
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diferenciación Bioquímica de "Microorganismos
no fermentadores" aislados de Diarreas Infantiles.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
IRMA LORENA SANCHEZ HUMARAN

Asesor: Q.F.B. María del Socorro Pulido García
GUADALAJARA, JAL., AGOSTO DE 1986



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.

3.4)	Medio de transporte para especímenes microbio- lógicos:	
	a) Medio de Cary y Blair	29
3.5)	Pruebas Bioquímicas:	
	a) Agar Hierro de Kligler	31
	b) Agar Citrato de Simmons	35
	c) Agar LIA	36
	d) Prueba del ác. sulfhídrico	37
	e) Prueba del Indol	39
	f) Prueba de la Motilidad	40
	g) Prueba del Rojo de Metilo	41
	h) Prueba de Voges-Proskauer	43
	i) Prueba de la Sacarosa	45
	j) Prueba de la Urea	48
	k) Prueba de Malonato-Fenilalanina	49
3.6)	Indicaciones para la siembra de bioquímicas	53
3.7)	Reactivos utilizados para la lectura de - las bioquímicas	54

CAPITULO IV .-

RESULTADOS	56
4.1) Tabla de resultados	57
4.2) Tabla de referencia para clasificación de resultados	58

CAPITULO V.-

CONCLUSIONES	59
--------------------	----

CAPITULO VI.-

BIBLIOGRAFIA	62
--------------------	----

CAPITULO I

INTRODUCCION.

1.1) El ser humano ha conocido un sin número de enfermedades que han afectado su salud a nivel individual o colectivo en su ya milenaria existencia. Es difícil establecer claramente una identificación de las enfermedades. Es evidente que muchas de ellas, a pesar de ostentar diferentes nombres corresponden a un mismo padecimiento.

Diarrea es un vocable médico derivado del latín (diarrhoea) y peste lo es a su vez del griego; la palabra significa "fluir a través" y de acuerdo con el diccionario médico se define como una evacuación intestinal frecuente, líquida y abundante. Sin embargo, el síntoma solamente puede constatarse como un hecho contable de proporciones alarmantes dentro de la morbilidad y mortalidad en la medicina.

Un análisis de la evolución de estas enfermedades a través de la historia muestra que mientras muchas de ellas cortan su existencia hace siglos, otras continúan hasta la fecha; otras más estarían -- presentes en todas las épocas, con la peculiaridad de presentar exacerbaciones a las que siguen periodos de latencia.

Sería prácticamente imposible asignar a una enfermedad el primer lugar como generadora de morbilidad; pero se podría decir que el síntoma diarrea puede contarse entre los participantes de primera categoría, como causa única o asociada a otros cuadros patológicos.

Los padecimientos diarreicos constituyen un síndrome de etiología variada que incluye enfermedades infecciosas específicas, como shigelosis, salmonelosis, amibiasis, enfermedades causadas por baci

los, protozoos, virus, helmintos, participando en -- forma secundaria otros factores, entre los cuales se encuentran los microorganismos no fermentadores que en este estudio se trata de aislar de diarreas infantiles. El término "no fermentadores" está referido a un grupo de bacilos gramnegativos, aerobios, no esporulados, que son incapaces de utilizar hidratos de carbono como fuente de energía ó que los degradan -- por la vía "oxidativa" más bien que por la vía "fermentativa"; pudiendo ocasionar estos microorganismos un alto porcentaje como causantes de diarreas en niños recién nacidos a cinco años de edad. Unicamente en grupos reducidos de casos se determina la etiología sistemáticamente, estableciéndose en mayor parte un diagnóstico basado en la simple apreciación clínica.

Los estudios epidemiológicos de las diarreas llevan implícito el concepto de un factor infeccioso causal y relacionan infección entérica con manifestaciones clínicas apreciándose tasas muy elevadas en los primeros años de la vida. Intimamente ligadas a la frecuencia de la diarrea están situación económica y social y grado de higiene de las comunidades.

Las diarreas ocupan el segundo lugar como causa de muerte en los menores de un año; el primero en los comprendidos entre uno y cuatro años y el segundo de los cinco a los catorce años.

La importancia que tienen estos microorganismos no fermentadores como agentes causantes de -- diarreas radica en que se encuentran en la naturaleza en forma saprófita y pueden confundirse con miembros de la familia Enterobacteriaceae. Estas son u--

nas de las causas más importantes por las que se re
lizó esta investigación.

CAPITULO II
GENERALIDADES

Los bacilos gramnegativos no fermentadores son de carácter sobre todo oportunista, este grupo de microorganismos debe su invasividad o infectividad a un estado de alteración o debilitación del huésped, causado por el uso de medicamentos potentes, por diversas maniobras instrumentales o por los espectaculares y prolongados procesos quirúrgicos desarrollados en los últimos tiempos. Con un medio de hidrato de carbono pobre en peptona (0.2 %) es posible determinar las propiedades oxidativas, fermentativas o inactivas de los bacilos gramnegativos que no forman esporas y son aerobios obligados que no producen cambio alguno en agar HTA (o con hierro de Kligler) y son indol negativos (con excepción de las flavobacterias) y ornitina descarboxilasa-negativos.

Los bacilos gramnegativos no fermentadores no son particularmente exigentes en cuanto a requerimientos para su desarrollo, y son incapaces de utilizar glucosa por la vía fermentativa. Algunas especies poseen metabolismo oxidativo y otras son no saccarolíticas es decir, utilizan compuestos distintos de los hidratos de carbono como fuente de energía.

2.1) PSEUDOMONADACEAS.-

El orden de los pseudomonadales (del griego pseudos = imitar, monas = un protozooario flagelado monótrico). Las bacterias de este orden son en general células sencillas indiferenciadas, en forma de bastoncillo (algunas son curvas o espirales), con diámetro de 0.7 micras y longitudes de 0.8 micras, pero algunas especies se acercan a las 15 micras de diámetro y longitudes de más de 100 micras. Ninguna

de ellas forman esporas y todas ellas son gramnegativas. Las formas móviles, que pueden ser mono o lofótricas. A diferencia de las Enterobacteriaceas, las pseudomonádáceas no son nunca peritricas.

2.2.) FAMILIA DE LAS PSEUDOMONADACEAS.-

Las pseudomonádáceas constituyen un amplio grupo que comprende unas 150 especies del género - Pseudomonas, 75 del género Xanthomonas y aproximadamente 35 especies en 10 géneros diferentes. La mayoría de las especies de Pseudomonas son de importancia, sobre todo como destructoras de materia orgánica en las aguas residuales marinas y corrientes, el suelo y la materia orgánica en descomposición. Muchas especies de la familia pseudomonádacea son de origen marino y muchas toleran altas concentraciones de sal (de un 3 a 30 %) es decir, son halotolerantes.

Los microorganismos citados son, con pocas excepciones, aerobios estrictos que nunca muestran metabolismo fermentativo, sino que utilizan los hidratos de carbono oxidativamente, (a diferencia de las Enterobacteriaceas).

Los géneros citados son suficientemente variados en todas las propiedades básicas de las pseudomonádáceas como para constituir un grupo taxonómico diferenciado. Este grupo se caracteriza además de la capacidad de estas especies de utilizar como fuente de carbono y energía, gran cantidad de diferentes compuestos orgánicos de muchas especies químicas diferentes bajo condiciones aerobias de crecimiento.

2.3) GENERO PSEUDOMONAS.-

Los miembros del género Pseudomonas son -- las bacterias más comunes y más ampliamente distri-- buidas, son enzimáticamente activas y metabolizan -- una amplia variedad de proteínas, grasas, hidratos - de carbono y otros compuestos orgánicos. En conse-- cuencia, son excelentes destructores de la materia -- orgánica. Son sobre todo, aerobios, algunas son - - facultativas.

2.4) PSEUDOMONAS AERUGINOSA.-

Es la especie tipo del género. Además del pigmento amarillo verdoso característico de muchas - Pseudomonas, produce un pigmento azul turquesa, la - piocianina. Cuando se cultiva en medio de agar produ-- ce típicamente placas de autólisis (autoplacas) como si hubiera fagos. Se dice que algunos brotes de dia-- rreas en adultos y especialmente entre los recién na-- cidos, están producidos por este microorganismo.

P. aeruginosa es la que con mayor frecuen-- cia es causa de infecciones en el hombre, puede in-- fectar el sitio de quemaduras, heridas, vías urina-- rias y el tracto respiratorio inferior sobre todo en pacientes con defensas disminuidas. La infección pue-- de causar una septicemia grave. Aún cuando puede ais-- larse P. aeruginosa de la piel y de las heces del -- ser humano normal, la mayor parte de las infecciones se consideran de origen exógeno. Como el microorga-- nismo forma parte del ambiente hospitalario puede so-- brevivir y multiplicarse en medios húmedos con el mí-- nimo de materia orgánica, se le atribuye al 5 % al - 15 % de las infecciones hospitalarias.

P. aeruginosa es un bastoncillo, gramnegativo, polar, monótrico, que se presenta aislado, en pares o en cadenas cortas. En agar sangre crece formando una colonia grande y aplanada con aspecto de vidrio esmerilado que produce una zona de hemólisis. P. aeruginosa crece en agar Mac Conkey como microorganismo que no fermenta la lactosa, se le elige frecuentemente y se le traspara de los cultivos de materia fecal a agar HTA (o de Kligler) como colonia sospechosa y puede ser identificada incorrectamente debido al cultivo inclinado alcalino y la reacción en el extremo superior del tubo, que es característica de dicho microorganismo.

P. aeruginosa es resistente a la Kanamicina, no desarrolla en todos los medios de cultivos ordinarios, más rápidamente a temperatura de 30 a - - 37 °C, requiere condiciones aerobias; no obstante en medios anaerobios y en presencia de nitrato hay cierto desarrollo. Su capacidad fermentativa es limitada produce ácido a partir de glucosa, pero muchos otros carbohidratos no son fermentados.

