

60.
Zep



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**FRECUENCIA DE *Salmonella*, *Escherichia coli* Y
Staphylococcus aureus, EN PRODUCTOS CARNICOS
DISTRIBUIDOS EN TIENDAS
DE AUTOSERVICIO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
MARIA DEL ROCIO LARA FUKUDA



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

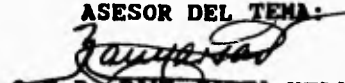
JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: PROF. ELDA PENICHE QUINTANA
VOCAL: PROF. SATURNINO DE LEON CHAPA
SECRETARIO: PROF. RAUL GARZA VELASCO
1er. SUPLENTE: PROF. ABEL GUTIERREZ RAMOS
2do. SUPLENTE: PROF. MAITE ASTIGARRAGA ZAVALETA

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA DEL DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA. FACULTAD DE QUIMICA, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:


Q.F.B. RAUL GARZA VELASCO

SUSTENTANTE:


MARIA DEL ROCIO LARA FUKUDA

A mi mamá:
Por su apoyo incondicional
que me permitió estudiar
esta carrera.

Agradezco al profesor:
Raúl Garza Velasco Q.F.B.
Por su confianza en el
asesoramiento de ésta tesis.
Por su apoyo y consejos
como maestro y amigo.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	2
I. GENERALIDADES SOBRE <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i>	
i. Clasificación taxonómica	3
ii. Características microscópicas	4
iii. Propiedades culturales	5
iv. Pruebas de identificación	10
v. Importancia de <i>Salmonella</i> en los alimentos	16
vi. Importancia de <i>Escherichia coli</i> en los alimentos	18
II. GENERALIDADES ACERCA DE <i>S. aureus</i>	
i. Taxonomía	26
ii. Microscopía	26
iii. Resistencia a los agentes físicos, químicos y biológicos	27
iv. Propiedades culturales	28
v. Pruebas de identificación	30
vi. Importancia de <i>Staphylococcus aureus</i> en los alimentos	43
III. PARTE EXPERIMENTAL	
i. Equipo, material, reactivos y medios de cultivo	46
ii. Metodología	47
iii. Resultados	51
iv. Discusión	52
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUCCION

Sin lugar a dudas, los padecimientos que se adquieren por ingestión de alimentos contaminados figuran entre los de mayor relevancia dentro de nuestro medio, dados sus altos índices de morbilidad a cualquier edad y, adicionalmente, sus notables tasas de mortalidad en la población infantil.

Entre las enfermedades intestinales más comunes destacan las gastroenteritis ocasionadas por *Rotavirus*, *Escherichia coli* -ambos microorganismos de gran significado en Pediatría-, *Salmonella sp*, *Campylobacter fetus subsp jejuni*, *Shigella sp*, *Entamoeba histolytica*, *Vibrio cholerae* y otros vibriones, *Yersinia enterocolitica*, etc. Sin embargo, también resultan importantes las intoxicaciones alimentarias asociadas a *Staphylococcus aureus* y, con menor frecuencia, afectando principalmente a los niños que consumen fórmulas lácteas, a *Bacillus cereus*.

Cabe señalar que los mecanismos a través de los cuales dichos microorganismos contaminan los alimentos, resultan muy diversos, involucrando a las personas y metodologías relacionadas con su comercialización -producción, procesamiento, almacenamiento, empaque y distribución-, como a quienes los cocinan, reparten, consumen o comparten.

El presente trabajo pretende establecer la probable frecuencia con la que diversos productos cárnicos distribuidos en tiendas de autoservicio, llegan a contener *Salmonella sp*, *E. coli* y/o *S. aureus*, debido a que comúnmente dicha clase de alimentos se consideran muy poco riesgosos como fuentes de contagio en los padecimientos intestinales.

La relevancia de *Salmonella* y *S. aureus* es directa, debido a que ambas bacterias provocan este tipo de afecciones, en tanto que *E. coli* sólo se considera muy virulenta en niños -principalmente en los menores de 5 años- pero, a cambio de ello, su presencia es un claro índice de contaminación fecal y, por lo tanto, establece la posibilidad de que los productos implicados contengan a otros microorganismos patógenos que se transmiten por vía oro-fecal.

OBJETIVO:

Establecer la frecuencia de *Salmonella sp*, *Escherichia coli* y/o *Staphylococcus aureus*, en diversos productos cárnicos que se expenden al público en tiendas de autoservicio.

I. GENERALIDADES SOBRE *Salmonella* y *Escherichia coli*

i. Clasificación Taxonómica

Salmonella y *Escherichia* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos principales géneros restantes son: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Shigella* y *Serratia*. Adicionalmente, las especies de mayor relevancia de ambos géneros en cuestión son *Escherichia coli* (única especie reconocida dentro del segundo de ellos) y *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella choleraesuis* en el primero, si bien se mencionan otras como *S. paratyphi*, *S. typhimurium*, *S. schottmulleri* y *S. hirschfeldii*, entre ellos, que en la actualidad se consideran variedades de *S. enteritidis* (2, 7, 11, 15, 31).

El nombre de la familia mencionada proviene del latín *Enterobacterium*, que significa bacteria intestinal, aunque aquélla sólo agrupa a los bacilos Gram negativos cuya característica común más trascendente es su contenido guanina + citosina (G/C) en el DNA, mismo que varía entre 38 y 60 moles % (31).

Dentro de cada género, las distintas especies sólo difieren en 10 a 20 moles % de G/C, aunque existen algunas que,

debiendo pertenecer a un mismo género, actualmente se encuentran clasificadas dentro de otro; tal es el caso de *Morganella morganii*, la cual anteriormente se denominaba *Proteus morganii*. Cabe señalar que estas situaciones son posibles hoy en día dado que, desde hace apenas algunos años, el concepto taxonómico se fundamenta en nuevas técnicas como las de hibridación, las cuales incuestionablemente resultan más específicas (31).

Por otra parte, la familia *Enterobacteriaceae* se encuentra extensamente distribuída, tanto en las plantas, el suelo y el medio ambiente, como en la flora habitual del humano, algunos de sus miembros formando parte de los microorganismos que colonizan las mucosas en condiciones de salud; aunque durante mucho tiempo se pensó que la familia no manifestaba actividad de fosfatasa, lo cierto es que recientemente se detectó que la mayoría de sus integrantes presenta esta característica (2, 7, 31).

ii. Características microscópicas

Tal como ocurre con la mayoría de los miembros de su familia, *Salmonella* y *Escherichia* son bacilos rectos Gram negativos que miden 0.5 a 3 μ de ancho por 1.5 a 6 μ de largo, generalmente móviles (con excepción de algunas cepas de *E. coli*), no esporulados y no capsulados, si bien *E. coli* presenta ocasionalmente material capsular y 2 especies de

Salmonella: *S. typhi* y *S. hirschfeldii* poseen diversas sustancias extracelulares antifagocitarias (antígeno Vi) que simulan grandes cápsulas. Cabe señalar que ambos géneros deben su movilidad a flagelos peritricos (2, 10, 23, 31).

iii. Propiedades culturales

Aunque todos los microorganismos que constituyen el objeto de este capítulo son organótrofos, también degradan los carbohidratos mediante fermentación. De cualquier manera, dependiendo de la composición de los medios en los que se les cultiva, la disminución del pH es el fenómeno que revela la utilización de los azúcares durante el crecimiento de cualquiera de estas bacterias (2, 7, 10, 15).

Medios de cultivo

Salmonella y *E. coli* presentan requerimientos nutricionales similares; es decir, no son exigentes y pueden desarrollar hasta en los medios mínimos tales como la gelosa y el caldo nutritivos, si bien generalmente se les cultiva en medios que favorecen su crecimiento, al tiempo de que proporcionan mayor información sobre su presencia durante su detección.

Dichos medios se consideran selectivos, porque inhiben eficazmente el desarrollo de numerosas bacterias Gram positivas, aunque también se clasifican como diferenciales,

merced a que en ellos se puede observar si los microorganismos fermentan o no la lactosa (2).

En este sentido, los bacilos contemplados en el presente trabajo se dividen de la siguiente manera (2, 7, 11, 15):

-Lactosa positiva: *Escherichia coli* (tal como también lo son *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*).

-Lactosa negativa: *Salmonella* (y los géneros *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, y *Shigella*).

Cabe señalar que, de acuerdo a su grado de selectividad, los medios a los que se hace referencia se clasifican en alguno de los 3 grupos siguientes:

- a. Ligeramente selectivos: el agar desoxicolato lactosa (ADL), EMB, Endo y Mac Conkey (McC).
- b. Moderadamente selectivos: el agar desoxicolato citrato lactosa sacarosa (DCLS), SS y XLD.
- c. Altamente selectivos: el agar sulfito de bismuto (ASB) y verde brillante (VB).

Aparte de sus inhibidores, los medios mencionados contienen

peptonas, lactosa (o adicionalmente otro carbohidrato fermentable sólo por los microorganismos lactosa positiva) y un indicador que virará de acuerdo al pH asociado a la capacidad -o incapacidad- que presenta(n) la(s) bacteria(s) cuyo desarrollo sustentan; en este sentido, previa incubación de 24 h, las lactosa positiva habrán generado acidez, mientras que las lactosa negativa -al no haber podido emplear los carbohidratos presentes- producirán alcalinidad, derivada de la utilización de las peptonas para obtener su fuente de carbono. Además, algunos medios contienen tiosulfato sódico y sales ferrosas para detectar síntesis de ácido sulfhídrico, e inclusive, algún inhibidor de swarming (crecimiento en enjambre), para impedir que el género *Proteus* -en caso de estar presente en la muestra- contamine las colonias "aisladas" del resto de los bacilos que hayan desarrollado (2, 18).

