

2 E. No. 27



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINAS
Y SU IMPORTANCIA COMO AGENTES CAUSANTES DE
DIARREA.**

T E S I S

FERNANDO DIAZ GUTIERREZ

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

	INDICE	pag.
INTRODUCCION		1
A.- GENERALIDADES		3
A.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS		3
A.2.- AGENTES ETIOLOGICOS		4
A.3.- MICROORGANISMOS PERTENECIENTES A LA FLORA NORMAL Y SU POSIBLE ASOCIACION CON LA DIARREA		7
A.3.1.- <i>Klebsiella</i>		7
A.3.2.- <i>Enterobacter</i>		8
A.3.3.- <i>Proteus</i>		9
A.4.- MECANISMOS DE ACCION DE LAS ENTEROTOXINAS		11
A.5.- METODOS UTILIZADOS PARA LA DETECCION DE ENTEROTOXINAS		13
A.6.- ANTIMICROBIANOS		15
A.7.- RESISTOTIPOS		16

	pag.
B.- PARTE EXPERIMENTAL	19
B.1. MATERIAL	19
B.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	19
B.1.1.1.- MUESTRAS CLÍNICAS	19
B.1.1.2.- ANIMALES	19
B.1.2.- MEDIOS DE CULTIVO	19
B.1.3.- PRODUCTOS QUÍMICOS ORGÁNICOS E INORGÁNICOS	20
B.1.3.1.- CARBOHIDRATOS	20
B.1.3.2.- AMINOÁCIDOS	20
B.1.3.3.- ANTIMICROBIANOS	20
B.1.3.4.- PRODUCTOS QUÍMICOS PARA RESISTOTIPOS	21
B.1.3.5.- REACTIVOS VARIOS	21
B.1.4.- VIDRIERIA	22
B.1.5.- EQUIPO	22

	pag.
B.2.- METODOS	25
B.2.1.- TOMA DE PRODUCTOS Y AISLAMIENTO	25
B.2.2.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA PRE- LIMINAR	25
B.2.3.- CARACTERIZACION DE CEPAS ENTERO- TOXIGENICAS	25
B.2.3.1.- OBTENCION DEL FILTRADO	25
B.2.3.2.- PRUEBA DE ASA LIGADA EN ILEON DE CONEJO	26
B.2.4.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA DEFINITIVA	27
B.2.5.- SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICRO- BIANOS	28
B.2.6.- RESISTENCIA A DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS (RESISTOTIPOS)	29
B.2.7.- ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA	30
C.- RESULTADOS	34
D.- DISCUSION DE RESULTADOS	51
E.- CONCLUSIONES	56
ANEXO	59
F.- BIBLIOGRAFIA	63

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

- I METODOS PARA DETECCION DE ENTEROTOXINAS
- II ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*
- II-A ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*
(continuación)
- III ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA EN CEPAS DE *Proteus sp*
- IV ENTEROBACTERIAS DIFERENTES *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA AISLADAS DE 25 COPROCULTIVOS
- V NUMERO Y PORCIENTO DE ESPECIES DE *Klebsiella* Y *Proteus* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA
- VI PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA CARACTERIZACION DE ESPECIE DE *Proteus* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA
- VII PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA CARACTERIZACION DE ESPECIE DE *Klebsiella* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA
- VIII PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Klebsiella* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA ESTABLECIENDO SU CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
- IX SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Proteus* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA ESTABLECIENDO SU CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
- X PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE *Klebsiella* ENTEROTOXIGENICAS INHIBIDAS POR DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Tabla

- XI PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE *Proteus* ENTEROTOXIGENICAS INHIBIDAS POR DIFERENTES ANTIMICROBIANOS
- XII RESISTENCIA DE *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS
- XIII CAPACIDAD DE RESISTENCIA A DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS (ORGANICOS E INORGANICOS) DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE *Klebsiella* (Resistotipos)
- XIV CAPACIDAD DE RESISTENCIA A DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS (ORGANICOS E INORGANICOS) DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE *Proteus* (Resistotipos)
- XV ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINA EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus*

Figuras

- 1 PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE *Klebsiella* ENTEROTOXIGENICAS INHIBIDAS POR DIFERENTES ANTIMICROBIANOS
- 2 PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE *Proteus* ENTEROTOXIGENICAS INHIBIDAS POR DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

INTRODUCCION

A pesar de los progresos logrados en el tratamiento de las enfermedades diarreicas agudas, dichas afecciones continúan siendo importante problema de salud pública en los países en desarrollo y la causa más frecuente de muerte en los lactantes.

Durante la última década, el conocimiento de la existencia de cepas de enterobacterias productoras de enterotoxinas ha venido a aclarar un poco el panorama relacionado con el diagnóstico etiológico de las diarreas.

Las enterobacterias constituyen gran parte de la flora habitual del intestino; se consideraba que los microorganismos en este sitio, generalmente no provocaban enfermedad y solo contribuían al funcionamiento normal y a la nutrición del huésped. Estas bacterias sólo se consideraban patógenas cuando alcanzaban tejidos fuera del intestino, particularmente de vías urinarias, vías biliares, pulmones, peritoneo o meninges, provocando inflamaciones en dichos sitios.

Los agentes causales de diarrea más importantes hasta ahora reportados son : *Escherichia coli* enterotoxigénica (como el causante más común), *Salmonella* , *Shigella* , *Vibrio cholerae* , *Vibrio parahaemolyticus* , *Campylobacter fetus* ss *jejuni* , *Clostridium difficile* , *Staphylococcus aureus* , *Yersinia enterocolitica* , *Giardia lamblia* , *Balantidium coli* , *Entamoeba histolytica* , *Rotavirus* , *Norwalk virus* y *Adenovirus* (9,15,20,26,33)

Además de *Escherichia coli* enterotoxigénica, se ha observado que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son capaces de ocasionar diarrea por la acción de enterotoxinas ; tal es el caso de *Klebsiella pneumoniae* que produce una enterotoxina termoestable que induce la hipersecreción de líquidos y de electrolitos al interior de la luz del intestino delgado provocando diarrea (17). Al parecer esta enterotoxina tiene propiedades muy semejantes a la enterotoxina termoestable de *Escherichia coli* , la cual se halla bajo el control genético de un grupo heterogéneo de plásmidos (34) . Esta condición permite suponer la posibilidad de que dichos plásmidos pudieran ser transferidos a diferentes géneros de enterobacterias.

El presente estudio pretende poner de manifiesto la importancia de algunas enterobacterias consideradas como flora habitual del intestino, como posibles productoras de enterotoxinas.

Con lo anteriormente dicho, se pretende encaminar la atención hacia este grupo de bacterias como agentes etiológicos de diarreas que pueden estar incrementando el porcentaje de morbilidad y mortalidad en niños, provocado por este padecimiento.

A.- GENERALIDADES

A.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS

El término diarrea es un vocablo médico que deriva del latín *diarrhoea* 'y éste a su vez lo es del griego ; el significado es 'fluir a través' y conforme al diccionario médico se define como evacuación intestinal frecuente, líquida y abundante. (15)

Los primeros agentes etiológicos fueron conocidos desde el siglo pasado a partir de la era pasteuriana ; Lösch demostró la presencia de *Entamoeba histolytica* en enfermos con disentería ; en 1883 Roberto Koch encontró los trofozoitos en la pared intestinal de enfermos con disentería y en el hígado de individuos con absceso hepático y un año después reportó el hallazgo de *Vibrio cholerae* en individuos con diarrea.

Salmon y Theobald Smith, en 1885, descubrieron el primer microorganismo del grupo de las salmonelas, *Salmonella cholerae-suis* , causante de enteritis tanto en el cerdo como en el hombre ; pero no fue sino hasta 1940 cuando se reconoció la importancia de esta enfermedad en los niños, debido a los trabajos de Hormaeche en Uruguay.

Entre 1898 y 1901, Shiga en el Japón, Flexner en las Filipinas y Kruse en Alemania, demostraron el papel de *Shigella* en las diarreas y disentería. Ewing, por su parte, integró más tarde un esquema serológico que comprendía alrededor de 40 serotipos de *Shigella* .(15,26)

Escherichia coli , el microorganismo aerobio más común del intestino del hombre y de los animales, fue descubierto por Escherich en 1885, durante sus investigaciones sobre la composición de la flora bacteriana normal del niño recién nacido. (15,26)

Aunque su participación en las diarreas se sospechó desde el siglo pasado, no fue sino hasta 1945 cuando investigadores ingleses demostraron, en forma concluyente, su papel en la diarrea epidémica del recién nacido. El esquema serológico de Kauffmann permitió aclarar que las primeras cepas descritas de *Escherichia coli* enteropatógena correspondían a los serotipos O11:B4 [K58] y O55:B5 [K59].

En el año de 1946, independientemente de los investigadores ingleses, en el Hospital Infantil de México, Varela , Aguirre y Carrillo, aislaron la cepa de *Escherichia* enteropatógena conocida como Coli-Gómez, la que posteriormente se encontraría que corresponde al serotipo O11:B4 [K58]. (15)

A.2.- AGENTES ETIOLOGICOS

En la etiología de las enfermedades diarreicas interviene una amplia variedad de agentes causales entre los que se incluyen : bacterias, virus, protozoarios, helmintos y hongos.

Existe un grupo de agentes etiológicos considerados como clásicos, constituido por : *Shigella* , *Salmonella* , *Giardia lamblia* , *Entamoeba histolytica* (en la actualidad la participación de ellos en la etiología del padecimiento se encuentra bien determinada) , *Vibrio cholerae* , cuya acción se ve confinada a ciertas áreas geográficas y *Escherichia coli* , la cual ha adquirido gran importancia en la etiopatogenia de este padecimiento, debido a que se le reconocen diferentes mecanismos por los cuales puede producir infecciones del tracto gastrointestinal y como consecuencia diarrea ; estos mecanismos han permitido agrupar a esta bacteria en : enteropatógena, enterotóxigena y enteroinvasiva (15,20,26).

Los virus también se han relacionado en forma importante en la etiología de las diarreas, señalándose como los de mayor relevancia a los *Rotavirus*, agentes inductores de diarrea en niños menores de 5 años ; los virus *Norwalk* que originan brotes limitados de gastroenteritis aguda , y los *Adenovirus* (26).

Recientemente se ha reconocido la participación de otros agentes en la etiología de las disrreas ; son de particular importancia : *Campylobacter fetus ss jejuni* , *Yersinia enterocolitica* , *Vibrio parahaemolyticus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Clostridium difficile* y un protozooario *Balantidium coli* (15,21 26).