2.5) PSEUDOMONAS MALLEI (Bacilo del Muermo).-

En los cultivos los bacilos pueden presentarse a pares; en los cultivos antiguos producen filamentos con extremos abultados en los cuales se observa verdadera ramificación. Los gérmenes no son móviles, no tienen cápsula y no forman esporas.

El bacilo se desarrolla en medios ordinarios, pero el aislamiento primario da un cultivo - - escaso de crecimiento lento. El bacilo de muermo es muy poco activo bioquímicamente. Con excepción de la

glucosa, no ataca los carbohidratos usuales; incluso la fermentación de la glucosa es irregular y variable de una cepa a otra.

Suele necesitarse 48 horas de incubación para que aparezcan colonias de 0.5 a 1 mm de diámetro en medios sólidos. Los cultivos puros parecen ser más resistentes a la desecación que los bacilos en secreciones nasales, los cultivos mueren de 4-6 semanas pero pueden conservarse por siembra en agar glicérol.

La forma aguda de la enfermedad es más frecuente en el hombre, y todos los casos casi siempre terminan con la muerte en 2-3 semanas, a veces en pocos días. Ni los ataques de la enfermedad, ni las vacunas permiten obtener inmunidad permanente contra el muermo.

2.6) PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI (Bacilo de Whitmore).-

El bacilo de whitmore difiere del P. mallei por cuanto es móvil, licúa la gelatina y fermenta activamente los carbohidratos. Puede ser difícil aislar de cultivo primario. Un medio selectivo el agar Mac Conkey, se ha descrito para su aislamiento del suelo y del agua. Se piensa que guarda una estrecha relación con P. aeruginosa en varios aspectos, y se ha señalado que algunas cepas producen piocianina.

Se ha dicho que el germen producía dos exotoxinas termolábil, una mortal y la otra necrosante, la meliodosis en el hombre puede adoptar tres formas generales: un proceso septicémico agudo con diarrea,

una forma tifóidica subaguda con síntomas pulmonares y formación local de abscesos y una forma crónica -- que puede localizarse en cualquier tejido.

2.7) PSEUDOMONAS MALTOPHILIA.-

P. maltophilia tiene un carácter ubicuo. - Lo mismo que P. aeruginosa es cada vez más frecuente su aislamiento de la sangre y otros líquidos orgánicos. Ocupa el segundo lugar entre las Pseudomonas -- aisladas comunmente ya que el primero corresponde a P. aeruginosa.

P. maltophilia es multitríca y presenta pe nachos de 2 o varios flagelos por polo. Produce un pigmento color amarillo a cobrizo en agar tripticosa de soja y despide olor a amoníaco. Las colonias de - P. maltophilia muestran en agar sangre un característico color verde y se observa también una coloración verdosa alrededor de las áreas de crecimiento confluente. En medio de O-F con glucosa produce una - - reacción alcalina rápida (después de una noche de -- incubación) que se vuelve debilmente ácida, con la - incubación prolongada; en medio O-F con maltosa produce muy pronto acidez oxidativamente.

2.8) PSEUDOMONAS CEPACIA.-

Es resistente a la mayoría de los agentes antimicrobianos (especialmente en presencia de Ca^{2+} y de Mg^{2+}) y, por lo tanto, adquiere prevalencia e - importancia cuando las bacterias más susceptibles de la flora normal son eliminadas. En personas muy débil es o en niños puede invadir la sangre, y dar lugar a una septicemia mortal. Esto ocurre comunmente en -

enfermos de leucemia o linfomas que han recibido medicamentos antineoplásicos o irradiaciones o en pacientes que tienen quemaduras graves.

Los nombres de P. multivorans y P. kinoshii son sinónimos de P. cepacia. Esta especie causa destrucción de los bulbos de la cebolla. Tiene una amplia distribución y ha sido aislada de orina, heridas, sangre, esputos, líquido intravenoso, líquido sinovial, oído medio, vendaje de los soldados con llagas en los pies, detergentes, termómetros de los niños, respiradores, aguas naturales, troncos en descomposición y del suelo. Los pacientes se contaminan del medio ambiente hospitalario. P. cepacia se ha relacionado con endocarditis, septicemia, neumonitis infecciones de las heridas, abscesos e infecciones del tracto urinario.

Son bacilos gramnegativos, rectos o ligeramente curvos, sin esporas, flagelos polares, monotricos, motilidad normalmente positiva. Crece abundantemente en caldo con extracto de corazón-cerebro a - - 30 °C; algunas cepas crecen muy poco a 37 °C; y la gran mayoría crecen muy pobremente a 42 °C. Muchas cepas producen un pigmento visible amarillo azufre, soluble en agua, no fluorescente que es fenacínico y que es fácilmente observable en las colonias y en el agar que las rodea, al cabo de 48 horas de incubación a 20 a 30 °C. Muchas cepas pueden crecer aunque no todas, en agar desoxicolato. Las colonias son claramente amarillas en distintos medios, incluso en agar ordinario; unas pocas cepas producen un pigmento púrpura después de varios días de incubación a - - 20 °C.

La síntesis del pigmento es variable y algunas cepas no son pigmentadas. Muchas cepas son incapaces de producir, o producen lentamente la indofenoloxidad. P. cepacia es capaz de crecer en medio base mineral sin factores de crecimiento, con el ión amonio como única fuente de nitrógeno y la glucosa como única fuente de carbono y energía. Las cepas -- son sensibles normalmente al cloramfenicol pero no a antibióticos como los del grupo de la polimixina o la gentamicina.

2.9) PSEUDOMONAS PUTREFACIENS.-

P. putrefaciens se encuentra en el suelo y el agua, con amplia distribución geográfica. Se ha encontrado en leche fresca, en la cuajada y en la nata, en huevos, cultivos de tejido, heces de sorpiente, aguas de desecho, aguas de corrientes y estancadas, en el gas anturial y en el agua salada del petróleo. Es la responsable del deterioro pútrido de la mantequilla, produce sulfhídrico, cuando descompone los filetes de bacalao, y dá una coloración verde a la carne fresca, también se le ha aislado de los filetes de bacalao ó congelados y almacenados, así como en los pescados congelados. P. putrefaciens ha sido aislada en muestras clínicas de procedencia humana, por ejemplo cultivo de sangre, sangre del corazón en autopsias, orinas, heces, esputos, secreciones de heridas, abscesos, úlceras y otitis media además de escobillados faríngeos.

P. putrefaciens posee las características del género Pseudomonas, es un bacilo gramnegativo, recto o ligeramente curvo, sin esporas, flagelos po-

lares, monótricos, motilidad normalmente positiva, tiene menos de tres flagelos por polo.

P. putrefaciens crece en caldo corazón-cerebro, agar sangre y en medio basal O-F. Muchas cepas requieren una incubación de 48 horas para que crezcan en agar desoxicolato; otras son incapaces de crecer en este medio. Muchas producen una densa turbidez en caldo peptona neutro y en caldo corazón-cerebro en 18-24 horas a 30 °C; otras cepas son incapaces de crecer en estos caldos a 37 °C. El crecimiento presenta un color rosa o rojo tostado.

P. putrefaciens es un bacilo con un flagelo polar, algunas cepas tienen flagelos laterales con una longitud de onda inferior a la del flagelo terminal. Producen sulfhídrico y ennegrecen el medio de agar hierro de Kligler en profundidad y también el agar hierro triple azúcar; por esta razón algunas cepas se han confundido con salmonela. Es incapaz de crecer en medio base mineral con p-hidroxibenzoato como única fuente de carbono; 15-16 cepas crecen en medio base mineral sin factores de crecimiento, con acetato como única fuente de energía y carbono. Algunas cepas no crecen en caldo corazón-cerebro con cloruro sódico al 6 %, y otras crecen en el agar nutritivo con cloruro sódico al 10 %.

2.10) AEROMONAS.-

Los miembros del género *Aeromonas* se encuentran en muestras humanas, y de otros mamíferos, así como en el agua, suelo y otras fuentes ambientales. Cuando se aíslan los miembros de este género deben diferenciarse de las *pseudomonas* y *vibrios* y -

tambien de las enterobacterias y otras bacterias -- fermentadoras. El género comprende 3 especies: A. -- hydrophila, A. shigelloides y A. salmonicida, siendo las dos primeras patógenas para el hombre.

Existe, desde luego, una necesidad práctica en distinguir entre bacterias gramnegativas como Aeromonas, Vibrios y Enterobacterias, de las que acidifican la glucosa u otros glúcidos oxidativamente por ejemplo; Pseudomonas y Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus, y los que no utilizan los glúcidos de ninguna forma como Alcaligenes, Acinetobacter calcoaceticus var. Iwoffi (Mima), y algunas otras. El medio O-F de oxidación fermentación está diseñado para detectar pequeñas cantidades de acidez oxidativa y para distinguir la acidez fermentativa. Otro -- criterio útil en la diferenciación de los grupos mencionados de bacterias son la producción de la indofenoloxidas, descarboxilación de aminoácidos y el crecimiento de ciertos sustratos. También es útil la -- determinación de la anatomía flagelar. Como cualquier otro microorganismo, la identificación de los miembros del género Aeromonas, debe hacerse en función de sus características como conjunto, debe hacerse no basado en uno o dos criterios.

Son las especies de este género gramnegativas, bacilares y no forman esporas de 1 a 3.5 micras de largo por 0.4 a 1 micra de ancho con flagelación polar en el caso de que posean flagelos. Son heterotróficas y producen indofenoloxidas y catalasa. La glucosa y otros glúcidos son fermentados con formación de ácido o ácido y gas. Este género se distingue

de las Enterobacteriáceas por su disposición flagelar, por la producción de la indofenoloxidasas. Se diferencian de Pseudomonas por su metabolismo fermentativo, más que oxidativo, de la glucosa y otros sustratos, en el medio O-F. Los cultivos de Aeromonas se diferencian de los Vibrios por ciertas características fisiológicas y en el caso de Vibrio cholerae por sus reacciones de descarboxilación.