Condiciones de incubación

Dado que *Salmonella* y *Escherichia* son facultativas, los cultivos en los que se sospecha su presencia deben incubarse en las condiciones clásicas de aerobiosis (31).

Además, por el hecho de que estas bacterias son mesófilas, su temperatura óptima de incubación es de 35°C, resultando suficientes 24 h para el desarrollo de colonias visibles.

Tabla 1. Características de los principales medios de cultivo diferenciales/selectivos, empleados para realizar el aislamiento de enterobacterias (2, 18).

MEDIOS DE CULTIVO	INDICADOR	DETECCION DE AC. SULFHIDRICO	INHIBICION DE SWARMING
Endo	fucsina	NO	NO
EMB	eosina	NO	NO
Mac Conkey	rojo neutro	NO	NO
Tergitol 7	azul de bro mo-timol	NO	SI
Agar DLS	rojo neutro	NO	+/-
Agar DCLS	rojo neutro	NO	+/-
Agar SS	rojo neutro	SI	SI
Agar XLD	rojo de fe- nol	SI	+/-
Agar VB	rojo de fe-	NO	NO
Agar SB	-----	SI	+/-
Agar HK	azul de bro motimol	NO	NO

claves:

DLS = desoxicolato lactosa sacarosa

DCLS = desoxicolato citrato lactosa sacarosa

SS = Salmonella-Shigella

FXLD = xilosa-lisina-desoxicolato

VB = verde brillante

SB = sulfito de bismuto

HK = Hecktoen entérico

EMB = Eosina-azul de metileno

+/- = variable, dependiendo de cada cepa.

Tabla 2. Comportamiento de los indicadores presentes en los diferentes medios de cultivo incluidos en la Tabla 1 (2, 18).

INDICADOR	COLORACION A pH ACIDO	COLORACION A pH NEUTRO*	COLORACION A pH ALCALINO
Fucsina	rojo magenta	rosa claro	rosa claro
Eosina	vino oscuro	vino claro	vino claro
Rojo neutro	rosa intenso	rosa claro	amarillo
Azul de bromo timol	amarillo	verde	azul
Rojo de fenol	amarillo	rojo	rojo intenso o lila

* Los medios incluidos en la tabla 1 presentan un pH neutro antes de la incubación correspondiente.

Morfología macroscópica

Esta depende en gran medida del medio de cultivo y de cada género, si bien estos microorganismos producen colonias circulares de 2 a 4 mm de diámetro, convexas, blancas o grisáceas (cuando el medio no contiene indicador), de bordes regulares, consistencia butirácea y aspecto húmedo. Adicionalmente, *E.coli* da lugar a colonias con brillo metálico azul-verdoso en Endo y EMB, amarillas en Tergitol 7, XLD, VB y Hecktoen y de color rosa intenso en MacConkey, agar SS, DLS y DCLS; por su parte, las colonias de *Salmonella sp* suelen ser negras (por la producción de H₂S) en agar SS, XLD,

ASB y Hecktoen, amarillo paja en MacConkey en MacConkey, DLS y DCLS y de color rojo intenso en XLD y VB (2, 18, 31).

iv. Pruebas de identificación

Aunque existen numerosas pruebas para llevar a cabo la identificación de estas bacterias, prácticamente cada laboratorio selecciona las que considera más confiables, tomando en cuenta también los costos y su disponibilidad. En general, los medios implicados suelen contener diferentes fuentes de carbón y algún revelador que permite poner de manifiesto el tipo de enzimas producido por cada microorganismo, obteniéndose finalmente un patrón de resultados que conduce a su detección.

En otras palabras, dichas pruebas bioquímicas suelen diferenciar al género y, ocasionalmente, a la especie aislada, con base en su capacidad "específica" para utilizar o no los sustratos involucrados.

Aunque es muy conveniente comparar la totalidad de los resultados con tablas elaboradas después de numerosos estudios experimentales (consultar la tabla 3), algunas pruebas representan verdaderos indicadores sobre la identidad de cada bacilo Gram negativo. Por ejemplo, entre los lactosa positiva, sólo *E. coli* convierte al triptofano en indol; de la misma manera, en los lactosa negativa, la mayoría de las

cepas de *Salmonella sp* es H₂S positivo, tal como también sucede con *Proteus*, pero ambos géneros difieren en cuanto a la ureasa, la cual es positiva para este último (18, 24).

Tabla 3. Resultados de las principales pruebas bioquímicas asociadas a la identificación de enterobacterias (2, 7, 15, 18).

MICROORGANISMO	-FERMENTACION -										
	GLU	LAC	MAN	SAC	SUL	GAS	CIT	IND	MOV	UR	
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	
<i>E. aerogenes</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	
<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
<i>P. mirabilis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	
<i>P. vulgaris</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
<i>M. morganii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
<i>S. marcescens</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
<i>Salmonella sp</i>	+	-	+	-	+	V	V	-	+	-	
<i>Shigella sp</i>	+	-	+	-	-	-	V	V	-	-	

CLAVES: GLU = GLUCOSA, LAC = LACTOSA, MAN = MANITOL, SAC = SACAROSA, SUL = AC. SULFHDRIICO, CIT = CITRATO, IND = INDOL, MOV = MOVILIDAD, UR = UREASA, V = VARIABLE

Las pruebas bioquímicas elegidas en este trabajo se mencionan a continuación, describiendo brevemente sus respectivos fundamentos:

Pruebas efectuadas en el agar hierro de Kligler (18, 24)

En este medio es posible determinar si los microorganismos

fermentan o no glucosa y lactosa, así como su capacidad para producir gas ($H_2 + CO_2$) y/o ácido sulfhídrico. El fundamento correspondiente se asocia al hecho de que dicho medio se encuentra inclinado en "pico de flauta" y contiene peptonas, 1 % de lactosa, 0.1 % de glucosa y trazas de rojo de fenol, así como tiosulfato sódico y sales de hierro; la bacteria analizada se siembra por estría ondulada sobre el "pico de flauta" y por picadura en el fondo del tubo, procediéndose a incubar durante 24 h a 35°C, para realizar las lecturas correspondientes.

Los resultados pueden ser los siguientes:

- 1) Glucosa positiva y lactosa positiva, cuando todo el medio de cultivo manifiesta coloración amarilla.
- 2) Glucosa positiva y lactosa negativa, cuando la porción inferior del medio es amarilla y la del "pico de flauta" aparece rojo intenso o lila.
- 3) Glucosa negativa y lactosa negativa, si todo el medio permanece rojo o esta coloración se intensifica, o inclusive, ocurre un vire a lila.

Cabe señalar que las coloraciones amarilla y roja intensa -o lila- de los 3 casos anteriores, se relacionan con el vire

del rojo de fenol a pH ácido y alcalino, dependiendo de la fuente de carbón utilizada y de la concentración de esta última: un microorganismo glucosa positiva y lactosa negativa consumirá rápidamente la glucosa del "pico de flauta" originando inicialmente un pH ácido, pero a las 24 h se encontrará empleando las peptonas de esa porción y ésta manifestará alcalinidad -coloración roja intensa o lila-. Lo anterior no sucederá en el fondo del tubo, puesto que en ella existe mayor cantidad de glucosa y, en ese lapso, la parte inferior continuará ácida (amarilla).

4) Producción de gas, cuando el agar manifiesta ruptura o se desplaza hacia la parte superior del tubo.

5) Síntesis de ácido sulfhídrico, cuando -independientemente de la coloración relacionada con el comportamiento del rojo de fenol- se observa un precipitado negro.

Capacidad para utilizar citrato (18, 24)

Esta prueba se realiza en el agar de Simmons cuya presentación es inclinada "en pico de flauta", y su contenido fundamental es: citrato como única fuente de carbón, fosfato dibásico de amonio como única fuente de nitrógeno e indicador azul de bromotimol.

La bacteria se siembra sobre la superficie del "pico de flauta" y el medio se incuba durante 24 h a 35°C antes de realizar la lectura. La prueba se considera positiva si el indicador vira a azul -originalmente es verde- en la porción que circunda al desarrollo; el cambio se debe a la hidrólisis de la sal aminada -la cual reditúa hidróxido de amonio que alcaliniza el medio-, fenómeno que sólo se presenta cuando el microorganismo es capaz de emplear el citrato. Es preciso recordar que las bacterias se procuran una fuente de nitrógeno, siempre y cuando dispongan de la de carbón.

Prueba de la manitolasa (18, 24)

El nombre de manitolasa se refiere a todo un conjunto o complejo de enzimas encargadas de llevar a cabo la transformación del manitol, un azúcar-alcohol, en fructosa 6-fosfato, con lo cual es posible incorporar al sustrato dentro del ciclo Embden-Meyerhoff, redituando ácidos orgánicos cuya presencia se puede detectar con base en el vire de un indicador ácido-base.

El medio más utilizado para realizar esta prueba es el caldo manitol rojo de fenol, que contiene principalmente manitol, peptonas y rojo de fenol.

Previa incubación a 35°C durante 24 h, la lectura se efectúa considerando que la prueba es positiva cuando el indicador ha

virado a amarillo o, en su defecto, negativa si dicha coloración es roja intenso o lila.