Otras bacterias como *Staphylococcus aureus* , *Clostridium perfringens* , *Bacillus cereus* , entre otros, se han relacionado con la etiología de este padecimiento, pero presentando una epidemiología y mecanismo de agresión distinto, ya que producen intoxicaciones por la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxinas elaboradas por estas bacterias y no por colonización del tracto intestinal como es el caso de las anteriormente mencionadas (15).

A pesar de los avances logrados en el esclarecimiento de la etiología de las gastroenteritis, y aun con el empleo de sofisticadas técnicas de diagnóstico, queda cierta proporción de casos en los que no se establece al agente causal del padecimiento.

A.3.- MICROORGANISMOS PERTENECIENTES A LA FLORA NORMAL Y SU POSIBLE ASOCIACION CON LA DIARREA.

Durante los últimos años se ha reconocido la participación de otras bacterias pertenecientes a la flora habitual del intestino, diferentes a *Escherichia coli*, como posibles responsables de cuadros diarreicos; entre estos se mencionan a *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus sp* (17,18,20). La implicación de ellas como posibles agentes etiológicos de cuadros diarreicos se ve afectada por el hecho de que, al formar parte de la flora normal del intestino, su número en las evacuaciones, de manera habitual, es casi siempre elevado, motivo por el cual cuando son aislados en un coprocultivo, no se consideran como los agentes causales del padecimiento.

A.3.1.- *Klebsiella*

El género *Klebsiella* está compuesto por bacterias no móviles pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y a la tribu *Klebsiellae*; dentro de este grupo son reconocidas cuatro especies: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoschleromatis* y *K. oxytoca* (22).

Klebsiellae pneumoniae se considera el patógeno más importante para la especie humana de todos los que constituyen el género *Klebsiella*. Es un microorganismo capsulado que produce colonias húmedas de gran tamaño, con aspecto

mucoide. Se encuentra en el aparato respiratorio y en las heces en un 5 a un 10 por ciento de individuos sanos.

No obstante que se ha reconocido cierta asociación de esta bacteria con cuadros de diarrea aguda en niños, a *Klebsiella* sólo se le considera patógeno cuando se localiza fuera de su hábitat natural.

Sin embargo, en 1975 en Puerto Rico y Haití, fueron aisladas cepas de *Klebsiella pneumoniae* del yeyuno de pacientes con sprue tropical. En estas bacterias se demostró la capacidad para la elaboración de una enterotoxina que inducía la secreción de agua y electrolitos, impidiendo la absorción de xilosa y mostrando anomalías estructurales en la mucosa intestinal, según experimentos realizados en diferentes modelos animales (17).

Actualmente se conoce que *Klebsiella pneumoniae* produce una enterotoxina termoestable [TE] con un peso molecular de aproximadamente 5,000 daltons (17). Su mecanismo de acción al parecer, es similar al de la toxina termoestable de *Escherichia coli*.

A.3.2.- *Enterobacter*

El género *Enterobacter* está compuesto de bacterias móviles pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y a la tribu *Klebsiellae*.

Los microorganismos del género *Enterobacter* se encuentran en el suelo, en los productos lácteos, en el agua, en las cloacas y en el conducto intestinal del hombre y de otros animales. Generalmente, estos microorganismos son considerados como patógenos secundarios, como oportunistas o como comensales. La especie típica es *Enterobacter cloacae*. (4,5,7,15,16,25)

Algunas cepas de *Enterobacter cloacae* son capaces de elaborar una enterotoxina termoestable que tiene aproximadamente el mismo peso molecular y características similares a las enterotoxinas termoestables producidas por algunas cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (18).

A.3.3.- *Proteus*

El género *Proteus* está compuesto de bacilos móviles pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y a la tribu *Proteeae*.

Cuatro especies son las que constituyen este género ; *P. mirabilis* , *P. vulgaris* , *P. rettgeri* [actualmente biogrupo 1-4 *Providencia rettgeri* , biogrupo 5 *P. stuarti*] y *P. morgani* [*Morganella morgani*]. (4,22)

Estos microorganismos se encuentran con frecuencia en el suelo, en las cloacas, en el estiércol y en las heces humanas normales, especialmente en caso de que el individuo esté en tratamiento con antibióticos o que sufra un proceso diarreico producido por otros microorganismos. (4,5,7,15,16,26)

Proteus producen con frecuencia enfermedades del tracto urinario e intervienen frecuentemente en otras enfermedades graves.

A.4.- MECANISMO DE ACCION DE LAS ENTEROTOXINAS TERMOESTABLE Y TERMOLABIL.

Aun cuando no ha sido plenamente establecido el mecanismo de acción y las propiedades químicas de las enterotoxinas producidas por algunas enterobacterias consideradas como flora habitual del intestino, se sabe que muestran gran similitud con la enterotoxina termoestable de *Escherichia coli* (17,18).

Escherichia coli es capaz de sintetizar dos tipos de enterotoxinas, una termolábil [TL] de alto peso molecular y otra termoestable [TE] de bajo peso molecular.

La toxina termolábil tiene un peso molecular aproximado de 100,000 daltons, su mecanismo de acción aparentemente es similar al de la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (2). Es de naturaleza proteica, se inactiva bajo la acción del calor [60°C] y los ácidos. Es antigénica (11, 15,33).

La toxina termoestable o termorresistente [TE] es de bajo peso molecular, de 1,400 a 10,000 daltons, es un polipéptido resistente al ácido y al calor, soporta temperaturas hasta de 100°C. A dosis bajas su acción es más rápida, pero de duración más corta (15). Está constituida de lípidos [83%] y proteínas [15%], con capacidad inmunogénica pobre (29,33).

MECANISMO DE ACCION

La toxina termolábil se fija a los gangliósidos GM_1 en el borde de cepillo de las células epiteliales del intestino delgado, provocando la estimulación de la adenilato ciclasa, la que a su vez induce un incremento en los niveles intracelulares de adenosín 3' 5' monofosfato cíclico [AMPc]. Este mediador provoca alteraciones profundas en los mecanismos de transporte de agua y electrolitos, dando origen a la pérdida de agua y de cloruros a través de la pared intestinal inhibiendo la reabsorción de sodio, mecanismo que propicia la salida masiva de los mismos a la luz del intestino (11,31).

Durante el proceso, las bacterias que elaboran la toxina se multiplican activamente en el intestino delgado. Los volúmenes de secreción originados en el intestino llegan a ser tan grandes, que sobrepasan la capacidad de absorción del colon, produciéndose la diarrea.

El mecanismo de acción de la toxina termoestable no es conocido con precisión, su forma de actuar es distinto al de la toxina termolábil. No se une al gangliósido GM_1 ; se sabe que es capaz de activar el sistema de la guanilato ciclasa induciendo un incremento en la concentración de guanosín 3' 5' monofosfato cíclico [GMPc], lo que provoca una secreción masiva de líquido y electrolitos al interior de la luz del intestino delgado, causando diarrea (11, 30).

El cuadro clínico que origina la toxina termoestable es semejante al de la toxina termolábil aunque posiblemente más benigno y de duración más corta, al igual que su período de incubación.

A.5.- METODOS UTILIZADOS PARA LA DETECCION DE ENTEROTOXINAS.

Ante la inexistencia de marcadores bioquímicos y características serológicas que singularicen a las cepas enterotoxigénicas, se han empleado para su identificación una variedad de métodos enfocados, exclusivamente, a averiguar la acción de las enterotoxinas sobre diferentes modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos métodos se describen en la página siguiente [tabla I].

Tabla I

METODOS PARA DETECCION DE ENTEROTOXINAS

prueba	toxinas	
	TL	TE
Modelos animales :		
Conejo, asas ligadas (ileon)	+ *	+ **
Conejo recién nacido (intragástrica)	+	+
Conejo intradérmica	+	-
Ratón recién nacido (intragástrica)	-	+
Rata, perfusión <u>in vivo</u> (yeyuno)	+	+
Cultivo de tejidos :		
Y 1 (tumor adrenales ratón)	+	-
CHO (ovario hamster chino)	+	-
VERO (riñon mono verde africano)	+	-
Serodiagnóstico :		
Inmunohemólisis pasiva	+	-
Inhibición de la inmunohemólisis	+	-
RIA (radio inmuno ensayo)	+	-
ELISA (inmunoabsorbencia enzimática)	+	-

TL = termolábil

TE = termoestable

* resultado observado a las 18 horas.

** resultado observado a las 6 horas.

A.6.- ANTIMICROBIANOS

El uso indiscriminado que se le ha dado a los antimicrobianos en las últimas décadas, ha provocado un incremento en el número de cepas resistentes, debido a la selección que se realiza de estas bacterias.

Se ha observado que la resistencia múltiple a los fármacos está condicionada por el intercambio de material genético entre las bacterias, el cual se puede efectuar por diferentes mecanismos como son : Conjugación, Transducción y Transformación. (5,16)

El empleo de agentes antimicrobianos en niños se ha justificado por algunos autores con el propósito de limitar o impedir el crecimiento de las bacterias patógenas ; sin embargo, cuando la administración de estos productos se realiza sin la identificación del agente causal del padecimiento, su uso implica graves riesgos.

Existen diferentes métodos que nos permiten determinar la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos : entre los más importantes están las pruebas de dilución en medios líquidos o sólidos y el método de difusión en placa utilizando discos de papel filtro impregnados con el antibiótico [Kirby-Bauer].(5,12,13,23,26)

Un procedimiento de gran utilidad es el método de dilución en placa utilizando para su realización un replicador de Steers, el cual cuenta con varias ventajas sobre otros métodos , tales como :

- a) probar hasta 32 cepas diferentes por placa.
- b) poder efectuar un control de la potencia y concentración de los antimicrobianos empleados.
- c) observar la posible presencia de contaminación, y
- d) los resultados son reproducibles en un 95 por ciento de los casos.

Todas estas ventajas lo convierten en un método práctico, confiable y rápido.

A.7.- RESISTOTIPOS

La Resistotipia es un método que fue descrito por vez primera por Elek y Higney en 1970 ; el principio en el que se basa consiste en la diferenciación de cepas bacterianas por el grado de resistencia o susceptibilidad a la acción de diferentes sustancias químicas [orgánicas e inorgánicas].

Este método se ha utilizado en cepas de *Escherichia coli* de enfermedades en tracto urinario, mostrando correlación de resultados a los obtenidos utilizando la tipificación serológica (8). Asimismo, también se ha empleado para la caracterización de *Staphylococcus aureus*.

