

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



INCIDENCIA DE E. coli EN ANIMALES DOMESTICOS QUE SE EXPLOTAN EN EL VALLE DE MEXICO Y SU IMPORTANCIA COMO ZONOSIS POR SU RELACION ANTIGENICA CON LAS CEPAS PATOGENAS DEL HOMBRE.

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a n

MARICELA GARZON CHAPA

RAMON RANULFO VAZQUEZ LOPEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

M.E. 172

CLAS. Tesis
ADQ. 1977
FECHA
PROC. MIT 172



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	Q.F.B.	MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL	Q.F.B.	OSCAR AMOR DODERO
SECRETARIO	DR.	SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE	Q.F.B.	LEONOR MARTINEZ SOZA
2o. SUPLENTE	Q.F.B.	JORGE SOTO SORIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: PRODUCTOS VETERINARIOS -

BAC. S.A.

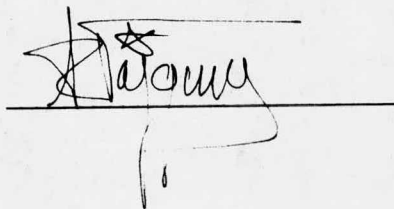
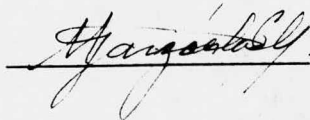
FACULTAD DE QUIMICA.

SUSTENTANTES:

MARICELA GARZON CHAPA

RAMON RANULFO VAZQUEZ LOPEZ

FIRMAS:



ASESOR:

OSCAR AMOR DODERO.

A mi Madre:

Kabiria Chapa de Garzón

Por que donde se encuentre, se sienta satisfecha de haberme
traído al mundo.

A mi Padre:

Lic. Gabriel Garzón Arcos

Por su gran amor y sus sabios consejos que me han alentado
siempre a seguir adelante.

A mis Hermanos:

Por que son lo más hermoso que tengo en esta vida.

A Tí:

David Muñoz Gonzalez

Compañero, amigo, que junto conmigo compartió alegrías,
tristezas y un gran amor.

A Mi Escuela y mis Maestros:

Gracias por darme tanto a cambio de nada.

A Los Profesores:

Q.F.B. Elda Peniche.

Q.F.B. Magdalena Acosta S.

Q.F.B. Oscar Amor Dodero.

Dr. Salvador Martin Sosa.

Por su desinteresada y valiosa ayuda.

A Todos Mis Amigos.

INDICE

	Pag.
Introducción	1
I. - Generalidades	3
II. - Material y Métodos	8
a) Colección de muestras	8
b) Identificación por pruebas bioquímicas	13
c) Tipificación con sueros específicos	17
d) Sensibilidad a antibióticos	25
III. - Resultados obtenidos	34
IV. - Resumen y discusión de los resultados obtenidos	45
Conclusiones	50
Bibliografía	51

INTRODUCCION

Desde hace siglos el hombre sabe que las epizootias (epidemias en los animales) amenazan a menudo la salud de los animales que tanto necesita; también se ha percatado que las enfermedades que afectan a los animales pueden poner en peligro la vida humana, por medio del fenómeno conocido como "ZONOSIS" (enfermedades e infecciones que se transmiten naturalmente entre animales vertebrados, el hombre y del hombre a los animales)

Las Zoonosis deben considerarse desde dos aspectos:

- a).- Constituyen una amenaza para la salud pública.
- b).- Imponen un pesado tributo a la economía de las zonas urbanas y rurales.

Asimismo, revisten cada vez mayor importancia en la medicina humana y veterinaria, por el continuo aumento de las posibilidades de contacto directo e indirecto, entre animales y humanos y en consecuencia, del peligro de infecciones mutuas.

En nuestro estudio, el interés se concretó a detectar en cuatro de las especies animales, que tienen mayor contacto con el humano (bovinos, aves, cerdos y conejos), a un microorganismo, al cual hasta hace poco tiempo se le ha mostrado un interés particular, este germen es Escherichia coli en su variedad "ENTEROPATOGENA", "ENTEROTOXIGENICA" el cual es causante de una gran diversidad de trastornos tales como: pielitis, pielonefritis, abscesos en órganos internos, septicemias, endocarditis, meningitis, etc.

Ciertos serotipos producen en infantes una diarrea epidémica grave que -

puede ocasionar porcentajes elevados de mortalidad en recién nacidos, terneras, lechones, etc. Son causa de las diarreas esporádicas de verano, no epidémicas, en niños durante el segundo y tercer verano de su vida, este tipo de diarrea está causado por productos metabólicos irritantes producidos por el colibacilo y no por verdadera infección. En dichos estados patológicos, intervienen diversos factores para producir o transmitir tal infección, siendo uno de los principales las Zoonosis.

Por tales motivos, decidimos realizar el presente estudio el cual trata de darnos un índice de la incidencia de E.coli patógena que se encuentra en los animales de mayor explotación por el hombre, así como su importancia desde el punto de vista de la zoonosis. En el desarrollo se persiguen los siguientes objetivos:

- 1.- Aislar y reconocer las características morfológicas y tintoriales del microorganismo presente en las secreciones, abscesos u órganos infectados.
- 2.- Hacer su identificación por pruebas bioquímicas.
- 3.- Hacer pruebas de aglutinación con sueros polivalentes de grupo y en los casos posibles el monovalente de determinados grupos para su serotipificación.
- 4.- Conocer la susceptibilidad actual del microorganismo a los antimicrobianos más usados, para así guiar el tratamiento adecuado que se empleará en la terapéutica de los padecimientos infecciosos que provoca.

CAPITULO I

GENERALIDADES

El género *Escherichia* está compuesto por bacilos móviles e inmóviles, pertenece a la familia Enterobacteriaceae y la tribu Escherichieae.

Escherichia coli es un bacilo grueso, corto, de 0.4 a 0.7 micras de grosor y de 1 a 4 micras de longitud. Con frecuencia se observan formas cocoides y cadenas cortas en los exudados y cultivos jóvenes.

Forman ácido y gas en la fermentación de una gran cantidad de carbohidratos, el ácido formado en dicha fermentación es principalmente ácido láctico, con pequeñas cantidades de ácido fórmico y acético. Se producen bióxido de carbono e hidrógeno en cantidades aproximadamente iguales.

Su poder de síntesis es tal, que los bacilos crecen en un medio compuesto por sales inorgánicas, una sal amónica y glucosa.

Son aerobios y anaerobios facultativos, no forman esporas, y una pequeña proporción presentan cápsulas. Desarrollan rápidamente (de 8-12 hs.) en todos los medios usuales a temperaturas que varían entre 20° y 40° C.

En placas de agar las colonias típicas son poco elevadas, convexas, lisas e incoloras aunque algo opacas; entre 12 y 24 h., alcanzan un tamaño de 2 a 3 mm. Los cultivos de colibacilos se caracterizan por un olor fétido, semejante a las heces diluidas.

Cuando se hacen cultivos en aerobiosis, los colibacilos son los -

microorganismos predominantes en las heces del hombre y de los animales.

Las bacterias coliformes constituyen una gran parte de la flora normal del intestino, dentro de él generalmente no provocan enfermedad y se cree que tienen probablemente una función útil en el organismo impidiendo el desarrollo de otro tipo de microorganismo (por la producción de la bacteriocina "colicina"), además de sintetizar cantidades apreciables de vitaminas del complejo "B".

Los microorganismos mencionados sólo se manifiestan como patógenos cuando alcanzan tejidos fuera del intestino produciendo bacteremia, particularmente infectan las vías urinarias, las vías biliares, los pulmones, el peritoneo o las meninges. Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas, o existe alguna inmunosupresión, los colibacilos pueden alcanzar la corriente sanguínea y provocar septicemias. Algunas cepas del microorganismo son más virulentas que otras y surge el problema de averiguar si un aislamiento en particular muestra los caracteres de tales cepas o si es miembro de la flora intestinal normal.

E. coli suele hallarse formando colonias del tipo "S" cuando se aísla de los pacientes enfermos. Las colonias lisas, son de consistencia "suave" y compuestas de bastones cortos y gruesos que presentan poca variación en el tamaño.