Pruebas de la ureasa y de fermentación de sacarosa (18, 24)

El medio utilizado en el presente trabajo fue el caldo sacarosa-urea, que contiene principalmente urea, sacarosa, rojo de fenol y azul de bromotimol.

En esta prueba, la urea es o no hidrolizada dependiendo de que el microorganismo produzca ureasa, la cual se considera una enzima constitutiva. En caso positivo, esta última catalizará la reacción produciéndose dióxido de carbono, amoníaco y agua y, con ello, se generará carbonato de amonio -cuyo pH es alcalino-. De esta manera, el vire de los indicadores rojo de fenol y azul de bromotimol conferirán una coloración morada o lila al medio.

Por otra parte, si la bacteria posee capacidad para fermentar sacarosa -lo cual generalmente no sucede cuando produce ureasa-, los ácidos originados vía Embden-Meyerhof disminuirán el pH del medio, apareciendo una coloración amarilla.

Cabe señalar que, una vez que se ha llevado a cabo la inoculación correspondiente, la lectura se efectúa, previo período de incubación de 24 h a 35°C.

v. Importancia de *Salmonella* sp en los alimentos

La presencia del género *Salmonella* en los alimentos posee un significado muy especial, porque precisamente todos los padecimientos relacionados con él tienen su origen en la vía de penetración oral del microorganismo y, consecuentemente, en su establecimiento y colonización intestinal (19, 33).

Por lo general, se acepta que las enfermedades causadas por *Salmonella* (salmonelosis) se dividen en 3 clases: a) las gastroenteritis, cuyo principal agente etiológico es la especie *S. enteritidis*, tiene un período de incubación de 2 a 5 días y se caracteriza por fiebres moderadas, dolor abdominal, vómitos ocasionales, espasmos en el intestino y diarrea, con evacuaciones que presentan moco, y una duración que fluctúa entre los 3 y 8 días; b) septicemia, entidad clínica en la que destaca *Salmonella choleraesuis*, la cual pasa fácilmente desde el intestino hacia el torrente circulatorio, provocando los signos clásicos de invasión sanguínea: fiebre elevada, náuseas y vómitos ocasionales, postración, dolor muscular generalizado y cefalalgia intensa; c) las fiebres entéricas: tifoidea y paratifoidea, ocasionadas por *S. typhi* y las cepas paratíficas (*S. paratyphi*, *S. schottmulleri* y *S. hirschfeldii*), respectivamente (16, 19, 23, 32, 33).

Cabe mencionar que las septicemias por *Salmonella*

choleraesuis presentan índices de frecuencia mucho menores que las debidas a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y otras especies; contrastando con lo anterior, las gastroenteritis por *S. enteritidis* figuran entre los trastornos intestinales de mayor importancia, tanto en niños como en adultos y, finalmente, las fiebres entéricas representan las salmonelosis de mayor gravedad (4, 11, 15, 16, 32).

Estas últimas, independientemente de la especie involucrada, se caracterizan por presentar un período prodrómico que fluctúa alrededor de 7 días, en los cuales el enfermo experimenta molestias poco definidas (desgano, anorexia, mareo, febrículas y estreñimiento) que no le hacen suponer una afección determinada sino cansancio inexplicable. La etapa más grave del padecimiento ocurre en la segunda semana, cuando el microorganismo ha ingresado al torrente circulatorio y se establece en bazo, hígado y vesícula biliar; en este caso, los síntomas son los de una septicemia clásica, con fiebres muy elevadas, e inclusive, una roséola tífica (pequeños pero numerosos exantemas en la piel) que aparece en aproximadamente la mitad de los pacientes; es precisamente en esta etapa donde la afección puede conducir a defunciones y, por lo tanto, en donde el individuo requiere de cuidados extremos; finalmente, si se superan exitosamente los graves riesgos implicados, la persona llega hasta la

tercera semana, en la cual el microorganismo se ha desplazado -a través del colédoco- hasta el intestino delgado, presentándose un cuadro diarreico poco severo, que suele no alterar considerablemente el equilibrio hídrico y electrolítico del organismo (2, 4, 7, 32).

vi. Importancia de *Escherichia coli* en los alimentos

Puesto que *E. coli* figura entre los miembros regulares de la flora intestinal humana y de los animales de sangre caliente, su presencia en los alimentos y en otros productos de consumo humano (medicamentos, agua, etc.) se considera "índice incuestionable de probable contaminación fecal" y, por lo tanto, sugiere la probabilidad de que su consumo dé lugar a enfermedades intestinales tales como disentería bacilar o amebiana, las diferentes salmonelosis, enteritis aguda por *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* o diversos vibriones, ascariasis, teniasis (o cisticercosis), etc. (2, 4, 14).

No obstante, por sí misma, puede ocasionar enteritis epidémicas a niños menores de 5 años y a turistas, cuando se trata de cepas patógenas en intestino. En este aspecto, la especie se subdivide en 5 clases: ECET (*E. coli* enterotoxigénica), que en nuestro medio es la que afecta con mayor frecuencia a niños y turistas (en los últimos de los cuales provoca "diarrea del viajero"); ECEP (*E. coli*

enteropatógena), cuya incidencia sólo es rebasada por la de ECET; ECEI (*E. coli* enteroinvasiva); ECEH (*E. coli* enterohemorrágica) y ECEA (*E. coli* enteroadherente) (6, 8, 17, 21, 28).

En otras palabras, se trata de una especie que, conjuntamente en cuanto a sus 5 clases, se considera en América Latina como la segunda causa de muerte infantil por deshidratación, sólo superada en tal sentido por los *Rotavirus*.

Los bacilos agrupados como ECET se caracterizan por producir las enterotoxinas termolábil (TL) y termorresistente (TR), las cuales inducen la salida de gran cantidad de agua de las células de la mucosa intestinal. Con ello, el paciente manifiesta una notable deshidratación sin fiebre, acompañada por náuseas, cólicos abdominales y evacuaciones sin leucocitos polimorfonucleares (2, 7, 10, 15, 25).

En el laboratorio, para llevar a cabo la detección de la toxina termolábil, se puede recurrir al método tradicional que utiliza asa ileal de conejo; sin embargo, en la actualidad existen técnicas más precisas como las que incluyen sueros anti-toxinas, cultivos celulares donde se observan alteraciones morfológicas de las mismas, o bien, a la más reciente que emplea sondas que sólo hibridizan con las cepas que poseen el plásmido que codifica para su

síntesis. Para poner de manifiesto a la toxina termorresistente, se utiliza la prueba con ratón lactante o métodos inmunológicos tales como RIA o ELISA, los cuales requieren el empleo de un suero antitoxina que se prepara con la ayuda de una proteína acarreadora, ya que dicha toxina posee un peso molecular muy bajo y, por tanto, no es inmunogénica por sí misma (25).

Por lo que respecta a *E. coli* enteroinvasiva, se ha observado que posee un plásmido de 140 megadaltons que codifica para la producción de algunas proteínas de membrana externa que le confieren la capacidad de penetrar en células epiteliales de la mucosa intestinal, reproducirse y provocar su destrucción; lo anterior provoca la presencia de moco, sangre y abundantes polimorfonucleares en la material fecal, además de fiebres altas y dolores abdominales severos como sucede en la disentería por *Shigella sp* (6, 17, 21, 22).

Es importante mencionar que ECEI posee algunas características idénticas a *Shigella*, ya que al igual que ésta, es inmóvil y no fermenta la lactosa; además, ambas cruzan antigénicamente.

Su identificación en el laboratorio se realiza utilizando cultivos celulares o mediante métodos inmunológicos tales como el de ELISA que utiliza anticuerpos contra las proteínas

de membrana externa asociadas a la invasividad; otro método relativamente nuevo incluye la utilización de DNA que sólo hibridiza con las cepas que poseen el plásmido; además, puede emplearse el método tradicional de Sereny que consiste en inocular la cepa en la conjuntiva de un cobayo; dicha cepa se considera invasiva si 48 h después aparece conjuntivitis en el animal (7).

En cuanto a las ECEH, se ha encontrado que sólo está involucrado el serotipo 0157:H7, el cual se relaciona directamente con la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. Los principales signos clínicos son fiebre y una notable presencia de sangre en las heces aunque con ausencia de leucocitos polimorfonucleares; esta última característica diferencia la enfermedad por ECEH de la provocada por ECEI o *Shigella* (21).

Las cepas de dicho serotipo que se aíslan de pacientes con colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico poseen plásmidos que codifican para las citotoxinas semejantes a la Shiga y Vero. La primera es aparentemente idéntica a la potente citotoxina/neurotoxina/enterotoxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, ya que también reacciona y es neutralizada por anti-toxina de Shiga. Muchas cepas también elaboran una segunda citotoxina llamada Shiga-like 2 ó toxina Vero que no es afectada por la antitoxina mencionada (4, 21).

Por lo que respecta al grupo ECEP, éste es el que generalmente ocasiona confusión, ya que cuando los investigadores se refieren a él, muchos lectores piensan lógicamente pero erróneamente que se trata de cualquier *E. coli* capaz de ocasionar trastornos intestinales; sin embargo, este grupo sólo se integra por las cepas cuyo mecanismo de patogenicidad no se relaciona con la producción de enterotoxinas ni con invasividad (17, 22, 30).