El uso de este tipo de procedimientos para la caracterización de diferentes especies bacterianas se ha venido discutiendo en virtud de que no todos los laboratorios cuentan con recursos para practicar la tipificación serológica y fágica de los microorganismos.

Por otro lado, se ha observado cierta relación entre la capacidad de resistencia a antimicrobianos y capacidad de elaborar enterotoxinas. Esto debido probablemente a que estas propiedades están asociadas con la presencia de material genético extracromosómico, por lo que de existir correlación, se podrían tener procedimientos accesibles a casi cualquier laboratorio para sospechar si una bacteria es capaz de elaborar enterotoxinas cuando se ha aislado de un paciente con un cuadro clínico diarreico.

OBJETIVOS

Los objetivos que se persiguen con la parte experimental del presente trabajo son los siguientes :

- A) Aislamiento y caracterización de cepas de enterobacterias productoras de enterotoxinas diferentes a *Escherichia coli* para establecer la frecuencia con la cual se pueden aislar a partir de coprocultivos.
- B) Estudio de la susceptibilidad frente a los antimicrobianos de las cepas enterotoxigénicas aisladas.
- C) Estudio de la resistencia a diversos productos químicos orgánicos e inorgánicos [Resistotipos] de las cepas enterotoxigénicas aisladas.

B.- PARTE EXPERIMENTAL**B.1.- MATERIAL****B.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO****B.1.1.1.- Muestras Clínicas**

Coprocultivos provenientes de niños con cuadro clínico diarreico [Clínica # 32 del Instituto Mexicano del Seguro Social].

B.1.1.2.- Animales

Conejos Nueva Zelanda blancos de 2.5 a 3.0 kilogramos [proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina U.N.A.M.].

B.1.2.- MEDIOS DE CULTIVO

Agar-agar (Merck)
Agar cerebro corazón (Difco)
Agar citrato de Simmons (Merck)
Agar eosina azul de metileno EMB (Merck)
Agar Kligler (Merck)
Agar Mueller Hinton (Merck)
Agar Salmonella-Shigella (Difco)
Bacto peptona (Merck)
Base de agar urea Christensen (Merck)
Caldo infusión cerebro corazón (Difco)
Caldo MR-VP (Merck)
Caldo Mueller Hinton (BBL)
Caldo soya triptícasea (BBL)

Caldo urea (Merck)
 Casaaminoácidos (Difco)
 Casein peptona-peptona de harina de soya (Merck)
 Extracto de carne (Difco)
 Extracto de levadura (Difco)
 Medio base caldo de Moeller descarboxilasa (Difco)
 Medio base caldo rojo de fenol (Difco)
 Medio de SIM (Merck)
 Medio para antibióticos # 2 (Bioxon)
 Peptona de caseína (Difco)
 Peptona de harina de soya (Merck)
 Soya tripticasa agar (BBL)

B.1.3.- PRODUCTOS QUIMICOS ORGANICOS E INORGANICOS

B.1.3.1.- Carbohidratos

Dulcitol (Merck)
 Lactosa (Merck)
 D (+) Rafinosa (Sigma chemical Co.)
 α-L-Ramnosa (Sigma chemical Co.)
 Sacarosa (Merck)

B.1.3.2.- Aminoácidos

L-Arginina (Merck)
 L (+) Lisina HCl (Merck)
 L- Ornitina HCl (Merck)

B.1.3.3.- Antimicrobianos

Acido nalidixico	(Sidney Ross)	
Amikacina	(Mead-Johnson)	lote FDA 05
Ampicilina	(Sanfer)	121679
Carbencilina	(Sanfer)	934036
Cefalosporina	(Abbot)	15890 ARM
Cloramfenicol	(Park Davis)	79132
Estreptomycin	(Wyeth-Vales)	680277
Gentamicina	(Scheramex)	
Kanamicina	(Bristol)	EB 306
Lincomicina	(Upjohn)	MX 91

Polimixina	(Lab. Dr. Zapata) lote 143010
Rifampicina	
Tetraciclina	(Sigma chem. Co.)
Tobramicina	(Ely-Lilly)
TMP /SZ	(Roche)

B.1.3.4.- Productos Químicos para Resistotipos

Acetato de cadmio (J.T. Baker)
Acido bórico (Merck)
Arsenato de sodio (Merck)
m-amino fenol (Eastman Organic Chemicals)
p-amino fenol (Eastman Organic Chemicals)
Cloruro de cetilpiridinio (Cepacol, Merrel)
Fucsina básica (Merck)
Metabisulfito potásico (Merck)
Nitrato de plomo (J.T. Baker)
Sulfato de cobre (Merck)
Verde de malaquita (Merck)

B.1.3.5.- Reactivos varios

Acido clorhídrico (Merck)
Alfa naftol (J.T. Baker)
Citrato de amonio férrico (Merck)
Cloroformo (J.T. Baker)
Esculina (Merck)
p-dimetil amino benzaldehido
Etanol (J.T. Baker)
Eter de petróleo (J.T. Baker)
Fosfato ácidodipotásico $3.H_2O$ (Merck)
Metanol (J.T. Baker)
Hidróxido de sodio (Merck)
Hidróxido de potasio (Merck)
Reactivo de Ehrlich
Cloruro de sodio (Merck)

B.1.4.- VIDRIERIA

Vaso de precipitado de 20, 100, 600 y 1000 ml (Pyrex)
 Probeta graduada de 50, 100 y 1000 ml (Pyrex)
 Caja Petri de 100x20 (Pyrex)
 Matraz de ebullición de 1000 ml (Pyrex)
 Matraz erlenmeyer grad. de 250 y 500 ml (Pyrex)
 Matraz volumétrico de 1000 ml (Pyrex)
 Pipeta serológica de 1/10x1/100, 1x1/10, 1x1/100
 5x1/10 y 10x1/10 (Pyrex)
 Tubo de cultivo de 13x100, 16x150 y 22x175 (Pyrex)

B.1.5.- EQUIPO

Agitadora con regulador de temperatura (Scientific
 Precision)
 Agitador vortex mod. R-90 (Lab-Line Instruments)
 Asa bacteriológica de nicromel
 Balanza analítica mod. H 35 AR (Mettler)
 Balanza granataria, doble plato capac. 2 kg
 mod. 1510 D (Ohaus)
 Baño giratorio mod. G 76 (New Brunswick Scientific)
 Centrifuga de 5,200 rpm mod. K 7165 (Damon/IEC
 Division)
 Caja Petri desechable de 100x20 (Inds. Tecnicare)
 Estufa
 Estuche de disección
 Fotocolorímetro mod. 800-3 (Klett-Summerson)
 Gradilla de alambre
 Jarra para cultivo anaerobio Gas Pak (BBL)
 Jeringas desechables de 1.0, 5.0 y 10.0 ml (Pyrex)
 Mechero fischer
 Membrana de filtración de 0.45 μ m, 13mm ϕ y 47 mm ϕ
 HAWP (Millipore Corporation)
 Microscopio óptico (Carl Zeiss)
 Olla de presión de 20 lbs.

Papel "Parafilm"
Potenciómetro digital (Cole Parmer)
Pinzas Millipore mod. XX 620006 (Millipore Corporation)
Replicador de Steers
Tabla para operación de conejos
Tela de alambre con centro de asbesto
Tripié
Tubo para centrifuga grad. de 50 ml (Falcon)
Unidades de filtración swinnex de 13 mm ϕ y 47 mm ϕ
(Millipore Corporation)

**METODOLOGIA UTILIZADA
EN LA PARTE EXPERIMENTAL.**

I. TOMA DE PRODUCTOS
[Coprocultivos de pacientes
con cuadro clínico diarreico]

**II. AISLAMIENTO EN MEDIOS
DIFERENCIALES Y SELEC
TIVOS [EMB, SS]**

III. IDENTIFICACION PRELIMINAR
Caracterización de género
mediante INVIC.

**IV. CARACTERIZACION DE CEPAS
ENTEROTOXIGENICAS POR EL
METODO DE ASA LIGADA EN
CONEJO**

V. IDENTIFICACION DEFINITIVA
Caracterización de especie
mediante pruebas bioquímicas.

**VI. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD
A LOS ANTIMICROBIANOS**

**VII. PRUEBAS DE RESISTENCIA
A DIFERENTES PRODUCTOS
QUIMICOS**

**VIII. ESTUDIO DE CONDICIONES
OPTIMAS PARA LA PRODUC
CION DE ENTEROTOXINA**

B.2.- METODOS

B.2.1.- TOMA DE PRODUCTOS Y AISLAMIENTO

Se trabajó con muestras de coprocultivos de pacientes que presentaban un cuadro clínico diarreico. Para su aislamiento, se sembraron un promedio de 3 a 6 colonias por coprocultivo en medios diferenciales y selectivos [EMB y SS].

B.2.2.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA PRELIMINAR

Con las colonias aisladas se procedió a la identificación preliminar del género mediante pruebas bioquímicas utilizando los medios de IMViC [indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato] , SIM [sulfhídrico, indol y movilidad] y Kligler.

Para su uso posterior las cepas aisladas e identificadas se guardaron en medio para conservación (ver Anexo).

B.2.3.- CARACTERIZACION DE CEPAS ENTEROTOXIGENICAS

B.2.3.1.- Obtención del filtrado

Las bacterias en estudio se sembraron en el medio de EMB durante 24 horas a 37°C. El crecimiento fue en condiciones aerobias utilizando tubos con 10.0 ml de caldo soya triplicasa, incubándose durante toda una noche a 37°C.

De cada cultivo se tomaron 0.5 o 1.0 ml inoculándose en matraces erlenmeyer de 250 y 500 ml que contenían 25 y 50 ml de caldo soya tripticasa respectivamente.

Los matraces se incubaron en baño con agitación a 37°C durante 18-24 horas. El cultivo obtenido se centrifugó a 3,500 rpm durante 60 minutos para el caso de *Klebsiella*, o 45 minutos en el caso de *Proteus*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. El sobrenadante obtenido se pasó a través de filtros Millipore de 47 mm ϕ adaptados con membranas de 0.45 μ m HAWP, obteniéndose así el filtrado.

B.2.3.2.- PRUEBA DE ASA LIGADA EN ILEON DE CONEJO

Se utilizó para la determinación de enterotoxigenicidad, el método de asa ligada en conejo.

Se emplearon conejos de la cepa Nueva Zelanda con un peso aproximado de 2 a 3 kg. Se practicó la anestesia por vía endovenosa administrando pentotal sódico a una dosis de 3 mg/Kg, y se mantuvo con éter etílico por inhalación. La asepsia de la región abdominal se realizó con alquil dimetil bencil amonio [Zolvacsol]. Mediante bisturí provisto de hoja # 22 se practica una incisión de aproximadamente 5 centímetros de longitud a nivel de la línea media, que abarca piel y tejido celular subcutáneo.