Las Aeromonas no son muy exigentes en sus medios de crecimiento. No tienen requerimientos especiales. Crecen abundantemente en agar nutritivo, además de crecer en agar sangre, y también las colonias aparecen en medios selectivos y diferenciales como el Mac Conkey, medio con eosina y azul de metileno y medio SS (salmonela-shigela), algunas cepas crecen en agar verde brillante, y en este caso las colonias se parecen a las de Salmonella. Las cepas de Aeromonas son fermentativas, y algunas cepas de A. hydrophila aeróbicas. Los cultivos que son inmóviles o muy lentos deben sembrarse en serie, en tubos de agar semisólidos para aumentar la motilidad y desarrollo flagelar antes de intentar teñir los flagelos. Algunos aislamientos inmóviles no se desplazan en agar blando. Poseen flagelos inactivos. Los cultivos jóvenes (2-4 horas) poseen gran cantidad de flagelos cortos y laterales; en cambio, en cultivos viejos se aprecia un flagelo polar o un penacho.

2.11) AEROMONAS HYDROPHILA.-

La especie tipo del género Aeromonas es A. hydrophila. Esta especie incluye a A. liquefaciens, A. punctata, A. formicans excepto A. shigelloides y -

A. salmonicida. A. hydrophila posee las características del género Aeromonas descritas anteriormente.

A. hydrophila se ha aislado de una gran variedad de muestras de procedencia humana, como de la sangre de pacientes con fiebre, exudados de heridas y úlceras, pus de osteomielitis, escobillados de garganta, orina, bilis, heces de personas normales y heces de personas con enfermedades diarréicas. Se encuentra en el agua, alimentos, aguas de desecho y en heces de animales. A. hydrophila es patógena para los peces, anfibios y reptiles.

A. hydrophila crece rápidamente en caldo nutritivo a temperaturas de 18 hasta 38 °C. Las colonias de muchos cultivos son incoloras en medio de Mac Conkey y desoxicolato unas pocas cepas fermentan la lactosa y dan colonias parecidas a E. coli en estos medios. Las colonias superficiales de algunos aislamientos en agar sangre aparecen rodeadas por una zona de eritrocitos hemolizados. Se ha demostrado que tales cepas hemolíticas son virulentas para los ratones cuando se inoculan por instilación nasal.

A. hydrophila es una bacteria bacilar, recta, aunque algunas células de algunos pocos cultivos tienen un aspecto curvo. Con raras excepciones, cuando tienen flagelos, éstos son polares monótricos y si tienen un único flagelo, éste alcanza generalmente una longitud de onda de 1.7 micras. Las células con dos flagelos en el mismo polo se encuentran raramente en las poblaciones predominantemente monótricas. Las cepas inmóviles son raras. Además del flagelo polar los cultivos jóvenes (24 horas) poseen - -

flagelos laterales y cortos con longitudes de onda - menor (menos de 1.7 micras).

2.12) AEROMONAS SHIGELLOIDES.-

A. shigelloides tiene las mismas caracte-- rísticas anteriormente descritas para el género Aeromonas. Esta especie fue descrita independientemente como el tipo C27 por Ferguson y Henderson y como P. shigelloides por Bader. Más tarde fueron transferi-- das al género Aeromonas. Otros autores han sugerido que estos microorganismos deben ser reclasificados como Plasiomonas shigelloides o como Vibrio shigelloides. Se necesitan estudios posteriores de hibrida-- ción del DNA entre los miembros de Aeromonas, Vibrio y de otros microorganismos relacionados, para poder efectuar un correcto cambio taxonómico.

A. shigelloides se ha aislado de heces hu-- manas y de animales y de una gran variedad de mues-- tras humanas como sangre, líquido cefalorraquídeo, - se ha asociado con shigela en personas con disente-- rías. Más aún se cree que fue el agente etiológico - en el caso de dos brotes de gastroenteritis aguda.

A. shigelloides crece bien en caldo nutriti-- vo y en extracto a 18-38 °C. Muchas cepas producen - colonias incoloras en medios como agar Mac Conkey y desoxicolato. En estos medios las cepas que fermentan la lactosa dan colonias de color rojo o rosado. Las colonias son a menudo incoloras o blancas después de ser incubadas 24 horas pero pasan a ser rosas o inco-- loras con papilas rojas después de una incubación -- continuada. Las cepas de esta especie crecen en me-- dio SS, medio con verde brillante y agar con sulfito

de bismuto. En medios ordinarios no se producen pigmentos y no aparece un halo de hemólisis de eritrocitos alrededor de las colonias cuando éstas crecen en agar sangre.

A. shigelloides son bacterias bacilares, normalmente móviles, aunque pueden encontrarse cepas inmóviles flageladas o sin flagelos. Cuando son flageladas, los flagelos son de 1-5, polares y largos - con una longitud de onda de media 3.5 a 4 micras. En los cultivos jóvenes (2-4 horas), las células poseen flagelos laterales además de él o los flagelos polares. Estos flagelos laterales tienen menor longitud de onda (menos de 1.7 micras) que los polares.

2.13) AEROMONAS SALMONICIDA.-

A. salmonicida ha sido incluida en el género Aeromonas por Griffin. Smith ha sugerido cambiarla al género Necromonas. Por el mismo motivo que A. shigelloides hasta que no se hayan efectuado los estudios de hibridación del DNA, se prefirió situarla en el género Aeromonas.

A. salmonicida produce furunculosis epizootica y bacteremias en peces, particularmente en los salmónidos, tienen una amplia distribución geográfica en lagos o presas de agua dulce y es importante para las industrias de criaderos de peces. Se describe someramente a este microorganismo porque es presuntible que puede aislarse del hombre alguna vez.

Los cultivos de A. salmonicida crecen bien en caldo nutritivo y con extracto a 18-25 °C. siendo la temperatura óptima aparente 22 °C. Este microorganismo crece tan sólo pobremente a 35-37 °C o no cre-

ce; así pues, es probable que no pueda aislarse de - medios incubados a ésta temperatura, muchas cepas producen un pigmento marrón soluble, parecido a la melanina, pero este pigmento no se forma en ausencia de fenilalanina o tirosina. Es una bacteria bacilar, inmóvil sin flagelos.

2.14) Plesiomonas shigelloides.-

La única especie de este género, Plesiomonas shigelloides estaba incluida anteriormente en el género Aeromonas.

Se ha aislado de agua dulce, lo mismo que de varios animales. Es oxidasa positiva y produce ácido sin formación de gas por fermentación de los hidratos de carbono. El microorganismo no es beta-hemolítico en agar sangre y generalmente no fermenta la lactosa en agares entéricos. Da una reacción arginina-dihidrolasa positiva, generalmente es lisina -- descarboxilasa-positiva; en cambio, es lipasa negativa. No degrada la gelatina.

La mayor parte de las cepas son sensibles al agente vibriostático 2,4-diamino-6,7-dibispropil pteridina. Lo mismo que las Aeromonas, puede crecer en varios medios entéricos. Por lo general se observa motilidad con flagelos polares, casi siempre los laterales aún cuando en cultivos jóvenes pueden verse flagelos laterales y células monótricas y también se encuentran cepas inmóviles.

Se ha aislado P. shigelloides de las heces del ser humano y de cultivo de sangre y líquido cefalorraquídeo. Se le considera causa de gastroenteritis aguda. Con frecuencia, Plesiomonas, es resis-

te a la ampicilina y carbonicilina pero, lo común es susceptible a las cefalosporinas, tetraciclina, aminoglucósidos, cloranfenicol y cotrimoxazol.

Plesiomonas son bacilos anaerobios facultativos, en forma de bastón, que pertenecen a la familia Vibrionaceae. Plesiomonas no se ha definido -- como causante de brotes de enfermedades intestinales en huéspedes saños. La mayor parte de las evidencias de su papel como patógeno procede de estudios que -- demuestran que hay mayor número de aislamientos en heces de enfermos con diarrea que en heces de individuos testigos; sin embargo, aislar un microorganismo de las heces no prueba su papel etiológico.

P. shigelloides ha sido relacionada con enfermedades gastrointestinales moderadas de curación espontánea; la diarrea es acuosa, no mucóide y sin sangre la mayor parte de los casos, aunque en casos puede ser verdosa, esponjosa y con sangre. No es posible calcular el periodo de incubación. La duración de la enfermedad puede durar de uno a siete días en individuos normales, pero en infantes puede ser mayor. En pacientes con enfermedad hepatoiliar o procesos malignos puede presentarse complicaciones graves como sepsis.

El diagnóstico, a partir del cultivo de heces normalmente no se realiza en el laboratorio de rutina; en ocasiones, estos microorganismos pueden confundirse con enterobacterias si no se practica -- prueba de oxidasa. El diagnóstico correcto requiere métodos de cultivos adecuados y las colonias sospechosas deben probarse con reactivos para oxidasas, -- pues pueden confundirse con E. coli (las enterobacte

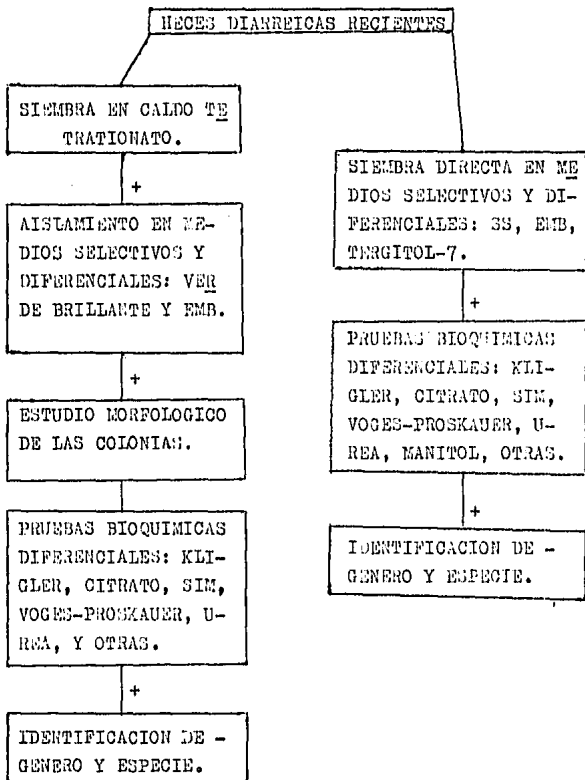
rias son oxidasa negativa).