Cuando se tiene a los microorganismos en solución salina isotónica, se forman suspensiones homogéneas y son aglutinados fácilmente por el suero específico o el de convaleciente, que contenga anticuerpos homólogos a esos antígenos. El carácter liso de la colonia y especificidad antigénica dependen de la presencia de antígenos de superficie, identificados como complejos de glúcido-lí-

pido-proteínas. Después de desarrollarse durante algún tiempo sobre medios artificiales, aparecen colonias de tipo "R", que son más grandes, más aplanadas y -- tienen superficies rugosas. Estas colonias de consistencia "dura", cuando se tienen en solución salina isotónica no forman suspensiones homogéneas y aglutinan espontáneamente cuando aumenta la concentración de sal. Las formas "R" han perdido su virulencia y son fagocitadas con facilidad por las células de animales normales. Microscópicamente son organismos pleomórficos, variando desde bastones muy cortos hasta filamentos muy largos. Estos cambios, en colonia y aspecto microscópico, están relacionados con la pérdida de los complejos glúcido-lípido-proteínas de superficie. Las formas "R" se adaptan mejor, desarrollando fácilmente en las dietas relativamente más pobres que proporcionan los medios-inanimados.

Escherichia coli al igual que otras bacterias Gramnegativas forman endotoxinas que son lipopolisacáridos complejos, derivados de la membrana de la célula bacteriana y muchas veces liberadas por lisis de la bacteria. Son sustancias termoestables de peso molecular entre 100 000 y 900 000 daltons, son pirogénicas, producen tolerancia y choque letal.

Algunas cepas de E.coli producen una endotoxina potente que se -- parece a la toxina del cólera, capaz de producir una diarrea aguda, sin invadir el epitelio intestinal. Otras cepas de E.coli penetran en el epitelio intestinal y provocan una inflamación que se semeja a la disentería por Shigella. Algunas -- cepas de E. coli pertenecientes a varios tipos serológicos (055,026,0111, 0127, 086, 0119, 0124, 0125, 0126, 0128,044, y 078) provocan brotes de diarreas infantiles, especialmente en las salas de hospitales de recién nacidos.

La infección de vías urinarias en el hombre y en la mujer es de las más comunes provocadas por E.coli; es también causa frecuente de apendicitis y peritonitis, sepsis puerperal, infecciones de vesícula biliar, vías biliares e hígado.

En cerdos recién nacidos E.coli ha sido aislada de una gran variedad de trastornos entéricos incluyendo edema, enteritis bacteriana primaria y secundaria a una enteritis viral o septicemia.

En terneros se ha aislado E. coli presentándose principalmente en dos formas:

- a).- Septicémica por invasión en la sangre y los tejidos.
- b).- Síndrome entérico caracterizado por diarrea.

En vacas se ha encontrado produciendo metritis y mastitis. En las mastitis las bacterias coliformes se multiplican rápidamente produciendo una toxina potencial que se libera por lisis de las bacterias resultando una toxemia aguda con síntomas locales y sistémicos.

En las aves E. coli está implicada en el síndrome de los sacos aéreos, enteritis y en complicaciones por vacunación.

En general podemos encontrar a E. coli en organismos de diferentes especies como un agente infeccioso oportunista en estados de "tensión" y produciendo infecciones secundarias o asociadas a otros microorganismos patógenos.

Las reacciones bioquímicas que son características de los cultivos de *Escherichia coli* se muestran en la tabla siguiente:

<u>PRUEBA O SUSTRATO</u>	<u>REACCION</u>	<u>PRUEBA O SUSTRATO</u>	<u>REACCION.</u>
INDOL	+	LACTOSA	+
ROJO DE METILO	+	MANITOL	+
VOGES-PROSKAUER	-	SACAROSA	<u>±</u>
CITRATO DE SIMMONS	-	GELATINA	-
H ₂ S	-	UREASA	-
MOVILIDAD	<u>±</u>	DULCITOL	<u>±</u>
GLUCOSA	+	SORBITOL	+
GAS DE GLUCOSA	+	ARABINOSA	+
ADONITOL	-	DESARROLLO EN KCN	-

(+) POSITIVO

(-) NEGATIVO

(+) VARIABLE

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

a).- Colección de muestras.

1.- Material, reactivos y medios de cultivo.

- 1.- Algodón.
- 2.- Solución de yodo al 1%
- 3.- Equipo de disección.
- 4.- Hisopos.
- 5.- Alcohol al 70%
- 6.- Tubos de ensayos de 16 x 150 mm. con tapón de rosca, conteniendo 5 ml. de caldo triptosa.
- 7.- Frasco de vidrio boca ancha con tapón de rosca, conteniendo 10 ml. de solución salina isotónica fosfatada.
- 8.- Cajas petri con 20 ml. de agar Endo.
- 9.- Cajas petri con 20 ml. de agar Mac Conkey.
- 10.- Cajas petri con 20 ml. de agar Sangre.
- 11.- Asas de platino o cromo-níquel.
- 12.- Colorantes de Gram.

2.- Métodos.

Los animales que fueron utilizados para este estudio, como anteriormente se mencionó, pertenecían a diferentes especies y en consecuencia, eran de diversos tamaños, por lo que no siempre fue posible hacer la toma en el Laboratorio; en los animales cuyo tamaño imposibilitó su traslado, fue necesario llegar al sitio donde se encontraban, tomar la muestra y colocarla en un medio de transporte

te o solución preservativa (solución salina isotónica fosfatada).

Los productos para el estudio bacteriológico de los animales enfermos con diversos procesos infecciosos, se tomaron en las mayores condiciones asépticas posibles de acuerdo al tipo de infección, es decir, en el caso de abscesos y secreciones se tomaron utilizando hisopos o torundas estériles y cuando se trató de infecciones en tejidos y órganos internos, se tomaron parte de estos mismos; siempre tomando porciones significativas y en cantidad suficiente para permitir un examen adecuado.

En los casos en que la necropsia mostró un estado agudo de la infección, se hicieron siembras directamente en los medios diferenciales y selectivos. Cuando las lesiones o estados patológicos no fueron aparentes (infección subclínica), fue necesario antes de la siembra en medios selectivos, el uso de los medios de enriquecimiento como caldo triptosa o caldo cerebro corazón (además de una incubación de 18-24 h.) debido a que los microorganismos se encontraban en números reducidos.

A.- Toma de muestras en aves.

La mayoría de las veces los animales fueron llevados al laboratorio practicándose la autopsia y presentando diferentes cuadros clínicos, tales como pericarditis, aerosaculitis y colisepticemia principalmente. El muestreo se efectuó tomando parte de las secreciones o bien, de los tejidos u órganos infectados como hígado, bazo, riñón, pulmones, sacos aéreos y/o tráquea (aproximadamente un gramo de muestra en 5 ml. de caldo triptosa).

Se procedió a incubar los tubos con la muestra problema (12-24 h.) y -

posteriormente a sembrarlos en los medios selectivos y diferenciales para enterobacterias (agar Endo, agar Mac Conkey).

B.- Toma de muestras en cerdos y bovinos.

Se recolectaron todas las muestras en el campo; en el caso de cerdos, se obtuvieron principalmente de cuadros diarréicos (en lechones), metritis y abscesos- (en adultos); en bovinos se colectaron principalmente de problemas de mastitis.

Se tomaron los especímenes depositándolos en frascos estériles con tapón- de rosca conteniendo solución salina isotónica o bien se tomaron utilizando toru- das de algodón o hisopos (según el caso) que posteriormente se colocaban en los frascos antes mencionados.

Cuando se obtuvieron las muestras, éstas fueron trasladadas al laboratorio - en el tiempo más corto posible, para hacer siembras directas en los medios selec- tivos y diferenciales e incubar las muestras en caldo triptosa por 12-24 h., para hacer una nueva siembra, en el caso de que no hubiera desarrollo en las siembras directas.

C.- Toma de muestras en conejos.

En casi todos los casos las muestras fueron tomadas en el laboratorio, de cuadros clínicos como: diarrea, abscesos y secreciones.

Se hicieron como en los casos anteriores siembras directas en los medios- convencionales.

3.- Aislamiento.

Se han propuesto numerosos medios para el aislamiento de enterobacterias patógenas; existen varios medios de cultivo, que inhiben los microorganismos Gram

positivos y contienen indicadores que diferencian a las bacterias que fermentan la lactosa rápidamente, de otras que no la fermentan.