Una vez localizada la capa muscular, se corta con tijeras para dejar expuesta la cavidad peritoneal. Se extrae el intestino delgado, se localiza la válvula ileocecal y 7 cm por arriba de ésta, se practica una ligadura utilizando seda (00) ; a partir de ella se realizan nuevas ligaduras en ileon y yeyuno dejando un espacio de 10 cm de longitud y de 3 cm entre ellas.

En cada conejo se hicieron de 10 a 12 segmentos de 10 cms inoculándose a cada una de estas porciones 2.0 ml del filtrado de un cultivo de la cepa en estudio o 1.0 ml de cultivo puro, empleándose como control positivo el filtrado de una cepa enterotoxigénica conocida y como control negativo el medio de cultivo estéril. Una vez inoculados todos los segmentos del intestino se procede a cerrar por planos.

El conejo se mantuvo hidratado, en reposo y a una temperatura de 25 a 30°C durante un período de 18 horas, al término del cual y previo sacrificio, se reabrió la cavidad abdominal y se observaron los resultados. Se considera la prueba positiva cuando el acúmulo de líquido en el segmento del intestino tiene una relación longitud/volumen de 0.5 a 1.0 cms/ 1.0 c.c. , teniendo en cuenta que el control positivo y negativo dieran el resultado esperado.

B.2.4.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA DEFINITIVA

La caracterización de especie se practicó a las cepas que dieron positiva la prueba de asa ligada en ileon de conejo, utilizando las siguientes pruebas bioquímicas :

indol, ácido sulfhídrico, ureasa, rojo de metilo, acetoina, citrato de Simmons, movilidad, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, glucosa, lactosa, sacarosa, dulcitol, rafinosa, ramnosa y esculina [tabla VI y VII]
Se siguió la metodología señalada por Edwards y Ewing (7).

B.2.5.- SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Se realizó la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas que dieron positiva la prueba de enterotoxigenicidad, así como a 4 cepas que resultaron negativas, utilizando 13 diferentes antimicrobianos de uso común sugeridos por el National Committe for Clinical Laboratory Standards [NCCLS] (25).

Se utilizó el método de dilución en placa con agar Mueller Hinton realizándose la inoculación con el replicador de Steers.

Las cepas problema fueron sembradas en agar EMB 24 horas a 37 °C con el objeto de contar con colonias aisladas y puras, creciéndose posteriormente en tubos con 5 ml de caldo Mueller Hinton durante 18 horas a 37°C. Se colocó 1.0 ml de cada cultivivo en los pozos de la placa del replicador y se procedió a inocular las cajas que se prepararon con 20 ml de medio y 1.0 ml del antibiótico en cuestión. En el caso de *Proteus* se utilizó el medio con una concentración 0.5% mayor de agar, con el objeto de eliminar el efecto indeseable del "swarming".

Las diluciones seriadas empleadas para los antimicrobianos fueron de 0.125 a 256.0 $\mu\text{g/ml}$ utilizándose 12 diluciones para cada antibiótico. Se sembraron placas sin antibiótico para probar la pureza del cultivo y su viabilidad. La lectura se hizo después de 16-18 horas de incubación a 35°C.

La concentración mínima inhibitoria [CMI] se determinó por la concentración del antibiótico en la primera placa que no mostró crecimiento.

La concentración inicial utilizada para todos los antimicrobianos fue de 100 mg. , excepto para gentamicina [214 mg] polimixina [200 mg] y tobramicina [119 mg].

Los antimicrobianos se disolvieron y/o suspendieron en 10 ml del disolvente apropiado teniendo una concentración inicial de 10 mg/ml. La preparación de las diluciones seriadas para los antimicrobianos se muestra en el anexo.

B.2.6.- RESISTENCIA A DIFERENTES PRODUCTOS QUIMICOS (RESISTOTIPOS)

A las cepas que dieron positiva la prueba de enterotoxigenicidad, se les estudio la capacidad de resistencia a 10 diferentes productos químicos [orgánicos e inorgánicos].

Se utilizó el método de dilución en placa con medio para antibióticos # 2. Las placas se prepararon con 27 ml del medio, adicionándoles 3 ml de la solución del producto químico a estudiar [Anexo].

Las cajas se sembraron con hisopos que contenían los microorganismos de prueba. El inóculo se preparó sembrando una asada de las cepas en tubos que contenían 1.0 ml de caldo BHI e incubándose durante 18 horas a 37°C. Terminado este tiempo se adiciona a cada tubo 9.0 ml de solución salina isotónica estéril para mantener una concentración de bacterias constante. Se sembró por estría recta en cada una de las cajas que contenían los diversos productos químicos, probando se 6 cepas en cada una de las placas, se incubaron durante 24 horas a 37°C ; pasado este tiempo se observaron los resultados [inhibición del desarrollo o crecimiento normal de la bacteria].

B.2.7.- ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS, EN CEPAS DE *Klebsiella* Y *Proteus*.

Se realizó el estudio con 2 cepas de *Klebsiella* y *Proteus* enterotoxigénicas, las cuales habían mostrado resultados positivos repetitivos mediante la prueba de asa ligada en conejo. Se empleó como control positivo una cepa enterotoxigénica conocida y como control negativo el medio de cultivo estéril.

Las condiciones empleadas para este estudio se describen en las tablas II , II-A y III.

Tabla II

ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION
DE ENTEROTOXINA EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*

condición	procedimiento empleado
A	Agitación con perlas de vidrio durante 2 horas, inmediata a la incubación con agitación [18-24 hrs., 37°C], utilizando además 1 ml de cultivo puro sin filtrar, para la inoculación en el <u>in</u> testino del conejo. *
B	Similar al punto "A" pero utilizando como inóculo en el conejo 1.0 ml del cultivo filtrado a través de membranas millipore de de 0.45 μ m HAWP. *
C	Similar al procedimiento descrito para la obtención del filtra <u>do</u> (B.2.3.1.) pero utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. *
D	Similar al procedimiento descrito para la obtención del filtra <u>do</u> (B.2.3.1.) utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo filtra <u>do</u> a través de membranas Millipore de 0.45 μ m HAWP. *
E	Incubación estacionaria con atmósfera de anaerobiosis (37°C , 18-24 hrs.) utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. *
F	Se añade 0.25 ml de polimixina a una concentración de 2.5 mg/ml / 25 ml de medio, durante las últimas 4 horas de incubación con agitación (37°C , 18-24 hrs.) , utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. *

condición	procedimiento empleado
G	Se añade lincomicina (90 mg/ml de medio) , durante las 4 horas finales de incubación con agitación (37°C , 18-24 hrs.) utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar . *
H	Agitación con perlas de vidrio durante 2 horas, inmediatas a la incubación con agitación (37°C, 18-24 hrs.). Se utilizó como medio de cultivo el CAAYE 2 y como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. **
I	Incubación estacionaria en atmósfera de anaerobiosis (37°C. 18-24 hrs.) , utilizando como medio de cultivo el CAAYE 2 y como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. **
J	Agitación con perlas de vidrio durante 2 horas, inmediatas a la incubación con agitación (37°C, 18-24 hrs.) , utilizando como medio de cultivo caldo soya tripticasa sustituyendo la glucosa por sacarosa y como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar.**
K	Incubación estacionaria (37°C, 18-24 hrs.) , utilizando como medio de cultivo caldo soya tripticasa sustituyendo la glucosa por sacarosa y como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar.**

* Se utilizó como medio de cultivo caldo soya tripticasa
 ** La cepa se desarrolló previamente en agar soya tripticasa 24 hrs. a 37°C

ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION
DE ENTEROTOXINA EN CEPAS DE *Proteus sp.*

condiciones	procedimiento empleado
L	Similar al procedimiento descrito en el punto B.2.3.1., utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo filtrado a través de membranas Millipore de 0.45 μ m HAWP. *
M	Similar al procedimiento descrito en el punto B.2.3.1. , utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. *
N	Se añade 0.25 ml de polimixina a una conc. de 2.5 mg/ml/25 ml de medio durante las 4 horas finales de incubación con agitación (37°C , 18-24 hrs.) , utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. *
O	Incubación estacionaria con atmósfera de anaerobiosis (37°C, 18-24 hrs.), utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. *
P	Se añade lincomicina, 90 μ g/ml de medio, durante las 4 hrs. finales de incubación con agitación (37°C , 18-24 hrs.) utilizando como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar.*
Q	Similar al procedimiento descrito en el punto B.2.3.1. , utilizando el medio de CAAYE 2 y como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar . **
R	Similar al procedimiento descrito en el punto B.2.3.1. , utilizando el medio de caldo soya tripticasa sustituyendo glucosa por sacarosa y como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar. ** .

* Se utilizó como medio de cultivo caldo soya tripticasa

** La cepa se desarrolló previamente en agar soya tripticasa 24 hrs a 37°C.

C.- RESULTADOS

Se estudiaron 25 coprocultivos de niños con cuadro clínico diarreico provenientes de la clínica # 32 del Instituto Mexicano del Seguro Social, aislados en un período comprendido de abril a julio de 1983. Mediante la prueba de IMVIC se procedió a identificar el género ; en 15/25 [60%] se aisló *Klebsiella* , 6/25 [24%] *Proteus* , 3/25 [12%] *Citrobacter* y 2/25 [8%] *Enterobacter* (tabla IV).

Para la caracterización de cepas productoras de enterotoxina se utilizó el método de asa ligada en conejo, mediante el cual se identificaron 17 cepas enterotoxigénicas, 11 de ellas pertenecientes al género *Klebsiella* y 6 al género *Proteus*. En uno de los coprocultivos se aisló tanto *Klebsiella* como *Proteus* resultando ambas productoras de enterotoxinas (tabla IV).

Mediante pruebas bioquímicas específicas se procedió a identificar la especie de las cepas enterotoxigénicas encontradas, obteniéndose 11 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 3 de *Proteus morganii*, 2 de *Proteus vulgaris* y 1 de *Proteus mirabilis* (tabla V).

Con las cepas enterotoxigénicas caracterizadas se realizó un estudio de susceptibilidad frente a 13 de los antimicrobianos de mayor uso clínico, estableciendo su concentración mínima inhibitoria y su relación de resistencia.

