2ej 38

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD EN *Citrobacter* ssp.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

IRMA CAÑEDO SOLARES

FALLA DE ORIGEN

1989

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Resumen.

I. INTRODUCCION.

1. Definición de la familia Enterobacteriacea.

a) Clasificación y Nomenclatura de la Familia.

2. Antecedentes del genero Citrobacter ssp.

a) Definición del género Citrobacter ssp.

b) Clasificación del género Citrobacter ssp.

3. Características del género Citrobacter ssp.

a) Antígenos Somáticos "O".

b) Antígenos Flagelares "H".

C) Resistencia antimicrobiana.

4. Citrobacter "aberrantes".

5. Habitat y Patogenicidad del género Citrobacter ssp.

II. OBJETIVO.

III. MATERIAL Y METODO.

IV. RESULTADOS.

V. DISCUSION.

VI. REFERENCIAS.

VII. CUADROS.

RESUMEN.

Se realizó un estudio con 140 cepas identificadas inicialmente como Citrobacter freundii aisladas de coprocultivos durante el transcurso de un estudio longitudinal sobre los agentes asociados a diarrea aguda en una cohorte de 75 niños rurales habitantes de un poblado del Estado de Morelos. Las cepas de Citrobacter freundii estudiadas se seleccionaron para estudio por tener características aberrantes en el cultivo inicial. A través de un proceso de enriquecimiento en medios de tetrationato y Rappaport, se logró determinar que las cepas de Citrobacter freundii estudiadas, eran en realidad variantes fenotípicas de especies de Salmonella infantis y de Salmonella senftenberg, esto fue confirmado por los estudios bioquímicos y serológicos.

I. INTRODUCCION.

1) La familia Enterobacteriaceae agrupa un gran número de géneros de bacterias relacionadas bioquímica y genéticamente. De acuerdo con Bergey (1) la familia comprende bacterias gram negativas, no formadoras de esporas aerobias o anaerobias facultativas. Los miembros de ésta familia son bacilos que crecen bien en medios de cultivo artificiales; son capaces de reducir nitratos o nitritos y fermentar la glucosa con formación de ácido, o bien, de ácido y gas. La prueba de indofenoloxidasa es negativa.

a) Clasificación y Nomenclatura de la Familia.

Respecto a la clasificación y nomenclatura de la familia Enterobacteriaceae, en la Octava Edición del Manual de Bergey (1) se señalan los siguientes géneros con más de 100 especies.

Familia ENTEROBACTERIACEAE Rahn 1937.

Género I — ESCHERICHIA Castellani y Chalmers, 1919

1. *Escherichia coli* (Migula 1895)

Género II — SHIGELLA Castellani y Chalmers, 1919

1. *Shigella dysenteriae* (Shiga) Castellani y Chalmers, 1919
2. *Shigella flexneri* Castellani y Chalmers 1919

3. Shigella boydii Ewing, 1949.

4. Shigella sonnei (Levin, 1920) Weldin, - 1927.

Género III SALMONELLA Bergey, Breed y Murray, 1900.

1. Salmonella cholera-suis (Smith) Weldin, 1927.

2. Salmonella hirscfeldii Weldin, 1927.

3. Salmonella paratyphi A Castellani y Chalmers, 1919.

4. Salmonella typhimurium Castellani y Chalmers, 1919.

5. Salmonella enteritis Castellani y Chalmers, 1919.

6. Salmonella typhi (Schroeter) Warren y Scott, 1930.

7. Salmonella gallinarum Bergey y col. 1925.

8. Salmonella schottmuellari Bergey y col. 1919.

Subgénero II

1. Shalmonella salame Le Monor, Rhode y Taylor, 1970.

Subgénero III

1. Shalmonella arizonae Kauffmann en van Oye

1964.

Subgénero IV

1. Salmonella houtenae Le Minor, Rhode y Taylor, 1970.

Subgénero V

1. Salmonella bongor Le Minor, Rhode y Taylor, 1969.

Género IV KLEBSIELLA Trevison, 1887.

Subespecie
1. Klebsiella pneumoniae (Schroeter, - 1986) Trevison, 1887.
2. Klebsiella ozaenae (Abel, 1893) -- Bergey, Bred y Murray, 1925.
3. Klebsiella rhinoschleromatis Trevisan 1887.

Especie
1. Klebsiella oxytoca Lautrop 1956.
2. Klebsiella terragena Izord y col. 1981.
3. Klebsiella plinticola Bergey, Seidler y Brenner, 1982.
4. Klebsiella pneumoniae (Schroeter, - 1886) Trevisan 1887.

Género V ENTEROBACTER Hormaeche y Edwards 1960.

1. Enterobacter cloacae Hormaeche y Edwards 1960.

2. Enterobacter sakazaki Farmer y col. 1980.

3. Enterobacter agglomerans Ewing y Fife, 1972.

4. Enterobacter aerogenes (Kruse, 1896) Hormache y Edwards, 1960.

5. Enterobacter gergoviae Brenner y col. 1980.

Género VI EDWARDSIELLA Ewing y Mc Whorter, 1965.

1. Edwardsiella ictaluri Hawke y col. 1981.

2. Edwardsiella tarda Ewing y Mc Whorter 1965.

Género VII SERRATIA Bizio 1823.

1. Serratia marcescens Bizio 1823.

2. Serratia liquefaciens (Grimes y Hennerty) 1931.

3. Serratia plymuthica Breed y col. 1948.

4. Serratia rubidaea Ewing y col. 1973.

5. Serratia odorífera Grimont y col. 1978.

6. Serratia ficaria Grimont y Starr. 1981.

Género VIII ARIZONA Ewing y Fife.

1. Arizona hinshawii (Ewing y Fife) Ewing.

Género IX PROTEUS Hauser 1885.

1. Proteus vulgaris Hauser 1885.

2. Proteus mirabilis Hauser 1885.

3. Proteus myxofaciens Cosenza y Podgwaite 1966.

Género X PROVIDENCIA Ewing 1966.

