativa despues de 24 hrs.

Gelatina (+) = digerida despues
 de 15 dias.
 Ac. orga. (-) = negativo despues
 de 4 dias.

COMPARACION DE LAS REACCIONES BIOQUIMICAS SEGUN KAUFFMAN PARA
DIFERENTES ESPECIES DE SALMONELLA DEL GRUPO E Y SALMONELAS
LAC+ Y LAC- AISLADAS DE POBLACION INFANTIL.

CEPAS AISLADAS Y LAS MAS COMUNES EN MEXICO	ARAB	DUL	INOS	PHAM	TREH	XIL	GLI	H ₂ S	GEL	CLT	MUC
LAC +	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LAC -	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. muenster	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. anatum	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
S. london	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. newington	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+

Nota: De arabinosa a xilosa
 (+) = positiva a las 24 hrs.
 (-) = negativa despues de 4 dias.
 (v) = variable.
 Glicerol (+) = positiva despues de 24 hrs.
 (-) = negativa despues de 24 hrs.

Galatina (+) = digerida despues
de 15 dias.
 Ac. Orga. (-) = negativa despues
de 4 dias.

DISTRIBUCION DE LA SENSIBILIDAD A LOS DIFERENTES
 ANTIBIOTICOS DE LAS SALMONELAS LAC+ Y LAC-
 PERTENECIENTES A LOS GRUPOS B,C₁,C₂ Y E.

CEPA	TOTAL DE CEPAS	LACTOSA	AMPI	GENTA	TETRA	ESTREP	CLORAN	KANA
SALMONELLA GPO B	17	+	0.18	0.25	0.93	0.75	0.87	0.93
	17	-	0.56	0.37	0.87	0.75	0.87	0.81
SALMONELLA GPO C1	5	+	0.0	0.0	0.8	1.0	1.0	1.0
	5	-	0.8	0.2	0.8	0.0	1.0	1.0
SALMONELLA GPO C2	2	+	0.5	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	2	-	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0
SALMONELLA GPO E	2	+	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	2	-	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0

bles clasificadas serológicamente como de los grupos B, C₁, C₂ y E. De los del grupo B sólo se efectuó la prueba de sensibilidad en 16 salmonelas lactosa positiva y 16 lactosa negativa.

La mayor sensibilidad de cepas del grupo B se observa para la tetraciclina independientemente de fermentar o no la lactosa. Siguiendo en frecuencia en la kanamicina, cloranfenicol y estreptomycin. La representación gráfica de estas proporciones estan en la gráfica 1 donde se ve de una manera más marcada estas diferencias.

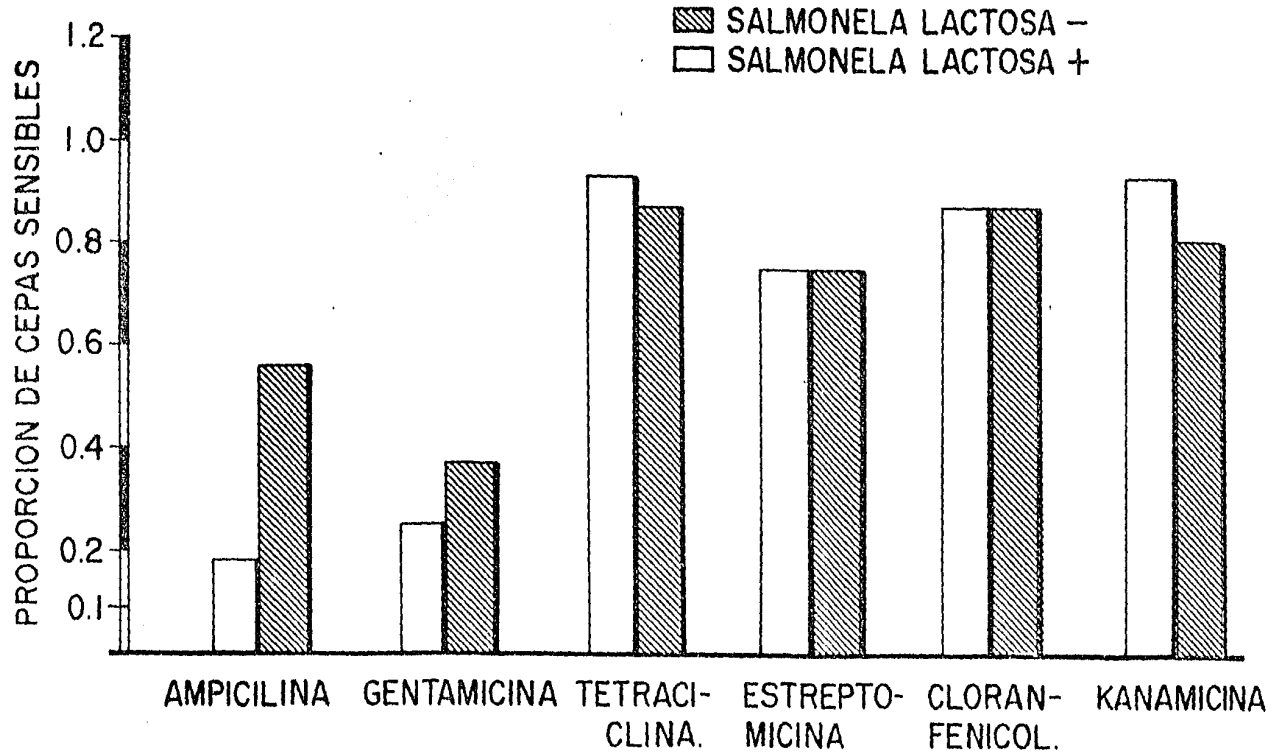
Las cepas sensibles, clasificadas serológicamente como del grupo C₁, se encuentran en la gráfica número 2 donde se observa que estas cepas fueron más sensibles, sin considerar la fermentación de la lactosa, a kanamicina y cloranfenicol, siguiendo en orden descendente, con estreptomycin y tetraciclina. Siendo nula para ampicilina y gentamicina en el caso de las cepas lactosa positiva.

La proporción de cepas lactosa positiva como lactosa negativa del grupo C₂, que presentaron sensibilidad hacia diferentes antibióticos, se encuentran representados en la gráfica número 3, donde se pone de manifiesto que la mayor proporción sensible fué hacia kanamicina, cloranfenicol, estreptomycin y tetraciclina; negativa en ambos casos para gentamicina.

En la gráfica número 4, se muestra que la sensibilidad a los antibióticos - kanamicina, cloranfenicol, estreptomycin, tetraciclina y ampicilina fué muy semejante para ambos tipos de cepas del grupo E, mientras que las cepas fueron resistentes a la gentamicina.