En el caso de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* se encontró un elevado porcentaje de resistencia para ampicilina , carbenicilina, cloramfenicol , rifampicina y cefalotina , la cual fue de 100 % y de un 84.6 % para trimetoprim y sulfametozazol [TMP/SZ].

Con el género *Proteus* se encontró también resistencia del 100 % para ampicilina, carbenicilina, cloramfenicol, rifampicina y trimetoprim/sulfametozazol .

La relación de resistencia o susceptibilidad la obtuvimos comparando los valores de corte con la concentración mínima inhibitoria obtenida para cada una de las cepas (tabla VII, IX y XII).

Otro estudio realizado consistió en conocer la capacidad de resistencia a 12 productos químicos orgánicos e inorgánicos [Resistotipos] ; las cepas de *Klebsiella* productoras de enterotoxina mostraron resistencia a todos los productos empleados, excepto para el m-amino fenol al 3.6% con el cual sólo se observó un 40% de resistencia y con el sulfato de cobre al 0.07% sólo el 70%. Con *Proteus* se obtuvo también 100% de resistencia con la mayoría de los productos, excepto con el m-amino fenol al 3.6% en donde sólo el 40 % de las cepas fueron sensibles y con el arsenato de sodio al 0.75 % y el ácido bórico al 3% con una sensibilidad de 80% en ambos casos (tabla XIII y XIV).

Con el objeto de buscar condiciones óptimas para la producción de enterotoxina en estas bacterias, se estudiaron diferentes variantes en cuanto a procedimientos físicos y medios de cultivo. Las condiciones con las que se obtuvieron resultados fueron, en el caso de *Klebsiella pneumoniae* a) agitación con perlas de vidrio durante 2 horas después de efectuar incubación [18-24 horas, 37°C] , utilizando el medio de caldo soya tripticasa y como inóculo 1.0 ml de cultivo puro sin filtrar ; b) incubación estacionaria en condiciones anaerobias [18-24 horas, 37°C] , utilizando el medio de caldo soya tripticasa y como inóculo 1.0 ml del cultivo puro sin filtrar.

Para *Proteus* se obtuvieron buenos resultados al adicionar polímixina al medio de cultivo utilizado [caldo soya tripticasa] (tabla XV).

En las tablas II, II-A y III se muestran las diferentes condiciones probadas.

Tabla IV

ENTEROBACTERIAS DIFERENTES A *Escherichia coli* PRODUCTORAS
DE ENTEROTOXINA AISLADAS DE 25 COPROCULTIVOS.

Género	# de cepas estudiadas	# de coprocultivos estudiados (%)	# de coprocultivos en que se aislaron cepas enterotoxigénicas (%)	cepas enterotoxigénicas aisladas de los coprocultivos
<i>Klebsiella</i>	82	* 15 / (60.0)	6 / 15 (40.0)	11
<i>Proteus</i>	31	* 6 / (24.0)	2 / 6 (33.3)	6
<i>Citrobacter</i>	12	3 / (12.0)	0	0
<i>Enterobacter</i>	9	2 / (8.0)	0	0
total :	134	* 26	8	17

* Se encontró en un mismo coprocultivo tanto *Klebsiella* como *Proteus* productoras de enterotoxina.

NUMERO Y PORCIENTO DE ESPECIES DE *Klebsiella*
Y *Proteus* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA.

Género	Especie	Cepas enterotoxigénicas	
		No.	(%)
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	11	(64.0)
<i>Proteus</i>	<i>morganii</i> *	3	(17.6)
<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i> *	2	(11.8)
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	1	(5.9)

* Se encontraron en un mismo coprocultivo dos especies diferentes de *Proteus* productoras de enterotoxina.

Tabla VI

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA CARACTERIZACION DE ESPECIE
DE *Proteus* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA.

cepa	prueba o sustrato															especie			
	ácido sulfhídrico	ureasa	índol	K ₃		citrato [Simmons]	movilidad	lisin descarboxilasa	arginina dihidrolasa	ornitina descarboxilasa	glucosa		lactosa	sacarosa	dulcitol		rafinosa	ramnosa	esculina
				rojo de metilo	acetofna [VP]						ácido	gas							
122	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>morganii</i>
123	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>morganii</i>
124	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>morganii</i>
131	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	<i>vulgaris</i>
138	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>vulgaris</i>
224	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>mirabilis</i>

Referencia : Edwards, P.R. and Ewing, W.H. ; Identification of Enterobacteriaceae (7) 1972.

Tabla VII

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA CARACTERIZACION DE ESPECIE
DE *Klebsiella* PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA.

cepa	prueba o sustrato														especie				
	ácido sulfhídrico	ureasa	indol	M-3		citrato [Simmons]	movilidad	lisin descarboxilasa	arginina dihidrolasa	ornitina descarboxilasa	glucosa		lactosa	sacarosa		dulcitol	rafinosa	ramnosa	esculina
				rojo de metilo	acetofina						ácido	gas							
32	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
33	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
37	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
39	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
81	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
102	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
103	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
104	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
145	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
159	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>
207	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>pneumoniae</i>

Referencia : Edwards, P.R and Ewing, W.H. :Identification of Enterobacteriaceae (7)
1972

Tabla VIII.

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Klebsiella*
PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA ESTABLECIENDO SU CONCENTRACION MINIMA
INHIBITORIA **

cepa	sc. nalidixico	amikacina	ampicilina	TMP/SZ *	carbencilina	cefalotina	cloranfenicol	estreptomycina	gentamicina	polimixina	rifampicina	tetraciclina	tobramicina
CONC. = µg / ml													
32	8.0	8.0	256	64.0	256	256	256	21.3	1.0	256	16.0	256	8.0
33	8.0	2.66	256	128	256	256	256	8.0	1.0	256	16.0	256	1.0
37	8.0	2.66	256	64.0	256	256	256	8.0	2.0	256	16.0	256	1.0
39	8.0	2.66	256	64.0	256	256	256	8.0	0.25	256	16.0	256	0.125
81	8.0	8.0	256	256	256	256	256	16.0	8.0	256	16.0	256	8.0
102	8.0	2.66	256	64.0	256	256	256	8.0	0.25	256	64.0	16.0	1.0
103	8.0	2.66	256	64.0	256	256	256	8.0	1.0	256	21.3	16.0	1.0
104	8.0	2.66	256	64.0	256	256	256	8.0	1.0	256	21.3	16.0	2.0
145	8.0	8.0	256	64.0	256	256	256	256	2.66	256	16.0	8.0	8.0
159	8.0	2.66	256	256	256	256	256	256	2.0	256	21.3	256	8.0
207	64.0	2.66	256	21.3	256	256	256	8.0	2.0	256	16.0	8.0	8.0
31***	8.0	2.66	256	64.0	256	256	256	8.0	1.0	256	16.0	256	1.0
202***	16.0	2.66	256	21.3	256	256	256	8.0	1.0	256	16.0	16.0	2.0

* Método de dilución en placa con agar Mueller Hinton. Inoculación realizada con replicador de Steers

** Las diluciones seriadas empleadas para los antimicrobianos fueron de 0.125 a 256.0 µg/ml

*** Cepas que dieron negativa la prueba de asa ligada en conejo

• Trimetoprim y sulfametoxazol [1:19]

Tabla IX

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS* DE CEPAS DE *Protsus*
 PRODUCTORAS DE ENTEROTOXINA ESTABLECIENDO SU CONCENTRACION
 MINIMA INHIBITORIA **

cepa	ac. nalidixico	amikacina	ampicilina	TMP / SZ *	carbencilina	cloramfenicol	estreptomicina	gentamicina	polimixina	rifampicina	tetraciclina	tobramicina
	conc. = µg / ml											
122	8.0	0.25	256	256	256	256	256	0.25	256	256	256	0.25
123	8.0	0.125	256	256	256	256	256	0.125	256	256	256	0.25
124	8.0	0.125	256	256	256	256	256	0.25	256	256	256	0.25
131	8.0	0.25	256	256	256	256	256	0.25	256	256	256	0.25
138	8.0	0.125	256	256	256	256	256	0.25	256	256	256	0.125
224	8.0	1.0	256	256	256	256	256	1.0	256	256	256	1.0
217***	21.3	1.0	256	256	256	256	256	1.0	256	256	256	1.0
126***	8.0	0.125	256	256	256	256	256	0.25	256	256	256	0.25

* Método de dilución en placa con agar Mueller Hinton 0.5% más conc.

Inoculación realizada con replicador de Steers.

** Las diluciones seriadas empleadas para los antimicrobianos fueron de 0.125 a 256.0 µg/ml

*** Cepas que dieron negativa la prueba de asa ligada en conejo.

• Trimetoprim y sulfametoxazol [1:19].

Tabla X

PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE *Klebsiella* ENTEROTOXIGENICAS
INHIBIDAS A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.

Antimicrobiano	concentración [$\mu\text{g/ml}$]											
	0.125	0.25	0.33	1.0	2.0	2.66	8.0	16	21.3	64	128	256
Ac. nalidixico							90.9	--	--	100		
Amikacina						72.7	100					
Ampicilina												100
Carbenicilina												100
Cefalotina												100
Cloranfenicol												100
Estreptomocina							63.6	72.7	81.8	--	--	100
Gentamicina		18.2	--	54.6	81.9	91.0	100					
Polimixina												100
Rifampicina							63.6	90.9	100			
Tetraciclina							18.2	45.5	--	--	--	100
Tobramicina	9.1	--	--	45.5	54.6	--	100					
TMF/SZ									9.1	72.7	81.8	100

nota : los espacios con la marca (--) indican no inhibición

FORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE *Klebsiella* ENTERO TOXIGENAS INHIBIDAS POR DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