1. Providencia alcalifaciens (Dasalles Gomes 1944). Ewing 1962.

Género XI MORGANELLA Fulton 1943.

1. Morganella morgani Brener y col. 1978.

Género XII ERWINIA Winslow y col. 1920.

1. Erwinia amylovora Winslow y col. 1920.

2. Erwinia tracheiphilia Bergey y col. 1923.

3. Erwinia mallotivora Goto, 1976.

4. Erwinia rubrifaciens Wilson y col. 1967.

5. Erwinia quercina Hilderbrand y col. 1967.

Género XIII HAFNIA Moller, 1954.

1. Hafnia alvei Moller 1954.

Género XIV YERSINIA

Género XV OBSUMBACTERIUM Shimwell, 1963.

1. Obsumbacterium proteus Shimwell, 1937.

Género XVI XENORHABDUS Thomas y Poiner, 1979.

1. Xenorhabdus nematophilus Thomas y --

Poiner, 1965.

2. Xenorhabdus lumniescers Thomas y Pointer 1979.

Género XVII KLUYVERA Farmer y col. 1981b.

1. Kluyvera ascorbata Farmer y col. 1981b.

2. Kluyvera cryocrescens Farmer y col. 1981b.

Género XVIII RAHNELLA Izard, 1981.

1. Rahnella aquatilis Izard y col. 1981.

Género XIX CEDECEA Grimnot y col. 1981.

1. Cedecea davisa Grimnot y col. 1981.

2. Cedecea lapagei Grimnot y col. 1981.

Género XX TATUMELLA Hollis y col. 1982b.

1. Tatumella ptyseoa Hollis y col. 1982.

Dentro de la familia Enterobacteriaceae existen varios géneros como Escherichia coli, Salmonella spp. Shigella spp. relacionados con enfermedades en humanos. Algunos tienen importancia desde el punto de vista epidemiológico por considerarse altamente patógenos, por ejemplo algunos miembros de la especie Salmonella.

Desde 1957 (4) se hizo evidente en medios hospitalarios la asociación entre infeccioes y la presencia de cepas atípicas de Citrobacter freundii, no consideradas hasta entonces como asociadas a enfermedades por laboratios de bacteriología.

2) Desde 1928 se llamó Bacterium freundii a cepas capaces de utilizar citrato, de fermentar glucosa y lactosa y de producir ácidos sulfhídrico. Estas cepas se aislaron inicialmente por Braak en 1928 (citado por Bergey) (1) en canales acuáticos en Holanda. Posteriormente se aislaron también de heces y secreciones purulentas de hombres y animales.

Werkman y Gillen en 1932 (citado por Crosa 1974) propusieron el nombre de Citrobacter para éstas bacterias, y describieron las primeras 15 especies designándose a Citrobacter freundii como la especie tipo.

Edwards (1) cita a Tittsler y Sanpholzer y posteriormente Carpenter y Fulton quienes sugirieron que éste grupo de bacterias que no producían acetil-metil-carbinol, pero utilizaban citrato de sodio como única fuente de carbono, fueron clasificadas como Escherichia y fue así que apareció como Escherichi freundii, en lugar de Citrobacter freundii en las ediciones del Manual de Bergey de 1939, 1948 y 1957. Más tarde Kauffman y Moller (citado por Bergey) (1) nombraron a estas cepas Salmonella ballerup y Salmonella coli; al mismo tiempo Vaung y Levine (citado por Edwards) (3) basados en la falta de producción de ácido sulfhídrico, las denominaron Escherichia intermedium. Sobre la base de velocidad de fermentación de lactosa Borman designó a las fermentadoras rápidas, como Colobactrum freundii y a las lentas como Paracolobactrum intermedium. Otro nombre que recibió este género fue el de Salmonella hormachei por Monteverde y Leiguarda. En 1956 empleó el nombre de Citrobac-

ter pro primera vez que quedó establecido y aceptado internacionalmente.

En 1966 el género se dividió en Citrobacter freundii y Citrobacter intermedius basándose en si existía o nó producción de ácido sulfhídrico, indol y fermentación del malonato.

Macierevicz (citado por Bergey) (1) llamó a las no productoras de ácido sulfhídrico que descarboxilan ornitina como Padlewskia, correspondiendo a lo que actualmente se conoce como Citrobacter amalonaticus.

Farmer (4) cita a Fredericksen en 1970 y Ewing y Davis dos años más tarde, reportaron la especie Citrobacter koseri, que hoy se conoce como Citrobacter diversus.

Young en 1971 (citado por Farmer) (4) propuso un nuevo género denominada Levinea para aquellos microorganismos que habían sido incluídos previamente como Citrobacter. Las dos especies del género Levinea fueron: Levinea malonatica y Levinea amalonatica, diferenciándolas por su capacidad para fermentar malonato; sin embargo, ésta clasificación no fue aceptada ya que conforme a datos obtenidos de secuencias de ácido desoxirribonucléico se confirmó que L. malonatica correspondía a Citrobacter diversus y L. amalonatica correspondía a Citrobacter amalonaticus. Quedando finalmente en la Octava Edición del Manual de Bergey (1) tres especies de Citrobacter: Citrobacter freundii, Citrobacter diversus y Citrobacter amalonaticus. (Cuadro 1).

a) El nombre de Citrobacter se deriva del latín -- citrus que significa "limon" y bacter que significa bacilo o - bastón; literalmente fueron definidos como bacterias en forma- de bastón capaces de utilizar citrato. Las bacterias de esta- especie crecen tanto en medio selectivo como en no selectivo, tales como agar, sangre, endo, eosina azul de metileno (EMB), MacConkey (MC), Xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), Tergitol 7, salmonella-shigella (SS), Soya tripticasaina (TSA), verde brillante (VB) y sulfito de bismuto.

La temperatura óptima para su crecimiento es entre 30°- y 37°C. Después de 24 horas aparecen como colonias de 2 a 3 - mm. de diámetro que resisten la acción de inhibidores presentes en medios de enriquecimiento como tetrationato (Moller) y selenito (4).