Nosotros usamos como medios para aislamiento de coliformes los siguientes:

a).- Agar Mac Conkey.- En este medio desarrollan coliformes y enterobacterias patógenas inhibiéndose las bacterias Grampositivas por la presencia de sales biliares y el cristal violeta. E. coli presenta desarrollo de colonias de diferentes tamaños, lisas o rugosas y de color rojo brillante o magenta.

b).- Agar Endo.- Se presenta inhibición de los microorganismos Grampositivos, por la presencia del sulfito de sodio y la fucsina básica. El desarrollo de E. coli presenta colonias de varios tamaños, lisas o rugosas, con un brillo metálico de color verdoso característico (también puede ser producido por Klebsiella sp. la cual se diferencia fácilmente por su aspecto, tamaño y morfología colonial).

c).- Agar Sangre.- Este es un medio enriquecido inespecífico, el que utilizamos con el fin de observar la hemólisis producida por algunas cepas.

Una vez sembradas las cajas de los medios convencionales con las muestras problema, se someten a un período de incubación de 12 a 18 h. antes de examinar las colonias que muestren un aspecto típico.

Debe enfatizarse que en el examen de las placas, inoculadas directamente con especímenes o de los medios de enriquecimiento, se tiene que ser cuidadoso para encontrar los microorganismos significativos, en este caso E. coli, que ordinariamente produce colonias de aspecto típico en medios selectivos y diferenciales, pero debe recordarse que la apariencia puede estar alterada por el cre-

cimiento de otros organismos cerca de estas colonias. También debemos recordar que puede haber colonias atípicas en su apariencia, por razones desconocidas. Por esto es aconsejable inocular 2 ó más placas que nos representen cada tipo de colonia y nos den resultados más claros. Las placas deben ser examinadas con luz transmitida a través de ellas y contra un fondo negro. Muchas bacterias viables no desarrollan colonias en medios selectivos, pero están presentes en la superficie del agar; sin embargo, con mucha práctica y cuidado es fácil tomar colonias puras utilizando alambres ligeramente curvos en la punta, con los que se toma únicamente el centro de la colonia elegida, si es posible se evita tocar la superficie del agar. Una atención apropiada a estos detalles resultará en favor de un cultivo puro, no mezclado con otras bacterias de la caja.

b).- Identificación por pruebas bioquímicas.

1.- Material, reactivos y medios de cultivo.

- 1.- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- 2.- Algodón.
- 3.- Gasa.
- 4.- Gradillas.
- 5.- Campanas de vidrio para fermentación.
- 6.- Reactivo de Ehrlich.
- 7.- Solución de hidróxido de potasio al 10%, sulfato de cobre e hidróxido de amonio.
- 8.- Medio de Sim.
- 9.- Lactosa.
- 10.- Glucosa.
- 11.- Agar de hierro y triple azúcar (TSI)
- 12.- Agar citrato de Simmons.
- 13.- Medio para reacción de Voges-Proskauer.

2.- Procedimiento.

Una vez aisladas y purificadas las colonias sospechosas como E.coli, se procedió a identificarlas utilizando medios que pusieron de manifiesto su fisiología y reacciones bioquímicas, por ejemplo, la producción de indol, producción de acidez o alcalinidad, producción de gas, movilidad, etc.

La producción de gas a partir de ciertos constituyentes proteínicos o hidrocarbonados en los medios, es importante para la identificación de los gérme-

nes, no importando la cantidad ni la naturaleza del gas producido. Para estudiar esta característica, en los medios líquidos se utiliza el método de la campana, y en los medios sólidos la producción de gas se reconoce por la ruptura del medio o la presencia de burbujas, al hacer en él una siembra profunda.

Los cambios alcalinos o ácidos se aprecian, si al medio de cultivo se le adiciona un indicador que virará al cambiar el pH.

Nosotros, en la identificación de microorganismos por pruebas bioquímicas con fines prácticos, seleccionamos una serie de diferentes medios, que nos dieran un máximo de información que nos permitiera diferenciar un germen de otro, aún del mismo grupo.

Los medios utilizados en este trabajo fueron los que a continuación se describen, mencionando sus características principales.

MEDIO DE SIM..- Es un medio semisólido que se emplea para determinaciones de la producción de sulfuros, formación de indol y movilidad de los bacilos entéricos. Ordinariamente se reparte en tubos de ensayo llenos hasta la mitad, que se inoculan con aguja por punción en el centro hasta la mitad de su profundidad. Se incuban de 18 a 24 h., antes de leer los resultados.

La reacción de sulfuros se indica por el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de inoculación y en ocasiones en todo el medio.

La producción de indol es llevada a cabo por las bacterias, por el alto contenido de triptofano y productos de hidrólisis de las proteínas en el medio. La presencia de indol se pone de manifiesto añadiendo a los cultivos unas gotas del reactivo de Ehrlich (paradimetilaminobenzaldehído), que al contacto con el cultivo

dará una coloración roja o rosada al ser **positivo**.

GLUCOSA Y LACTOSA.- Son azúcares en medios líquidos, utilizados para observar la producción de ácido y gas al ser fermentados. Estos azúcares se utilizan en proporción de 1% adicionados a un caldo base de Rojo de Fenol.

Se colocan dentro de los tubos, campanas de vidrio que nos detectarán el gas producido en caso de que lo haya.

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR (TSI).- Medio sólido que se utiliza para la diferenciación de bacilos entéricos Gramnegativos, por medio de su capacidad para atacar a la sacarosa, la lactosa, la dextrosa y para liberar sulfuros.

El agar inclinado se inoculará por estría con la colonia elegida y se puncciona el fondo. Los cultivos pueden interpretarse después de 18-24 y 48 h., de incubación.

La formación de ácido se manifiesta por un cambio en la coloración del indicador, del rojo a un color amarillo.

Si las bacterias no fermentan los carbohidratos, pueden descomponer los aminoácidos del medio produciendo hidróxido de amonio, el cual dará un color rojo intenso al medio, debido a la alcalinidad producida por los iones hidroxilo.

En el medio T.S.I. al que se han incorporado las sales de hierro, las bacterias forman a partir de ácido sulfhídrico producido, sulfuro férrico de color negro.

AGAR CITRATO DE SIMMONS.- Es un medio sólido que contiene como indicador el azul de Bromo-timol y que al pH que se utiliza el medio (neutro), es de color verde. Se emplea para hacer la prueba de citratos como una de las reacciones IMVIC. (Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato). Se pueden hacer culti

vos en placa, o si se prefiere el medio inclinado, se inocula estriando la superficie y puncionando el fondo. Se incuban a 37°C de 24 a 48 h. Sólo los microorganismos que utilizan el citrato como única fuente de carbono crecen en el -- Agar de Citrato de Simmons. La aparición de un crecimiento visible va acompañado en general, de un cambio alcalino (azul) del indicador.

REACCION DE VOGES PROSKAUER.- Esta reacción se hace generalmente para mostrar la capacidad de los cultivos para producir acetilmetil-carbinol, después de incubarlos por 24 a 48 h. El acetilmetil-carbinol se oxida en presencia de un álcali dando diacetil, que produce una coloración roja en las pruebas positivas.

Con todas las cepas aisladas se realizaron las siembras en los medios bioquímicos mencionados, utilizando como testigos para la lectura de las reacciones bioquímicas típicas, cepas patrón de E. coli 0111 y 0126; se reunieron todas las cepas que resultaron positivas como E. coli para proceder a su identificación con los sueros anti-especie específicos.

c).- Tipificación con sueros específicos.

1.- Material empleado.

- 1.- Placas o Portaobjetos excavados.
- 2.- Solución salina isotónica estéril.
- 3.- Solución salina al 0.5%.
- 4.- Asas de Platino o Cromo-Níquel.
- 5.- Solución de Acriflavina al 0.2%
- 6.- Tubos de ensayo de 13 x 100 m.m.
- 7.- Sueros polivalentes anti-E.coli del Grupo A, B y C.
- 8.- Sueros Monovalentes: 026:K60(B6), 055:K59(B5), 0111:K58(B4), - -
0127a:K63(B8), 086a:K61(B7), 0119:K69(B14), 0124:K72(B17), - --
0125:K70(B15), 0126:K71(B16), 0128:K67(B12).
- 9.- Alcohol, agua destilada y mecheros.

Los lineamientos para el reconocimiento de las cepas "enteropatógenas" - de las no "patógenas" mediante sueros anti-especie, los señalaron los trabajos de Kauffmann, los cuales constituyen un sistema de tipificación serológica. Trabajos y estudios posteriores hechos por Orskov, Ewing y Edwards contribuyeron para el desarrollo de un esquema antigénico para diferentes grupos de microorganismos, el cual hace posible su identificación y caracterización.

El nombre de E.coli enteropatógena fue sugerido para los serotipos que han sido aislados e identificados como un agente etiológico iniciador de una --- diarrea epidémica en infantes.