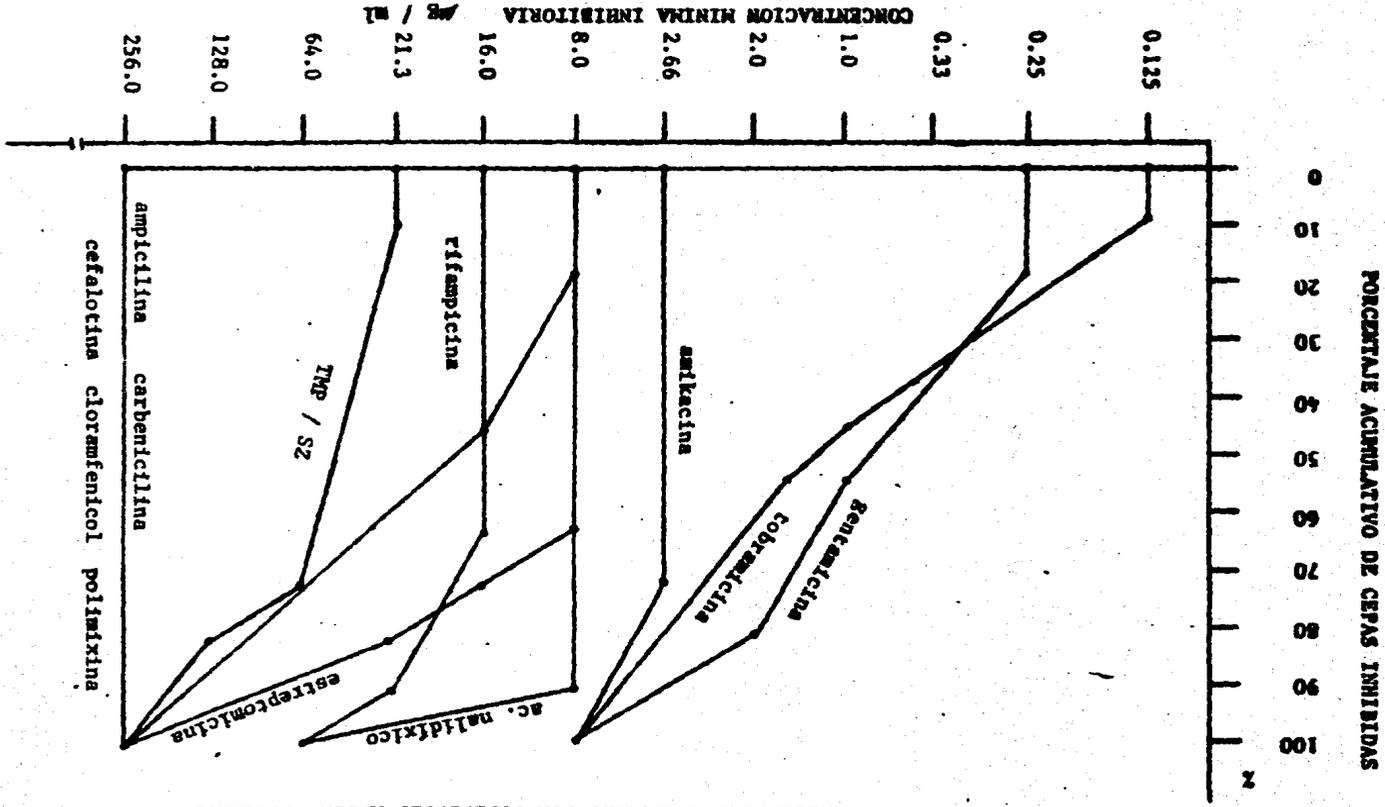


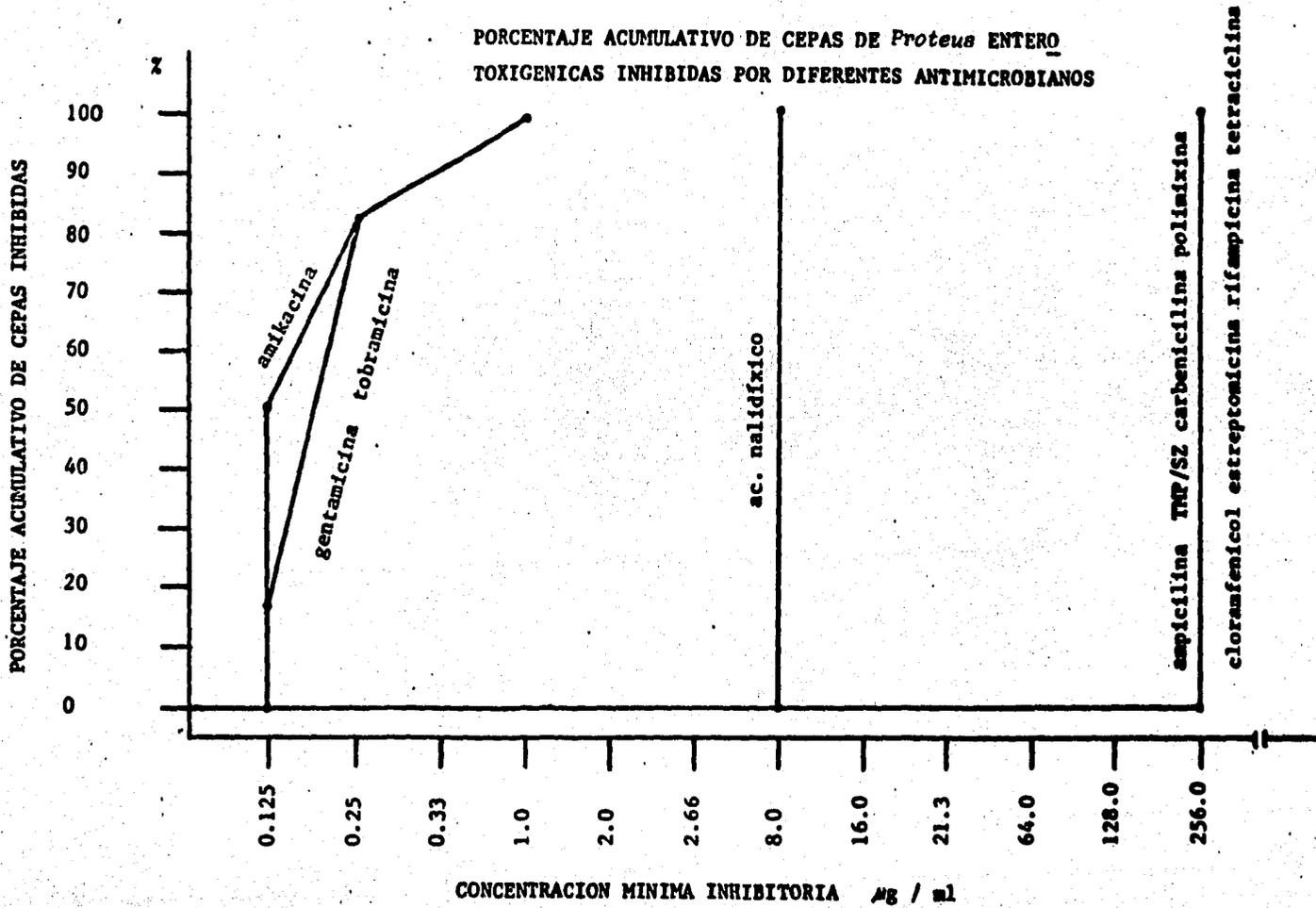
FIG. 1

**PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE *Proteus* ENTEROTOXIGENICAS
INHIBIDAS POR DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.**

Antimicrobianos	concentración [µg/ml]											
	0.125	0.25	0.33	1.0	2.0	2.66	8.0	16	21.3	64	128	256
Acido nalidixico								100				
Amikacina	50.0	83.3	--	100								
Ampicilina												100
TMP / SZ												100
Carbenicilina												100
Cloramfenicol												100
Estreptomina												100
Gentamicina	16.7	83.4	--	100								
Polimixina												100
Rifampicina												100
Tetraciclina												100
Tobramicina	16.7	83.4	--	100								

nota : los espacios con la marca (--) indican no inhibición

fig. 2



**RESISTENCIA DE *Klebsiella pneumoniae* Y
Proteus A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS**

ANTIMICROBIANOS *	Valor de corte $\mu\text{g/ml}$	porcentaje de resistencia	
		<i>Klebsiella</i> (13)	<i>Proteus</i> (8)
Ampicilina	32	100.0	100.0
Carbenicilina	128	100.0	100.0
Gentamicina	8	7.7	0
Amikacina	16	0	0
Cloramfenicol	16	100.0	100.0
TMP/SZ [1:19]	32	84.6	100.0
Cefalotina	16	100.0	---
Rifampicina	4	100.0	100.0

() = número de cepas

* Antimicrobianos sugeridos por el NCCLS (25)

**CAPACIDAD DE RESISTENCIA A DIFERENTES PRODUCTOS
QUIMICOS (ORGANICOS E INORGANICOS) DE CEPAS ENTE
ROTOXIGENICAS DE *Klebsiella* (RESISTOTIPOS).**

Patrones de Resistencia

Cepa	producto químico empleado										
	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac	m-af	p-af	cap
32	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac		p-af	cap
33	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac		p-af	cap
37	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac		p-af	cap
39	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac	m-af	p-af	cap
102	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac		p-af	cap
103	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac	m-af	p-af	cap
138	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac		p-af	cap
145	fb	vm	np	as	ab		mp	ac		p-af	cap
159	fb	vm	np	as	ab		mp	ac	m-af	p-af	cap
207	fb	vm	np	as			mp	ac	m-af	p-af	cap

fb) fucsina básica 0.0014 %
 vm verde de malaquita 0.003%
 np nitrato de plomo 1.62%
 as arsenato de sodio 0.75%
 ab ácido bórico 3%
 sc sulfato de cobre 0.07%

mp metabisulfito potásico 1%
 ac acetato de cadmio 0.4%
 m-af m-amino fenol 3.6%
 p-af p-amino fenol 3.6%
 cap cloruro de cetilpiridinio 0.0125%

NOTA : las abreviaturas del producto químico correspondiente en el cuadro indican resistencia; la ausencia de abreviaturas indica sensibilidad.

**CAPACIDAD DE RESISTENCIA A DIFERENTES PRODUCTOS
QUIMICOS (orgánicos e inorgánicos) DE CEPAS ENTEROTO
XIGENICAS DE *Proteus* (RESISTOTIPOS).**

Patrones de Resistencia

cepa	fb	vm	np	producto químico empleado							m-af	p-af	cap
				as	ab	sc	mp	ac					
122	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac			p-af	cap	
123	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac	m-af		p-af	cap	
124	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac			p-af	cap	
131	fb	vm	np			sc	mp	ac			p-af	cap	
224	fb	vm	np	as	ab	sc	mp	ac	m-af		p-af	cap	
fb	fucsina básica 0.0014%							mp	metabisulfito potásico 1%				
vm	verde de malaquita 0.003%							ac	acetato de cadmio 0.4%				
np	nitrate de plomo 1.62%							m-af	m-amino fenol 3.6%				
as	arsenato de sodio 0.75%							p-af	p-amino fenol 3.6%				
ab	ácido bórico 3%							cap	cloruro de cetilpiridinio 0.0125%				
sc	sulfato de cobre 0.07%												

NOTA : las abreviaturas del producto químico correspondiente en el cuadro indican resistencia ; la ausencia de abreviaturas indica sensibilidad

Tabla XV

ESTUDIO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA LA
 PRODUCCION DE ENTEROTOXINA EN CEPAS DE
Klebsiella pneumoniae Y *Proteus sp.*

condiciones empleadas **	resultado de la prueba de asa ligada en conejo *
A	+
B	-
C	-
D	-
E	+
F	-
G	-
H	-
I	-
J	-
K	-
L	-
M	-
N	+
O	-
P	-
Q	-
R	-

+ = positiva - = negativa

* Se utilizaron las cepas 32 de *Klebsiella pneumoniae*
 y 224 de *Proteus mirabilis*.