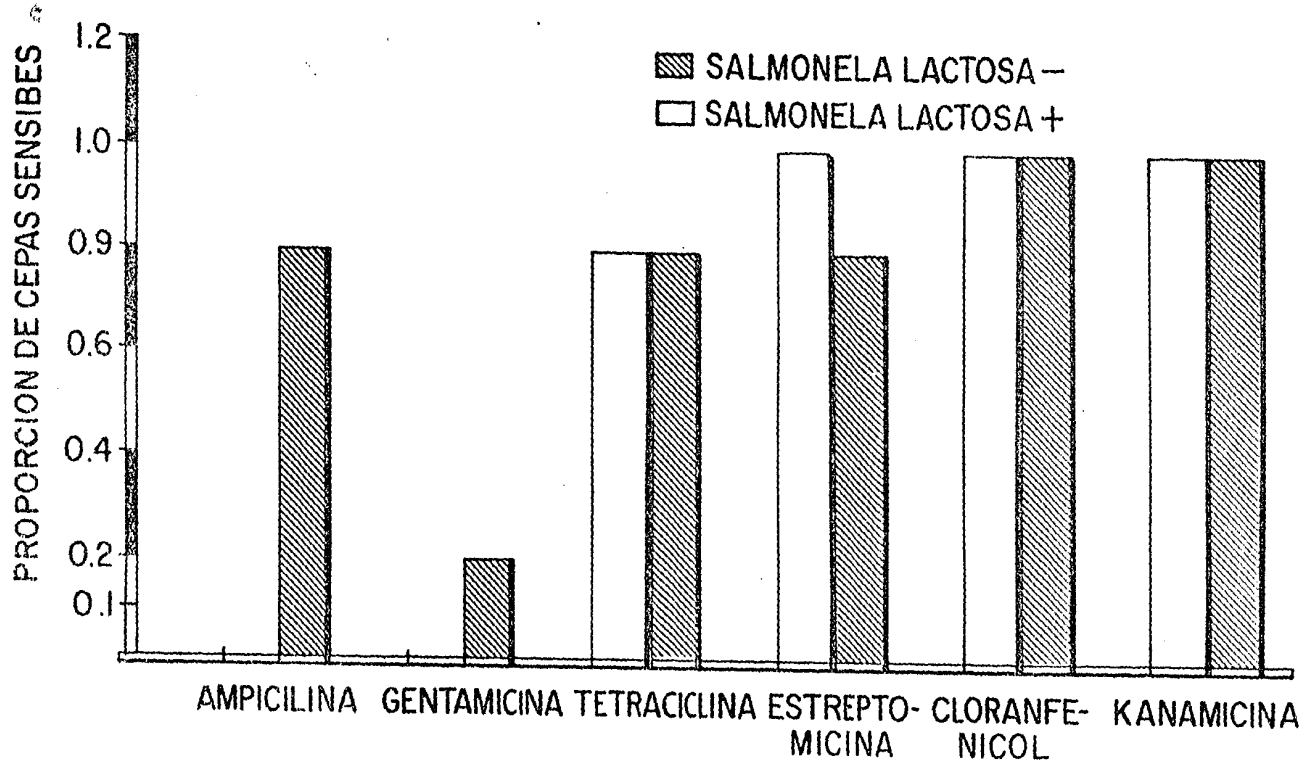
GRAFICA I

DISTRIBUCION PROPORCIONAL DE CEPAS DE SALMONELA LACTOSA+Y LACTOSA- DEL GRUPO B SENSIBLES A DIFERENTES ANTIBIOTICOS



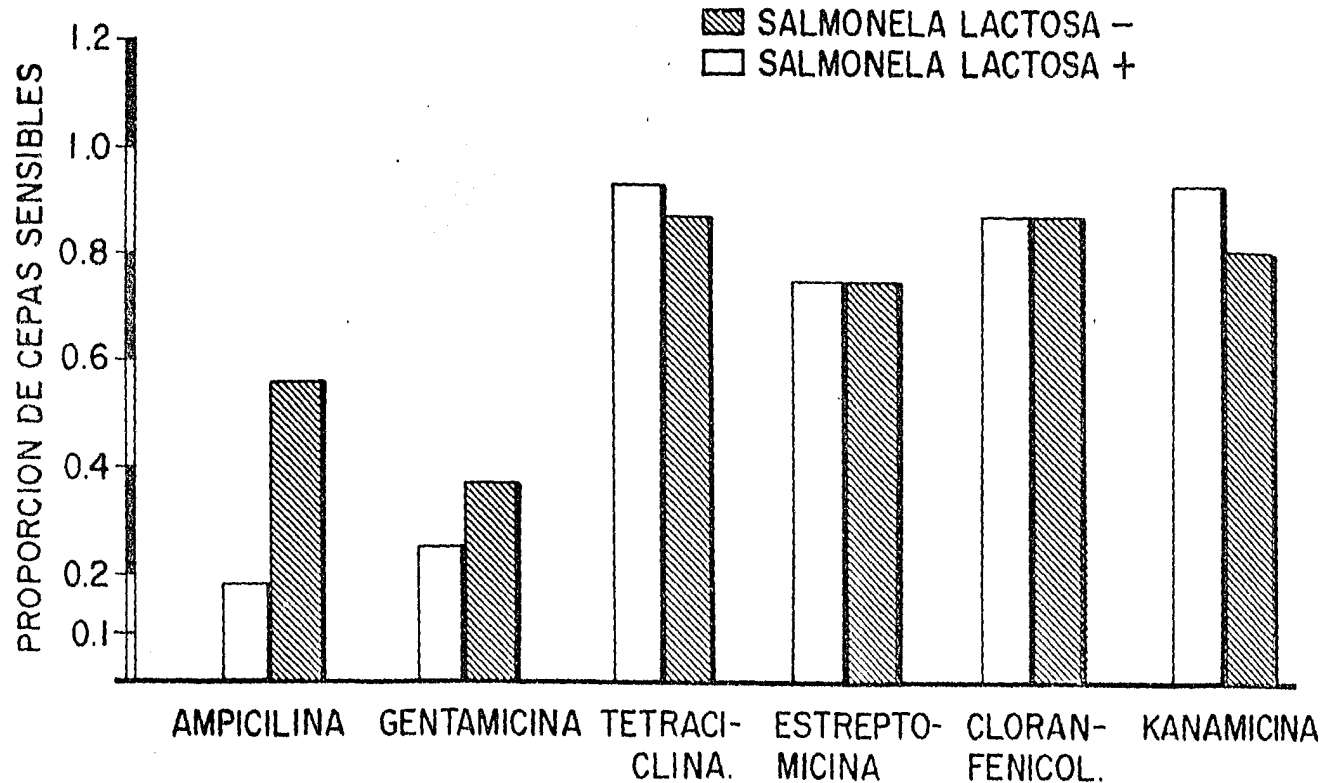
GRAFICA II

DISTRIBUCION PROPORCIONAL DE CEPAS DE SALMONELA LACTOSA+ Y LACTOSA- DEL GRUPO C I SENSIBLES A DIFERENTES ANTIBIOTICOS



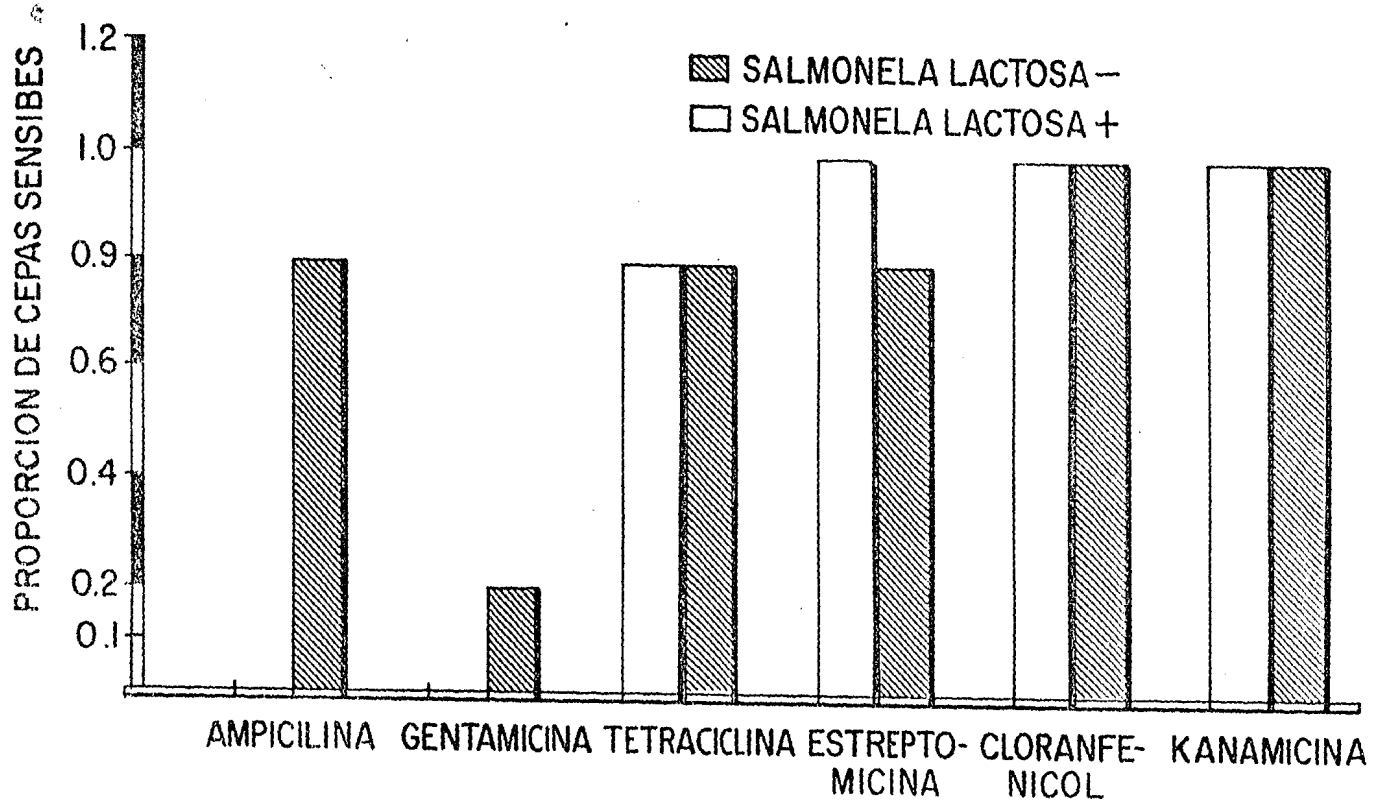
GRAFICA I

DISTRIBUCION PROPORCIONAL DE CEPAS DE SALMONELA LACTOSA+Y LACTOSA- DEL GRUPO B SENSIBLES A DIFERENTES ANTIBIOTICOS

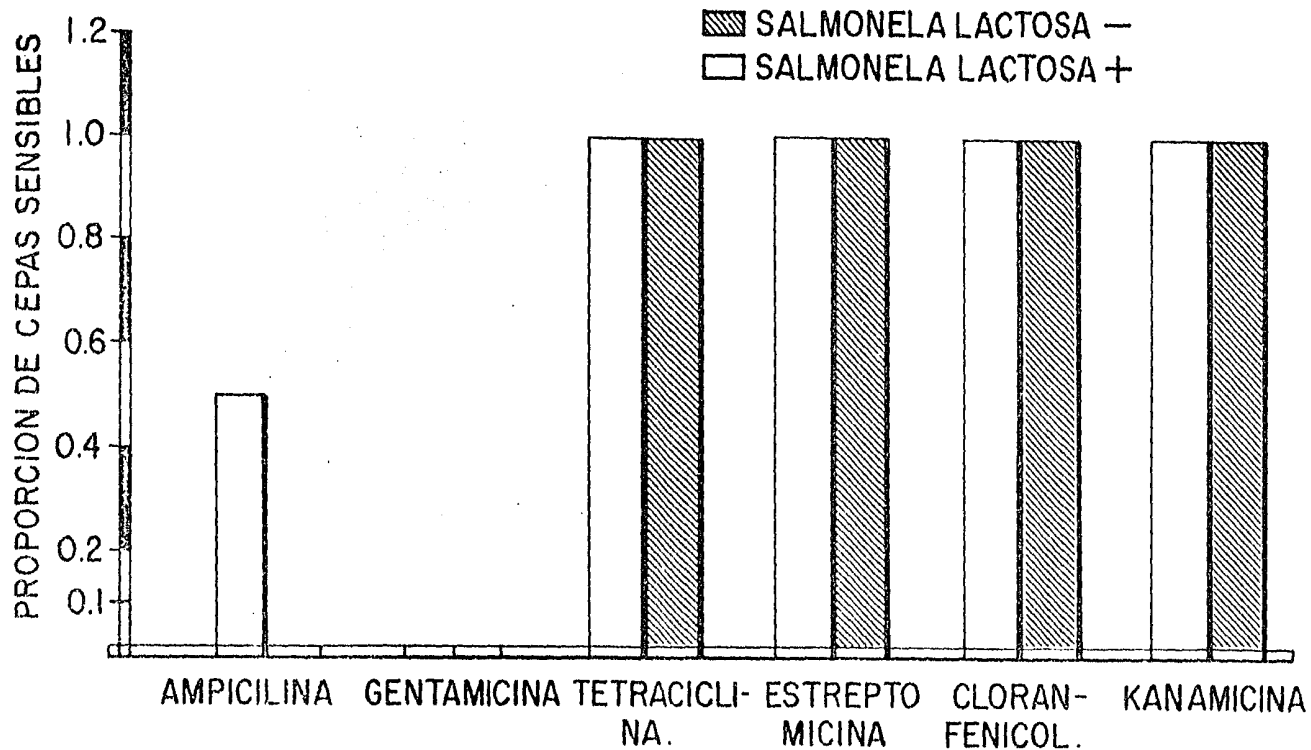


GRAFICA II

DISTRIBUCION PROPORCIONAL DE CEPAS DE SALMONELA LACTOSA+ Y LACTOSA- DEL GRUPO CI SENSIBLES A DIFERENTES ANTIBIOTICOS

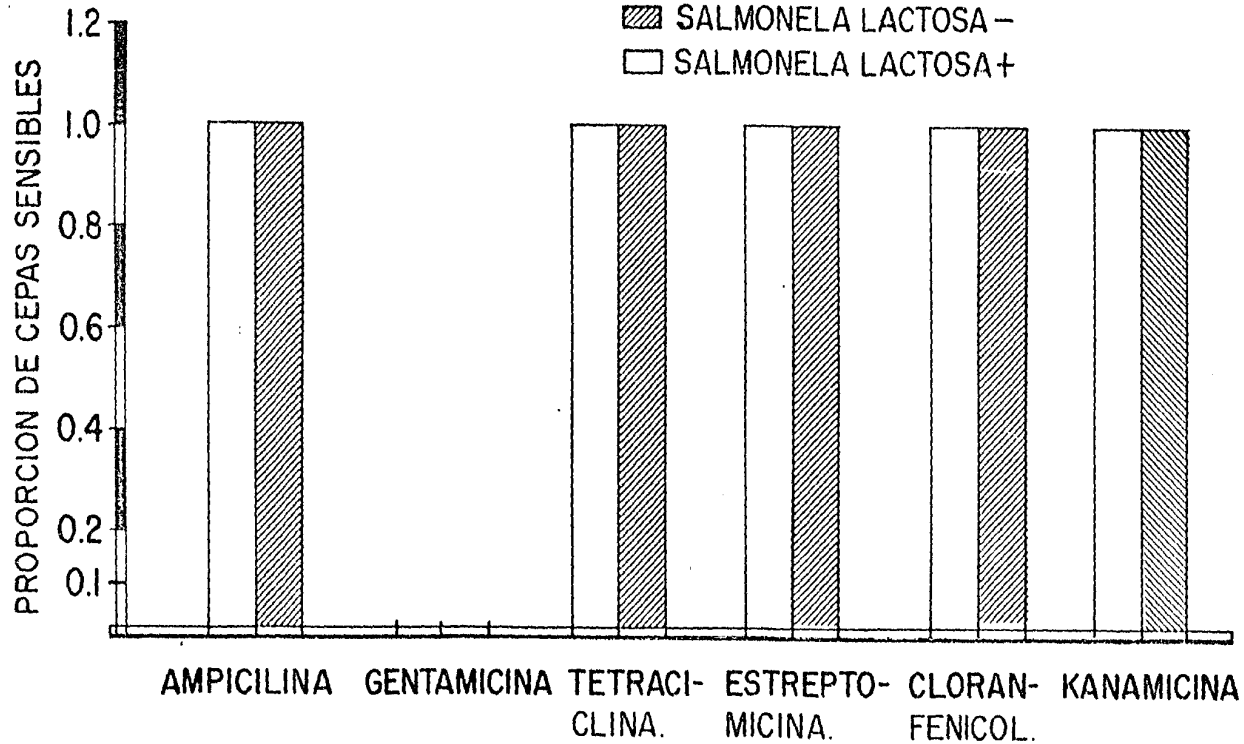


GRAFICA III
DISTRIBUCION PROPORCIONAL. DE CEPAS DE SALMONELA LACTOSA + Y
LACTOSA- DEL GRUPO C2 SENSIBLES A DIFERENTES ANTIBIOTICOS



GRAFICA IV

DISTRIBUCION PROPORCIONAL DE CEPAS DE SALMONELA LACTOSA+ Y LACTOSA- DEL GRUPO E SENSIBLES A DIFERENTES ANTIBIOTICOS



DISCUSION:

Los resultados obtenidos al efectuar las pruebas bioquímicas de todas las cepas estudiadas, independientemente de que fermentaran o no la lactosa, cuando fueron comparados con los que reportaron Edwards