La aparición de colonias de Citrobacter sobre placas de Endo y en todos los medios que contienen lactosa es semejante- a la de Escherichia coli. En medio especial de sulfito de bismuto pueden confundirse con Salmonella spp. o Arizona spp. (5).

Citrobacter freundii y Citrobacter diversus pueden aislarse con frecuencia en brotes esporádicos de intoxicación alimenticia, cistopielitis, e infecciones pulmonares en lactantes y niños menores de seis años de edad, o en aquellos individuos cuya respuesta inmune está disminuída por el uso de medicamentos inmunosupresores, o por shock traumático hemorrágico o endotóxico.

b) Clasificación del género Citrobacter.

En los reportes originales de Werkman y Gillen (citado por Farmer) (4) describieron las siguientes espeices, considerando a Citrobacter freundii como la especie tipo:

1. C. freundii
2. C. glycogenes
3. C. album
4. C. intermedium
5. C. decolorans
6. C. diversum
7. C. anindoculum

El género se subdivide en dos subgrupos sobre la base de la formación de ácido sulfhídrico (H_2S) en agar de triple-azúcar y hierro (TSI), producción de indol y fermentación de-malonato (Cuadros 2,3).

a) Subespecie C.freundii caracterizada por:
   1. Producción de ácido sulfhídrico, en agar de triple azúcar y hierro.
   2. Fermentación del malonato.
   3. Producción de indol.

b) Subespecie C. intermedium caracterizada por:
   1. Falta de la producción de ácido sulfhídrico en agar de TSI.
   2. Falta de la descarboxilación de lisina.

3. Producción de indol en 20% y fermentación de manitol en 40% de las cepas.

3) Para caracterizar y clasificar al género Citrobacter mediante el análisis de sus antígenos de superficie es necesario tomar en cuenta lo siguiente:

a) Antígenos semáticos "O" (del alemán Ohne Hauch): compuestos de 20-30% de lípidos, 60% de polisacáridos y 9.5% de hexosaminas. La composición de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetitivas en las cadenas laterales dan como resultado la especificidad de los diferentes tipos de antígenos somáticos.

West y Edwards (citado por Edwards) (3) describieron la presencia de 32 grupos de antígenos somáticos que correspondían a 167 tipos serológicos y 75 combinaciones con antígenos flagelares (H). Estos autores trabajaron con cepas de C. freundii de las cuales 68 fermentaban la lactosa en 24 horas, 7 a las 48 horas, y 2 a las 72 horas. En este estudio 17 cepas capaces de fermentar lactosa correspondieron a serotipos diferentes de los 167 tipos serológicos de Citrobacter fermentadores lentos de lactosa, por lo que no se encontró relación entre tipos serológicos y velocidad de fermentación de estas cepas (3).

Los antígenos somáticos de C.freundii están relacionados con los de otras especies de enterobacterias, como

Escherichia, Salmonella, Arizona y Providencia. Utilizando el sistema de West y Edwards (citado por Edwards) (3) se ha podido clasificar muchas cepas de Citrobacter freundii. Sedlack y Slajsova emplearon 35 antisueros para poder determinar el antígeno somático de 70% de 3,586 cultivos. Otros autores han podido demostrar un cruce antigénico entre antígeno de Citrobacter y los de otras enterobacterias. Mustakalio reportó la -- reacción de antígeno somático 29 de C.freundii con el 1, 3, 19 de Salmonella. Un análisis más completo de estas reacciones - se muestra en el Cuadro 3.

Sedlak y Slajsova (citado por Edwards) (3) reportaron la acción del antígeno 37 de C.freundii con el 48 de Salmonella; el 39 con el 3, 10; el 40 con el 57; el 41 con el 55 y el 42 con el 54. Bartes et al detectaron también la reacción recíproca de antígenos somáticos de C.freundii con antígenos somáticos de Salmonella 01, 6, 7, 9, 10 etc., algunas de estas reacciones se extienden a los antígenos 1, 2, 9, 20, 23, y 29 de Arizona. Cuadro 4.

Es importante señalar que los grupos somáticos - de C.freundii 5, 12, 29 poseen un antígeno relacionado con el antígeno Vi de Salmonella, por lo que las primeras aglutinan - con sueros polivalentes no absorvidos de Salmonella. Las reacciones antígenicas de C.freundii y Escherichia como lo descubrieron West y Edwards y Davis y Ewing (citado por Edwards)(3) se muestra en el Cuadro 5.

b) Los antígenos flagelares "H" (del alemán Hauch) son proteínas termolabiales que se encuentran como flagelos en -- las bacterias y están compuestos por una proteína llamada flagelina. El contenido de aminoácidos y el orden en que se encuentran en la flagelina determinan la especificidad de éstos antígenos.

Edwards cita a West (3) que en 1954 encontraron una relación parcial entre antígenos flagelares de C. freundii - del cultivo 4598, 53 con los antígenos Z_{36} de serotipos Welasco y Z_{36} de serotipo Mcallen, demostrando que ésta reacción - era recíproca, aunque los antígenos no eran idénticos.

A Bartes y et al quienes describieron un número decultivos de C. freundii que poseían antígenos flagelares relacionados con antígenos flagelares Z_{36} (antisueros, Z_{36} provenientes del serotipo Welasco) y antígenos flagelares Z_{27} y - Z_{46} de Salmonella, así como con antígenos flagelares 17, 20 y 29 del grupo Arizona.

A Gross y et al de 1972 a 1983 estudiaron un número considerable de cepas de C. diversus con respecto a sus relaciones bioquímicas, serológicas y su resistencia antimicrobiana.

Estas investigaciones resultaron en el establecimiento de un esquema antigenico para C. diversus con 17 grupos- de antígenos somáticos y flagelares.

Respecto a las cepas de C. amalonaticus no existen-

estudios que permitan tener un conocimiento sobre sus antígenos somáticos y flagelares, ni su relación con los de Salmonella, E. coli o Shigella.