En la actualidad se ha incrementado el interés por caracterizar debidamente a este grupo, al grado de que se intenta establecer su clasificación mediante diversas vías: serológicamente en función de su antígeno O, con base en su forma de adherirse a células HeLa o Hep 2 en presencia de D-manosa o de acuerdo a su capacidad para incorporar en su genoma fragmentos de DNA que codifican para una proteína de membrana externa a la que se ha denominado EAF (Factor enteroadherente de *E. coli* enteropatógena) (30).

Por lo que toca a los métodos serológicos, se ha asociado este grupo a serotipos bien definidos que pueden detectarse utilizando sueros polivalentes como el "Pasteur"; sin embargo, varios autores reportan poca confiabilidad en los resultados correspondientes, ya que sólo el 50 % de los aislamientos reportados como ECEP son confirmados como tales al probarse con sueros provenientes de laboratorios de referencia (21, 30).

Por otro lado, Trabulsi y Scaletsky observaron que ECEP se adhiere a células HeLa o Hep 2 mostrando dos característicos patrones de adherencia: "adherencia localizada" o "adherencia difusa" (30).

Por lo que corresponde a la aplicación de técnicas de índole genético para efectuar la detección de ECEP, destacan los trabajos de Nataro y cols, quienes obtuvieron una sonda de una kilobase que sólo hibrida con el DNA de cepas de *E. coli* que muestran adherencia localizada (4).

Debido a las interrogantes sobre el mecanismo de patogenicidad de este grupo, muchos investigadores han estudiado el fenómeno. Así, Polotsky notó que las cepas ECEP causaban lesiones histopatológicas en el intestino humano; concretamente, destruían las microvellosidades aunque sin invadirlas (30).

Más tarde, Cantey y Blake analizaron biopsias de intestino delgado de conejos inoculados con *E. coli* del serogrupo 015 (cepa RDEC-1) no productora de enterotoxinas y no invasiva, detectando destrucción de las microvellosidades (6).

Posteriormente, Ulshen reportó un caso de diarrea severa en una infante, en el cual evidenciaron este mismo fenómeno asociado a la presencia de una gran cantidad de *E. coli* (10^6

microorganismos por mililitro) en las correspondientes biopsias del intestino. Knutton, aplicando la microscopía electrónica al estudio de enterocitos, propuso la posible explicación de la destrucción de las microvellosidades; él postula que se lleva a cabo un proceso de vesiculación de la membrana en dos etapas: el evento inicial que se presenta al adherirse la bacteria al receptor celular a través de pili y, el segundo, que parece estar asociado a alteraciones del epitelio intestinal, el cual experimenta la elongación y vesiculación de sus microvellosidades durante la adherencia íntima; al parecer, este último fenómeno también está mediado por adhesinas localizadas en la superficie bacteriana (EAF) (17).

En dicho proceso de destrucción de las microvellosidades influyen las concentraciones de calcio, ya que cuando se encuentran por arriba de las normales, los filamentos de actina se rompen en porciones más cortas y, bajo estas condiciones, cada vellosidad se torna termodinámicamente inestable permitiendo que las bacterias se unan fuertemente a su membrana.

Con estos y otros estudios actuales, se espera que en un futuro inmediato pueda establecerse con exactitud el mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enteropatógena para que al sumarse ésto con lo que se conoce sobre los otros grupos,

sea posible diseñar algún método que prevenga eficazmente las diarreas en infantes.

Tabla 4. Principales grupos serológicos "O" de cepas diarreogénicas de E. coli (21).

<u>Categoría patogénica</u>	<u>Serogrupos O</u>
Enteropatógena (EPEC)	18, 26, 44, 55, 86, 111, 114, 119 125, 126, 127, 128 ab, 142, 158.
Enterotoxigénica (ETEC)	1, 6, 7, 8, 9, 15, 20, 25, 27, 60, 63, 75, 78, 80, 85, 88, 89, 99, 109, 114, 115, 128, 148, 159.
Enteroinvasiva (EIEC)	28, 112, 124, 136, 143, 144, 152, 164.
Enterohemorrágica (EHEC)	157

II. GENERALIDADES ACERCA DE *S. aureus*

i. Taxonomía

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae* y se divide actualmente en 27 especies: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. kloosii*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. arlettae*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. carnosus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. caseolyticus* y *S. lentus* (2).

ii. Microscopía

Los estafilococos son bacterias esféricas cuyo diámetro fluctúa entre 0.8 y 1.0 micras (alrededor de un décimo de diámetro del eritrocito humano); no poseen flagelos ni esporas y sólo algunas cepas son capsuladas; además, se tiñen fácilmente reteniendo el colorante de Gram de manera tenaz, aunque esta propiedad varía en los cultivos viejos y los que se obtienen en condiciones adversas (2, 7, 15, 31).

Su agrupación característica en acúmulos parecidos a racimos de uvas es la más evidente, aunque sólo se observa en las

preparaciones provenientes de muestras biológicas y de cultivos sólidos; su pared celular consta de una capa externa rica en proteínas y de una capa interna de mucopéptido; aunque su estructura antigénica ya se ha definido, los diversos antígenos tienen poco valor en su identificación, exceptuando a la proteína A de los estafilococos coagulasa positiva (ECP), la cual se utiliza para diferenciar a este grupo mediante la reacción pseudoinmune (2, 7, 10, 11, 15, 27).

Cabe mencionar que dicha proteína A se fija a la porción Fc de las moléculas de IgG (salvo la IgG3), quedando los Fab de estas últimas en libertad de combinarse con su antígeno específico. Por tanto, la proteína A se ha convertido en un reactivo importante en inmunología y tecnología diagnóstica, en particular, por lo que respecta a las pruebas de coaglutinación (2).

iii. Resistencia a los agentes físicos, químicos y biológicos

Los estafilococos figuran entre las bacterias no esporuladas más resistentes, ya que pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales desfavorables durante su camino de un hospedador a otro; son muy resistentes a la luz, temperaturas externas extremas y desecación, por lo cual estos microorganismos se pueden transmitir aún por medio del polvo. Además, sobreviven días a semanas en el pus desecado y en esputo, y pueden resistir calor húmedo hasta de 60°C durante 30 minutos (7, 11).

Los estafilococos sobreviven a la acción de los fenoles y a la de muchos otros desinfectantes empleados en los laboratorios (cloruro de magnesio, cloruro de benzalconio, etc.). La adición de 7 a 8 % de cloruro sódico a los medios de cultivo permite su desarrollo, inhibiéndose el de casi todas las demás bacterias. De hecho, el diseño de medios selectivos para su aislamiento se basa en esta propiedad y/o en su capacidad para soportar la oxidación por teluritos. Finalmente, su resistencia a la penicilina suele depender de su capacidad para producir β lactamasa, propiedad transmitida por conjugación o transducción y que implica la presencia de plásmidos. A la fecha, se han descrito otros plásmidos estafilocócicos portadores de genes relacionados con la resistencia a numerosos antibióticos (2, 10, 12).

iv. Propiedades culturales

a) Medios de cultivo

Aunque estos microorganismos se reproducen fácilmente en el laboratorio previa siembra en caldo o agar nutritivos, los medios de cultivo que carecen de tiamina y ácido nicotínico no favorecen su desarrollo; sin embargo, en los medios corrientes suelen existir cantidades pequeñas de estas vitaminas. Su crecimiento en sangre es más abundante y pone de manifiesto ciertas hemolisinas de acción enérgica (α , β , γ o δ) (15).

Independientemente de que el laboratorio emplea gelosa sangre para lograr el aislamiento de estos microorganismos, se suelen incorporar al análisis otros de naturaleza selectiva, tales como el S110 y el manitol sal agar -que deben su selectividad a su alto contenido en NaCl-, así como Baird Parker y Vogel Jhonson -cuyo agente inhibidor es el K₂TeO₃ al 1 %- (18).

b) Condiciones de incubación

Estos microorganismos desarrollan dentro de límites muy amplios de temperatura (10 a 40°C), aunque su óptima se encuentra entre los 30 y 37°C. Es importante precisar que, su pigmentación característica -la cual sólo es producida por ciertas especies-, se produce mejor entre los 19 y 25°C (7).

A la presión atmosférica normal de aerobiosis se logra un desarrollo más abundante, pero muchas cepas se reproducen -aunque en medida escasa- en ausencia de oxígeno; adicionalmente, se ha observado que el exceso de bióxido carbónico aumenta la producción de enterotoxinas por *S. aureus*, sobre todo si el medio posee almidón (1, 3).

c) Morfología macroscópica

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* produce un pigmento dorado amarillento; en cambio, varios ECN presentan pigmentos que varían del blanco al amarillo limón. Las colonias de *S. aureus* en medios sólidos guardan semejanza con

manchas redondas de pintura, con un diámetro que varía entre 3 y 5 mm, de acuerdo a la composición del medio, mostrando -a diferencia del resto de las especies- extensas zonas de hemólisis (10, 11, 15).

v. Pruebas de identificación

a) Detección del género

Una vez efectuado el aislamiento de colonias sospechosas de estafilococos, es necesario contar con la seguridad de que se trata de este género, lo cual por lo regular se logra mediante la observación de extensiones teñidas al Gram. Sin embargo, "en caso de persistir algunas dudas, puede recurrirse a la realización de la prueba de la catalasa, para diferenciar a estos microorganismos -que la dan positiva-, en relación con los estreptococos -cuyo resultado es negativo- (24).

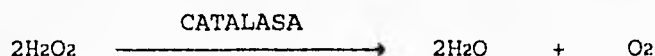
A continuación se describen los principales aspectos asociados a la prueba de la catalasa.