y Ewing para Salmonella, mostraron variaciones en el porcentaje de positividad o negatividad, como se ve en lo que se refiere a: a) la presencia de ureasa que, aunque en bajo porcentaje, se observó tanto en las lactosa positiva como en las lactosa negativa b) la utilización de cianuro de potasio que fué positiva (100%) en las dos variedades de Salmonella, no es posible explicar esto, pero se piensa que quizá se deba a variaciones de técnica o a que estas cepas poseen características de cultivo diferentes a las reportadas por Edwards, c) la prueba de la determinación de Beta-galactosidasa (utilizada en la diferenciación de cepas del género Salmonella y género Arizona) mostró en salmonelas lactosa negativa una frecuencia de 3.6% de positivas, en cambio en el grupo de salmonelas lactosa positiva la frecuencia fué de 96%, d) la fermentación de la sacarosa se observa con mayor frecuencia en las lactosa positiva, aunque algunas lactosa negativa también la fermentan. Estas diferencias deben ser analizadas más cuidadosamente - tratando de ver si las lactosa positiva pudieran ser " Curadas " o analizadas genéticamente para ver si estas nuevas propiedades son definitivas o adquiridas mediante información extracromosómica. Las cepas de posibles salmonelas estudiadas tanto lactosa positiva como lactosa negativa fueron aglutinadas con sueros comerciales ; únicamente se hizo la aglutinación de grupo, pero mediante el estudio detallado de la fermentación de azúcares, según lo señalado por Kauffman, se observó que a cada grupo correspondía un patron determinado de serotipo; considerando los aislados mas frecuentemente se tiene que en el grupo 6 (cuadro 3) son sorprendentes las semejanzas de las cepas estudiadas y las señaladas por Kauffman, en lo que se refiere al comportamiento frente a los dife

rantes azúcares; como no se hizo la clasificación de especie por antígenos flagelares, no se puede decir si todo este grupo estuvo constituido por una sola especie o por varias. En el mismo cuadro se observan todos los posibles serotipos de este grupo B que podrían corresponder al patron de fermentaciones.

En lo que se refiere al grupo C₁, se observa el mismo fenómeno al igual que en C₂. En el grupo E parece ser que tanto en salmonelas lactosa positiva como en lactosa negativa corresponden, en su patron de fermentaciones de los diferentes azúcares utilizados, a los serotipos meunster y london.