En este trabajo se trató de identificar a las diez cepas serológicamente - diferentes de E.coli que con mayor frecuencia han sido señaladas como responsa-

bles del padecimiento arriba señalado.

La serología tiene gran aplicación en la identificación y tipificación de las especies bacterianas patógenas, debido a que se trata de la reacción de un anticuerpo específico con su antígeno homólogo y se le puede considerar en la mayoría de los casos, como la forma más fácil y rápida para el diagnóstico microbiológico, y con la ayuda de las características bioquímicas nos proporciona una identificación segura del agente etiológico de la enfermedad.

El fundamento para la tipificación serológica de los diferentes géneros de Enterobacterias es muy similar, aunque se empleen diferentes series o juegos de sueros y los procedimientos presenten ligeras variaciones.

La serotipificación completa consiste en la determinación de los antígenos "O" (somáticos), de los factores antigénicos "O", de los antígenos "H" (flagelares), de los factores antigénicos "H" y de los antígenos "K" (capsulares).

Antígenos "O". Son antígenos somáticos termoestables, formados de un complejo fosfolípido-polisacárido y la forma en que se presentan los grupos terminales de este complejo nos dá la especificidad antigénica de las numerosas clases de antígenos "O", son resistentes al alcohol y los ácidos diluidos.

Las reacciones de aglutinación en tubo se presentan lentamente y los agregados o acúmulos que se forman son gránulos finos, que se dispersan con mucha dificultad.

Los antígenos "O" son dependientes de las formas de variación lisa (S) a rugosa (R) y algunos de la conversión lisogénica.

ANTIGENOS "H".- Son antígenos termo-lábiles que se presentan en los flagelos de las bacterias. Están compuestos de una proteína llamada FLAGELINA- y la secuencia o el orden de aminoácidos que se presenta en ella, nos determina la especificidad antigénica de los diferentes antígenos "H" de las enterobacterias. Estos antígenos se inactivan por el alcohol, el calor y los ácidos diluidos. La - aglutinación flagelar ocurre muy rápidamente y los agregados que se forman son - acúmulos "esponjosos" que se disgregan y flocculan fácilmente.

ANTIGENOS "K".- Estos son antígenos que se presentan como "cápsulas" o "envolturas"; cuando se encuentran en gran cantidad, inhiben la aglutinación - del suero anti "O" con bacterias vivas o suspensiones bacterianas no calentadas.

Los antígenos "K" son también polisacáridos, forman una clase que se - sub-divide de acuerdo a sus propiedades y características físicas y químicas. La mayoría de los antígenos "K" no se destruyen por calentamiento, pero son altera das algunas de sus características cuando se calientan a varias temperaturas por - intervalos específicos de tiempo. Las reacciones de aglutinación en tubo ocurren lentamente y los títulos de sueros Anti-K son relativamente bajos.

La aglutinación de antígenos "K" produce un agregado que semeja un - disco o membrana, esta clase de antígenos incluye los antígenos "L", "A" y --- "B" de E. coli los cuales podemos diferenciar por las características siguientes:

ANTIGENOS "K-A".- Se presentan como cápsulas.

- a) Aglutinabilidad del antisuero con el antígeno A inactivado a 120°C durante 2 1/2 h.

- b) Las suspensiones se vuelven aglutinables en el antisuero O, por calentamiento a 120° C por 2 1/2 h.
- c) El poder de unión con el anticuerpo no se inactiva a 100° C por -- 2 1/2 h. ni a 121° C por 2 h.
- d) La antigenicidad es inactivada por calentamiento a 120 ° C por -- 2 1/2 h.

ANTIGENOS "K-L".- Se presentan como envoltura o cubierta, ocasionalmente como cápsulas.

- a) Aglutinabilidad del antisuero L con el antígeno L inactivado a 100° durante 1 h.
- b) Las suspensiones se vuelven aglutinables en el antisuero O, por calentamiento a 100° C durante 1 h.
- c) El poder de unión con el anticuerpo es inactivado a 100° C durante 1 h.
- d) La antigenicidad es inactivada a 100° C durante 1 h.

ANTIGENOS "K-B".- Se presentan como envoltura o cápsula.

- a) Aglutinabilidad del antisuero B con el antígeno B inactivado a 100° C durante 1 h.
- b) Las suspensiones se vuelven aglutinables en el antisuero O, por calentamiento a 100° C durante 1 h.
- c) El poder de unión con el anticuerpo se inactiva por calentamiento a 100° C por 2 1/2 h. o a 121° C durante 2 h.
- d) La antigenicidad se inactiva a 100° C durante 1 h.

Cada serotipo de E. coli relacionado con un síndrome diarreico posee un tipo "B" de antígeno "K" que es serológicamente diferente de otros antígenos "B" reconocidos en otros tipos. A excepción de los tipos 025 y 044 todos los tipos-patógenos poseen el antígeno B.

La pérdida o variación completa o incompleta de estos antígenos, ocurre algunas veces de la forma "KO" a la "O".

Las características generales de los antígenos "O", "H" y "K" son de gran importancia en la producción y en el uso de los anticuerpos preparados con miembros del género Enterobacteriaceae.

Para la preparación de los sueros inmunes se escogen conejos sanos de -- 2.5 a 3.0 Kg. de peso; se preparan suspensiones de las cepas perfectamente comprobadas, se inactivan a 52-55° C., durante media hora, se comprueba la inactivación del germen y se ajusta nefelométricamente a una concentración de 1 millón de gérmenes por mililitro. Con esta suspensión se lleva a cabo la inmunización de los conejos, de los cuales se obtendrá el suero inmune para las reacciones de aglutinación. Se purifica el suero mediante métodos que pueden ser de 2 clases:

a) Inespecíficos (Fisicoquímicos).- Cuando lo que se desea es separar las gama-globulinas del resto de las proteínas que constituyen el plasma, para lo cual se puede utilizar: alcohol, sulfato de amonio, dietilaminoetil celulosa, etc.

b) Específicos (Inmunológicos).- Cuando se desea separar del suero o -- plasma un determinado

PROCEDIMIENTO.- Inicialmente realizamos una prueba de aglutinación presuntiva preliminar, que nos permitiera seleccionar las cepas "patógenas" de las que no fueran y se llevó a cabo como se describe a continuación:

De los cultivos puros aislados en placas de Mueller-Hinton agar se probaron dos o tres colonias, haciendo con cada una de ellas una suspensión en un portaobjetos con una gota de solución salina isotónica estéril y a continuación una gota de una solución de "Acriflavina" (1:500 en solución salina isotónica), se homogeniza con movimientos circulares horizontales y se interpreta el resultado.

Si se observa aglutinación, la cepa debe ser descartada como patógena y se elimina; si la reacción es ligera, se repite la prueba y si no hay aglutinación la cepa se confronta con los sueros anti-especie específicos, es decir se sospecha de una cepa patógena.

Los cultivos que presentaron una reacción de aglutinación negativa se probaron primero, con los sueros polivalentes y a continuación con los sueros monovalentes de grupo de acuerdo con la técnica siguiente:

AGLUTINACION CON SUEROS ANTI E. coli ESPECIFICOS.

1.- Se selecciona una colonia lisa de las placas de agar de Mueller-Hinton, la cual se homogeniza en un porta-objetos excavado con una gota de solución salina isotónica estéril, hasta formar una suspensión.

2.- Se adiciona una gota del suero polivalente de prueba.

3.- Se mezclan completamente por medio de una asa de platino y se gira horizontalmente el porta-objetos hasta que estén completamente homogenizados el suero y la suspensión bacteriana; se continúa la rotación durante un minuto.

4.- Se observa la reacción con una fuente de luz en un campo oscuro.

5.- Cuando la reacción no se presenta, se calienta la suspensión bacteriana durante una hora a 100° C para destruir los antígenos flagelares ó de pared — celular que pudieran estar inhibiendo la reacción.

6.- Resultados.- Si obtenemos una aglutinación fuerte, se considera que alguno de los sero-grupos de E. coli está presente. La reacción de aglutinación con el suero debe ser inmediata y completa; una reacción parcial o retardada se considera negativa. La lectura debe hacerse antes de que se sequen las gotas, ya que de lo contrario, se interpretarán como positivas aquellas en que los acúmulos de gérmenes se formen por desecación.

7.- Se repite el procedimiento anterior para 2 ó 3 colonias más de la caja de agar.

8.- Una vez realizada la prueba con el suero polivalente y obtenida una reacción positiva, se repite la técnica utilizando los sueros monovalentes de grupo, que se seleccionan de acuerdo al tipo de monovalente que está contenido en el polivalente usado en la reacción. El suero polivalente A contiene los grupos monovalentes: 026, 055, 0111 y 0127.