Se han encontrado que cepas de Citrobacter son capaces de producir sustancias llamadas bacteriocinas que actúan destruyendo gérmenes de la misma o diferente especie. En el caso de Citrobacter a estas bacteriocinas se les ha denominado como Citrocinas (5). Su producción se ha utilizado también como método de tipificación. Sedlak en 1967 (citado por Sedlak en 1973) (5) examinó la bacteriogenicidad de 217 estractos de cepas de Citrobacter serológicamente definidas encontrando que el 5.5% de éstas poseían dicha propiedad.

En el caso de Citrobacter se conoce muy poco sobre fagos específicos, sin embargo, se ha encontrado que con raras excepciones, Citrobacter es resistente a fagos que infectan Salmonella, Shigella y Escherichia. Citrobacter y cepas monofásicas de Arizona son resistentes al fago 0_1 descrito por Felix y Collow en 1951 (citado por Sedlak) (5), mientras que cepas de Salmonella subgrupo I y II y cepas difásicas de Arizona sí son lisadas por estos virus. Goodman y Pickett (citados por Sedlak) (5) reportaron 8 bacteriofagos específicos de Citrobacter capaces de lisar al 31% de cepas del mismo género, estos fagos sin embargo, no lisaban cepas de los géneros Aerobacter, Arizona, E. coli, Providencia, Proteus y Serratia.

c) Algunas cepas de Citrobacter tienen la particularidad de ser resistentes a determinados antibióticos. Sedlack - (5), reportó en 1973 cepas de Citrobacter resistentes a sulfonamidas. Recientemente se reportaron cepas de Citrobacter intermedius resistentes a polimixina B, kanamicina, gentamicina, ácido nalidixico y nitrofuranos. Estas cepas fueron sensibles a cloranfenicol, tetraciclina y estreptomicina pero prácticamente todas resistentes a cefaloridina (5).

Bauer et al en 1966 (citado por Farmer) (4), señala resistencia a penicilina y susceptibilidad a colestín, sulfadiacina, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidixico, estreptomicina, kanamicina y gentamicina en otro grupo de cepas de Citrobacter.

Farmer (4) encontró que solo el 5% de cepas de Citrobacter aisladas esporádicamente eran resistentes a varios - antibióticos, mientras que cepas aisladas de epidemias frecuentes, eran resistentes a varios microbianos. Por este motivo,- se llegó a la conclusión de que la mayoría de las cepas resistentes de Citrobacter eran epidémicas y no endémicas.

4) Crosa y Farmer (citado por Farmer) 94) sugirieron- que debido al comportamiento bioquímico tan variable de Citrobacter se trataba de un género con cepas evolutivas intermedias "aberrantes" que procedían de nichos ecológicos particulares.

Desde 1966 a la fecha, se han aislado cepas de Citrobacter que poseen características "aberrantes", algunas son capaces de producir indol o son capaces de crecer en medio de citrato de Simmons, de utilizar glucosa o de fermentar inositol. Algunas otras son incapaces de utilizar mucato, cianuro de potasio, de producir ácido a partir de glicerol o de fermentar celobiosa. La mayoría sin embargo, desarboxilan lisina (5).

5) Debido a su aislamiento como flora única de heces provenientes de pacientes con diarrea, Stuart et al (citado por Hodges, 1978) (6) consideraron a Citrobacter como posible agente patogéno en humanos. Barnes y Cherry y posteriormente West y Edwards (citados por Farmer) (4) aislaron Citrobacter freundii durante varios brotes, aunque no lo consideraron como agente etiológico por encontrarlo con frecuencia similar en heces de individuos sanos y enfermos; quedando como única evidencia de la patogenicidad de estas cepas datos epidemiológicos sobre fuentes de aislamiento y frecuencia dudosa de asociación con enfermedad (4).

Su papel como causante de intoxicaciones alimenticias se describió por primera vez por Sedlack y Rische (citado por Farmer)(4) cuando aislaron a Citrobacter como germen en pacientes convalecientes de esta enfermedad, además de haber encontrado aglutininas específicas en el suero de pacientes enfermos contra antígenos de estos gérmenes. Se han podido ais-

lar también cepas de Citrobacter como parte de la flora encontrada en procesos respiratorios o en heridas (4).

Guerrant y Wadstron en 1976 (citato por Farmer)-(4), reportaron que Citrobacter freundii y Citrobacter diversus podían estar asociados a proceso diarréicos basándose en cambios citopatológicos obtenidos con filtrados de cultivos libre de bacterias aisladas de pacientes con diarrea. Las células empleadas para demostrar estos cambios fueron las usadas en investigaciones sobre producción de enterotoxinas en cepas de E. coli (4). Estos estudios no fueron ratificados por otros autores. Posteriormente Majtan et al (7) cultivaron Citrobacter en un medio que llamaron completo (infusión de cerebro corazón) y en medio mínimo añadido de asparagina y acetato de sodio, encontrando que los filtrados libres de bacterias crecidas en estos medios tenían, además de endotoxinas, componentes que variaban, según el origen, en su efecto citotóxico sobre células Vero. Aunque Swedereski (citado por Majtan) (7) en 1976, reportó la presencia de enterotoxinas en cepas de Citrobacter no se han descrito la presencia de factores de colonización similares a los descritos para E. coli (4). Farmer (4) consideró como posibilidad la adquisición de ciertos plasmidos de otras enterobacterias patógenas que pudieron proporcionar habilidad patógena a Citrobacter.

Citrobacter solo o con otros microorganismos puede considerarse también como patógenos en el tracto respiratorio, en heridas, en secresiones, en infecciones de vías urina -

rias y, rara vez, en meningitis. Es agente importante en infecciones hospitalarias, al igual que otros microorganismos de la flora normal que pueden ser fuente endógena de procesos infecciosos.

Todo lo anterior mencionado permite plantear que algunas cepas de Citrobacter pueden jugar un papel en la producción de diarrea en niños. En un estudio longitudinal diseñado para determinar los posibles agentes etiológicos asociados a diarrea, en una población rural cercana a la ciudad de México, se aislaron una serie de cepas con características de Citrobacter aberrante semejante a los mencionados por Sedlack (5). El presente trabajo constituye parte del estudio de estas cepas y su posible relación con procesos diarréicos.