No se investigó si la propiedad de fermentar la lactosa se debía o no a la presencia de un plásmido (elemento extracromosómico) o se encontraba presente en el cromosoma bacteriano. En Salmonella, Proteus y aún en Escherichia coli se han descrito diferentes plásmidos responsables de fermentar la lactosa, y estos son: Fo-lac, F-lac y P-lac. Entre ellos se han reportado, además de la variabilidad de comportamiento, variabilidad de tamaño, como ha sido determinado por el método de ultracentrifugación en cloruro de cesio (4,18). Sin embargo, el empleo de metodología mucho más reciente, como el uso de enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa, hubiera permitido conocer otras diferencias; su clasificación por pruebas de compatibilidad y homología en secuencia de bases para suponer de esta manera un origen común.

Los resultados obtenidos en la prueba de la enzima Beta-galactosidasa, sugieren que la presencia del gen codificador de la enzima en algunas de las cepas aisladas puede ser de naturaleza extracromosómica, transferido de manera semejante a los plásmidos F-lac o Fo-lac. En aquellas cepas de Salmonella (4%) que no presentaron producción de Beta-galactosidasa no se investigó si esto era real o si su ausencia pudiera aplicarse en base a la sensibilidad de la prueba, ya que se sabe que esta enzima se produce en pequeñas cantidades.

La posibilidad de que la capacidad de fermentar la lactosa se observe en gér

menes que habitualmente no la tienen, debida a la presencia de un plásmido integrado, o no al cromosoma bacteriano, no es remota ya que ha sido demostrada por Falcow en Salmonella typhi y Le Minor en Salmonella typhimurium y Salmonella oranienburg. Sería muy interesante investigar si esa propiedad podría ser modificada mediante segregación o empleo de incubación a diferentes temperaturas para tratar de eliminar estos plásmidos, como ha sido descrito por Jacob (8); o en su defecto, con naranja de acridina para determinar si, además del factor lac^+ , se pierde algún otro elemento de los estudiados genéticamente, como ya fué mencionado antes, o si se trata de otra propiedad diferente a la descrita por Le Minor, consistente en que el plásmido contiene información para resistencia al cloranfenicol, además de la propiedad de fermentar la lactosa en Salmonella typhimurium y Salmonella oranienburg, aunque en este estudio la fermentación de la lactosa no está ligada a la resistencia al cloranfenicol.

Le Minor no demostró la propiedad de fermentar la lactosa "in vitro" sino que sugiere la presencia de los plásmidos diferentes, uno relacionado con la fermentación de lactosa y el otro referido a la presencia de Km-col Ib responsable de la no transferencia espontánea del factor lac^+ (27). La posibilidad de que el factor lac^+ pueda ser transferido es probablemente debido a la formación del pili que es sintetizado por el segundo plásmido. No se debe descartar la posibilidad de la presencia de plásmidos que lleven información de resistencia a diferentes antibióticos. Parece ser, que, en el presente trabajo y conforme a los patrones de resistencia obtenidos, estos difieren en Salmonella lactosa positiva y lactosa negativa; la susceptibilidad a ampicilina de los grupos de C_2 , C_1 , nos permite sospechar en estas cepas la presencia o no de plásmidos que llevan información de la síntesis de alguna Beta-lactamasa no presente en el grupo E. En un estudio realizado por Cravioto (28) en el hospital del Niño Dif (ahora INF) durante el periodo en que se desarrolló este trabajo, en los niños de quie

nes se aislaron las cepas de este estudio se observaron características clínicas de gastroenteritis, pero no hubo diferencias clínicas (en relación a la presencia de sangre, vómito y fiebre) importantes entre los tres grupos de niños, integrados en base al aislamiento de : Grupo 1, Salmonella lactosa positiva; grupo 2, Salmonella lactosa negativa y grupo 3, Salmonella lactosa positiva y lactosa negativa. Con objeto de encontrar un factor que pudiera influir en la presencia de Salmonella lactosa positiva, se investigó la proporción de niños que habían recibido tratamiento de antibiótico previo al aislamiento de Salmonella; la diferencia fué significativa en los niños que presentaron Salmonella lactosa positiva respecto a los infectados con Salmonella lactosa negativa, por lo que es importante dilucidar en estudios posteriores o mediante experimentos "in vitro", si la presencia de antibióticos favorecen la adquisición de la propiedad de fermentar la lactosa, y si influye además el tipo de antibiótico utilizado, para permitir que se lleven a cabo fenómenos genéticos que quizá posteriormente permitan a las bacterias establecerse como constituyentes de la flora normal en el huésped; también es posible que al desaparecer el antibiótico esta propiedad se pierda, explicando así la presencia de portadores de Salmonella lactosa negativa después de un tratamiento.

Todo lo anterior demuestra la gran variabilidad de comportamiento bioquímico que hay en la familia de las Enterobacteriaceas, como consecuencia de fenómenos genéticos (muy probablemente existen otras variantes aún desconocidas);- esto se traduce como una lucha de las bacterias por sobrevivir frente a los mecanismos de defensa del huésped y que afortunadamente sirven para que el campo de la investigación en genética bacteriana sea mas fascinante y todavía poco conocido no obstante los adelantos de la Biología Molecular.

CAPITULO IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN:

Durante el periodo de julio a octubre de 1975 se obtuvieron aislamientos de cepas de *Salmonella lactosa* positiva y *lactosa* negativa. El estudio comprendió 1547 muestras clínicas. De 420 coprocultivos de donde se aisló *Salmonella*, sólo 25 presentaron simultáneamente los dos tipos de microorganismos.

Las cepas estudiadas mostraron un patrón de comportamiento bioquímico que se compara con el clásicamente establecido; también se estudió la fermentación de los diferentes azúcares según la metodología establecida por Kauffman.

Al probar la susceptibilidad de estas cepas a diferentes antibióticos, los grupos B, C₁ y C₂ mostraron diferencias en lo que se refiere sólo a ampicilina.

No se investigó si el carácter de fermentar o no la lactosa es extracromosómico, pero se sugieren varias hipótesis para explicar este fenómeno.

CONCLUSIONES:

El presente trabajo mostró que en México, durante el periodo mencionado, hubo aislamientos positivos de bacterias lactosa positiva que de no haberse llevado a cabo todas las pruebas específicas por los manuales de identificación hubieran sido clasificadas erróneamente y confundidas con Citrobacter freundii. No se pudo afirmar absoluta y definitivamente que estas cepas con características no idénticas a Salmonella, fueran verdaderas salmonelas. La prueba definitiva hubiera sido la pérdida de las propiedades en que diferían mediante la destrucción o cura de plásmidos, si es que estas propiedades dependen de la presencia de elementos extracromosómicos que lleven información genética para las mismas, ó al empleo de fagos para demostrar su identidad.

En caso de que no se tratara de salmonelas, se debe de señalar la presencia de antígenos somáticos comunes a esta familia, y presentes en otro grupo de bacterias que no pueden ser clasificadas según los patrones establecidos.