El suero polivalente B: 086a, 0119, 0124, 0125, 0126 y 0128.

El suero polivalente C: 018, 020a - 020c, 020a - 020b, 028, 044, --
0112a - 0112c.

Por lo tanto, cuando aglutina una cepa con el suero polivalente A, -
se prueba con los sueros 026, 055, 0111 y 0127, hasta obtener una reacción -
positiva con alguno de ellos.

Se utilizaron como testigos para reacciones de aglutinación típicas, - -
cepas patron de E.coli 0111 y 0126.

* Se utilizaron sueros liofilizados marca DIFCO, los cuales se rehi-
dratan cada uno con 3 ml. de solución salina isotónica estéril.

d).- Sensibilidad a antibióticos.

El arsenal constantemente creciente de antibióticos para uso terapéutico y de otros agentes disponibles para el médico, ha creado una demanda en el laboratorio para proporcionar información relativa a la sensibilidad o susceptibilidad de los microorganismos a esos productos. La necesidad de esa información se hace más -- aguda por las conocidas variaciones en la sensibilidad hallada normalmente dentro de las especies, y el hecho de que algunas cepas de microorganismos poseen naturalmente o pueden desarrollar resistencia a esos agentes, "in vitro" así como "in vivo".

Existen distintos métodos "in vitro", que permiten medir la sensibilidad de los gérmenes a los antibióticos; estos métodos se denominan "antibiogramas", entre los cuales cabe mencionar:

- 1.- El Método de Difusión.- Comprende el método de discos, y nos proporciona una información que indica si existe o no actividad de un determinado antibiótico ante la cepa estudiada; pero muestra sólo parcialmente el grado en que se manifiesta esa actividad, es por tanto un método semi cuantitativo.
- 2.- Métodos de Dilución.- Comprenden, el método de dilución seriada en tubo y el de dilución seriada en placa, que indican la actividad de un antibiótico y el grado de tal actividad que se expresa en términos de concentración inhibitoria mínima, la información que proporciona es por tanto cuantitativa.

El método que se utiliza universalmente y que fué usado por nosotros, por -

su bajo costo y facilidad de realización, es el de difusión con discos de Kirby y - Bauer. Existen ciertos factores variables que afectan los resultados de este método, los cuales se trataron de eliminar o al menos reducir al máximo estandarizando la metodología, lo que nos permite hacer del sistema de discos un sistema que posteriormente se aplique en la terapéutica.

Entre los principales factores que afectan los resultados en mayor o menor grado y que por lo tanto requieren consideraciones especiales tenemos:

- 1.- Cantidad del inóculo. Si el inóculo es demasiado, las zonas pueden no ser claras y la susceptibilidad pueden no percibirse con exactitud.
- 2.- Tiempo de incubación. Cuando exceda de lo necesario, puede presentar un recrecimiento en las zonas que originalmente mostraron inhibición, provocando dificultades en la interpretación e incluso falta de percepción de la susceptibilidad.
- 3.- Indices de desarrollo. Un cultivo de crecimiento lento muestra zonas de inhibición mayores que una cepa de desarrollo más rápido.
- 4.- Diferencias de densidad y humedad de la base del medio. Algunos -- antibióticos difunden mucho más lento que otros; así, los tamaños de las zonas de organismos susceptibles, son mucho mayores con agentes de rápida difusión que con los que difunden lentamente.
- 5.- Grosor del agar. Influye en la concentración del antibiótico, por su difusión en ambos sentidos, horizontal y verticalmente hacia el fondo de la caja.
- 6.- Actividad de los antibióticos contenidos en los discos. La potencia - de estos agentes varía de acuerdo a las condiciones de manejo a que se someten.

PROCEDIMIENTO.-

1.- SELECCION DE MEDIOS.- La selección del medio que se utiliza para la prueba de sensibilidad depende de la naturaleza bacteriológica del cultivo, con referencia especial a los resultados de la tinción de Gram y a los agentes infecciosos sospechosos; los medios empleados habitualmente son: el agar de Soya Trypticase, el medio de Muller Hinton, el Eugonagar, el agar de Infusión Cerebro Corazón y la Gelosa Sangre o Chocolate. No se recomienda el uso de Agar Nutritivo porque algunos agentes antimicrobianos por ejemplo la Colistina, no difunde en el agar y por lo tanto no forma zona de inhibición con los microorganismos susceptibles en un medio de agar que no contenga el 0.4 por ciento por lo menos, de cloruro de sodio; el resultado se puede informar equivocadamente como "resistente". Para obtener mejores resultados las placas deben prepararse de la siguiente manera: los medios líquidos esterilizados se enfrían hasta los 45° C aproximadamente antes de ser vertidos en las placas, se almacenan en refrigeración. La superficie del agar no debe estar seca, pues esto tiende a inhibir el crecimiento microbiano, debe estar húmeda pero no mojada.

2.- INOCULACION.- El inóculo del cultivo puro se prepara a partir de las placas de aislamiento, suspendiendo 2 ó 3 colonias "idénticas" en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm conteniendo 1 ml. de solución salina isotónica estéril. La transferencia del inóculo se hace por medio de un hisopo del cual se exprime el exceso de líquido y se hace pasar en todas direcciones uniformemente sobre la superficie del agar. El inóculo no debe ser muy abundante, pero sí lo suficientemente concentrado para dar crecimiento de

numerosas colonias pequeñas. Se dejan secar las placas de 5 a 10 minutos y se aplican los discos.

3.- SELECCION DE DISCOS.- Esta selección, en general debe basarse en la reacción al Gram, el tipo o tipos de microorganismos bajo prueba y por las solicitudes de los médicos. Se recomienda la inclusión de un disco de cada grupo de una amplia variedad de agentes antibacterianos.

Un antibiótico para ser considerado útil en la terapéutica cuando se le use en una dosis que produzca una concentración sérica inhibitoria o bactericida para algún microorganismo infectante, debiera ser atóxico, que provoque el mínimo de sensibilización, que induzca a la resistencia en el menor grado posible, que actúe sólo sobre estructuras o funciones de microorganismos y que sea bactericida, mejor que bacteriostático.

Los discos seleccionados se colocan sobre los medios previamente inoculados, utilizando pinzas estériles o flameadas al mechero. En nuestro trabajo utilizamos discos de la marca "Bioclín" que contienen 12 antibióticos diferentes y cumplen con los requisitos mencionados anteriormente.

4.- INCUBACION.- Las placas de prueba de sensibilidad se incuban de preferencia a una temperatura de 35 a 37°C. La incubación se continúa hasta que se haya obtenido un crecimiento satisfactorio, aproximadamente de 8 a 12 h., (en este caso de E.coli). Si las placas se preparan ya tarde en el día, deben interpretarse al día siguiente tan pronto como sea posible. Dado que las drogas siguen difundiendose de los discos, las concentraciones pueden caer por debajo de los niveles inhibitorios críticos y entonces, puede presentarse el crecimiento de microorganismos inhibidos, pero no muertos por

las drogas dentro de las zonas originales de inhibición y estas pueden reducirse o aún desaparecer con la incubación continuada; esto es particularmente cierto con algunas sulfonamidas. Así, las lecturas demoradas pueden informar erróneamente de los resultados de cultivos "resistentes" o "sensibles".

5.- INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS. - Debe prestarse una atención cuidadosa a la interpretación e informe de los resultados; en la práctica médica usual los antimicrobianos se utilizan con la intención de destruir o disminuir los gérmenes que provocan una infección clínica. El procedimiento de los discos como antes se mencionó, es esencialmente cualitativo y está proyectado para la indicación de la susceptibilidad y no necesariamente para la correlación con una dosificación específica o con un nivel medio en la sangre. - Una dosificación puede cambiarse a veces y una droga eficaz puede dar origen a un nivel sanguíneo muy bajo porque pasa de la sangre a los tejidos. - La terapéutica depende no solo de la sensibilidad del agente infeccioso sino también de la fisiología y grado de la enfermedad en el paciente, de la localización de la infección y especialmente de lograr el contacto entre la droga y el microorganismo infeccioso, es decir de su biodisponibilidad. La presencia de una zona definida de inhibición de crecimiento, se considera como cierto grado de susceptibilidad a la droga y el microorganismo se registra como "sensible".

Si el medicamento no es capaz de destruir o alterar al agente patógeno a pesar de que se logra poner una determinada concentración frente a él, o sea cuando no es visible zona alguna o solamente se observan trazas de reacción, el informe es "resistente" o no "sensible".