Prueba de la catalasa (18, 24)

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína bastante similar a la hemoglobina, con la diferencia de que los cuatro átomos de hierro contenidos en su molécula, se encuentran en su estado más oxidado (Fe^{+++}), mientras que en la hemoglobina lo están en estado reducido

(Fe⁺⁺). Exceptuando a los estreptococos y a *Gardnerella vaginalis*, las bacterias aerobias y facultativas poseen esta enzima, no así la mayoría de las anaerobias que, con el objeto de llevar a cabo la degradación del mismo sustrato, producen la peroxidasa.

La reacción catalizada por la catalasa es :



Dentro del laboratorio de Bacteriología, la prueba de la catalasa se utiliza generalmente para diferenciar al género *Streptococcus* (-) del *Staphylococcus* (+) y, con menor frecuencia, para hacerlo entre las especies de bacilos Gram positivos y entre las micobacterias. Para llevarla a cabo es necesario disponer, por un lado, de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % -almacenada en frasco ámbar y en refrigeración- y, por otro, de un cultivo puro de 18-24 h del microorganismo por probar, contenido en una caja de Petri o bien en tubos de ensayo exentos de sangre, toda vez que los eritrocitos poseen esta actividad enzimática.

El procedimiento más sencillo y rápido incluye el uso de un portaobjetos, en el cual se colocan, primeramente, una asada del microorganismo -ya sea que éste se encuentre en medios sólidos o en un cultivo líquido- y, posteriormente, se vierten sobre ésta una o dos gotas de la solución de H₂O₂ al

30 %. La reacción es tan rápida que bastan unos segundos para que en la solución que está en contacto con las células, se empiecen a notar burbujas ocasionadas por el O₂ que se desprende.

b) Diferenciación de especie

Una vez que el aislamiento se ha identificado plenamente como *Staphylococcus*, puede procederse a determinar la especie correspondiente, iniciando con la prueba de la coagulasa -para establecer si se trata de *S. aureus* o de ECN- (26).

La tabla 5 muestra los patrones de identificación de las principales especies patógenas para el humano.

Tabla 5. Pruebas involucradas en la identificación de las principales especies estafilocócicas (2, 26).

P R U E B A	1	2	3	4	5	6
COAGULASA	+	-	-	-	-	-
FACTOR AGLUTINANTE	+	-	-	-	(+)	+
TERMONUCLEASA	+	-	-	-	-	+
FOSFATASA ALCALINA	+	+	-	-	-	+
LECITINASA	+	-	-	-	-	-
ORNITINA DC	-	(d)	-	-	+	-
UREASA	d	+	-	+	d	-
RESISTENCIA A						
NOVOBIOCINA	-	-	-	+	-	-
MANITOLASA	+	(+)	-	-	+	+

CLAVES: 1 = *S. aureus*; 2 = *S. epidermidis*; 3 = *S. haemolyticus*; 4 = *S. saprophyticus*; 5 = *S. lugdunensis*; 6 = *S. schleiferi*; d = 11 a 89 % de cepas positivas; () = reacción tardía.

A continuación se describen los aspectos relevantes de las pruebas más empleadas en los laboratorios clínicos y farmacéuticos, mismas que tienen como objetivo central diferenciar entre *S. aureus* y los ECN -como grupo-.

Prueba de la coagulasa (18, 24, 26)

La coagulasa es una proteína de composición química desconocida y que resulta relativamente termoestable, ya que resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos; es muy sensible a la acción de enzimas proteolíticas y, como posee una actividad similar a la de la protrombina -que la capacita para convertir el fibrinógeno en fibrina, aún cuando en el medio de reacción se encuentren ciertas sustancias anticoagulantes-, permite que el infectólogo la detecte mediante reacciones simples.

En cuanto a su función *in vivo*, ésta consiste principalmente en interferir la fagocitosis, debido a que genera la producción de redes de fibrina alrededor de los microorganismos, impidiendo que el fagocito entre en contacto con ellos para englobarlos; sin embargo, al parecer también neutraliza la actividad antimicrobiana que el suero normal manifiesta contra los agentes infectantes.

Tocante a su mecanismo de acción, existen evidencias de que la coagulasa puede inducir la activación de un mecanismo

alterno de coagulación, habilitando a un componente del plasma, denominado factor reactivo de la coagulasa o FRC, para convertir el fibrinógeno en fibrina.

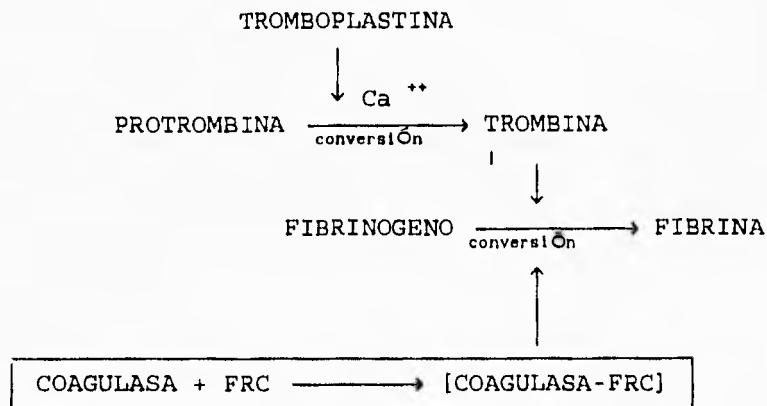
De hecho, se sugiere que la coagulasa es una sustancia muy parecida a la protrombina que, al reaccionar con el FRC, forma un compuesto muy parecido a la trombina. Este paso es el decisivo porque, como es sabido, es la trombina la que activa al fibrinógeno para formar fibrina en el proceso normal de la coagulación.

De acuerdo a lo anterior, la coagulasa origina la coagulación del plasma en dos pasos: inicialmente se verifica una reacción entre la enzima producida por el microorganismo y el FRC y, posteriormente, las redes de fibrina son producidas por efecto del complejo formado en el paso anterior.

Recordando el proceso que se efectúa en la última etapa de la coagulación sanguínea en el organismo, es posible relacionar el mecanismo asociado a la enzima estafilocócica (diagrama 1).

Como se puede observar en el diagrama 1, existen una coincidencia y una diferencia entre los mecanismos de la coagulación sanguínea y el que implica a la coagulasa: ambos requieren de fibrinógeno, pero el que implica a la enzima estafilocócica no necesita de la presencia de iones Ca^{++} .

Diagrama 1. Los pasos cruciales en el proceso de coagulación de la sangre y su relación con la reacción en la que participa la coagulasa estafilocócica.



En este sentido, debe recordarse que el plasma -a diferencia del suero- siempre contiene algún anticoagulante que mantiene atrapado al Ca^{++} . De esta manera, el hecho de que ocurra la coagulación durante la prueba, permite acreditar al microorganismo como productor de coagulasa. Sin embargo, para que lo anterior se considere como posibilidad única, es necesario que la cepa analizada sea pura, ya que otros microorganismos podrían utilizar al anticoagulante como fuente de carbono y, al degradarlo, la consecuente liberación del Ca^{++} reactivaría la ruta que se presenta en el organismo.

Otro aspecto importante en la realización de la prueba, radica en la elección del plasma que se va a emplear; debe considerarse principalmente su origen, ya que se ha encontrado que algunas cepas presentan resultados positivos con el humano y el de conejo, pero negativos con el de

bovino.

Para llevar a cabo la prueba, se adicionan asépticamente 0.5 ml de plasma de conejo reconstituido en un tubo de ensayo estéril, al que posteriormente le son agregados 0.5 ml de un cultivo líquido y puro de 18-24 h del microorganismo analizado; los componentes se mezclan rotando el tubo y se procede a incubar a 37°C hasta que se observe la formación, bien sea de redes de fibrina o de un coágulo.

La reacción se considerará positiva si ocurre cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. Las bacterias coagulasa fuertemente positiva pueden producir el coágulo dentro de las primeras cuatro horas, razón por la que es recomendable leer el resultado a intervalos de 30 minutos, ya que *S. aureus* también produce fibrinolisinias, y la acción de éstas puede destruir el coágulo, provocando la obtención de resultados falsos negativos cuando se toman las lecturas en lapsos mayores. Otras cepas de *S. aureus* sólo son capaces de producir suficiente cantidad de coagulasa hasta que transcurren cerca de 18 h. Por tal motivo, es conveniente revisar nuevamente a las 24 h los cultivos que en los primeros tiempos se observen como coagulasa negativa.

Finalmente, es importante hacer notar que, a mayor virulencia de la cepa analizada, menor será el tiempo en que la prueba será positiva.

Prueba del factor aglutinante (9, 26)

El factor aglutinante -antes conocido como coagulasa ligada- debe su nombre actual a que las pruebas en que se manifiesta aparentan reacciones de aglutinación; dicha sustancia se encuentra íntimamente ligada a la célula bacteriana (aunque se desconoce la naturaleza de dicha unión), por lo cual no se encuentra en filtrados de cultivos y puede ser detectada mediante una prueba en portaobjetos. Por otra parte, el hecho de que su reactividad no se vea afectada por la acción de anticuerpos inducidos por la coagulasa demuestra que la estructura química de ambas es diferente, además de que convierte el fibrinógeno en fibrina directamente, sin la necesidad de que intervengan factores plasmáticos.