Si las diferencias de comportamiento bioquímico son adquiridas por plásmidos es necesario hacer estudios de mapeo de estos elementos extracromosómicos para determinar, por ejemplo, si la resistencia a ampicilina en Salmonella lactosa positiva se debe a enzimas cuya síntesis está presente en el mismo o si es diferente al que lleva la información para que la bacteria fermenta la lactosa.

Estas bacterias lactosa positiva están originando patología diarreica ya que cuando se estudiaron clínicamente los pacientes de donde provenían estos microorganismos, según lo reportado por Cravioto, demostró que independientemente de la propiedad lactosa positiva o lactosa negativa, los niños representaban los signos que caracterizan este síndrome.

Por último es necesario continuar estos estudios con objeto de determinar si estos gérmenes constituyen o no parte de la tribu Salmonelleae y género Salmonella.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kunz, L.J., and W.H. Ewing. 1955. Laboratory infection with a lactose fermenting strain of *Salmonella typhi*. *J.Bacteriol.* 69:1629.
- 2.- Bulmash, J.M., M.D. Fulton, J.Jiron. 1965. Lactose and sulfide reaction of an aberrant *Salmonella* strain. *J.Bacteriol.* 89:259.
- 3.- González, A.B. 1966. Lactose-fermenting *Salmonella*. *J.Bacteriol.* 91:1661.
- 4.- Easterling, S.E., E.M. Johnson, J.A. Wohlhieter, and L.S. Baron. 1969. Nature of lactose-fermenting *Salmonella* strains obtained from clinical sources. *J.Bacteriol.* 100:35.
- 5.- Le Minor, L., C.Coyault, et G.Pessoa. 1974. Determinism plasmidique du character atypique "Lactose positif" de souches de *Salmonella typhimurium* et de *Salmonella oranienburg* isolees lors d'epidemies de 1971 a 1973. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. 125A:261.
- 6.- Anand, C.M., M.C. Finlayson, J.Z. Garson, and M.L. Larson. 1980. An institutional outbreak of Salmonellosis due to a lactose-fermenting *Salmonella newport*. *Am.J.Clin.Pathol.* 74:657.
- 7.- Dube, S.D. 1983. Outbreak of food poisoning caused by lactose-fermenting *Salmonella tuebinger*. *J.Clin.Microbiol.* 17:698.
- 8.- Falcow, S., J.A. Wohlhieter, R.V. Citarella, and L.S. Baron. 1964. Transfer of episomic elements to *Proteus*. I, transfer of F linked chromosomal determinants. *J. Bacteriol.* 87:209.
- 9.- Edwards, P.R., and W.H. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae, Atlanta, Georgia. 3rd edition, Burgess, Pub. Co. Minneapolis.
- 10.- Kauffman, F. 1965. The bacteriology of Enterobacteriaceae. Copenhagen. 5th edition.
- 11.- Mac Faddin, J.F. 1976. Biochemical test for identification of medical bacteria. Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 12.- Bergey's R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. Manual of determinative bacteriology

- gy 8th edition, New York. Ed Board. 1974.
- 13.- Lennette, E.H., E.H. Spaulding, Truant J.F. 1974. Manual of clinical microbiology. Second edition. Ed.Board.
- 14.- Davis, B.A., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, y W. Barry Wood. 1971. Tratado de Microbiología, primera edición.
- 15.- Karmali, M.A., M.B., CH.B., M.R.C.P. (U.K.), F.R.C.P., and F.C. Fleming, M. G., B.S., F.R.C. 1979. Campylobacter enteritis in children. Journal of Pediatric. 94:527.
- 16.- Campbell, A.M. 1969. Episomes. Edit. Harper and Row, New York.
- 17.- Falcow, S., and L.S. Baron 1962. Episomic element in a strain of Salmonella typhosa. J. Bacteriol. 84:581.
- 18.- Synenki, M., J.A. Wohlhieter, E.W. Johnson, J.R. Lasere and L.S. Baron. 1973. Isolation and characterization of circular DNA obtained from lactose-fermenting Salmonella strain. J.Bacteriol. 115:1185.
- 19.- Kontomichalou, P. 1957. Studies on resistance transfer factors II. Transmissible resistance to eight antibacterial drugs in a strain of Escherichia coli. Path. Microbiol. 30:185.
- 20.- Mitsuhashi, S., K. Harada and H. Hashimoto. 1960. Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strain by mixed cultivation. Japan. J. Exptl Med. 30:179.
- 21.- Meynell, G.G. 1972. Bacterial plasmids. 1st.ed., The Mac Millan Press Ltd., London.
- 22.- Meynell, E., G.G. Meynell, and N. Datta. 1968. Phylogenetic relationships of drug resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. Bacteriol. Rev. 32:55.
- 23.- Hall, W.L.M., E.J. Threlfall, G. Rows. 1978. Lactose-fermenting Salmonella indiana from turkeys in Britain. Lancet. 1197.

- 24.- Porschen, Richard K., W.D. Devon Hale, and Z. Goodman. 1977. Misdiagnosed -
Salmonella septicemia and endarteritis due to a lactose-fermenting strain
- 25.- Hayes, W. 1955. The genetics of bacteria and their viruses, 3rd. ed. John -
Wiley & Sons., Inc., New York.
- 26.- Watanabe, T., and T. Fukasawa. 1961. Episome-mediated transfer of drug re--
sistance in Enterobacteriaceae I. Transfer of resistance factors by conjuga
tion. J. Bacteriol 81:669.
- 27.- Le Minor, L., C. Coynault, R. Rohde, B. Rowe et S. Alek Sic. 1973. Localisa
tion plasmidique du determinant genetique du caractere atypique "saccharose
positif des Salmonella". Ann. Microbiol. (Inst Pasteur) 124B:295.
- 28.- Cravioto A.R. 1976. Aislamiento de Salmonella lactosa-positiva y la influen
cia de factores del huésped en su aparición. Curso de especialización en Pe
diatría. México, D.F.
- 29.- Akiba, T., K. Koyama, Y. Ishiki, S. Kimura and T. Fukushima. 1950. On the -
mechanism of the development of multiple resistant clones of Shigella. Ja--
pan. J. Microbiol 4:219.
- 30.- Anderson, E.S., and N. Datta. 1955. Resistance to penicillins and its trans
fer in Enterobacteriaceae. Lancet, 1:407.
- 31.- Hardy, K. 1963. Bacterial plasmids. Second edition. American Society for Mi
crobiology U.S.A.
- 32.- Bauer, A.W., W.W. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck. 1956. Antibiotic suscep
tibility testing by a standardized single disc method. Am.J. Clin. Pathol.
45:493.

APENDICE:

MEDIOS DE CULTIVO.

Todas las fórmulas se refieren en gramos por litro de agua destilada, se utilizaron medios deshidratados marca B.B.L.