La presencia de algún crecimiento dentro de la zona de inhibición puede deberse a las causas siguientes:

1.- La lectura tardía de la prueba. De modo que el desarrollo de microorganismos, inhibidos pero no muertos por el agente de prueba, ha aparecido después de la difusión de la droga en el medio, por haberse reducido la concentración por debajo del nivel crítico de inhibición. Esto puede suceder con cualquier droga que no sea bactericida.

2.- La presencia de miembros resistentes en una población del mismo microorganismo. Esta situación se interpreta generalmente como "resistencia". Si el crecimiento en las placas es muy intenso, se repite la prueba con un inóculo menos concentrado.

3.- El empleo de discos que han perdido potencia.

4.- La presencia de un microorganismo diferente no susceptible, contaminando el cultivo.

Se conocen otros métodos en este sistema de antibiogramas por difusión (discos). Mientras se sigue cuidadosamente un sistema, se obtienen resultados satisfactorios, aunque los detalles de los diferentes sistemas, varíen considerablemente.

1.- Método de Anderson. Utiliza discos con baja concentración de antibióticos en placas de agar sangre. Solamente es necesaria una medición mínima y no se informa el tamaño de la zona. La interpretación con discos de baja potencia es como sigue:

Mayor de 15 mm = susceptible.

De 10 a 15 mm = moderadamente resistente.

Menor de 10 mm = resistente.

Toda zona en torno de los discos que contengan Bacitracina, Colistina, - Kanamicina, Nitrofurantoina, Polimixina y Ristocetina, se interpreta como indicando susceptibilidad a pesar de que no se alcancen los valores anteriores.

2.- Métodos de Dos Discos. Utiliza un disco de baja concentración y otro de alta concentración. Los demás detalles son según el método recomendado. La interpretación es como sigue:

Sensible: Una marcada zona de inhibición en torno a los discos de ambos niveles. Moderadamente sensible o intermedia: poca o ninguna zona en torno al disco de bajo nivel, y una zona definida de inhibición en torno al disco de alto nivel. No sensible o resistente: Ninguna zona o tan solo trazas de - inhibición en torno de cada disco.

3.- Sistema WHO. Este método utiliza discos de un solo nivel "sumamente elevado" y las zonas se miden pero no se registran. El medio debe tener un pH - de 7.2 a 7.4 aproximadamente y debe ser el que "proporciona un desarrollo satisfactorio de todas las bacterias comunes que causan las enfermedades hu-
manas".

El inóculo se prepara en caldo sembrado con colonias aisladas. Se dispersa - el caldo con el inóculo uniformemente sobre la placa de agar, con una varilla de vidrio doblada en ángulo recto, retirando el exceso de líquido mediante una pipeta. Los resultados se interpretan como sensibilidad total, resistencia parcial o resistencia, de acuerdo con la experiencia del bacteriólogo, o

por comparación con pruebas de microorganismo de sensibilidad conocida.

RESULTADOS:

La prueba de sensibilidad, solo se realizó en las cepas que se identificaron como E. coli entero patógenas y las lecturas se realizaron en base a la tabla siguiente:

CONCENTRACION DE LOS DISCOS UTILIZADOS.

AGENTES ANTIMICROBIANOS	POTENCIA DEL DISCO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (Aprox. m.m.)		
		RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
AMPICILINA	10 mcg.	11 o menos	12 - 13	14 o más
TETRACICLINA	10 mcg.	8 o menos	9 - 11	12 o más
CLORAMFENICOL	30 mcg.	13 o menos	13 - 17	17 o más
KANAMICINA	30 mcg.	12 o menos	12 - 17	17 o más
GENTAMICINA	10 mcg.			13 o más
ESTREPTOMICINA	20 mcg.	11 o menos	12 - 14	15 o más
CEFALOTINA	30 mcg.	14 o menos	15 - 17	18 o más
NEOMICINA	30 mcg.	12 o menos	12 - 16	16 o más
FURADANTINA	100 mcg.	9 o menos	9 - 12	12 o más
AC. NALIDIXICO	30 mcg.	13 o menos	14 - 18	19 o más
POLIMIXINA	10 mcg.	8 o menos	9 - 11	12 o más
T. SULFA	150 mcg.	12 o menos	13 - 16	17 o más

C A P I T U L O III
RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación se expresan en forma de cuadros, los resultados obtenidos de los aislamientos, serotipificación y pruebas - de sensibilidad a los antibióticos, de las distintas cepas recolectadas de E.coli.

A I S L A M I E N T O S

Cuadro No. 1

NUM. DE C A S O S	HUESPED	LOCALIZACION DEL PADECIMIENTO	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS	SITIO DE LA TOMA DE MUESTRA
3	A V E S *	APARATO DIGESTIVO	E.coli S. gallinarum Cocos G (+)	LABORATORIO.
2	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+) Hongos.	"
1	"	APARATO DISGESTIVO	E.coli, S. gallinarum bacilos G (-)	"
1	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+) bacilos G (-)	"
1	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, S. Gallinarum	"
1	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+)	"
4	"	APARATO DIGESTIVO Y RESPIRATORIO.	E.coli, bacilos G (-) cocos G (+), hongos, levaduras	"
2	"	APARATO DIGESTIVO Y RESPIRATORIO.	E.coli, cocos G (+)	"

NUM. DE CASOS.	HUESPED.	LOCALIZACIÓN DEL PADECIMIENTO	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS	SITIO DE LA TOMA DE MUESTRA
2	A V E S	APARATO DIGESTIVO Y UROGENITAL.	E. coli, cocos G (+)	LABORATORIO
11	"	APARATO RESPIRATORIO.	E. coli, cocos G (+)	"
1	"	APARATO RESPIRATORIO.	E. coli, bacilos G (-)	"
1	"	APARATO RESPIRATORIO.	E. coli, cocos G (+) bacilos G (-)	"

NUMERO TOTAL DE MUESTRAS TOMADAS: 30

* Se recolectaron las muestras en aves con edades que variaban desde un día hasta 36 semanas.

NUM. DE CASOS.	HUESPED	LOCALIZACION DEL PADECIMIENTO	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS	SITIO DE LA TOMA DE MUESTRA
12	CERDOS.**	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+)	GRANJA
1	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, bacilos G (-) levaduras.	"
2	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli	"
1	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, Cl. perfringens cocos G (+)	"
4	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+) bacilos G (-)	"
3	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, bacilos G (-)	"
3	"	APARATO UROGENITAL	E.coli, cocos G (+) bacilos G (-)	"
2	"	APARATO RESPIRATORIO	E.coli, bacilos G (-) cocos G (+)	"
2	"	APARATO UROGENITAL	E.coli, cocos G (+)	"
3	"	ABSCESO ABIERTO EN UNA PIERNA.	E.coli, cocos G (+)	"
1	"	ABSCESO CERRADO EN UNA PIERNA.	E.coli, cocos G (+)	"
1	"	APARATO UROGENITAL	E.coli, bacilos G (-)	"

NUM. DE CASOS	HUESPED	LOCALIZACION DEL PADECIMIENTO	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS	SITIO DE LA TOMA DE MUESTRA
1	CERDO	SEPTICEMIA	Ec.coli, cocos G (+) bacilos G (-)	GRANJA
1	"	APARATO RESPIRATORIO	E.coli, bacilos G (-)	"

NUMERO TOTAL DE MUESTRAS RECOLECTADAS: 37

** Se recolectaron las muestras en cerdos lechones, de engorda y cerdas recientes de parto.

CUADRO No. 3

NÚMERO DE CASOS.	HUESPED	LOCALIZACION PADECIMIENTO	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS	SITIO DE LA TOMA DE MUESTRA
5	CONEJOS	ABSCESO Y SECRECION OCULAR	E.coli, cocos G (+)	GRANJA
4	"	SEPTICEMIA	bacilos G (-) cocos G (+)	"
5	"	APARATO DIGESTIVO	bacilos G (-) cocos G (+)	"
3	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, bacilos G (-)	"
2	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+)	"
1	"	SECRECION DE LESION EN UNA PATA	E.coli, bacilos G (-) cocos G (+)	"