II. OBJETIVO.

Conocer si las cepas aberrantes de Citrobacter aisladas de heces están asociadas con procesos diarreicos agudos en niños.

III. MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron como material de estudio cepas obtenidas de coprocultivos provenientes de niños de 0 a 3 años de edad originarios de una población rural del Estado de Morelos. Las cepas fueron determinadas inicialmente como Citrobacter freundii conforme a pruebas bioquímicas (3).

Equipo Utilizado:

- Microscopio estereoscopico Carl Zeiss.
- Centrífuga clínica.
- Congelador de -20°C.
- Autoclave.
- Incubadora a 37°C.
- Incubadora a 42°C.
- Baño de agua a 37°C.
- Material de vidrio diversos.
- Incubadora de agitación.

Medios de Cultivo:

- Placas de agar de McConkey (MC).
- Placas de agar Salmonella-Shigella (SS).
- Placas de agar de soya tripticasa (TSA).
- Caldo de tetrationato.
- Caldo de Rapapport.
- Caldo de peptona.
- Medio hecho a base de huevo (Dorset).

METODO.

Las cepas se conservaron desde su aislamiento en medio de huevo de Dorset, a partir del cual se sembraron en - TSA para su manejo. Todas las incubaciones se hicieron a 37°C durante 18 horas, excepto cuando se uso medio de Rapapport, el cual se incubó a 42°C por 18 horas.

De los tubos de TSA se sembraron placas de agar-

McConkey y Salmonella-Shigella (SS). Después de incubados, se transfirieron colonias únicas a tubos de TSA, a agar Kligler y agua peptonada; se tomaron 50 µl de estos cultivos y se inocularon caldos de enriquecimiento con tetrationato, añadiendo a este último solución de yodo al 10%. Una vez crecidas las bacterias se transfirieron sucesivamente a placas de agar McConkey y Salmonella-Shigella (SS), para volver a tomarse colonias únicas y continuar el mismo proceso. A las bacterias aisladas en cada paso se les realizaron pruebas bioquímicas y serológicas.

Pruebas bioquímicas: las cepas se incubaron en agua peptonada. A partir de este caldo se tomaron 50 µl. y se incubaron a tiempos de lectura para cada prueba. Los medios utilizados fueron Sim, ureasa, acetil-metil-carbinol (Voges Proskawer), rojo de metilo, descarboxilación de lisina y ornitina, malonato de sodio y gluconato de potasio, así como medio de fenilalanina.

Considerando las características establecidas por Edwards y Ewing (3) se seleccionaron bacterias con características generales de Citrobacter para realizar pruebas más específicas. Estas pruebas fueron: citrato de Simmons, oxidasa, betagalactosidasa (ONPG), tartrato de Jourdan, cianuro de potasio (KCN), así como fermentación de dulcitol, glucosa, inositol, lactosa, manitol, manosa, sacarosa, salicina, sorbitol, rafinosa. Cuadros 6, 7, 8 y 9.

Pruebas serológicas: las cepas se sembraron en

TSA y se incubaron a 37°C por 18 horas, de este crecimiento se tomó una asada, colocando la muestra sobre un portaobjeto en - aproximadamente 100 µl. de solución salina al 0.9% en la primera suspensión se observó si existía autoaglutinación, en la segunda se adicionó antisuero omnivalente de Salmonella, en la - tercera se depositó una gota del antisuero 3,19 de Salmonella senftenberg y en la cuarta gota se puso antisuero 6,7 de Salmonella infantis. Para su confirmación dependiendo de la aglutinación observada se procedió a hacer aglutinación en tubo con- el antisuero que hubiera dado reacción en placa.

Para la obtención de antígenos flagelares se sembraron las cepas sucesivamente en medio semisólido de Craig -- (3). Una vez que hubo desarrollo de flagelo, se sembraron - las cepas en caldo de soya tripticaseína y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. A éstos últimos cultivos se les adicionaron volúmenes iguales de solución salina formulada al 0.6% y - se dejaron a temperatura ambiente durante dos horas. A 0.5 ml. de esta suspensión se le adicionaron 0.5 ml. de cada uno de -- los antisueros flagelares de Salmonella de acuerdo con la serotipificación somática encontrada. La suspensión se colocó en- baño serológico a 48-50°C y se leyó una hora después de incubarse.

IV. RESULTADOS.

Sobre la base de características bioquímicas y -

serológicas, se detectó la presencia de cepas de Citrobacter - freundii que presentaban características bioquímicas aberran - tes. Al someter a estas cepas a enriquecimientos sucesivos en medios de Rapapport y tetrationato se observaron cambios en - sus relaciones bioquímicas, las cuales progresivamente fueron- demostrando que en realidad las cepas detectadas originalmente como Citrobacter freundii aberrante eran cepas de Salmonella.

Las características bioquímicas específicas que- se tomaron en cuenta, verificadas por reacciones serológicas,- demostraron que estas cepas aberrantes de Citrobacter consti - tuían en realidad cepas de Salmonella que se encontraban "en - mascaradas" en el aislamiento inicial (Cuadro 10).

De un total de 140 cepas aisladas inicialmente - como Citrobacter freundii aberrante se tomaron 5 cepas al azar para estudios de enriquecimiento subsecuente (Cuadro 10).

En la cepa 11 270 se observó que de un total de- 31 cepas estudiadas obtenidas de diferentes experimentos de en riquecimiento, se obtuvieron 4 cepas de Salmonella infantis y- 8 de Salmonella senftenberg.

En la cepa 7 449, de un total de 29 cepas, en -- los experimentos I, II, IV, y V se encontraron 16 cepas de Sal monella infantis y 4 de Salmonella senftenberg.

De la cepa 2 966 se lograron obtener únicamente- en el pase II, 6 cepas de Salmonella infantis de un total de -

25 cepas escogidas para estudio.