Se ha descrito gran variedad de medios de cultivo para aislamiento de P. shigelloides, desarrollados fundamentalmente en base a que esta bacteria es resistente a ampicilina; sin embargo, es más práctico utilizar la prueba de la oxidasa y dejar los medios con antibióticos para los casos en que el número de microorganismos sea reducido y su papel como causante de diarreas incierto. En la fase aguda de diarrea estos agentes se encuentran presentes en grandes cantidades, por tanto se requiere de aislamiento en medio no selectivo para demostrar su elevada proporción con relación a otros componentes de la flora, lo que puede ser índice de actividad patógena.

Como P. shigelloides generalmente causa una enfermedad en personas normales no se recomienda tratamiento, pero en personas que presentan complicaciones o desarrollan diarrea crónica se ha utilizado penicilina, ampicilina y carbenicilina, aunque no se conoce bien el comportamiento pero existen informes que es resistente a dichos antibióticos.

C A P I T U L O I I I

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S



+ Incubación a 37 °C por 24 horas.

Diagrama de flujo donde se muestra el procesamiento de las muestras una vez llegadas al laboratorio.

Se recolectaron 150 muestras de heces diarréicas de niños recién nacidos a cinco años de edad proporcionadas por diferentes hospitales.

Las muestras fueron tomadas con hisopos -- estériles en tres formas diferentes: a) Al niño directamente con el hisopo humedecido en solución salina; b) Del pañal del niño o del papel con el hisopo estéril; éstas dos primeras formas de recolección se llevaron al laboratorio en el medio de transporte de Cary-Blair conservándose en previa refrigeración; -- c) Directamente del frasco con el hisopo estéril.

Una vez obtenidas las muestras se llevaron al laboratorio donde inmediatamente fueron procesadas de la siguiente manera:

De cada medio de transporte Cary-Blair se sacaba el hisopo que contenía la muestra en estudio y se descargaba en los medios selectivos y diferenciales esenciales para el aislamiento de bacilos -- gramnegativos como son el SS, EMB y Tergitol-7; sembrándose por la técnica de aislamiento por estrías e incubándose a 37 °C por 24 horas, luego se pasaba -- este mismo hisopo a un caldo de enriquecimiento como es el caldo tetracionato para primoincubación a 37°C por 24 horas para una posterior resiembrada.

Pasado el tiempo de incubación, se veía el desarrollo en los medios; y de las colonias sospechosas lactosa negativas, que tienen las siguientes características; en el medio SS tiene como indicador al rojo neutro, las colonias fueron incoloras tomando un ligero color gris claro, mucoides y redondas al igual que en el medio EMB que tiene como in--

dicador a eosina y azul de metileno; y en el medio de agar Tergitol-7 que tiene como indicador al azul de bromo timol, las colonias fueron azules.

A estas colonias se les hicieron pruebas bioquímicas para identificar a la bacteria en estudio, siendo las siguientes bioquímicas: a) Kligler; b) Citrato; c) LIA; d) SIM; e) MR; f) VP; g) Sacarosa; h) Urea; i) Malonato-Fenilalanina.

Después del tiempo de incubación los caldos que contenían estos gérmenes patógenos demostraron las características siguientes: desarrollo en exceso formando una densa turbidez, película y abundante depósito viscoso desintegrable; con dichos caldos que contenía el hisopo se hizo la resiembra en los medios diferenciales y selectivos como el verde brillante y EMB por la técnica de aislamiento por estrías incubándose a 37 °C por 24 horas.

Se observó el desarrollo en dichos medios y con las colonias sospechosas se hizo exactamente lo mismo anteriormente descrito, tomando en cuenta que en el agar verde brillante las colonias fueron grandes, rojas y secas.

3.2) MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO.

a) CALDO TETRACIONATO.- Se utiliza para enriquecer miembros del grupo salmonela (bacilos gramnegativos) en el aislamiento de éstos organismos en material infeccioso.

El honor de descubrir la utilidad de un caldo con tetracionato para enriquecer el grupo tifoide y paratifoide se atribuye a Mueller quien de-

mostró claramente que inhibía o eliminaba los organismos coliformes y permitía que los tifoïdes y paratifoïdes crecieran casi sin restricci3n.

Schaeffer, utilizando caldo con tetratona, tambien demostró la enorme eficiencia del enriquecimiento detectando cuatro veces tantos especímenes fecales positivos tifoïdes y paratifoïdes como podían encontrarse sembrando directamente en placa.

3.3) MEDIOS DIFERENCIALES Y SELECTIVOS.

Son muy útiles cuando la muestra proviene de alguna parte del cuerpo, en donde existe flora normal, por lo cual el desarrollo de los habitantes normales puede ser ampliamente inconveniente y se requerirá entonces de medios que supriman este crecimiento y al mismo tiempo que favorezcan el crecimiento de invasores, los cuales en patología clínica, son denominados como los organismos deseados. Con este propósito han sido creados los medios de este tipo y como las propiedades inhibitorias pueden ser específicas, el medio de cultivo escogido, debe ser de acuerdo al microorganismo que tratemos de aislar.

a) AGAR SS (Salmonella-Shigella Agar).-- El agar SS es un medio altamente selectivo que inhibe el desarrollo de la mayoría de los coliformes y permite el de especies de salmonela y shigela de muestras ambientales y clínicas. La alta concentración de sales biliares y citrato de sodio inhibe a todas las bacterias grampositivas y a muchas gramnegativas, incluyendo las coliformes. La lactosa es el único hidrato de carbono y el rojo neutro detecta la producción de ácido.

El tiosulfato de sodio es una fuente de -- azufre, las bacterias que producen H_2S se detecta -- por el precipitado negro formado por el citrato fé-- rrico (relativamente insensible). La alta selectivi-- dad del SS permite el uso de un inóculo abundante.

Es usado para diferenciar fermentadores de lactosa de los que no la fermentan y proporcionan la máxima inhibición de organismos coliformes sin res-- tringir el crecimiento de bacilos patógenos gramne-- gativos. Shigella, Salmonella y otros no fermentado-- res de la lactosa producen colonias translúcidas u -- opacas que son por lo general lisas. Los pocos orga-- nismos que fermentan la lactosa que se desarrollan, -- se diferencian fácilmente por sus colonias rojizas, -- mucoides o con el centro de color negro.

b) AGAR EMB (Eosina y Azul de Metileno Agar).--

Es un medio diferencial utilizable en lugar de agar de Mac Conkey para aislar y detectar enterobac-- terias ó bacilos coliformes relacionados en muestras con bacterias mixtas. Se recomienda para la detecci-- ón y aislamiento de bacterias entéricas gramnegati-- vas.

Los colorantes de anilina (eosina y azul - de metileno) inhiben a las bacterias grampositivas y a las gramnegativas exigentes. También se combinan -- precipitando a pH ácido, actuando como indicadores -- de producción de ácidos.

El agar EMB de levine con lactosa solamen-- te dá reacciones más paralelas a las del agar de Mac Conkey; la fórmula modificada detecta también fermen-- tadores de sacarosa.

c) AGAR TERGITOL-7.- Es un medio selectivo para la enumeración e identificación de miembros del grupo coliforme. Es un medio selectivo para E. coli y miembros del grupo coliforme preparado de acuerdo con la fórmula publicada por Chapman.

Chapman manifestó que la adición de tergitol-7 a un medio de agar consistente en peptona proteosa no. 3, extracto de levadura, lactosa y azul de bromo timol, permitía un desarrollo sin restricción de todos los organismos coliformes e inhibía el desarrollo de formadores de esporas gramnegativos así -- como de microorganismos grampositivos.

d) AGAR VERDE BRILLANTE.- Es un medio altamente selectivo recomendado para el aislamiento de salmonela, distintas de la Salmonella typhi, directamente de excremento u otros materiales sospechosos de contener estos organismos, ó después de un enriquecimiento preliminar en caldo con tetrationato.

El empleo de una agar con verde brillante como medio primario de siembra para aislamiento de salmonela, fué originalmente descrito por Kristensen Lester y Jurgens, los cuales pusieron de manifiesto su utilidad para la diferenciación de paratifoides B y de otros bacilos gramnegativos.

3.4) MEDIO DE TRANSPORTE PARA ESPECIMENES MICROBIOLOGICOS.

a) MEDIO DE CARY Y BLAIR.- Las torundas de transporte y los medios de transporte se utilizan en la recogida, transporte y conservación de espécime--

nes microbiológicos.

Se emplean varios métodos en el transporte y conservación de especímenes. El método utilizado depende de la clase de espécimen bajo estudio. Una forma común de transporte y conservación incorpora el uso de un medio de transporte. Entre los microorganismos que han sido transportados con éxito en este medio están Neisseria, Haemophilus influenzae, Bordetella pertusis, Streptococcus, Staphylococcus, Neumococcus, Shigella, Salmonella, Escherichia, Enterobacter y Trichomonas vaginalis. Como norma estos organismos muestran escasa ó ninguna reducción de viabilidad en este medio durante su transporte dentro de un periodo de 24 horas. Posteriormente, existe una disminución gradual de células viables durante periodos de más de 72 horas. Se recomienda que los especímenes transportados se cultiven sin demora después de recibirlos en el laboratorio.