Número total de muestras recolectadas: 20

CUADRO No. 4

NUM. DE CASOS	HUESPED	LOCALIZACIÓN DEL PADECIMIENTO	MICROORGANISMOS ENCONTRADOS	SITIO DE LA DE LA MUESTRA
4	BOVINOS	UBRE	E.coli, cocos G (+) bacilos G (-)	GRANJA.
10	"	UBRE	E.coli, cocos G (+)	"
1	"	UBRE	E.coli, cocos G (+) bacilos G (+)	"
1	"	UBRE	E.coli, bacilos G (+)	"
6	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, bacilos G (-)	"
7	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+) bacilos G (-)	"
5	"	APARATO DIGESTIVO	E.coli, cocos G (+)	"
2	"	APARATO UROGENITAL	E.coli, cocos G (+) bacilos G (-)	"
1	"	APARATO UROGENITAL	E.coli, bacilos G (-)	"
1	"	APARATO UROGENITAL	E.coli, cocos G (+)	"

NUMERO TOTAL DE MUESTRAS RECOLECTADAS: 38

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AGLUTINACION

NUMERO TOTAL DE CEPAS PROBADAS CON ACRIFLAVINA _____ 125
 PRESENTARON REACCION POSITIVA _____ 54
 PRESENTARON REACCION NEGATIVA _____ 71

AGLUTINACION CON SUEROS ANTI-ESPECIE

SUEROS POLIVALENTES	NUMERO DE CEPAS AGLUTI NADAS	SUEROS MONOVALENTES									
		026	055	0111	0127	086	0119	0124	0125	0126	0128
GRUPO A	32	5	2	16	9						
GRUPO B	14					0	0	7	3	3	1
GRUPO C *	19	* NO SE REALIZO LA DETERMINACION CON LOS SUEROS MONOVALENTES POR NO ENCONTRARLOS EN EXISTENCIA EN EL MERCADO NACIONAL.									

RESULTADO DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD "IN VITRO" A ANTIBIOTICOS

CUADRO No. 6

NUMERO DE CEPAS	HUESPED	NOMBRE DEL ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
20	B O V I N O S	AMPICILINA	25 %	55 %	20 %
		TETRACICLINA	5 %	5 %	90 %
		CLORAMFENICOL	45 %	10 %	45 %
		KANAMICINA	35 %	25 %	40 %
		GENTAMICINA	70 %	30 %	0 %
		ESTREPTOMICINA	10 %	35 %	55 %
		CEFALOTINA	45 %	35 %	20 %
		NEOMICINA	15 %	45 %	40 %
		FURADANTINA	10 %	35 %	55 %
		AC. NALIDIXICO	100 %	0 %	0 %
		POLIMIXINA	30 %	70 %	0 %
		TRIPLE SULFA	0 %	0 %	100 %

RESULTADO DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD "IN VITRO" A ANTIBIOTICOS

CUADRO No. 7

NUMERO DE CEPAS	HUESPED	NOMBRE DEL DEL ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
16	A	AMPICILINA	69 %	19 %	12 %
		TETRACICLINA	19 %	19 %	62 %
		CLORAMFENICOL	56 %	12 %	32 %
	V	KANAMICINA	69 %	25 %	6 %
		GENTAMICINA	75 %	25 %	0 %
	E	ESTREPTOMICINA	0 %	50 %	50 %
		CEFALOTINA	74 %	13 %	13 %
		NEOMICINA	56 %	44 %	0 %
	S	FURADANTINA	0 %	25 %	75 %
		AC. NALIDIXICO	93 %	7 %	0 %
		POLIMIXINA	68 %	32 %	0 %
		TRIPLE SULFA	13 %	0 %	87 %

RESULTADO DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD "IN VITRO" A ANTIBIOTICOS

CUADRO No. 8

NUMERO DE CEPAS	HUESPED	NOMBRE DEL ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
4	C O N E J O S	AMPICILINA.	25 %	25 %	50 %
		TETRACICLINA.	0 %	0 %	100 %
		CLORAMFENICOL.	0 %	0 %	100 %
		KANAMICINA.	25 %	0 %	75 %
		GENTAMICINA.	50 %	50 %	0 %
		ESTREPTOMICINA.	25 %	25 %	50 %
		CEFALOTINA.	25 %	25 %	50 %
		NEOMICINA.	25 %	0 %	75 %
		FURADANTINA.	0 %	25 %	75 %
		AC. NALIDIXICO.	100 %	0 %	0 %
		POLIMIXINA.	75 %	25 %	0 %
		TRIPLE SULFA.	0 %	0 %	100 %

RESULTADO DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD "IN VITRO" A ANTIBIOTICOS

CUADRO No. 9

NUMERO DE CEPAS	HUESPED	NOMBRE DEL ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
31	C E R D O S	AMPICILINA.	45 %	32 %	23 %
		TETRACICLINA.	7 %	7 %	86 %
		CLORAMFENICOL.	45 %	3 %	52 %
		KANAMICINA.	64 %	10 %	26 %
		GENTAMICINA.	77 %	23 %	0 %
		ESTREPTOMICINA.	13 %	48 %	39 %
		CEFALOTINA.	58 %	26 %	16 %
		NEOMICINA.	26 %	48 %	26 %
		FURADANTINA.	19 %	13 %	68 %
		AC. NALIDIXICO.	94 %	6 %	0 %
		POLIMIXINA.	32 %	68 %	0 %
TRIPLE SULFA.	6 %	0 %	94 %		

CAPITULO IV

RESUMEN Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

a) RESUMEN.

Por razones de salud pública es importante aislar e identificar del lugar en -- que se presentan, los agentes etiológicos de las infecciones más frecuentes. Esta afirmación rige particularmente para los países tropicales y subtropicales en desarrollo, donde las características de exposición a los agentes patógenos infectantes suelen diferir de las observadas en los países desarrollados.

En este trabajo se trató de encontrar una relación entre cepas de E.coli aisladas de animales domésticos de explotación y las encontradas en el hombre, -- que pueden ser transmitidas recíprocamente entre ambos, mediante el fenómeno -- conocido como "Zoonosis".

Se realizó la colección de muestras para el aislamiento de E.coli en las mayores condiciones asépticas posibles, de animales cuya procedencia eran granjas situadas en el Valle de México y sus alrededores; las muestras se tomaron de animales con diversos estados patológicos como mastitis, metritis, evacuaciones -- diarreicas, abscesos, septicemias y otros. Posteriormente se procedió a hacer el aislamiento, sembrando las muestras en los medios convencionales para enterobacterias. Se hicieron pruebas bioquímicas de las cepas aisladas, sospechosas de ser -- E.coli, identificándose la presencia de dicho microorganismo en 116 de ellas, de las cuales 30 correspondieron a nuestras tomadas de aves, 38 de bovinos, 37 de -- cerdos y 11 de conejos.

A continuación se realizó la serotipificación de cultivos, efectuando primeramente una reacción presuntiva de aglutinación con una solución de acriflavina

na, para seleccionar las cepas sospechosas como "patógenas"; los cultivos que mostraron aglutinación positiva con acriflavina se eliminaron y los que no presentaron aglutinación se hicieron reaccionar con los sueros anti-E.coli específicos, primeramente con los polivalentes y en seguida con los monovalentes de grupo ; de estos últimos, los utilizados para este fin, fueron los sueros monovalentes de las especies que más comunmente se encuentran en nuestro medio produciendo trastornos patológicos, resultando en número de 65 las cepas serotipificadas.

Se efectuaron las pruebas de sensibilidad a los antibióticos con las técnicas de difusión en placas de agar para los cultivos serotipificados, empleando los antimicrobianos de mayor uso. Se hicieron las anotaciones de los resultados.

b) DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

En los datos obtenidos de las muestras tomadas en aves, se observó que en infecciones de tipo respiratorio, E.coli se asocia con microorganismos Grampositivos del tipo estafilococos, causando junto con ellos, septicemias y aerosaculitis, - debido a sus toxinas y gran invasividad.

En infecciones del tracto digestivo, encontramos a E.coli principalmente - con Salmonella y hongos, con los que en acción sinérgica producen los cuadros -- diarreicos y las lesiones en la mucosa intestinal.

En los resultados de las muestras obtenidas en cerdos y bovinos, encontramos a E.coli en trastornos digestivos, asociados a microorganismos Grampositivos - del tipo estreptococos principalmente. En algunos casos de muestras tomadas de lechones y terneros, se presentó E.coli como único agente infectante y tal vez co-

mo oportunista. En estos casos, es probable que el calostro de las madres, ó no es ingerido por los recién nacidos ó contiene una baja concentración de anticuerpos, y en la mayoría de los casos esto trae como consecuencia la muerte de los lactantes cuando no son tratados a tiempo y con el medicamento adecuado.