La realización de la prueba es sencilla y rápida, ya que basta poner en un portaobjetos una colonia del microorganismo suspendida en solución fisiológica estéril homogeneizada y, a un lado de ella, una gota de plasma; ambas partes se mezclan perfectamente con un aplicador de madera y la observación de un precipitado granular o de acúmulos blancos al cabo de 20 a 30 segundos deberá interpretarse como positiva; cuando estas características no se presentan dentro de los dos o tres minutos siguientes a la ejecución, la prueba se reportará negativa.

Es importante mencionar que el factor aglutinante y la coagulasa pueden tener el mismo valor diagnóstico en los

laboratorios clínicos, siempre que el primero se haya detectado en la prueba correspondiente. Sin embargo, cuando sólo se realiza esta última y ha resultado negativa, el analista estará obligado a llevar a cabo la prueba de la coagulasa, en razón de que 15 a 45 % de las cepas de *S. aureus* no son productoras de factor aglutinante.

Prueba de la nucleasa termoestable (18, 24, 26, 29)

Otro recurso utilizado para clasificar a los estafilococos dentro de la especie *S. aureus*, está basado en la detección de enzimas capaces de degradar al DNA. Sin embargo, se ha comprobado que en dicho género existen dos complejos diferentes que catalizan la reacción, a los cuales se conoce como DNasa termolábil y DNasa termoestable, respectivamente, y que en realidad sólo el segundo de ellos puede establecer la presencia de *S. aureus* -aunque este microorganismo sintetiza ambos-.

Para demostrar la existencia de los dos complejos enzimáticos en los estafilococos, los investigadores recurrieron a introducir una pequeña variante en la metodología original, la cual consiste en exponer a la cepa -cuya actividad se desea investigar-, a temperaturas de 90 a 100°C, antes de inocularse en el medio que contiene al sustrato.

Al complejo enzimático capaz de llevar a cabo su actividad degradativa después de haber sido expuesto a la temperatura, se le conoce como DNasa estable al calor o termorresistente,

mientras que, al que pierde esa capacidad, se le denomina DNasa termolábil.

Las formas termorresistente y termolábil se han puesto de manifiesto en la mayoría de los ECP, en tanto que en los ECN sólo se ha demostrado la presencia de la última de ellas. Sin embargo, la prueba considerada como definitiva para la detección de *Staphylococcus aureus* -tanto en las industrias alimentaria y farmacéutica, como en el laboratorio clínico- es la prueba de la coagulasa.

La metodología que se sigue para llevar a cabo la prueba que evalúa la producción de DNasa por los microorganismos, es bastante sencilla: se parte de un cultivo puro del microorganismo cuya actividad se desea probar -ya sea que se tenga en un medio líquido o en uno sólido-, el cual se siembra por estría en el medio agar para DNasa, que contiene DNA entre sus componentes; posteriormente se incuba a 35°C durante 18-24 h y, una vez que se ha obtenido desarrollo, se adiciona 1 ml de HCl 1 N que se distribuye sobre toda la superficie del medio; al cabo de 3 minutos, aparecerán zonas transparentes alrededor de las colonias productoras de DNasa, mientras que alrededor de aquellas que no lo hagan, el medio conservará el aspecto opaco que el DNA confiere al mismo. Cabe señalar que puede ser sembrada en alguna otra porción de la superficie del medio, alguna cepa que haga las veces de control negativo, con el objeto de que las personas que no cuentan con experiencia en la interpretación de los

resultados de esta prueba, puedan comparar entre una reacción positiva y una negativa.

En cuanto a la prueba que evalúa de una manera cualitativa únicamente la producción de DNasa termorresistente, ésta tiene como variantes que el cultivo puro de microorganismos por probar debe tenerse en forma líquida, de tal manera que antes de ser sembrado en el medio agar para DNasa, pueda resistir una exposición a la temperatura de un baño de agua hirviendo durante 15 minutos, sin que por ello pueda verse fundido el medio o inundado el cultivo (lo cual puede ocurrir si en su lugar es expuesta una placa que contenga medio sólido); la metodología posterior es la misma que la anteriormente mencionada.

Prueba de la lecitinasa (2, 18, 24)

La lecitina o yema de huevo, es un fosfolípido y representa el sustrato natural sobre el cual actúan las lecitinasas.

Desde el punto de vista de la identificación de *S. aureus*, esta prueba es la más utilizada en análisis de alimentos para detectar la presencia de esta especie, misma que figura entre los principales agentes causales de intoxicaciones alimentarias.

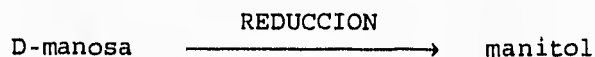
La prueba consiste en inocular las muestras en el medio Baird Parker, que se elabora adicionando yema de huevo a la base. El fosfolípido confiere una turbiedad evidente al medio, y

ésta se pierde alrededor de las colonias lecitinasas positivas, previa incubación de 24 h a 35°C.

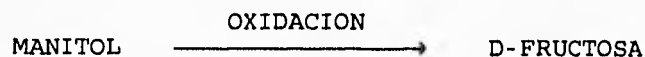
Cabe mencionar que el medio Baird Parker también contiene 1 % de K_2TeO_3 , por lo cual las colonias de *S. aureus* manifestarán una coloración negra, además de ser circundadas por halos transparentes asociados a la hidrólisis de la lecitina.

Prueba de la manitolasa (18, 24, 26)

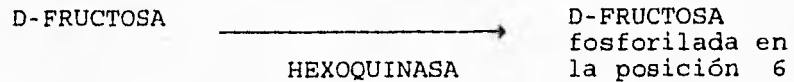
Con este nombre se conoce al sistema enzimático mediante el cual una célula bacteriana es capaz de llevar a cabo la utilización de manitol; químicamente, éste es un azúcar-alcohol o un alcohol polihídrico, muy similar a otros -adonitol, dulcitol y sorbitol-, que también son producidos a partir de la reducción de monosacáridos:



La vía mediante la cual *S. aureus* metaboliza a este compuesto es la glicólisis, misma que sucede una vez que han ocurrido reacciones en las que se ven involucradas isomerasas, ligasas, transferasas y oxidorreductasas, para transformar al manitol o a la manosa -según el caso-, en fructosa-6-fosfato.



ATP



De esta manera, el sustrato será incorporado al sistema Embden Meyerhoff-Parnas, cuyos productos finales ácidos provocarán una disminución en el pH del medio de cultivo, que podrá detectarse mediante el virre a amarillo del indicador rojo de fenol.

La prueba de la manitolasa constituye una reacción que, dada su aceptable exactitud y sencillez, es utilizada en muchos laboratorios para diferenciar a la especie *S. aureus* -que la da positiva- de la mayoría de los ECN -que no lo hacen-. Puede ser llevada a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido, si bien una parte de los analistas prefiere efectuarla en el primero, al mismo tiempo que se aísla al microorganismo en medios selectivos con alta concentración de NaCl -como el manitol sal agar-.

De esta manera, se reduce el tiempo de diagnóstico, aunque existe un serio inconveniente: el índice de confiabilidad de la prueba no es del 100 % y, de no realizarse también la reacción de la coagulasa, se estará corriendo el riesgo de reportar erróneamente al microorganismo aislado, con toda la problemática que ello origina.

La técnica se reduce a sembrar la muestra o a la bacteria en manitol sal agar o en caldo manitol rojo de fenol

-respectivamente-, dado que sus composiciones incluyen tanto al sustrato como el indicador; los medios se incuban posteriormente durante 24 h, después de las cuales se hará la lectura de los resultados, interpretándose la prueba como positiva cuando el indicador del medio ha virado a amarillo o, como negativa, cuando dicha coloración es roja.

Cabe mencionar que en algunos laboratorios se prefiere realizarla en el medio líquido dado que, a la vez que se lleva a cabo, se obtiene el cultivo líquido de 24 h a partir del cual puede llevarse a cabo la prueba de la coagulasa en tubo; esto implica un considerable aumento en el tiempo de identificación, pero con ello se aumenta la confiabilidad del diagnóstico.

vi. Importancia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos

Sin lugar a dudas, la presencia de los ECP en los alimentos resulta sumamente dañina para los consumidores, en razón de que suele traducirse en severos cuadros entéricos que aparecen muy poco tiempo después de la ingestión correspondiente (1, 4, 5).

La intoxicación alimentaria estafilocócica no es una infección, sino un verdadero envenenamiento resultante de la ingestión de alimentos contaminados que contienen toxina preformada; *S. aureus* produce seis tipos de enterotoxinas: A, B, C, D, E y F, entre las cuales las que con mayor frecuencia se presentan causando intoxicación son la A, B y D.

Regularmente, la fuente de contaminación es un portador o enfermo manipulador de alimentos; los microorganismos producen la enterotoxina con gran rapidez, incluso a temperatura ambiente, pudiendo acumularse concentraciones peligrosas de la misma en el término de algunas horas; además, como las toxinas estafilocócicas oponen gran resistencia al calor, el calentamiento no garantiza en modo alguno su inactivación.

Al cabo de una a seis horas (período de incubación) de la ingesta, suelen aparecer náuseas, vómitos en proyectil y diarrea, con espasmos en el colon; la emesis continúa a intervalos de 15 a 30 minutos, hasta que sede el cuadro patológico y los calambres abdominales y la diarrea resultan lo bastante severos para causar deshidratación y postración; otros síntomas son: salivación excesiva, sudoración, cefalalgia y escalofríos, si bien no ocurren episodios febriles. En general, no se presentan complicaciones ni secuelas serias, aunque en los ancianos y los niños puede producirse colapso circulatorio (7, 13, 15).