De la cepa 8 635 en los experimentos II y III se obtuvieron 3 cepas de Salmonella infantis de un total de 19 -- cepas estudiadas.

Por último, de la cepa 11 264 se obtuvieron 5 -- cepas Salmonella infantis en los experimentos III y V de un total de 24 cepas estudiadas.

TOmando en cuenta todos los estudios, del experimento II fue donde se obtuvieron la mayor cantidad de cepas de Salmonella. En forma decreciente se obtuvieron un mayor número de cepas de Salmonella infantis o de Salmonella senftenberg de los experimentos de enriquecimiento III, VI, IV y V (Cuadro 10). Considerando el total de los experimentos realizados se lograron "desenmascarar" un total de 34 cepas de Salmonella a partir de 140 cepas aberrantes de Citrobacter freundii. De éstas 34 fueron clasificadas serológicamente como Salmonella - infantis y el resto como Salmonella senftenberg (Cuadro 10).

V. DISCUSION.

Para incriminar un germen como agente etiológico de un proceso infeccioso se requiere demostrar, además de su - aislamiento, una respuesta inmune local o sistémica en el huesped a la bacteria o sus productos. La dificultad que existe - de realizar estos ensayos serológicos durante estudios epide -

miológicos de tipo longitudinal obliga a que la identificación microbiológica de los gérmenes aislados durante el proceso infeccioso agudo sea de la mayor precisión posible.

Desafortunadamente, por las reacciones genéticas en los géneros de la familia Enterobacteriaceae, existen zonas de traslape en cuanto a características bioquímicas y serológicas entre géneros cercanos, como por ejemplo Escherichia-Shigella o Citrobacter-Salmonella. Dilucidar entre estos géneros requiere en ocasiones de estudios de hibridización de ácido desoxirribonucleico para ver la homología entre secuencias desconocidas y aquellas exclusivas para cada especie previamente establecidas (3, 4).

Dada la importancia clínica y epidemiológica que puede tener el aislamiento de bacterias fenotípicas aberrantes por la adquisición de material genético en plasmidos que confiera al germen características bioquímicas poco usuales, así como una mayor capacidad de virulencia, el estudio de bacterias con características aberrantes constituye un punto importante dentro de cualquier investigación en el campo de las enfermedades infecciosas.

Existen ejemplos de que la adquisición de resistencia a antimicrobianos o de la habilidad para adherir a células de la mucosa intestinal (9, 10) pueden acompañarse de modificaciones fenotípicas a nivel bioquímico. Estas modificaciones constituyen un marcaje que facilita la identificación de

estos gérmenes durante el transcurso de brotes o durante estudios longitudinales de prevalencia.

Las bacterias, sin embargo, no cambian para beneficio de los microbiologos o en perjuicio de sus huespedes. - Los cambios que presentan deben representar una ventaja para - si mismas durante el proceso de colonización temporal o definitiva de nichos ecológicos, como es el caso de las enterobacterias a nivel intestinal.

Siguiendo estas líneas de pensamiento la primera ventaja que podría tener una enterobacteria al "enmascararse"- fenotípicamente pudiera ser la evasión de sus propios predadores. Se conoce un número importante de bacteriofagos específicos capaces de reproducirse y lisar enterobacterias especifi - cas. En el presente trabajo se encuentran en proceso estudios de fagos aislados de las bacterias utilizadas para ver si puede sustentarse el punto antes mencionado.

Una segunda ventaja de los cambios fenotípicos - encontrados pudiera ser el tener características aparentes más similares a las de la flora autóctona de ciertos nichos del intestino para competir con mejor ventaja por substrato y espa - cio con estas últimas. Resultados preliminares parecen indi - car que este tipo de bacterias aberrantes se encuentran con -- mayor frecuencia en niños que en adultos, lo cual hace pensar- que la dieta a esta edad puede ser un factor importante en la- selección de este tipo de flora autóctona a nivel intestinal.-

En el caso específico de las bacterias utilizadas en la presente investigación, la adquisición de habilidad para utilizar -- lactosa como fuente de carbono puede representar una ventaja - importante de competencia con el resto de la flora aerobica -- por un substrato abundante presente en el intestino de niños - pequeños alimentados con leche.

El estudio presentado abre otro campo importante que es el de la evasión inmunológica a nivel bacteriano. Se - sabe que algunos protozoarios y helmintos son capaces de evadir la respuesta inmune del huésped a través de enmascarar antígenos de su superficie que al ocasionar una respuesta inmune ocasionaría su desalojo del intestino (11). En el caso de bacterias el estudio de estos procesos está aún lejos de esclarecerse. Se conoce que Neisseria gonorrhoea es capaz de utilizar información genética diferente para la producción de diversos tipos de fimbriae que les permiten adherirse a epitelios - uretrales o vaginales cuando ya existe respuesta inmune local- contra alguno de ellos (12).

La colonización temprana por bacterias patógenas a nivel intestinal permite un conocimiento inmunológico a través de los primeros años de la vida de antígenos externos de - gérmenes con habilidad patógena. El enmascaramiento de antígenos somáticos y flagelares de cepas de Salmonella pudieran ser de gran beneficio para la bacteria durante su tránsito por el- intestino para sobrevivir más tiempo prolongado dentro de un -

huésped que le está proporcionando habitat y alimento.

FInalmente, los cambios fenotípicos encontrados-en los gérmenes estudiados no permiten pensar que se trate de-pequeñas mutaciones o de información genética nueva adquirida a través de plásmidos transferidos de otras enterobacterias.

Los loci involucrados se encuentran sumamente -- alejados dentro del mapa genético realizado para Salmonella - typhimurium (13). El esclarecimiento de este punto se está -- realizando a través de delimitar si los cambios fenotípicos estudiados están relacionados con procesos de mutación, de ampliación o de reversión genética que expliquen los hallazgos - encontrados. A este respecto se encuentran en marcha estudios a nivel genético para dilucidar los mecanismos utilizados por-estas bacterias que expliquen el proceso encontrado, así como-estudios de reversión del mismo proceso que permita demostrar-su reproducción en vivo. Los resultados de estos estudios complementarios permitirán un avance en el conocimiento de la relación huésped-parásito y su asociación con procesos de salud y enfermedad.