En casos de infecciones en ubres y urogenitales, se presenta E. coli asociado con cocos y bacilos Grampositivos, los cuales forman toxinas que se liberan -- por lisis de la bacteria, resultando una toxemia aguda con síntomas locales y sistémicos.

En los resultados de las muestras obtenidas en conejos, pudimos observar la escasa pululación de E. coli en estos organismos. En algunos casos de abscesos y secreciones, se encontró asociada a cocos Grampositivos del tipo estafilococos y - en trastornos intestinales asociada a bacilos Gramnegativos.

Como se pu_do observar, E. coli se encuentra relacionada con los más diversos tipos de infección que se producen en diferentes organismos.

Al realizar las aglutinaciones con los sueros anti- E. coli específicos de las cepas sospechosas como patógenas, obtuvimos como resultados que, aproximadamente un 52% del total de las muestras recolectadas, aglutinaron con alguno de los 3 sueros polivalentes utilizados, lo que nos induce a pensar que posiblemente E. coli intervino directamente en los procesos infecciosos que padecieron los organismos de los cuales se obtuvieron las muestras.

Los serotipos que más comunmente se encontraron fueron: el 0111, 0127, --

0124, 026, 0125 y 0126, coincidiendo en que son las principales cepas patógenas infectantes en el humano y por lo tanto cabe la posibilidad de que éstas sean -- transmitidas por diferentes vías de humanos a animales ó viceversa para producir o intervenir en los diversos padecimientos infecciosos.

Con respecto a la sensibilidad de las cepas obtenidas de E. coli, se presentaron variaciones muy notables, desde sensibilidades de 100%, hasta 0%, como en los casos del Acido Nalidíxico, con el que encontramos casi un 100% de efectividad, contrastando con los resultados obtenidos con sulfas en los cuales se presentó casi un 100% de resistencia en las cepas aisladas de las diferentes especies animales estudiadas.

Tradicionalmente se aconseja en medicina veterinaria, el uso de combinaciones de antibióticos tales como Tetraciclina-Cloramfenicol, Tetraciclina-Neomicina, Tetraciclina-Cloramfenicol Neomicina, Estreptomina-Sulfas, Nitrofuranos-Neomicina- Tetraciclinas, para tratar las diferentes enfermedades infecciosas como son: mastitis, enteritis, metritis,, etc., que se presentan en los animales de explotación incluidos en este trabajo.

Los resultados encontrados (ver cuadros Nos. 6, 7, 8 y 9), nos muestran - que existe una gran resistencia a estos antibióticos tan comunmente utilizados, debido a su uso indiscriminado y al abuso que de ellos hacen las personas dedicadas a la explotación de los animales mencionados, y a la gran facilidad que tienen - los microorganismos Gramnegativos de adquirir resistencia a los antimicrobianos.

En medicina humana existen como en medicina veterinaria, algunos antibióticos que han sido y son utilizados con mucha frecuencia tales como Tetraciclina y Ampicilina; ahora bien haciendo una relación de los resultados enumerados en las tablas mencionadas, podemos observar que coinciden como los antibióticos mayormente usados en veterinaria, en que las cepas probadas muestran una gran resistencia.

Así tenemos a la Tetraciclina, en que existe una resistencia de aproximadamente un 60% y la Ampicilina que nos muestra una resistencia de un 80%. Sin embargo existen antibióticos cuyo uso en medicina humana es un poco más limitado, que nos muestran un elevado porcentaje de sensibilidad como se observa con la Gentamicina, el Acido Nalidixico y la Kanamicina.

De los resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos concluir que:

CONCLUSIONES

Se encontró una alta incidencia de E. coli en las muestras estudiadas, recolectadas de animales enfermos, de serogrupos patógenos infectantes en el humano.

Por lo que podemos decir, que encontramos a E. coli causando enfermedad, actuando directa o indirectamente en acción sinérgica con otros microorganismos, sola y como complicación en infecciones secundarias y hasta terciarias en origen viral o bacteriano.

Las extremas medidas higiénicas en la explotación de los animales de las especies estudiadas, ayudará a evitar posibles infecciones que pueden presentarse por diferentes vías de transmisión de humanos a animales e inversamente; ya que como se constató existen en animales cepas relacionadas antigénicamente, con las encontradas en humanos, que producen diversos cuadros patológicos.

Respecto a la sensibilidad a los agentes antimicrobianos, encontramos que E. coli, muestra todavía una alta sensibilidad a varios de ellos, lo que permite que sea relativamente simple y efectiva la terapéutica en las enfermedades producidas por este microorganismo, siempre y cuando sean aplicados los tratamientos en el momento adecuado.

BIBLIOGRAFIA

- Arbuckle, J. B. R. 1968. The distribution of certain E.coli strains in pigs and their environment. B. Veterinary J. 124, 152
- Bailey W. R and E. G. Scott. 1973 Diagnóstico Microbiológico. 3a. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Baltimore, Biological Laboratories. 1974. Manual de Procedimientos de Laboratorio. 5a. Ed. México.
- Barrett, J. T. 1972. Inmunología. 1a. Ed. Nueva Ed. Interamericana, S.A. de C. V. México. 118.
- Biro, E. C. 1976. Terapéutica Antimicrobiana. 5a. Ed. Diógenes, S.A. México.
- Brandenburg, A. C. and M.R. Wilson. 1972. Immunity to E. coli in pigs. Ig G immunoglobulin in passive immunity to E.coli enteritis. Immunology - 24, 119.
- Bryant, M. C. 1976. Antibióticos y su control mediante el laboratorio. 1a. Ed. El Manual Moderno S. A. México.
- Buchanan. E. R. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8-th Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 8, 293.
- Carlson, H. C. and G. R. Whenham. 1968. Coliform bacteria in chicken broiler house dust and their possible relationship to colisepticemia. Avian - Disease. 12, 297.
- Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg and W.B Wood. 1973. Microbiology. 2.-nd Ed. Harper and Row Páb. Inc. Maryland. 29, 753.
- Dikken, H y A.M.L. Guzman. 1965. Métodos para el aislamiento e identificación de enterobacteriaceae. C.N.I.P. Palo Alto. México.
- Edwards. P.R. and W.H.Ewing. 1972. Identification of enterobacteriaceae. 3rd Ed. Burgess P. Co. Minnesota. 3, 21, 4, 49, 5, 67.
- Glantz, P.J. 1965. An E. coli serotype useful por experimental infections. Avian Disease, 9, 264.
- Gross, W. 1961. E. coli as a complicating factor of Newcastle disease - vaccination. Avian Diseases, 2, 132.
- Jawetz, E., G.L. Melnick y E.A. Adelberg. 1973. Manual de Microbio-

logía Médica. 5a. Ed. El Manual Moderno, México, D. F.

Jones, A. 1966. In vitro studies with E. coli from piglets and calves development of resistance to antibiotics, J. Comp. Path, 74, 1,

Kenworthy, R. and W.D. Allen. 1966. Influence of diet and bacteria on small -- intestinal morphology, with special reference to early weaning and E. coli, J. Comp. Path; 76, 291.

Logan, E. F. and W. J. Penhale. 1972. Studies on the immunity of the colibacillosis. The Veterinary Record, 18, 419, 423.

Lynch. J. M. y S. S. Raphael, L. D. Mellor, P. D. Spare and M.J.H. Inwood 1974. Métodos de Laboratorio. 2a. Ed. Interamericana. México.

Mata, J., R. Fernández y J. J. Urrutia 1969. Infección del intestino por bacterias enteropatógenas en niños de una aldea de Guatemala, durante los tres primeros años de vida. Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología. 11, 102.

Merchant, I. A and R.A. Packer. 1975. Bacteriología y Virología Veterinaria. 3a. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 523.

Merck, Sharp and Domm. Int. 1970. El Manual Merck de Veterinaria. 1a. Ed. - Rahway, N. J. E.U.A.

OMS. 1960-62. Revista del Centro Panamericano de Zoonosis 5, 16

Schpper, I. A. y C. Kelling, H. Ebeltoft and D. Graves. 1973. Comparison of the direct agglutination and indirect hemagglutination tests in the determination of blood serum titers to E. coli organisms. App. Mic. 3, 458.

Secretaría de Agricultura y Ganadería. Manual de Laboratorios de diagnóstico No. 1 Aspectos epidemiológicos de algunas Zoonosis. México.

Swith. T. D., N. F. Conant, H. P. Willett. 1971. Microbiología de Zinsser. 14a. Ed. U.T.E.H.A. México.

Sojka, W.J. 1965. E. coli in domestic animals and poultry. Commonwealth. Agricultural Bureaux. Farnham Royal England.