Una vez ingerido 1 μ g o más de enterotoxina(s), se inicia una respuesta neural que conduce a emesis vagomediada y a hipermotilidad intestinal. Los estudios sugieren que las toxinas estafilocócicas no producen efectos directos sobre el intestino porque, de hecho, no provocan acumulación de líquido en asas intestinales ligadas de conejo, exceptuando a

la δ -toxina (4, 14).

Cabe subrayar que la enfermedad cura espontáneamente -con recuperación completa a veces en un día- al eliminarse las toxinas ingeridas mediante el vómito y las evacuaciones (11, 13).

El diagnóstico correspondiente se realiza analizando los alimentos y detectando 10^5 células estafilocóccicas por gramo, o bien, poniendo de manifiesto la presencia de enterotoxinas mediante técnicas inmunológicas; sin embargo, esto último se practica directamente en los alimentos implicados, porque las metodologías no son lo suficientemente sensibles para hacerlo en los líquidos orgánicos (evacuaciones y vómitos). Por otra parte, los anticuerpos antitoxina suelen aparecer en el suero del paciente 2 a 6 semanas después del cuadro clínico (4).

Con respecto al tratamiento, las intoxicaciones no se neutralizan con antibióticos. Ocasionalmente, pueden requerirse líquidos endovenosos, aunque ello sólo tiene sentido cuando ha sucedido deshidratación intensa (1, 3, 4, 5, 13).

III. PARTE EXPERIMENTAL

i. Equipo, material, reactivos y medios de cultivo

- Autoclave
- Balanzas analítica y granataria
- Campana de flujo laminar
- Incubadora ajustada a 35°C
- Microscopio óptico
- Refrigerador (4°C)

- Agitadores de vidrio
- Asas bacteriológicas
- Cajas Petri desechables
- Espátulas
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1,000 ml
- Mecheros Bunsen y Fisher
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- Portaobjetos
- Probetas de 500 y 1,000 ml
- Tripié con tela de alambre
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

- Aceite de inmersión
- Azul de bromotimol
- Cloruro de sodio

- Colorantes y reactivos de Gram
- Hidróxido de sodio
- N,N p-aminobenzaldehído
- Peróxido de hidrógeno
- Plasma de conejo
- Urea

- Agar Baird Parker
- Agar Citrato de Simmons
- Agar EMB
- Agar de hierro Kligler
- Agar Salmonella-Shigella (SS)
- Agar SIM semisólido
- Agar Sulfito de bismuto
- Caldo manitol rojo de fenol
- Caldo sacarosa rojo de fenol

ii. Metodología

En este trabajo se llevaron a cabo 4,000 análisis microbiológicos de diversos productos cárnicos (consultar tabla 6) distribuidos comercialmente en tiendas de autoservicio, a fin de determinar la frecuencia con la que se encuentran contaminados con *Salmonella*, *E. coli* y/o *S. aureus*.

Las muestras consistieron en 6 g de cada lote, obtenidos bajo condiciones asépticas, que se depositaban en recipientes que contenían 94 ml de solución salina isotónica estéril, se mezclaban lo mejor posible con este último -mediante el empleo de agitadores de vidrio estériles- y se incubaban en los mismos recipientes durante 24 h a 35°C, obteniéndose de esta manera el macerado de siembra.

Una vez transcurrida la incubación de la mezcla: muestra + solución salina isotónica, **a partir de ella** se procedía a realizar lo siguiente:

a) Para detección de *Salmonella sp*, se depositaba 1 ml en caldo tetracionato -previa adición de lugol de doble concentración a este último, inmediatamente antes de su inoculación- y otra cantidad similar en caldo selenito. Ambos medios de enriquecimiento se incubaban a 35°C durante 16 a 18 h y, posteriormente, de cada uno de ellos, se sembraban placas de agar SS y agar Sulfito de Bismuto (ASB).

b) Para búsqueda de *E. coli*, se recogían 0.5 ml y se colocaban sobre la superficie del agar, en placas con gelosa Eosina-azul de metileno; dicho inóculo se distribuía después sobre el medio con asa estéril y por estría cruzada.

c) Para detección de *S. aureus*, se empleaban las mismas técnicas y cantidades de inóculo, aunque la siembra se efectuaba en el medio Baird-Parker.

Selección de las colonias y pruebas de identificación

Previa incubación durante 24 h a 35°C de las placas de agar SS, ASB, EMB y Baird Parker, se procedió a llevar a cabo lo descrito a continuación:

Por lo que respecta a *Salmonella sp*, las colonias negras que aparecían en SS y ASB se sometían a frotis al Gram -para comprobar a inmersión que se trataba de bacilos cortos Gram negativos- y se les realizaban pruebas de fermentación de glucosa, lactosa, manitol y sacarosa, de movilidad, de producción de gas ($H_2 + CO_2$), H_2S , ureasa e indol y de capacidad para utilizar citrato. Los medios elegidos para la diferenciación bioquímica señalada fueron: Kligler, Citrato de Simmons, SIM, Caldo manitol-rojo de fenol y Caldo sacarosa-urea, y las reacciones involucradas se leyeron después de una incubación de todos ellos, a 35°C durante 24 h. Se determinó presencia de *Salmonella sp* cuando los resultados obtenidos fueron: glucosa, manitol, H_2S , y movilidad positivos, así como lactosa, sacarosa, ureasa e indol negativos; en cuanto al citrato, todas las cepas identificadas lo dieron positivo, por lo que se les consideró como *S. enteritidis*.

En cuanto a *E. coli*, se seleccionaron las colonias nucleadas o que presentaban brillo metálico en EMB. Las pruebas de identificación utilizadas coinciden con las mencionadas en el párrafo anterior, estableciéndose el hallazgo de esta especie cuando las lecturas resultaron: glucosa, lactosa, manitol, sacarosa, movilidad e indol positivos y, en contraste, el citrato, ureasa y H₂S fueron negativos.

Finalmente, en relación con *S. aureus*, las colonias negras obtenidas en el Baird Parker se observaron a inmersión -para comprobar que se trataba del género en cuestión- y se sembraron en caldo manitol-rojo de fenol, principalmente cuando se habían encontrado rodeadas por halos transparentes -lecitinasa positivas-; previa incubación a 35°C durante 24 h, los cultivos líquidos correspondientes se sometieron a la prueba de la coagulasa, añadiéndoseles antes unas gotas de NaOH cuando el pH era ácido, hasta alcanzar pH aproximado de 7. El plasma utilizado fue de conejo y la incubación secuencial se efectuó a 35°C, tomándose las lecturas cada 60 minutos, durante las 4 primeras horas; los casos en que no se detectó algún grado de coagulación se volvieron a incubar otras 20 h, antes de determinar que se trataba de especies coagulasa negativa. La prueba de la coagulasa se tomó en cuenta como el parámetro determinante para establecer presencia de *S. aureus*.

iii. Resultados

La tabla 6 hace referencia a las respectivas frecuencias de *Salmonella sp*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en los productos cárnicos analizados:

La primera se detectó en 18 de las 4,000 muestras, para un global de 0.5 %, distribuído como sigue: 1.3 % en carne molida de res, 0.3 % en carne molida de pollo, 0 % en bistek de res, 1 % en carne de res, 0.8 % en filete de pescado, 0.3 % en jamón, 0.5 % en chorizo, 0.3 % en salchicha, 0 % en tocino y 0.3 % en pastel de pollo.

En cuanto a *E. coli* y *S. aureus*, sus respectivas frecuencias globales fueron de 43 y 14, para 1.1 % y 0.4 %, distribuídas de la siguiente manera en los diversos productos: 3 % y 0.5 % en carne molida de res, 1 % y 0.3 % en carne molida de pollo, 0.5 % y 0.8 % en bistek de res, 1.3 % y 0.3 % en carne de res, 0.8 % y 0.8 % en filete de pescado, 1 % y 0.5 % en jamón, 0.5 % y 0 % en chorizo, 1.5 % y 0 % en salchicha, 0.8 % y 0.3 % en tocino y, finalmente, 0.5 % y 0.3 % en pastel de pollo.

Tabla 6. Frecuencia de *Salmonella sp*, *E. coli* y/o *S. aureus* en diversos productos cárnicos distribuidos comercialmente en tiendas de autoservicio.

PRODUCTOS	MUESTRAS ANALIZADAS (#)	---CASOS POSITIVOS---					
		<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
		#	%	#	%	#	%
H DE RES	400	5	1.3	12	3.0	2	0.5
H DE POLLO	400	1	0.3	4	1.0	1	0.3
BISTEK DE RES	400	0	0.0	2	0.5	3	0.8
CARNE DE RES	400	4	1.0	5	1.3	1	0.3
F DE PESCADO	400	3	0.8	3	0.8	3	0.8
JAMON	400	1	0.3	4	1.0	2	0.5
CHORIZO	400	2	0.5	2	0.5	0	0.0
SALCHICHA	400	1	0.3	6	1.5	0	0.0
TOCINO	400	0	0.0	3	0.8	1	0.3
P DE POLLO	400	1	0.3	2	0.5	1	0.3
TOTALES	4,000	18	0.5	43	1.1	14	0.4

CLAVES: H = HAMBURGUESA (CARNE MOLIDA); F = FILETE; P = PASTEL.

iv. Discusión

Como puede observarse en la tabla 6, la frecuencia global de los 3 microorganismos estudiados, en productos cárnicos de distribución comercial en tiendas de autoservicio, es relativamente baja: 0.5 % para *Salmonella*, 1.1 % para *E. coli* y 0.4 % para *S. aureus*.