Como control positivo el filtrado de una cepa entero
 toxigénica conocida y como control negativo el medio
 de cultivo estéril.

** Las condiciones utilizadas son descritas en las
 tablas II, II-A y III.

C.- DISCUSION DE RESULTADOS

Como se pudo observar de los resultados obtenidos en los 25 coprocultivos estudiados , en todos ellos se aislaron Enterobacterias consideradas como flora habitual del intestino.

En 15 / 25 coprocultivos estudiados se aisló *Klebsiella* [60%] , en 6 /25 *Proteus* [24%] , en 3 /25 *Citrobacter* [8%]. Cabe mencionar que algunos de estos coprocultivos se aisló más de un género.

En lo referente a la capacidad de estas enterobacterias para producir enterotoxinas, de las 134 cepas estudiadas, se encontró que 17 de ellas fueron enterotoxigénicas. Si correlacionamos el número de cepas enterotoxigénicas encontradas, con el total de cepas estudiadas, el porcentaje que resulta es bajo [12.6%]. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que estas bacterias son consideradas como no patógenas en tracto digestivo, y por lo general cuando son aislados de un coprocultivo son reportados como flora normal y hasta en publicaciones recientes se ha empezado a mencionar la presencia de cepas enterotoxigénicas de estos géneros.

De los diferentes géneros de enterobacterias identificados, *Klebsiella* resultó ser la bacteria más importante como productora de enterotoxina, encontrándose en el 24% del total de coprocultivos ; la otra bacteria fue *Proteus* con 8%.

Los porcentajes antes señalados se incrementan cuando se consideran solamente aquellos coprocultivos en los cuales se aisló *Klebsiella* [6 / 25] , con lo que de un 24 % obtenido se eleva al 40 % de frecuencia. En estos 6 coprocultivos se aislaron 11 cepas enterotoxigénicas.

En lo que corresponde a las cepas de *Proteus* en 2 / 25 coprocultivos fueron caracterizadas 6 cepas como productoras de enterotoxinas [33.3 %] , en este caso, podemos asegurar que no se trata de una misma cepa productora de enterotoxina, ya que en la identificación de especie se encuentran varias especies (tablaIV).

Lo anterior nos hace pensar la importancia que la transferencia de información genética tiene en este tipo de bacterias, por lo que existe la necesidad de estudiar más profundamente la frecuencia con la que estas bacterias puedan ser portadoras de información para producir enterotoxinas, así como los posibles mecanismos para controlar este fenómeno.

Otro aspecto interesante observado fue el aislamiento de cepas de *Klebsiella* y *Proteus* productoras de enterotoxinas en un mismo coprocultivo, situación que probablemente nos señala que la transferencia de material genético encargado de la expresión de las enterotoxinas se esté realizando a una frecuencia alta, aún entre géneros diferentes.

Con respecto a las especies caracterizadas como productoras de enterotoxinas, en el caso del género *Klebsiella*, *K. pneumoniae* fue la única especie productora de enterotoxinas ; esto es comprensible, si tomamos en cuenta que es la especie más comúnmente encontrada como flora habitual en el tracto intestinal.

Con el género *Proteus*, las especies caracterizadas como productoras de enterotoxinas fueron : *P. morgani* [17.6 %], *P. vulgaris* [11.8 %] y *P. mirabilis* [5.9 %]. (tabla V)

En virtud de que el número de bacterias identificadas [6] es bajo, los porcentajes en cuanto a frecuencia se refiere, probablemente no sean representativos. Sin embargo, es importante señalar que 2 especies diferentes con capacidad enterotoxigénica se aislaron de un mismo coprocultivo ; esto nos permite nuevamente establecer la posible frecuencia de la transmisión del material genético extracromosómico, en estas bacterias.

Por otro lado, queremos mencionar que de acuerdo a la Sociedad Americana de Microbiología (22), la tribu *Proteeae* ha sufrido modificaciones en su nomenclatura ; sin embargo, en este trabajo no hemos considerado estos cambios en virtud de que se utilizaron esquemas bioquímicos en los cuales aún no se refieren las modificaciones.

Para el estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos utilizamos, además de los recomendados por el NCCLS para el tratamiento de infecciones por enterobacterias, algunos otros, principalmente porque en la actualidad el uso de antimicrobianos se ha hecho rutinario por parte de algunos facultativos, motivo que puede estar favoreciendo la selección de mutantes resistentes, razón que justificó nuestro interés por conocer la sensibilidad que tienen este tipo de bacterias estudiadas frente a diferentes productos.

Los resultados obtenidos nos muestran que con respecto a los antimicrobianos recomendados para el tratamiento de enfermedades por enterobacterias , la resistencia fue entre el 85% y el 100% para ampicilina , cefalotina , cloramfenicol , trimetoprim / sulfametoxazol , y sólo hubo sensibilidad para amikacina y gentamicina , tanto en el caso de *Klebsiella* como el de *Proteus*.

Con antimicrobianos no utilizados comunmente para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por este tipo de bacterias , se encontró resistencia del 100 % con carbenicilina y rifampicina , en ambos géneros bacterianos.

Otros antimicrobianos utilizados fueron ácido nalidixico , estreptomina , polimixina , tetraciclina y tobramicina, en los que se observa que la concentración mínima inhibitoria [CMI] fue muy variada , encontrándose desde un valor de 8.0 hasta 256 $\mu\text{g/ml}$.

Con estos productos no se estableció la resistencia por no contar con los valores de corte correspondientes. Estos valores de corte no se reportan para estos antimicrobianos en razón de no ser productos utilizados comunmente para el tratamiento de enfermedades gastroentéricas.

Los valores de corte reportados están dados en $\mu\text{g/ml}$ y nos sirven para considerar a una cepa como sensible o resistente, estableciéndose de acuerdo con los niveles promedio que alcanza el antimicrobiano en el líquido corporal de donde se aisló la bacteria. Los valores de corte utilizados en el presente trabajo se han tomado de estudios en donde se observó la resistencia de enterobacterias a diferentes antimicrobia

nos (13) y del Boletín Informativo del Comité de Control de Antimicrobianos, Hospital de Pediatría, C.M.N. (3).

Como se puede apreciar claramente, la resistencia a la mayoría de los medicamentos de uso común y aun para los que no lo son para el tratamiento de esta clase de padecimientos es alta, lo cual nos debe preocupar y además nos obliga a realizar más estudios de este tipo para tratar de conocer cómo puede ir modificándose esta resistencia, para intentar de predecir cambios con respecto al uso de estos productos.

En el presente estudio se observó además la resistencia a diferentes productos químicos [orgánicos e inorgánicos]. Esta parte del trabajo se realizó debido a la asociación que existe entre la capacidad para elaborar enterotoxinas y la capacidad de resistencia a productos químicos, información que podría radicar también en plásmidos transmisibles.

Desafortunadamente, la posibilidad de establecer una probable correlación entre la producción de enterotoxinas y la resistencia a productos químicos no se logró llevar a cabo, en virtud de que se trabajó sólo con cepas enterotoxigénicas, sin contar con resultados de cepas no productoras de enterotoxinas.

La última parte de este estudio se dedicó a buscar condiciones óptimas para la obtención de enterotoxinas. Esto se debió, a que durante el desarrollo del trabajo, en algunos casos se tuvieron variaciones en los resultados de positividad por el método de asa ligada en el conejo. A pesar de que se han reportado condiciones óptimas no fue posible lograrlas de manera repetitiva, razón por la cual se buscaron métodos aplicables a nuestras peculiares condiciones de trabajo en el laboratorio.

CONCLUSIONES

- En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos señalar que algunas enterobacterias con sideradas como flora habitual del tracto intestinal, son capaces de elaborar enterotoxinas y por lo tanto, se les puede considerar como posibles agentes etiológicos respon sables de cuadros diarreicos ; tal es el caso de *Kleb- siella pneumoniae* , *Proteus morgani* , *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*.

- La frecuencia con la que se aislaron estas bacte^u rias, a partir de coprocultivos de niños con cuadro clí nico diarreico, resultó muy alta en relación al número de coprocultivos estudiados, hecho que demuestra la im portancia que estas enterobacterias pueden adquirir den tro de la etiología del padecimiento, ya que hasta el momento no se han considerado como posibles agentes pa tógenos en tracto intestinal.

La elevada resistencia mostrada frente a los antimicrobianos por las cepas enterotoxigénicas aisladas, nos pone de manifiesto los daños que el uso indiscriminado de antimicrobianos puede ocasionar en lo que se refiere a la aparición, cada vez más frecuente, de cepas multirresistentes, ya que tomando en cuenta que las enterobacterias estudiadas no habían sido combatidas específicamente con estos antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales por no considerárseles patógenas en dichos sitios, presentan ya una marcada resistencia a la mayoría de los antimicrobianos utilizados, condición que adquiere relevancia clínica.

En lo referente al estudio de la resistencia a diferentes productos químicos orgánicos e inorgánicos [Resistotipos] de las cepas enterotoxigénicas aisladas, la falta de resultados comparativos con cepas no enterotoxigénicas hace que no sea posible establecer un patrón de resistencia característico que permita evidenciar a las cepas productoras de enterotoxinas. No obstante, es de tomarse en cuenta la alta resistencia que a la mayoría de los productos químicos empleados, mostraron estas cepas.

Los resultados obtenidos en relación con el aislamiento en un mismo coprocultivo de cepas de *Klebsiella* y *Proteus* productoras de enterotoxinas, así como la resistencia frente a los antimicrobianos y a los diferentes productos químicos orgánicos e inorgánicos, permite considerar que la frecuencia con la que se está realizando la transferencia de material genético entre estas bacterias, posiblemente pueda ser muy alta.

Además de las condiciones reportadas por diversos autores para la producción de la enterotoxina, se observó que se pueden utilizar otras condiciones como agitación con perlas de vidrio e incubación anaerobia, en el caso de cepas de *Klebsiella* y la adición de lincomicina al medio de cultivo utilizado para la producción de enterotoxina en cepas de *Proteus*.