Cary y Blair utilizando el medio de transporte Sturat al transportar especímenes fecales que contenían shigela, también experimentaron dificultades con el sobrecrecimiento de contaminantes en un gran número de especímenes. Estos autores tomaron conciencia de los organismos contaminantes (E. coli, E. freundii y E. aerogenes) en relación con la composición del medio de transporte y llegaron a la conclusión de que los contaminantes obtenían su energía del glicerofosfato. Cary y Blair observaron que Verkatraman y Ramakrishnan habían mantenido Vibrio cholerae viable durante más de 92 días en un medio de sales marinas, sin nutrientes, ajustado a un pH de 9.2. Por ello, sustituyeron el glicerofosfato por --

fosfatos inorgánicos en el medio de transporte de -- Stuart y eliminaron el sobrecrecimiento de contami-- nantes.

Amies, confirmó las observaciones de Cury y Blair de que el tampón de sales inorgánicas era -- superior al glicerofosfato. El modificó además la -- fórmula de Cury y Blair mediante el uso de una solu-- ción de sales balanceadas que contenían el tampón de fosfato inorgánico y omitiendo el azul de metileno.

El medio así modificado, según el autor, - proporcionaba significativamente un porcentaje más - alto de cultivos más que el medio de transporte de - Stuart.

Este medio de transporte se recomienda pa-- ra el transporte de especímenes microbianos por co-- rreo ó bien al laboratorio para su cultivo. Se hace-- según el modelo de la modificación de Cary y Blair - del medio de transporte de Stuart.

Bacto medio de transporte de Stuart se re-- comienda como un sustrato para transportar especímenes clínicos que contengan bacterias, hongos ó pará-- sitos en la práctica de los laboratorios de salud -- pública. Posee la capacidad de mantener viables du-- rante el transporte a microorganismos fastidiosos.

3.5) PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

a) PRUEBA CON AGAR HIERRO DE KLIGLER.- De-- termina la capacidad de un organismo de atacar un hi-- drato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción ó no de gases, junto con la determinación de posible producción de

ácido sulfhídrico (H_2S).

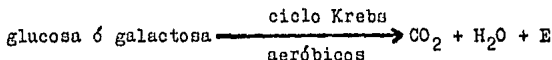
El agar hierro de Kligler es un medio diferencial en tubo que sirve con doble fin:

- 1.- Determinación de las fermentaciones de los hidratos de carbono.
- 2.- Determinación de la producción de ác. sulfhídrico.

En el medio de agar hierro de Kligler, algunos organismos tiene la capacidad de fermentar ambos hidratos de carbono (lactosa y glucosa); otros fermentan solamente la glucosa y otros no son capaces de fermentar ni la lactosa ni la glucosa. La fermentación del hidrato de carbono puede llevarse a cabo con producción o no de gases ($CO_2 + H_2$).

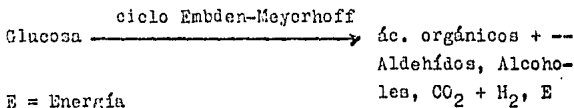
La fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de flauta) y anaeróbicamente (en la capa inferior del cultivo). En el pico de flauta el monosacárido glucosa es catabolizado inicialmente por medio del ciclo de Embden-Meyerhoff, utilizado tanto por los aerobios como por los anaerobios para dar el intermediario clave, ác. pirúvico. A su vez, este ác. es degradado por medio del ciclo de Krebs, por los aerobios ó anaerobios facultativos para dar CO_2 , H_2O y energía. Ambos ciclos el de Embden-Meyerhoff y el de Krebs, comprenden etapas en serie que producen muchos intermediarios; en cada etapa intervienen enzimas específicas. La lactosa es un disacárido formada por dos unidades de monosacáridos: glucosa y galactosa.

Lactosa $\xrightarrow{\text{beta-galactosidasa}}$ glucosa + galactosa



E = Energ\u00eda

En la capa profunda del cultivo en agar hierro de Kligler, existen condiciones aner\u00f3bicas por lo cual es metabolizada la glucosa a trav\u00e9s del ciclo de Embden-Meyerhoff, en ATP y el intermediario clave, \u00e1c. pir\u00fabico, que despu\u00e9s es convertido en diversos productos finales estables; \u00e1c. l\u00e1ctico y/u otros \u00e1cidos org\u00e1nicos, aldeh\u00eddos, alcoholes, CO₂, H₂ y energ\u00eda.



Se han observado tres formas b\u00e1sicas de --fermentaci\u00f3n en el medio agar hierro de Kligler:

- 1.- Fermentaci\u00f3n de la glucosa solamente.
- 2.- Fermentaci\u00f3n tanto de glucosa como de la lactosa
- 3.- No fermentaci\u00f3n de la glucosa ni de la lactosa.

El indicador de pH en esta prueba es el --rojo de fenol, los indicadores del H₂S son:

- 1.- Tiosulfato de sodio; 2.- Citrato f\u00e9rrico de Amonio.

Los resultados de esta prueba se interpretan de la siguiente manera:

A) Utilizaci\u00f3n del hidrato de carbono.

- 1.- Fermentaci\u00f3n de la glucosa solamente.-

- a) En pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo.
- b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo.

2.- Fermentación tanto de la glucosa como de la lactosa.-

- a) Pico de flauta. Reacción ácida. Color amarillo.
- b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo

3.- No fermentación de la glucosa ni de la lactosa.-

- a) Pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo
- b) Capa profunda.

1.- Organismo aeróbico, no hay cambio de color.

2.- Organismo facultativo, reacción alcalina, color rojo.

B) Producción de gas se manifiesta por lo siguiente:

- a) Una o varias burbujas en el medio.
- b) Desdoblamiento del medio.
- c) Desplazamiento completo del medio del fondo del tubo, dejando un área clara.
- d) Ligera muesca del medio en el costado del tubo.

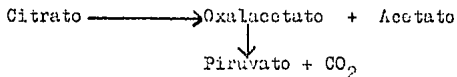
C) Producción de ác. sulfhídrico se manifiesta por:

- a) Color negro distribuido por toda la capa profunda
- b) Un precipitado negro distribuido por la capa profunda, pero que no oculta totalmente la acidez.

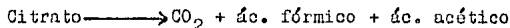
b) PRUEBA DEL CITRATO DE SIMMONS.- Deter--
na la capacidad de un organismo de utilizar citrato
como única fuente de carbono para el metabolismo, --
provocando alcalinidad.

Algunas bacterias pueden suministrar ener--
gía en ausencia de fermentación o producción de ác.
láctico empleando el citrato como única fuente de --
carbono.

El metabolismo del citrato comprende una -
condensación del acetilo con la Co. A y oxalacetato
para entrar en el ciclo de Krebs, se considera actual--
mente que el oxalacetato y el acetato son interme--
diarios en el metabolismo del citrato.

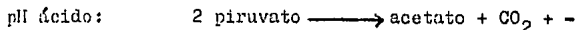
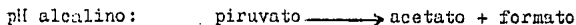


Los productos obtenidos del metabolismo --
del citrato dependen del pH del medio. Si el pH au--
menta (alcalino), se produce más acetato y formato,-
con una disminución de la producción de lactato y --
CO₂. Por encima de pH 7 no hay producción de lactato
y los productos son:



Con un pH ácido el acetimetilcarbinol - -
(acetofna) y el lactato son los principales produc--
tos de utilización del citrato.

La degradación del piruvato depende del pH
del medio:



lactato



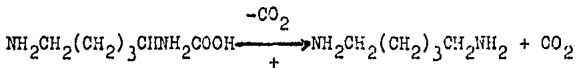
El indicador de ph en esta prueba es el azul de bromo timol.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- 1.- Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta.
- 2.- Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color (verde).

c) PRUEBA DEL LIA (Lisina Hierro Agar).-

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas sustrato-específicas, capaces de actuar sobre la porción carboxilo (COOH) de los aminoácidos, conformación de aminas de reacción alcalina. Esta reacción conocida como descarboxilación, produce dióxido de carbono como producto secundario.



L-Lisina

Cadaverina (diamina)

+ = Lisina descarboxilasa.

Cada una de las descarboxilasas es específica para un aminoácido. Lisina, Ornitina y Arginina son los tres aminoácidos ensayados habitualmente en la identificación de las enterobacterias y producen las siguientes aminas específicas:

Lisina	—————	Cadaverina
Ornitina	—————	Putrescina

Arginina ————— Citrulina

Determina la capacidad de descarboxilación de las enterobacterias. El aminoácido (Lisina) por ensayar se añade al medio base antes de inocular el organismo en estudio y se incuba por cierto tiempo. Durante las etapas iniciales de la incubación, el tubo se vuelve amarillo debido a la fermentación de la pequeña cantidad de glucosa del medio, si el aminoácido (lisina) es descarboxilado se forman aminas -- alcalinas y el medio se vuelve a su color púrpura -- original.

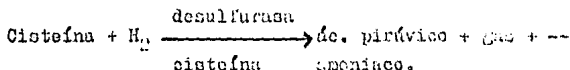
Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

El desarrollo de un color amarillo en el tubo control indica que el organismo es viable y que el pH del medio ha disminuido como para activar las descarboxilasas. El retorno al color azul púrpura de tubo que contiene el aminoácido (lisina) indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas -- por descarboxilación.

4) PRUEBA DEL ACIDO SULFURICO.- Determina si se ha liberado ác. sulfhídrico (H_2S) por acción enzimática, de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro. Algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen produciendo el gas ác. sulfhídrico (H_2S).

La peptona, la cisteína, la cistina y el tiosulfato, son fuente de azufre, pero las diferentes especies utilizan compuestos distintos o amino--

ácidos que contienen azufre para producir H_2S . La enzima responsable de esta actividad es la cisteinasa. El catabolismo anaeróbico de la cisteína de H_2S ácido pirúvico y amoniaco.



La bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio por medio de una reacción de reducción que da un sulfito y un sulfato. El gas incoloro, H_2S reacciona con una sal pesada, citrato férrico de amonio para producir un precipitado negro insoluble, sulfuro ferroso.

Para determinar la producción de ácido sulfhídrico deben tenerse en cuenta cuatro factores:

- 1.- El tipo y la disponibilidad de la fuente de azufre.
- 2.- La sensibilidad de la prueba para la detección del H_2S .
- 3.- El crecimiento de un organismo en un medio básico.
- 4.- La presencia de la enzima productora de H_2S en el organismo que se estudia.

Los indicadores del ácido sulfhídrico son los siguientes:

- 1.- Hierro; 2.- Sulfato ferroso; 3.- Sulfato de amonio ferroso; 4.- tiosulfato de sodio o sulfito de bismuto.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

A) Medios de aminoácidos que contienen - -
azufre:

1.- Medios en tubo: AHK, SIM.

a) Positivo: se observa ennegrecimiento del me-
dio.

1.- Siguiendo la línea de inoculación.

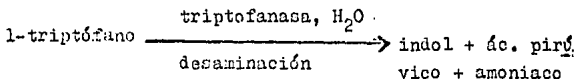
2.- En toda la capa superficial.

b) Negativo: No se observa ennegrecimiento.

c) PRUEBA DEL INDOL.- Determina la capaci-
dad de un organismo de desdoblar el indol de la molé-
cula de triptófano.

El triptófano es un aminoácido que puede -
ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres -
metabolitos indólicos principales: indol, escatol --
(metilindol) e indolacético, diversas enzimas intra-
celulares que intervienen en este proceso reciben el
nombre colectivo de "triptofanasa".

El principal intermediario en la degrada-
ción del triptófano es el ác. indolpirúvico, del cu-
al puede formarse indol por desaminación.



Las enzimas triptofanasa cataliza la rea-
cción de desaminación atacando la molécula triptófa-
no. La desaminación por el triptófano es del tipo --
reductor, por lo cual es extraído el NH_2 y liberado
como NH_3 y energía, que es utilizada por la bacteria
la degradación por el triptófano libera indol, ác. -
pirúvico, amoníaco y energía.

El indol, desdoblado de la molécula de triptófano puede ser detectado por un reactivo que posea una combinación química que produzca un color definido. La presencia o ausencia de formación de indol se emplea para la identificación bacteriana.

Cuando existe indol, éste se combina con el aldehído que se encuentra tanto en el reactivo de Kovacs como en el de Ehrlich, para dar un color rojo en la capa de alcohol. Esta reacción se produce por un proceso de condensación formado por un desdoblamiento ácido de la proteína, la reacción de color se basa en la presencia de la estructura pirrólica en el indol.

Los reactivos utilizados para interpretar esta prueba son los siguientes: a) Reactivo de Ehrlich; b) Reactivo de Kovacs.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- 1.- Prueba Positiva: un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica.
- 2.- Prueba Negativa: no se produce color en la capa alcohólica; toma el color del reactivo de Ehrlich o de Kovacs (amarillo).
- 3.- Variable (\pm): un color anaranjado en la superficie del medio debido a desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser un precursor de la formación de indol.

f) PRUEBA DE LA MOTILIDAD.- Determina la capacidad de un organismo si es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos.

que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo, algunas formas de cocos son móviles.

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo, los organismos no móviles carecen de flagelos.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

A) Medio de motilidad.

- 1.- Prueba Positiva (motilidad): los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbidez. Pueden mostrar un crecimiento en estrías vellosas.
- 2.- Prueba Negativa (sin motilidad): crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra, el medio circundante se mantiene claro.

g) PRUEBA DEL ROJO DE METILO (MR).- a) Comprueba la capacidad de un organismo de producir y -- mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. b) Es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación del -- pH); algunos organismos producen más ácido que otros.

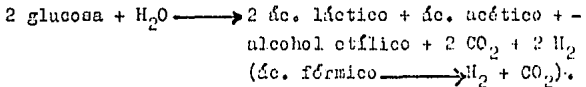
La prueba del rojo de metilo se basa en el empleo de un indicador de pH, rojo de metilo, para -- determinar la concentración de iones hidrógeno pH -- presente cuando un organismo fermenta la glucosa.

Los organismos rojo de metilo positivos -- producen un alto volumen de ácidos: láctico, succí--

nico, acético y fórmico; la descomposición del ác. - fórmico es la llave para la producción de hidrógeno y anhídrido carbónico.

Los organismos rojo de metilo positivos - producen más ácidos y dan como resultado un bajo pH terminal manteniendo un medio ácido, (pH: 4.2 ó - - menos).

La reacción general del metabolismo de la glucosa es la siguiente:

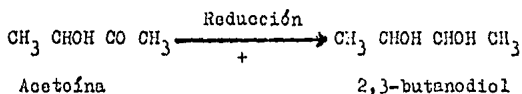


Los organismos rojo de metilo positivos -- producen ácidos estables, manteniendo una alta concentración de iones hidrógeno hasta alcanzar cierta concentración y entonces cesa toda actividad.

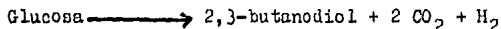
Los organismos rojo de metilo negativos - también producen ácidos (acético, láctico y fórmico) pero tienen una concentración menor de iones hidrógeno, estos organismos continúan metabolizando los - productos iniciales de la fermentación por descarboxilación producen acetilmetilcarbinol neutro, lo que da un elevado pH terminal que disminuye la acidez -- del medio, elevando el pH hacia la neutralización -- (pH: 6 ó más).

La validez de la prueba del rojo de metilo depende de un tiempo de incubación suficiente como - para permitir que se produzca la diferencia en el me - tabolismo de la glucosa.

El medio empleado para esta prueba es el -



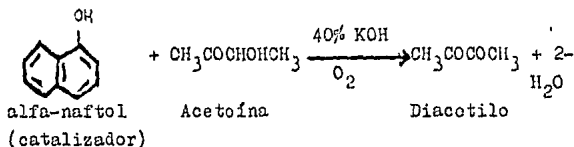
+ = diacetil (acetoína) reductasa.



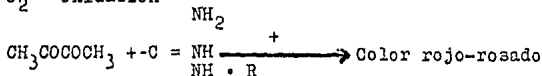
En presencia de oxígeno atmosférico y álcali; los productos finales neutros acetoína y 2,3-butanodiol son oxidados en diacetilo. Se utiliza el medio de Clark y Lubs (caldo MR/VP), y los reactivos - VP de Barritt.

A) Alfa-naftol: actúa como intensificador del color y es una sustancia nitrogenada que se encuentra en la peptona y diacetilo.

B) Hidróxido de potasio: actúa como agente oxidante para apresurar la oxidación de la acetoína en diacetilo, reactante esencial que da una reacción de color con el KOH y peptona.



O₂ = Oxidación



Diacetilo Núcleos en (arginina: NH=C(NH₂)·NH
 Sustrato peptona (CH₂)₃ CH(NH₂)COOH)

+ = Condensación

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- a) Reacción VP Positivas: color rojo rosado en la su perficie del medio (presencia de acetofina).
- b) Reacción VP Negativa: color amarillo en la superficie en el medio (el mismo color del reactivo).

1) PRUEBA DE FERMENTACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO (Sacarosa).- Capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas visible. Las formas de fermentación son generalmente características para grupos o especies bacterianas específicas.

La fermentación es un proceso metabólico - de oxidación reducción anaeróbica, en el cual un sus trato orgánico sirve como el acceptor de hidrógeno fi nal. La fermentación de sustratos orgánicos como los carbohidratos dan tantos productos finales reducidos como oxidados. El tipo de productos finales obteni dos por la fermentación de los hidratos de carbono - dependen de varios factores:

- 1.- El tipo de organismo que lleva a cabo este proce so de fermentación.
- 2.- La naturaleza del sustrato que debe ser fermenta do.
- 3.- A veces, los factores ambientales como la tempe ratura y la acidez.

El más importante ciclo fermentativo de la degradación de la glucosa es el ciclo de Embden-Me--yerhoff.

El ácido pirúvico es el intermediario clave en la degradación de la glucosa.

Los productos finales característicos de la fermentación son:

- a) ác. láctico; b) ác. acético y fórmico; c) ác. láctico y alcohol etílico; d) alcohol etílico; e) acétilmetilcarbinol y CO_2 ; f) ác. succínico o ác. propiónico; g) CO_2 y acetona a alcohol isopropílico; - h) ác. butírico o alcohol butílico.

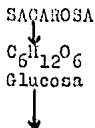
Existen clases de fermentación producidas por las bacterias y cada una depende de los productos finales característicos formados.

Las principales formas de fermentación de los grupos más importantes de bacterias son:

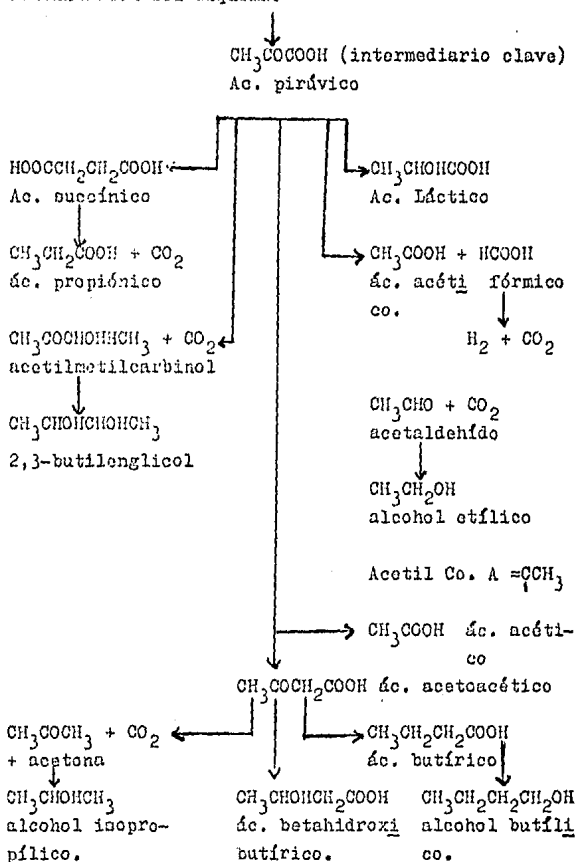
- a) Fermentación alcohólica.
- b) Fermentación del ác. láctico.
- c) Fermentación del ác. propiónico.
- d) Fermentación del grupo coliforme.
- e) Fermentación del alcohol butílico.