Ello implica que *Salmonella* puede encontrarse presente en uno de cada 200 lotes, *E. coli* en uno de cada 100 y *S. aureus* en uno de cada 250. En este sentido, las frecuencias correspondientes ya no parecen despreciables, si se considera que las tiendas de autoservicio están consideradas como expendedoras de alimentos confiables para la comunidad, tanto debido a los precios como a sus respectivos prestigios.

En cuanto a la detección de *Salmonella*, la cifras mayores se encontraron asociadas a la carne molida de res (1.3 %), a la carne de res (1 %), al filete de pescado (0.8 %) y al chorizo (0.5 %), todos los cuales se ingieren previo proceso de cocimiento. Por tal motivo, las frecuencias de este género podrían considerarse menos importantes; de hecho, en jamón, salchicha y pastel de pollo, productos que suelen consumirse tal como se adquieren, las cifras observadas son de 1 en 400 (0.3 %) en los 3 casos.

Por lo que toca a *E. coli*, su frecuencia máxima también se obtuvo en carne molida de res (3 %) y en carne de res (1.3 %), tal como ocurrió con *Salmonella*; aunque ambos tipos de producto se consumen después del cocimiento, es muy claro que los cárnicos de res figuran entre los más frecuentemente contaminados, si bien ello varía cuando se trata de bistek; cabe subrayar que en la salchicha se detectaron frecuencias

relativamente elevadas de *E. coli* (1.5 %), lo cual de alguna manera confirma las apreciaciones de numerosos autores, en cuanto a que los embutidos suelen exhibir indicadores de clara contaminación fecal.

Por lo que respecta a *S. aureus*, sus mayores frecuencias se localizaron en bistek de res (0.8 %), filete de pescado (0.8 %), carne molida de res (0.5 %) y jamón (0.5 %); en este contexto, debe considerarse que las enterotoxinas estafilocóccicas pueden resistir las temperaturas de cocción, y que las intoxicaciones alimentarias relacionadas con esta especie involucran con gran regularidad el consumo de sandwiches de jamón. En este aspecto, es importante mencionar que el jamón es sometido a procesos de cocimiento antes de su distribución y, por lo tanto, que su contaminación por *S. aureus* aparenta asociarse a su almacenamiento.

Sin lugar a dudas, algunos resultados del trabajo merecen una atención mayor; en particular, los obtenidos para productos de res, tales como la carne molida, la simple y el bistek, mismos que sugieren que los microorganismos se incorporan al producto durante su procesamiento: la carne molida siempre se encontró contaminada con mayor frecuencia que la carne de res simple. No obstante, el bistek de res se manifestó como un producto contaminado con menos frecuencia que los anteriores, excepto en el caso de *S. aureus*.

De cualquier manera, las frecuencias globales de *Salmonella* y *S. aureus* no rebasaron el 0.5 % y, como se esperaba, la de *E. coli* resultó mayor a las de las bacterias anteriores, aún cuando los valores individuales no reflejan una consistente contaminación fecal de los productos analizados.

CONCLUSIONES

1. Los productos cárnicos de distribución comercial en tiendas de autoservicio resultan confiables en cuanto a ausencia de contaminación bacteriana, si bien algunos lotes llegan a manifestar la presencia -en bajas proporciones- de *Salmonella*, *E. coli* o *S. aureus*.

2. En relación con *Salmonella* y *S. aureus*, *E. coli* es la especie bacteriana que más frecuentemente aparece como contaminante en productos cárnicos.

3. Entre los productos cárnicos que llegan a presentar contaminación con *Salmonella*, *E. coli* y/o *S. aureus*, destaca muy particularmente la carne de res; por lo tanto, sería conveniente recomendar su adecuada cocción previa a la ingestión.

4. Dada la regularidad con la que el jamón, el pastel de pollo y la salchicha se consumen tal como se adquieren comercialmente, el control microbiológico de dichos productos resulta de mayor relevancia.

BIBLIOGRAFIA

1. Altboum Z., Hertman I. and Sarid S.: Penicillinase plasmid - linked genetic determinants for enterotoxins B and C production in *Staphylococcus aureus*, Infect Immun, 1987; 47-514-519.
2. Balows A., Hausler W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D. and Shadomy H. J.:
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY
American Society for Microbiology, 5th Edition
Washington D.C., 1991.
3. Betley M.J., Lofdahl S. and Kreiswirth B.N.: Staphylococcal enterotoxin A gene, Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 81: 5179-5184.
4. Braude A.I.:
ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Editorial Médica Panamericana
Buenos Aires, 1984.
5. Crass B.A. and Bergdoll M.S.: Toxin involvement in food poisoning, J Inf Dis, 1989; 153: 918-923.
6. Dalet E.F., Segovia T.T. y Del Río P.G.: Papel de las adhesinas de *Escherichia coli* en la patogénesis de la infección gastrointestinal, Rev Clin Esp, 1991; 189(1): 8-

- 13.
7. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N. and Ginsberg H.S.:
MICROBIOLOGY
J.B. Lippincott Company, 4th edition
Philadelphia, 1990.
8. Echeverría J.T.: HeLa cell-adherent *E. coli* in children with
diarrhea in Thailand, *J Inf Dis*, 1992; 156(4): 669-672.
9. Espersen F., Clemmensen I and Barkholt V.: Isolation of
Staphylococcus aureus clumping factor, *Infect Immun*, 1985;
49: 700-706.
10. Finegold S.M. y Baron E.J.:
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
Editorial Médica Panamericana, 7a. edición
Buenos Aires, 1989.
11. Freeman B. A.:
MICROBIOLOGIA BURROWS.
Editorial Interamericana.
México, D.F., 1989.
12. Haley R. W.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:
do we just have to live with it?, *Ann Intern Med*, 1994;
114(2): 162-164.
13. Holmberg S.D. and Blake P.A.: Staphylococcal food poisoning
in the United States, *JAMA*, 1992; 251: 487-493.
14. Jean D. Wilson., Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf

- R.G., Marthin J.B., Fanci A.S. y Root R.K.:
HARRISON, PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA.
Editorial MacGraw Hill. 12a ed.
México D. F. 1993.
15. Joklik W.K., Willett H.P., Amos D.B. y Wilfert C.M.:
ZINSSER MICROBIOLOGIA
Editorial Médica Panamericana, 20a. edición
Buenos Aires, 1994.
16. Fawahara K., Haraguchi Y. and Tsuchimoto M.: Evidence of
correlation between 50-kilobase plasmid of *Salmonella*
choleraesuis and its virulence, Microbiol Pathog, 1990; 4:
155-158.
17. Knutton S., Lloyd R. and McNeish S.: Adhesion of EPEC to
human intestinal enterocytes and cultured human mucosa,
Infect Immun, 1987; 55(1): 69-77.
18. Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Janda W.M., Sommers
H.M. y Winn W.C.:
DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
Editorial Médica Panamericana, 3a. edición
Buenos Aires, 1992.
19. Lee C.A. and Falcow S.: The ability of *Salmonella* to enter
mamalian cells is affected by the bacterial growth state,
Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 4304-4310.
20. Lee J. C., Liu M. J., Parsonnet J. and Arbeit R. D.:
Expression of type 8 capsular polysaccharide and

production of toxic shock syndrome toxin 1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*, J Clin Microbiol, 1990; 28(12): 2612-2615.

21. Levine M.: *E. coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent, J Inf Dis, 1987; 155(3): 377-389.
22. Levine M. and Edelman R.: Enteropathogenic *E. coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis, Epidemiologic Rev, 1989; 6: 31-50.
23. Looney R.J. and Steigbigel R.T.: Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense *in vitro*, J Clin Med, 1991; 108: 506-509.
24. MacFaddin J.F.:
PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA MEDICA
Editorial Médica Panamericana
Buenos Aires, 1990.
25. Mosley S.L. and Hugh I.: Detection of enterotoxigenic *E. coli* by DNA colony hybridization, J Inf Dis, 1990; 142(6): 892-898.
26. Peniche Q.E. y Garza V.R.: La importancia clínica de los estafilococos coagulasa negativa y su identificación en el laboratorio, Lab-acta, 1993; 5(2): 77-82.
27. Peniche Q.E., Garza V.R. y Castellanos Ch.N.: La reacción

pseudoinmune y su aplicación en el diagnóstico de laboratorio de los padecimientos ocasionados por *S. aureus*, Lab-acta, 1990; 2(4): 39-41.

28. Phillips S.: Diarrhea: A current view of the pathophysiology, Gastroenterol, 1993; 63: 495-506.
29. Ratner H. B. and Stratton C. W.: Thermonuclease test for same-day identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures, J Clin Microbiol, 1985; 21(6): 995-996.
30. Scaletsky A.C., Silva M. and Trabulsi R.: Distinctive patterns of adherence of EPEC to HeLa cells, Infect Immun, 1987; 45(2): 534-536.
31. Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G.:
MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Volume 2
Williams and Wilkins, 1st. Edition
Baltimore, 1984.
32. Taylor J.P., Shandera W.X. and Betz T.G.: Typhoid fever in San Antonio, Texas: An outbreak traced to a continuing source, J Inf Dis, 1989; 149: 553-558.
33. Wilkins E.G.L. and Roberts C.: Extraintestinal salmonellosis, Epidemiol Infect, 1993; 100: 361-366.