ANEXO

I. Preparación de soluciones para Resistotipos

Productos utilizados :

Fucsina básica	0.0014%
Verde de malaquita	0.003%
Nitrato de plomo	1.62%
Arsenato de sodio	0.75%
Acido bórico	3.0%
Sulfato de cobre	0.07%
Metabisulfito potásico	1.0%
Acetato de cadmio	0.4%
m-amino fenol	3.6%
p-amino fenol	3.6%
cloruro de cetil piridinio	0.0125%

Se utiliza como disolvente amortiguador TRIS 0.1 M pH 7.6

Para la preparación de la fucsina básica, m-amino fenol y p-amino fenol se utiliza como disolvente una pequeña cantidad de alcohol y se completa con agua destilada hasta alcanzar la con centración deseada.

Medio base para Resistotipos.**Medio para Antibióticos # 2 10% más concentrado**

Bacto peptona o peptona de gelatina-----	6.6 g
Extracto de levadura -----	3.3 g
Extracto de carne -----	1.65 g
Agar-agar -----	16.5 g

Se disuelve en TRIS 0.1 M pH 7.6

II. Medio para conservación de cepas.

Agar agar -----	2%
Cloruro de sodio ---	0.5%
Bacto peptona -----	2.0%

disolver en 1 000 ml de agua destilada

III. Medio para producción de enterotoxina CAAYE 2

Casaaminocidos -----	2.0 %
Extracto de levadura -----	0.6 %
cloruro de sodio -----	0.25%
K_2HPO_4 -----	0.875%
Bacto dextrosa -----	0.25%
solución de : 0.5% $MgSO_4$	
0.5% $MnCl_2$	
0.5% $FeCl_3$ -----	0.1%

Ajustar a pH 8.5 con NaOH o HCl 1 N

La dextrosa se esteriliza por filtración y se adiciona en condiciones de esterilidad (1,10,14)

IV. PREPARACION DE LOS ANTIMICROBIANOS

tubo	ml H ₂ O dest.	ml del antibiótico	conc. final * µg/ml
1	4.88	5.12 [del antibiótico]	256
2	2.5	2.5 [del tubo # 1]	128
3	6.0	2.0 [" # 1]	64
4	2.0	1.0 [" # 3]	21.3
5	3.0	1.0 [" # 3]	16
6	7.0	1.0 [" # 3]	8
7	2.0	1.0 [" # 6]	2.66
8	3.0	1.0 [" # 6]	2.0
9	7.0	1.0 [" # 6]	1.0
10	2.0	1.0 [" # 9]	0.33
11	3.0	1.0 [" # 9]	0.25
12	7.0	1.0 [" # 9]	0.125

* concentración que se tiene en la placa tomando 1.0 ml de cada dilución / 20 ml de medio.

PREPARACION DE LOS ANTIMICROBIANOS

disolvente utilizado

Acido Nalidixico	NaOH 0.2N (mínima cantidad) completar con H ₂ O dest. estéril.
Ampicilina	Buffer de fosfatos pH = 8.0 0.1 M , completar con buffer de fosfatos pH = 6.0 0.1 M.
Amikacina	Buffer de fosfatos pH = 8.0 0.1 M , completar con H ₂ O dest.
Carbenicilina	H ₂ O
Cloramfenicol	Etanol (mínima cantidad), completar con H ₂ O dest. estéril.
Gentamicina	Buffer de fosfatos pH = 8.0 0.1 M , completar con H ₂ O dest. estéril.
Polimixina	H ₂ O
Rifampicina	Alcohol o dimetil sulfoxido hasta que esté totalmente disu <u>e</u> lta, completar con H ₂ O dest. estéril.
Tobramicina	H ₂ O
Estreptomina	Agregar casi en volúmenes iguales alcoh <u>o</u> = vol = H ₂ O, se <u>pre</u> cipita, agregar más alcohol, se pone opalescente, completar con H ₂ O dest. estéril.
Trimetoprim / sulfa metoxazol	Metanol mínima cantidad.

F.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alderete, J.F. ; and Robertson, D.C. : Nutrition and Enterotoxin Synthesis by Enterotoxigenic Strains of *Escherichia coli* : Defined Medium for Production of Heat-Stable Enterotoxin. Infect. Immun. 15(3) : 781-788 . (1977).
- 2.- Alderete, J.F. ; and Robertson, D.C. : Purification and Chemical Characterization of the Heat-Stable Enterotoxin Produced by Porcine Strains of Enterotoxigenic *Escherichia coli* . Infect. Immun. 19(3): 1021-1030 (1978).
- 3.- Boletín Informativo. Comité de Control de Antimicrobianos. Hospital de Pediatría. C.M.N. No. 8 (1982).
- 4.- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. : BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8 th edition. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. (1980).
- 5.- Davis, B.D. ; Dulbecco, R. y cols. : TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 2a edición. Salvat editores S.A. Barcelona, España (1980)
- 6.- Donta, S.T. and cols : Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Diarrheal disease in Mexican Children. J. Infect. Dis. 135:482 (1977).

- 7.- Edwards, P.R. ; and Ewing, W.H. : IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE. Burgess Publishing Company 3 rd edition (1972)
- 8.- Elek, S.D. ; and Moryson, C. : Resistotyping of *Staphylococcus aureus* . J. Med. Microbiol. 7:237-249 (1974)
- 9.- Evans, D.G. ; Olarte, J. ; Dupont, H.L. ; Evans, D. J. ; Galindo, D. ; Portnoy, B. ; and Conklin, R.H.: Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico City. J. Pediatr. 91:65 . (1977).
- 10.- Evans, D.J. ; and cols : Stimulation of Adenyl cyclase by *Escherichia coli* Enterotoxin. Nature New Biology. 236: 137-138 . (1972).
- 11.- Gianella, R.A. ; and Drake, K.A. : Effect of Purified *Escherichia coli* Heat Stable Enterotoxin on Intestinal Cyclic Nucleotide Metabolism and Fluid Secretion. Infect. Immun. 24 (1): 19-23. (1979).
- 12.- Goodman, L.S. ; and Gilman A. : BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. Quinta edición. Editorial Interamericana. (1978).
- 13.- Guiscafré, G.H. ; García, P.M. y cols : Resistencia de Enterobacterias y *Pseudomonas*. Recomendaciones Terapeuticas. Rev. Méd. IMSS, 20:485 (1982).

- 14.- Guzmán-Verduzco, L.M. ; Fonseca, R. ; and Kuppertoch-Portnoy, Y.M. : Thermoactivation of a Periplasmic Heat-Stable Enterotoxin of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 154 (1):146-151 . (1983).
- 15.- Joaquín, D.T. ; Kumate, J. ; y cols : ENFERMEDADES DIARREICAS EN EL NIÑO. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 7a. edición. Tomo I. México. (1981).
- 16.- Jawetz, E. ; Melnick, J.L. y Adelberg, E.A. : MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA. Edit. El Manual Moderno. 9a. edición México, (1981).
- 17.- Klipstein, F.A.; Engert, R.F. : Purification and Properties of *Klebsiella pneumoniae* Heat - Stable Enterotoxin. Infect. Immun. 13 (2) : 373-381 (1976).
- 18.- Klipstein, F.A. ; and Engert, R.F. : Partial Purification and Properties of *Enterobacter cloacae* Heat-Stable Enterotoxin. Infect. Immun, 13 (5) : 1307-1314 (1976).
- 19.- Klipstein, F.A. ; and Engert, R.F. : Immunological Interrelationships Between Cholera toxin and the Heat-Labile and Heat - Stable Enterotoxins of Coliform Bacteria. Infect Immun 18 (1) : 110-117 (1977).

- 20.- Klipstein, F.A. ; and Engert, R.F. ; and Short, H.B. :
Relative Enterotoxigenicity of Coliform Bacteria.
J. Infect Si. 136 : 205 (1977)
- 21.- Kubota, Y. ; and Liu, P.V. : An Enterotoxin of
Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 123 (1)
(1971).
- 22.- Lennette, E. H. ; Balows, A. ; Hausler , W. J. ;
and Truant, J.P. : MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
Third Edition. (1980)
- 23.- Lorian, V. : ANTIBIOTICS IN LABORATORY MEDI
CINE. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore /London
(1980).
- 24.- Morris, G . K. ; and cols : Laboratory Investi
gation of Diarrhea in Travelers to Mexico ; Evalua
tion of Methods for Detecting Enterotoxigenic
Escherichia coli . J. Clin. Microbiol. 3 :486
(1976).
- 25.- National Committe for Clinical Laboratory Standards :
Perfomance standards for antimicrobial discs suscep
tibility test. (1979).

- 26.- Olarte, J. : AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA ETIOPATOGENIA DE LAS DIARREAS EN : ANALECTAS DE MEDICINA MEXICANA 2 . Primera edición . Academia Nacional de Medicina. México (1981).
- 27 Old, D.C. ; Crichton, P. B. : Maunder, A. J. ; and Wilson, M. I. : Discrimination of Urinary Strains of *Escherichia coli* by Typing Methods. J. Med. Microbiol. 13 : 437-444 (1980).
- 28.- Pérez , P. G. : Toxina Termolábil [TL] de *Escherichia coli*. Infectología, Organo de la Asociación Mexicana de Infectología , A. C. 5: 223-232 (1983)
- 29.- Pesti, ; Laszlo ; and Clara, L. ; Staining Technique for Peptides of *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin. Infect. Immun. 33 (1) : 944 - 947. (1981).
- 30.- Rao, M. C. ; Orellana, S. A. ; Field, M. ; Robertson, D. C. ; and Gianella, R. A. : Comparison of the Biological Actions of three Purified Heat-Stable Enterotoxins : Effects on Ion Transport and Guanylate Cyclase Activity in Rabbit Ileum *in vitro*. Infect. Immun. 33 (1) : 165-170 (1981).

- 31.- Richards, K.L. ; and Douglas, S.D. : Pathophysiological Effects of *Vibrio cholerae* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* and their Exotoxins on Eucayotic Cells : Microbiol. Rev. 42 (3) : 592 - 613 (1978).
- 32.- Sack, S.A. ; Kaminsky, D. C. ; and cols ; Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea of Travelers : A prospective study of American Peace Corps Volunteers. The Johns Hopkins Med. J. 141 : 63 (1977).
- 33.- San Joaquin, V.H. ; and Marks, M.I. : New agents in diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis* 1:53 (1982)
- 34.- Schenkein, I. ; Green, R.F. ; Santos, D.S. ; and Maas, W.K. : Partial Purification and Characterization of a Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 12 (6) : 1710-1720 (1976).