AGAR TERGITOL 2

Heptadecil-Sulfato de sodio	0.10
Polipeptona-peptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
Lactosa	10.0
Agar	15.0
Azúl de bromotimol	0.025
pH final \pm 6.9	

Se hierve y se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos, distribuyéndose cuando se ha enfriado a 50°C, en cajas petri estériles.

AGAR MAC CONKEY.

Peptona	17.0
Polipeptona-peptona	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.030
Cristal violeta	0.001
pH final \pm 7.1	

Se hierve y se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se distribuye en cajas petri estériles.

AGAR XLD (xilosa, lisina, desoxicolato)

Xilosa	3.5
L-lisina	5.0
Lactosa	7.5
Sacarosa	7.5
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	3.0
Hojito de fenol	0.08
Agar	13.5
Desoxicolato de sodio	2.5
Tiosulfato de sodio	6.8
Citrato de hierro amónico	0.8
pH final \pm	7.4

No se esteriliza en autoclave; únicamente se disuelve en agua estéril, se lleva a ebullición y se reparte en cajas petri estériles.

AGAR DE VERDE BRILLANTE

Extracto de levadura	3.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sucrosa	10.0
Hojito de fenol	0.08
Verde brillante	0.0125
Agar	20.0
pH final \pm	6.9

Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos, se distribuye en cajas petri estériles.

CALDO TETRACIONATO

Polipeptona-peptona	5.0
Salas biliares	1.0
Carbonato de calcio	10.0
Tiosulfato de sodio	30.0

Se disuelve en agua estéril y se lleva a ebullición. Al momento de usarlo - se le agrega una solución Yodo-Yodurada (20 ml en 1000 ml de caldo tetratona to).

CALDO SELENITO F

Polipeptona-peptona	5.0
Lactosa	4.0
Fosfato disódico	10.0
Selenito ácido de sodio	4.0
pH final \pm 7.0	

Se disuelve en agua destilada, no se esteriliza en autoclave si el medio - es usado inmediatamente; se distribuye en tubos de 13x100.

AGAR DE HIERRO DE KLIGLER

Peptona	20.0
Lactosa	10.0
Glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato férrico amónico	0.5
Tiosulfato de sodio	0.5
Agar	15.0
Rojo de fenol	0.025
pH final \pm 7.3	

Se disuelve y se distribuye en tubos de 13x100; se esteriliza a 121°C por - 15 minutos, solidificar en forma inclinada.

MEDIO DE SIM

Tripticasa-peptona	20.0
Tintonna-peptona	6.2
Sulfato de amonio ferroso	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5
pH final \pm 7.3	

Disolver y distribuir en tubos de 13x100. Esterilizar a 121°C por 15 minutos; se deja solidificar en forma vertical.

GELATINA NUTRITIVA

Peptona	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Gelatina	120.0
pH final \pm 6.8	

Disolver, repartir en tubos de 13x100 con tapon de algodón y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Solidificar en forma vertical.

BASE DE AGAR DE UREA

A) Medio base.

Gelosa peptona	1.0
Glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monobásico de potasio	2.0
Urea	20.0
Rojo de fenol	0.012
pH final \pm 6.8	

Hervir para disolver y esterilizar por filtración.

B) Disolver 15 gramos de agar en 900ml de agua destilada, esterilizar a 121°C -

por 15 minutos y enfriar a 50°C. Agregar la solución A; mezclar, distribuir 3 - ml en tubos estériles con tapon de algodón e inclinar para solidificar.

MEDIO DE FENIL ALANINA

D-L-fenil-alanina	2.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	1.0
Agar	12.0
pH final \pm 7.3	

Hervir hasta disolver y distribuir en tubos de 13x100. Esterilizar a 121°C - por 15 minutos y enfriar en posición inclinada.

CALDO KCN

Peptona-polipeptona	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato de potasio monobásico	0.225
Fosfato dibásico de sodio anhidro	5.64
pH final \pm 7.6	

Disolver y esterilizar a 121°C por 15 minutos (al medio frio se le agre-- gan 15 ml de solución de cianuro de potasio al 0.5% (.5 grs de KCN disolverlos en 100 ml de agua fría destilada estéril) y distribuirlos en tubos de 13x100.

CALDO DE MALONATO DE EWING MODIFICADO

Sulfato de amonio	2.0
Fosfato dipotásico	0.6
Fosfato monopotásico	0.4
Cloruro de sodio	2.0
Malonato de sodio	3.0
Dextrosa	0.25

Extracto de levadura	1.0
Azúl de bromotimol	0.025

pH final \pm 6.7

Disolver en agua destilada, distribuirlo en tubos de 13x100 y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

MEDIO DE INDOLE NITRATO

Peptona	20.0
Fosfato disódico	2.0
Dextrosa	1.0
Agar	1.0
Nitrato de potasio	1.0

pH final \pm 7.2

Disolver, distribuir en tubos de 13x100 y esterilizar en autoclave a 121°C - por 15 minutos.

AGAR CITRATO DE SIMMONS

Fosfato monobásico de amonio	1.0
Fosfato dibásico de potasio	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Agar	15.0
Azúl de bromotimol	0.08

pH final \pm 6.9

Disolver y distribuir en tubos de 13x100. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y enfriar en posición inclinada.

MEDIO DE CLARK Y LUBS

Peptona	7.0
---------	-----

Glucosa 5.0

Fosfato dibásico de potasio 5.0

pH final \pm 6.9

Disolver y distribuir en tubos. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

MEDIO PARA ACIDOS ORGANICOS

Peptona 10.0

Azúl de bromotimol (sol. al 0.2%) 12.0 ml

A 100 ml del medio basal se le añaden 1 gr del ácido orgánico o su sal. En el caso del tartrato de sodio o citrato de sodio se agrega solución de hidróxido de sodio 10N hasta pH de 7.4, se reparte en tubos de 13x100 y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. En el caso del ácido mucico este se agrega al medio base caliente, se ajusta posteriormente a un pH de 7.4 y se reparte en tubos para esterilizar a 121°C por 15 minutos.

MEDIO BASE PARA DECARBOXILASA

Peptona-fitona 5.0

Extracto de carne 5.0

Púrpura de bromocresol 0.01

Rojo de cresol 0.005

Dextrosa 0.5

Piridoxal 0.005

pH final \pm 6.0

Un litro de caldo base se divide en cuatro partes, una para control a la que no se le agrega ningún aminoácido. A las tres partes restantes se les agrega L-arginina, L-lisina y L-ornitina en cantidad suficiente para obtener una concentración de 1%; en el caso de la L-ornitina se ajusta el pH a 6.6. Se distribuye en tubos de 13x100 con tapón de hule y se esterilizan a 121°C por 10 min.