Cuadro 1

	Sinónimos de *Citrobacter freundii*
1932	*C. anindolicum* *C. album* *C. decolorans* *C. diversum*
1942	*E. freundii*
1944	*Paracolobactrum intermedium*
1948	*Grupo Bethesda*
1949	*Grupo Ballerup e intermedius szu*
1957	*Grupo Citrobacter*
1962	*Grupo Bethesda-Ballerup*
	Sinónimos de *Citrobacter intermedius*
1942	*C. intermedium*
1941	*Salmonella coli*
1944	*Escherichia intermedia*
1970	*Citrobacter koseri*
1971	*Levinea malonatica*
1972	*Citrobacter diversus*
	Sinónimos de *Citrobacter amalonaticus*
1974	*Citrobacter intermedius* *Levinea amalonaticus* *Padlewskia*

Cuadro 2

Características principales de las tres especies de *Citrobacter internationalmente*

	C. freundii			C. Intermedius			C. amalonaticus	
	Sig.	%	%(+)	Sig.	%	%(+)	Sig.	%
H_2S	+	93.1	(2.4)	-	52.2	(2.7)	-	0
Indol	-	2.1		+	100		+	100
KCN	+	97		-	0		+	98.2
Malonato	-	0		+	94.3		-	0
Ornitina decarboxilasa	d	15.4	(0.2)	+	99.6		+	98.2
Dulcitol	d	70.6	(0.4)	+	52.2		-	3.6
Adonitol	-	0		+	98.3		-	0
Rafinosa	d	17.2	(0.6)	-	0		-	7.3
Celobiosa	d	8.5	(3.7)	+	93.6	(2.7)	+	96.3
Glycerol gas	±	85.5		+	97.3		±	20.4
Alfa-metil glucocide	+	4.6	(9.6)	±	35.3	(57.4)	-	0

Davis y Ewing (1966), Ewing (1971) Ewing y Davis (1972)

Cuadro 3

Características bioquímicas del género Citrobacter

	C. freundii			C. diversus			C. amalonaticus		
	Sig.	%	(%+)[b]	Sig.	%+	(%+)[b]	Sig.	%+	(%+)[b]
H_2T en TS	+	93.1	(2.7)	-	0		-	0	
Urcasa	d	78.5	(8.2)	±	85.8	(6.2)	+ó(**)	89	(5.5)
Indol	-	2.1		+	100		+	100	
Rojo de Met.	+	99.3		+	100		+	100	
Voges-Proskawer	-	0		-	0		-	0	
Cit. Simmons	d	88.1	(5.1)	+	98.7	(0.4)	+	94.6	(1.8)
KCN	+	97		-	0		+	98.2	
Movilidad	+	95.3		+	91.1		+	100	
Gelatina	-	0	(2.1)	-	0	(1)	±	0	(13.5)
Lysina-decarboxylasa	-	0		-	0		-	0	
Arginina dehidrolasa	d	46.8	(41.6)	+ó+	62.4	(35)	±	76.4	(20)
Ornitina de carboxylasa	d	15.4	(0.2)	+	99.6		+	98.2	
Phenilalanina	-	0		-	0		-	0	
Glucosa ac.	+	100		+	100		+	100	
Gas	±	89.7		+	97.8		+	96.4	
Lactosa	d	37.3	(53.4)	d	40.3	(47.9)	d	69.1	(12.7)
Sacarosa	d	16.8	(1.6)	∓	20.8		-	5.5	
Manitol	+	100		+	100		+	100	
Dulcitol	d	70.6	(0.4)	±	52.2		-	36	
Salicina	d	3	(20.8)	+ó+	17.3	(77.9)	d	41.8	(47.3)
Adonitol	-	0		+	100		-	0	

Cuadro 3a

Características bioquímicas del género Citrobacter

	C. freundii			C. diversus			C. amalonaticus		
	Sig.	%+	(%+)[b]	Sig.	%+	(%+)[b]	Sig.	%+	(%+)[b]
Inositol	-	1.2	(2.3)	-	100		-	0	
Sorbitol	+	97.2	(1.2)	+	98.2	(0.9)	+	100	
Arabinosa	+	100		+	100		+	100	
Rafinosa	d	17.2	(0.6)	-	0		-	7.3	
Ramnosa	+	99.5		+	99.6		+	100	
Malonato	d	21.8		+	94.3		-	0	
Mucato	+	95.6	(1.4)	+	94.9		+	100	
Citrato de Christensen	+	99.1	(0.9)	+	99		+	100	
Tart. Joudan	+	90	(10)	±	71.1		±	59.3	
Pectato	-	0		-	0		-	0	
Acetato de Sodio	+ó+	76.9	(13.9)	+ó+	78.2	(16)	+ó+	77.1	(20.8)
Arginato de Sodio	-	0		-	0		-	0	
Lipasa	-	0		-	0		-	0	
Maltosa	+	98.6	(0.1)	+	100		+	100	
Xilosa	+	100		+	100		+	100	
Trehalosa	+	100		+	100		+	100	
Celobiosa	±	60.4	(38.4)	+	97.9	(0.5)	+	100	
Gas	d	8.5	(3.7)	+	93.6	(2.7)	+	96.3	
Glycerol ácido	+	99	(0.5)	+	99.5		±	70.4	
gas	±	85.5		+	97.3		∓	20.4	

Edwars, R.P. and Ewina, H.W. 1986: Identification of Enterobacteriaceae, 3a. Ed. Bugess, Publishing Co. Minessota USA.