El medio básico empleado es el caldo rojo de fenol, pH 7.4, el indicador de pH es el rojo de fenol. Sacarosa Glucosa + Fructosa

ESQUEMA: Donde se muestra la fermentación de la Sacarosa.-



Continuación del esquema.



Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

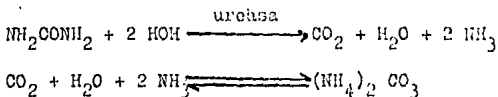
A) Medio de caldo con hidratos de carbono

y rojo de fenol.

- 1.- Positivos: ácido, color amarillo.
- 2.- Retardada: color anaranjado, si no se tiene seguridad comparar el tubo no inculado, volver a incubar.
- 3.- Negativa: alcalina, color rosa-rojizo.

j) PRUEBA DE LA UREA.- La urea es una diamida del ác. carbónico con la fórmula $\text{NH}_2\text{-CO/NH}_2$. Todas las amidas son fácilmente hidrolizables con liberación de amoniaco y dióxido de carbono.

La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea de acuerdo con la siguiente reacción química:



El amoniaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciendose una alcalinización y un aumento del pH del medio. El caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen son los dos medios más comunmente utilizados en los laboratorios clínicos para la detección de actividad de ureasa.

Los organismos que hidrolizan la urea rápidamente pueden producir reacciones positivas en 1 ó 2 horas; las especies menos activas pueden requerir 3 ó más días.

Los resultados se interpretan de la manera siguiente:

Caldo de Stuart: un color rojo en todo el-

medio indica alcalinización e hidrólisis de urea.

Agar de Christensen:

- 1.- Degradadores rápidos de urea (Proteus sp.): color rojo en todo el medio.
- 2.- Degradadores lentos de urea (Klebsiella sp.): color rojo inicial sólo en el pico y gradualmente abarca todo el tubo.
- 3.- No hay hidrólisis de urea: el medio conserva el color amarillo original.

k) PRUEBA DE MALONATO-FENILALANINA.- La fenilalanina es un aminoácido que por desaminación forma un cetoácido, el ác. fenilpirúvico. De la familia Enterobacteriaceae, sólo los miembros de los géneros Proteus y Providencia posee la enzima desaminasa, necesaria para esta conversión.

La prueba de la fenilalanina se basa en la detección de ác. fenilpirúvico en el medio, tras el desarrollo del organismo en estudio. La prueba es positiva si aparece un color verde visible por adición de una solución de cloruro férrico al 10 %.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

La inmediata aparición de un color verde intenso indica la presencia de ác. fenilpirúvico y una prueba positiva.

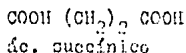
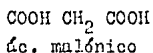
MALONATO.- Determina la capacidad de un organismo para utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono con resultados alcalinos.

Malonato es un inhibidor enzimático. - -

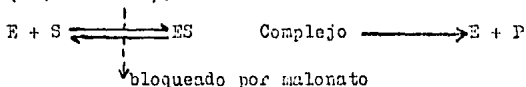
Quasted y Wooldridge fueron los primeros en demostrar la habilidad del ác. malónico (malonato) para interferir con la oxidación del ác. succínico u ác. fumárico por inhibición de la acción catalítica de la enzima succínico deshidrogenasa.

El ácido malónico inactiva la enzima por un proceso llamado inhibición competitiva. La enzima succínico deshidrogenasa transfiere hidrógenos a un compuesto aceptor conveniente en la conversión de -- ác. succínico a ác. fumárico. Sin embargo, esta reacción puede ser inhibida por un compuesto orgánico -- que es estructuralmente similar al ác. succínico y -- compite por un sitio en la enzima.

El ác. malónico difiere químicamente del sustrato por ser un ác. 3-carbono dicarboxílico mientras que el ác. succínico es un 4-carbono dicarboxílico.



El ác. malónico se une a la enzima, de tal modo que se liga al sitio activo, así que la enzima no puede combinarse con el sustrato normal, ác. succínico. Esto bloquea la acción de oxidación del ác. succínico. Un complejo enzima-sustrato es necesario para la activación del sustrato y si la activación es bloqueada no puede ser formado un nuevo producto (ác. fumárico).



E = Enzima

S = Sustrato

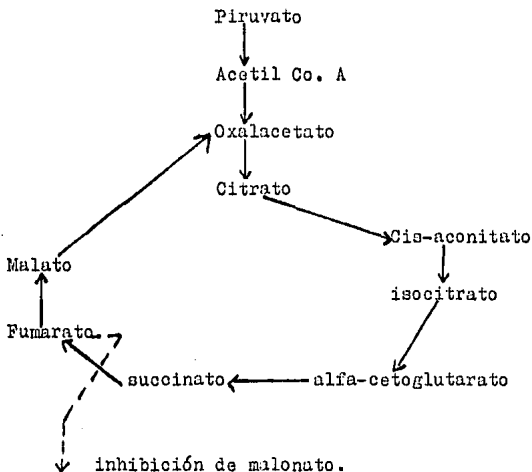
P = Producto

El grado de inhibición esta relacionado al cociente de la concentración del sustrato inhibidor. El ácido malónico inhibe al ácido succínico por ser análogo al metabolismo normal del ácido succínico y este antagonismo metabólico, tiene la propiedad antibacteriana de inhibir el crecimiento. Sin embargo, la inhibición competitiva es una reacción reversible.-- Si la concentración del sustrato normal (succínico) se adiciona al medio y un aceptor de hidrógenos está presente, el malonato se desprende de la enzima la cual será libre para catalizar la oxidación del ácido succínico a fumárico.

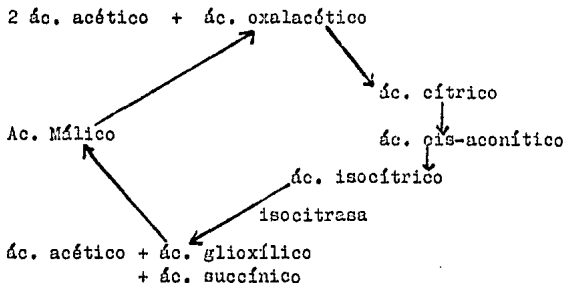
En el ciclo de Krebs cada compuesto ácido está influido por una enzima específica, una molécula es utilizada y otra formada en un proceso paso a paso. Si la formación de un ácido en particular es detenida y no reemplazada, así como el ácido fumárico, - el ciclo de Krebs detiene su función.

Una gran cantidad de energía para el metabolismo bacteriano es proporcionada por el ciclo de Krebs. La célula bacteriana entonces debe confiar en el ciclo del ácido glioxílico para la producción de intermediarios además de continuar el metabolismo de la biosíntesis. Por el ciclo glioxílico la célula bacteriana regula la cantidad de acetyl Co. A introducida en el ciclo para su continuidad, la cual es controlada por la producción de la enzima isocitrasa. Sin embargo, un incremento en la concentración de ácido succínico también inhibiría a la enzima isocitrasa resultando una ausencia en la formación de ácido glioxílico y ácido acético.

ESQUEMA: Muestra un antagonismo metabólico con propiedad antibacteriana que inhibe el crecimiento.



ESQUEMA:- Muchas bacterias pueden sintetizar una pequeña cantidad de isocitrato bajo cualquier condición, pero esta síntesis es inhibida por la adición de ácido succínico a un medio de cultivo.



Por lo tanto una acumulación de ácido succínico debido a la inhibición de succínico deshidrogenasa interrumpe el ciclo de Krebs, impidiendo la producción de energía por algunos organismos y también interfieren en el ciclo del ácido glicólico, detienen además la producción de intermediarios requeridos -- por la biosíntesis de nuevos compuestos necesarios -- para el metabolismo. El resultado final es que un organismo es incapaz de crecer y reproducirse a menos que pueda fermentar o utilizar malonato de sodio como única fuente de carbono. Si tal reacción es esencial para una actividad metabólica bacteriana, entonces la inhibición del malonato presenta una actividad antibacteriana.

Se trata de un medio líquido preparado con materiales de composición química conocida son sulfato amónico y malonato sódico como las únicas fuentes de nitrógeno y carbono. Un indicador de pH, azul de bromo timol fue incorporado al medio para fines de diferenciación.

3.6) INDICACIONES PARA SIEMBRA DE BIOQUÍMICAS.-

La manera en que se sembraron las pruebas bioquímicas se hizo con una sola toma de la colonia característica y con el asa desdoblada siendo la siguiente:

- 1.- Agar Hierro de Kligler: se sembró por estría.
- 2.- Agar Citrato de Simmons: se sembró por estría.
- 3.- Agar TIA: se sembró por estría.
- 4.- Agar SIM: se sembró por picadura.
- 5.- Prueba del Rojo de Metilo: se sembró por agita--

ción en el caldo, dentro del tubo.

6.- Prueba de Voges-Proskauer: se sembró por agitación en el caldo, dentro del tubo.

7.- Prueba de la Sacarosa: se sembró por agitación en el caldo, dentro del tubo.

8.- Prueba de la Urea: se sembró por agitación en el caldo, dentro del tubo.