AGAR DE MUELLER-HINTON

Infusión de carne de res	300.0 ml.
Peptona	17.5
Almidón	1.5
Agar	5.0
pH final \pm 7.4	

Disolver y distribuir en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

CALDO DE MUELLER-HINTON

Infusión de carne de res	300.0 ml
Peptona	17.5
Almidón	1.5
pH final \pm 7.4	

Disolver y distribuir en tubos grandes con tapón de algodón. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

CALDO PARA FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

Peptona	10.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Indicador de Andrade	10.0 ml
pH final \pm 7.1	

Las soluciones de los azúcares al 20% se esterilizan por filtración; se distribuyen en frascos estériles y conservar en el congelador. Se pueden usar en el momento oportuno. Al caldo base se le agrega la cantidad necesaria de la solución de azúcar al 20%, para alcanzar una concentración final del 1%. Se distribuye en tubos estériles con las campanas de Durham.

CALDO DE FUSINA Y GLICERINA

Solución 1

Extracto de carne	10.0
Peptona	20.0
Ajustar el pH a 8	
Agua	1000.0 ml

Solución 2

Solución alcohólica de fucsina básica al 10%.

Solución 3

Solución reciente de sulfito de sodio anhidro al 10%.

Mezclar: Solución 1	100.0 ml
Solución 2	0.2 ml
Solución 3	1.66 ml
Glicerina	1.0 ml

Repartir en tubos con tapón de algodón y esterilizar en autoclave a 121°C - por 15 minutos.

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Reactivo de Kovac.

Alcohol amílico o isoamílico	150.0 ml
p-dimetil-amino-benzaldehído	10.0 grs
Ac. clohídrico concentrado	50.0 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol y se agrega lentamente el ácido.

Solución de rojo de metilo.

Rojo de metilo	0.1 g
Etanol al 95%	300.0 ml

Disolver el rojo de metilo en el alcohol.

Reactivo para la prueba de Voges-Proskauer

Sol A:

Alfa-naftol	5.0 g
-------------	-------

Etanol 100.0 ml

Disolver el alfa-naftol en el alcohol.

Sol B:

Hidróxido de potasio 40.0 g

Agua destilada cbp 100.0 ml

Disolver el hidróxido de potasio en el agua.

Solución para la prueba de catalasa.

Agua oxigenada al 3%

Solución Yodo-Yodurada

Yodo 5.0 g

Yoduro de potasio 5.0 g

Agua destilada 20.0 ml

El yodo en cristales y el yoduro de potasio se trituran en un mortero y se disuelven en los 20 ml de agua.

Reactivo para fenil-alanina.

Cloruro férrico ($Fe Cl_3$) 10.0 g

Agua destilada cbp 100.0 ml

Disolver el cloruro férrico en el agua.

Reactivo para nitratos.

Reactivo A

Se disuelven 5.0 g de ácido sulfanílico en 1000 ml de ácido acético 5N.

Reactivo E

Se disuelven 5.0 g de dimetil-alfa-naftil-amina en 1000 ml de ácido acético 5 N.

Solución amortiguadora de fosfato monosódico 1 M pH=7.0

Fosfato monosódico hidratado 6.9 g

Hidróxido de sodio al 30% 3.0 ml

Agua destilada 50.0 ml

Disolver el fosfato monosódico en aproximadamente 45 ml de agua destilada, adicionar el hidróxido de sodio y ajustar a pH de 7; completar el volumen a 50 ml con agua destilada.

Reactivo de ONPG

O-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido 80.0 mg

Agua destilada 15.0 ml

Solución de fosfato monosódico 1 M pH=7 5.0 ml

Disolver el ONPG en agua destilada a 37°C y adicionar la solución de fosfato monosódico.

Indicador de Andrade.

Fucsina ácida 0.5 g

Agua destilada 100.0 ml

Hidróxido de sodio 1 N 15.0 ml

Mezclar perfectamente; debe quedar incoloro, si es necesario adicionar una o dos gotas de álcali. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

Solución amortiguadora de fosfatos pH=5 y pH=8.0

Solución 1: Fosfato disódico anhidro ($\text{Na}_2 \text{H PO}_4$). Disolver 9.4 g en agua destilada y llevar a un litro.

Solución 2: Fosfato monopotásico ($\text{KH}_2 \text{ PO}_4$). Disolver 9.0 g y aforar a 1 litro de agua destilada. Se mezclan ambas soluciones vol/vol y se ajusta el pH con solución diluida de Na OH o HCL.

Cristal Violeta.

Solución A: Cristal violeta 2.0 g

Alcohol etílico al 95% 20.0 ml

Solución B: Oxalato de amonio 0.8 g

Agua destilada 80.0 ml

Se mezclan las soluciones A y B; se almacena durante 24 hrs antes de usarse y finalmente se filtra en frasco obscuro.

Solución de lugol.

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

El yodo y el yoduro de potasio se pulverizan en un mortero y se disuelven en el agua; se guarda en frasco ámbar.

Solución alcohol-acetona.

Alcohol etílico al 95%	100.0 ml
Acetona	100.0 ml

Se mezclan los dos reactivos.

Safranina

Solución concentrada:

Alcohol etílico al 95%	100.0 ml
Safranina	2.5 g

Solución de trabajo:

Solución concentrada	10.0 ml
Agua destilada	90.0 ml

Se mezclan ambas solución de trabajo y el agua.

Solución de cloranfenicol.

Cloranfenicol G.P.	25.0 mg
Etanol	5.0 ml

Disolver el antibiótico en un matraz y aforar a 25 ml con caldo de Mueller Hinton estéril; esta solución tiene una concentración de 1000 Mg por mililitro.

Solución de Estreptomina

Estreptomina G.P.	25.0 mg
-------------------	---------

Agua destilada estéril cbp 25.0 ml

Esta solución tiene una concentración de 1000 microgramos por mililitro.

Solución de tetraciclina.

Tetraciclina Q.P. 25.0 mg

Acido clorhídrico 1N 5.0 ml

Disolver en el ácido y completar a 25 ml con solución amortiguadora de fosfatos pH=5; esta solución tiene una concentración de 1000 microgramos por ml.

Solución de ampicilina.

Ampicilina G.P. 12.5 mg

Solución amortiguadora de fosfatos pH=8 cbp 25 ml. Esta solución tiene una concentración de 500 microgramos por mililitro.

Solución de gentamicina.

Gentamicina G.P. 12.5 mg

Solución amortiguadora de fosfatos pH=8 25.0 ml

Esta solución tiene una concentración de 500 microgramos por mililitro.

Solución de kanamicina.

Kanamicina G.P. 12.5 mg

Solución amortiguadora de fosfatos pH=8 25.0 ml

Esta solución tiene una concentración de 500 microgramos por mililitro.

Discos taxo N (B.B.L. 31044)

Sueros comerciales para la determinación de antígenos:

Suero anti-Salmonella polivalente O

Suero anti-Salmonella O grupo A, B, C₁, C₂, D, E, Vi, F, G, H, I.