9.- Prueba de Malonato-Fenilalanina: se sembró por agitación en el caldo, dentro del tubo.

3.7) Los reactivos utilizados para la lectura de las bioquímicas son los siguientes:

a) SIM: Para la prueba del Indol se utilizó el reactivo de Ehrlich que contiene lo siguiente:

p-dimetilbenzaldehído	2.0 g
Alcohol Etilico Absoluto	190 ml.
HCl concentrado	40 ml.

Se utilizaron de 2 a 3 gotas de este reactivo para la interpretación de la bioquímica.

b) MR: Para la prueba del Rojo de Metilo se utilizó el reactivo Rojo de Metilo que contiene lo siguiente:

Rojo de Metilo	0.1 g
Alcohol Etilico al 95 %	300 ml.

Se utilizaron del reactivo 5 gotas para la lectura de su correspondiente bioquímica.

c) VP: Para la prueba de Voges-Proskauer (acetilmetilcarbinol) se utilizó alfa-naftol y KOH al 40%.

alfa-naftol (5 %)	5.0 g
Alcohol Etilico Absoluto	100 ml.

Hidróxido de Potasio (40 %)	40 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml.

Se utilizaron 6 gotas de alfa-naftol y 2 gotas de hidróxido de potasio.

d) Fenilalanina desaminasa: Para la prueba de la fenilalanina se utilizó Cloruro Férrico y HCl concentrado.

Cloruro Férrico	10 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml.

HCl concentrado	2.5 g
-----------------	-------	-------

Se utilizaron 4 ó 5 gotas del reactivo de Cloruro Férrico y 3 ó 4 gotas de HCl para la lectura de la bioquímica.

C A P I T U L O I V

R E S U L T A D O S

Para la realización de este trabajo se recolectaron 150 muestras fecales diarréicas proporcionadas por diferentes hospitales. El único parámetro que se tomó en cuenta del paciente, fue la edad que osciló de cero meses a cinco años de edad. No se tomó en cuenta el tipo de recipiente en el cual se recolectaron las muestras y solo en casos necesarios se transportaron en el medio de Cary-Blair, posteriormente se les hizo coprocultivo; obteniéndose los siguientes resultados que se muestran en la tabla adjunta.

4.1) TABLA DE RESULTADOS.- Indica el nombre de la bacteria aislada de las muestras procesadas, así como también el número de muestras positivas y su porcentaje correspondiente.

GENERO Y ESPECIE	MUESTRAS OBTENIDAS	MUESTRAS POSITIVAS	% DE LAS MUESTRAS
<u>Pseudomonas sp</u>	150	3	2.0
<u>P. aeruginosa</u>	150	1	0.66
<u>P. putrefaciens</u>	150	1	0.66
<u>P. putrefaciens</u>	150	4	2.6
<u>P. maltophilia</u>	150	9	6.0
<u>P. cepacia</u>	150	10	6.6
<u>P. mallei</u>	150	13	8.6
<u>Aeromonas sp</u>	150	16	10.0
<u>A. punctata</u>	150	4	2.6
<u>A. salmonicida</u>	150	13	8.6
<u>A. hydrophila</u>	150	37	24.6
<u>Flavobacterium sp</u>	150	3	2.0
<u>F. chitinoideus</u>	150	37	24.6

4.2) Los resultados obtenidos se clasificaron - en base al cuadro siguiente; para lo que las cepas - fueron numeradas de la siguiente manera:

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1.- <u>Pseudomonas</u> sp. | 8.- <u>Acromonas</u> sp. |
| 2.- <u>P. seruginosa</u> . | 9.- <u>A. punctata</u> . |
| 3.- <u>P. pseudomallei</u> . | 10.- <u>A. salmonicida</u> . |
| 4.- <u>P. nutrefaciens</u> . | 11.- <u>A. hydrophila</u> . |
| 5.- <u>P. maltophilia</u> . | 12.- <u>Plesiomonas</u> sp. |
| 6.- <u>P. cepacia</u> . | 13.- <u>P. shigelloides</u> . |
| 7.- <u>P. mallei</u> . | |

CEPA	K	C	L	S	I	M	MR	VP	S'	U	M/FA
1	A/A	V	-	-	-	V	-	-	-	V	-/-
2	A/a	+	-	-	-	+	-	-	-	V	-/-
3	a/a	+	-	-	-	+	-	-	+	V	-/-
4	a/a	V	-	+	-	+	-	-	V	V	-/-
5	a/a	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-/-
6	a/a	+	+	-	-	+	-	-	+	V	+/-
7	A/a	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-/-
8	A/a	V	-	-	V	+	V	V	-	-	-/-
9	A/A	-	-	-	+	+	V	-	V	-	-/-
10	A/A	-	V	-	-	-	-	V	V	-	V/-
11	A/a	V	V	-	+	+	V	V	V	-	-/V
12	A/a	-	+	-	+	V	+	-	-	-	-/-
13	A/a	-	+	-	+	V	+	-	-	-	-/-

INTERPRETACION: K = Kligler; C = Citrato; L = LIA; - S = Ac. Sulfhídrico; I = Indol; M = Motilidad; MR = Rojo de Metilo; VP = Vogues-Proskauer; S' = Sacarosa U = Urea; M/FA = Malonato/Fenilalanina.

A = Alcalino; a = Acido; V = Variable
+ = Positivo; - = Negativo

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En base a los resultados se puede ver el predominio de algunas de las bacterias patógenas -- presentes en los niños, ocasionando en algunos casos graves cuadros patológicos, siendo las más predominantes las siguientes:

Aeromonas hydrophila: 24.6 %

Plesiomonas shigelloides: 24.6 %

Lo cual concuerda con uno de los artículos consultados, donde se dice que los géneros de la familia Vibrionaceae: Aeromonas y Plesiomonas se encuentran entre los llamados nuevos agentes productores de diarreas en el humano, lo que ha sido determinado por estudios de correlación clínica microbiológica en diferentes países y por investigación de mecanismos de patogenia específicos, como toxinas -- descubiertos recientemente en Aeromonas.

Está muy ligado a la frecuencia de las -- diarreas la situación económica y social y el grado de higiene de las comunidades, ocupando así uno de -- los primeros lugares sobre todo en niños.

Existe un acuerdo al respecto de algunos -- elementos básicos en el control de las enfermedades diarréicas como son el aprovisionamiento de agua potable intradomiciliaria y su correcta utilización, -- aunado a la higiene satisfactoria en la producción, -- almacenamiento y distribución, así como una adecuada eliminación de los excreta humanos.

La existencia de tales servicios y su operación continua y eficiente, implican inversiones -- muy cuantiosas que no están al alcance de los países

en vías de desarrollo.

Las recomendaciones para reducir el impacto de las diarreas sobre la morbilidad y mortalidad de la población más gravemente afectadas aunado a -- disminuir las consecuencias indeseables de los epi--
--nocios diarreicos sobre el estado nutricional de los niños, en particular los lactantes y preescolares me
nores, son los siguientes:

- 1.- Manejo clínico de la diarrea aguda con énfasis -
en la rehidratación oral.
- 2.- Mejoría en la práctica de los cuidados materno--
infantiles, lactancia al seno materno, ablacta--
ción adecuada, apoyo nutricional a embarazadas y
madres lactantes y manejo higiénico del niño y -
de sus alimentos.
- 3.- Vigilancia epidemiológica a través de un sistema
de información eficiente y confiable de la inci--
dencia de diarreas que identifique grupo en ma--
yor riesgo y pueda evaluar los efectos de progra
mas de control.
- 4.- Implantación de programas de educación higiéni--
ca.

Cada uno de estos parámetros son importan--
tes para este estudio, ya que las bacterias no fer--
mentadoras se encuentran en la naturaleza en forma--
saprófitas, pudiendo ocasionar algunos casos graves -
enfermedades.

· CAPITULO VI
BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lennette, E. H.; Spaulding, E. H.; Truan, J.
Manual de Microbiología Clínica.
Editorial SALVAT Editores, S. A.
Barcelona, España; 1981.
- 2.- Finegold, Sydney M.; Martin, William J.
Diagnóstico Microbiológico (Bailey-Scott).
6ta. Edición.
Editorial Médica Panamericana, S. A.
Buenos Aires, Argentina; 1983.
- 3.- Pumarola, A.; y colaboradores.
Microbiología y Parasitología Médica.
Editorial SALVAT Editores, S. A.
Barcelona, España; 1984.
- 4.- Koneman, Elmer; y colaboradores.
Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas.
Editorial Médica Panamericana, S. A.
Buenos Aires, Argentina; 1983.
- 5.- Enfermedades Diarréicas en el Niño. Vol. 1
7ma. Edición.
Hospital Infantil de México.
México, D. F.; 1981.
- 6.- Probsther, M.; y colaboradores.
Microbiología.
Editorial SALVAT Editores, S. A.
Barcelona, España; 1969.
- 7.- Manual DIFCO. Medios de Cultivos deshidra-
tados y reactivos para Microbiología.
DIFCO Laboratories.
10ma. Edición.
1984.

- 8.- González, B. Celia; Reyes, M. Elba; y col.
Aeromonas y Plesiomonas.
Infectología.
Vol. 5, No. 6, Jun. 1985; pp. 164-168.
- 9.- Mac Faddin, Jean F.
Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria.
2nd. Edition.
U. S. A.; 1980.

INSTANESIS

TESIS • INFORMES • MEMORIAS
COPIAS • REDUCCIONES • EN-
CUADERNADO • IMPRESIONES •
COPI-OFFSET • TRANSCRIP-
CIONES IBM EN LINO • DIBUJO DE
GRAFICAS, PLANOS Y ORGANI-
GRAMAS • HELIOGRAFICAS •
REVELADO KODAK.

ENRIQUE G. MARTINEZ No. 30
(ANTES PARROQUIA)
TEL. 13-99-23 GUADALAJARA