Cuadro 4

Relaciones de los antígenos O de Salmonella y Arizona con antisueros de Citrobacter freundii

Antígenos O Salmonella	Antígenos O Arizona	3a,3b,1c	9a,9b	11	12a,12b	12a,12c	19	20	21a,21b	22	23
						Antígenos O (Citrobacter)					
1,2,12		-	-	++	-	-	-	-	++	-	-
4,5,12		-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-
1,4,27,12		-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-
6,27	27	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6,8		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
9,12		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3,10		++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,14,24	32	-	-	++	-	-	-	-	++++	-	-
(1),6,14,25		-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-
17	12	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-
18	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
21	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28		-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
30		-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-
40	10	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-
41	13	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	1,3	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

West and Edwards (1954)

Cuadro 5

Relación de los antígenos somáticos O de
C. freundii y *Escherichia coli*

Citrobacter freundii	*Escherichia coli*
1a, 1b, 1c	9
7, 3b, 1c	99
8a, 8b	93
9a, 9b	7
10a, 9b	71
12a, 12c	38
15	57, 65
17	101
18	1, 15, 100
21	73
28, 1c	9, 44, 73
29	53, 62, 78
31	52

West and Edwards (1954) and Davis and Ewing (1963)

Cuadro 6

RELACIONES BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS DE CITROBACTER ESTUDIADAS

EXPERIMENTO	EXPERIMENTO I			EXPERIMENTO II												
NO. DE COPRO	7449			7449												
CEPA	CF10	CF11	CF12	$CF10_2$	$CF10_{2a}$	CF11	$CF11_{2a}$	$CF12_{2a}$	$CF12_{2b}$	$CF13_{2a}$	$CF14_2$	$CF14_{2a}$	$CF14_{2b}$	$CF15_2$	$CF15_{2a}$
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lac. Kligler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lac. Andrade	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H_2S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Poskaver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cit. Simmons	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN base	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dnasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tart. Jourdan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aglutinación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serotipo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 7

RELACIONES BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS DE CITROBACTER ESTUDIADAS

EXPERIMENTO	EXPERIMENTO II								EXPERIMENTO III					
NO. DE COPRO	7449	2966						8635	11270				8635	
CEPA	$CF15_{2b}$	$CF16_2$	$CF16_{2a}$	$CF18_2$	$CF18_{2b}$	$CF20_2$	$CF20_{2a}$	$CF21_2$	CF4	CF4a	CF5	CF5a	$CF21_3$	$CF21_{3a}$
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lac. Andrade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lac. Kligler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Postkawer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cit. Simmons	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mucato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+ ?	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+-	-	-	-	-	-		+-	-	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN base	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dnasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tart. Jourdan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aglutinación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cuadro 8

RELACIONES BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS DE CITROBACTER ESTUDIADAS

EXPERIMENTO	EXPERIMENTO III			EXPERIMENTO IV				EXPERIMENTO V		EXPERIMENTO VI				
NO. DE COPRO	11264			7449		11270		11264		7449				
CEPA	$CF30_3$	$CF30_{3a}$	$CF36_3$	$CF11_4$	$CF12_4$	CF7-4	CF8-4	$CF30_{5b}$	$CF36_{5a}$	$CF12_{6a}$	$CF12_{6b}$	CF_{6a}	CF_{6b}	CF_{6c}
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lac. Kligler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lac. Andrade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Postkawer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cit. Simmons	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+-	+	+	+	+
Mucato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+-	-	+	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN base	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dnasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tart. Jourdan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aglutinación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serotipo														

Cuadro 9

Relaciones Bioquímicas de las Cepas de
Citrobacter Estudiadas

Experimento No. de Copro Cepa	EXPERIMENTO VI 11270 $CF8_a$	$CF8_b$	$CF8_c$
Glucosa	+	+	+
Lac. Kligler	-	-	-
Lac. Andrade	-	-	-
H_2S	+	+	+
Indol	-	-	-
Movilidad	+	+	+
Rojo de Metilo	+	+	+
Voges Postkawer	-	-	-
Malonato	-	-	-
Fenilalanina	-	-	-
Urea	-	-	-
Gluconato	-	-	-
Lisina	+	+	+
Ornitina	+	+	+
Arginina	+	+	+
Cit. Simmons	+	+	+
Mucato	+	+	+
ONPG	-	-	-
Manitol	+	+	+
Sacarosa	-	-	-
Dulcitol	+	+	+
Inositol	-	-	-
Sorbitol	+	+	+
Manosa	+	+	+
Rafinosa	-	-	-
Salicina	-	-	-
Gelatina	-	-	-
Oxidasa	-	-	-
KCN	-	-	-
KCN base	+	+	+
Dnasa	-	-	-
Tart. de Jourdan	+	+	+
Aglutinación	+	+	+

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 10

Obtención de Cepas de Salmonella a Partir de Cepas Aisladas Inicialmente como Citrobacter freundii

	Cepas de Citrobacter Estudiadas	Cepas de Salmonella Obtenidas
Citrobacter 11270		
Experimento I	8	0
Experimento II	7	0
Experimento III	4	4x
Experimento IV	6	2*
Experimento V	0	0
Experimento VI	6	6*
Citrobacter 7449		
Experimento I	6	3x
Experimento II	15	13x
Experimento III	0	0
Experimento IV	6	2*
Experimento V	0	0
Experimento VI	2	2*
Citrobacter 2966		
Experimento I	5	0
Experimento II	11	6x
Experimento III	0	0
Experimento IV	5	0
Experimento V	0	0
Experimento VI	0	0

Salmonella infantis (S. infantis)x
Salmonella senftenberg (S. senftenberg)*

Cuadro 10a

Obtención de Cepas de Salmonella a Partir de Cepas Aisladas Inicialmente como Citrobacter freundii

	Cepas de Citrobacter Estudiadas	Cepas de Salmonella Obtenidas
Citrobacter 8635		
Experimento I	5	0
Experimento II	7	1x
Experimento III	4	2x
Experimento IV	3	0
Experimento V	0	0
Experimento VI	0	0
Citrobacter 11264		
Experimento I	12	0
Experimento II	6	0
Experimento III	3	3x
Experimento IV	1	0
Experimento V	2	2x
Experimento VI	0	0

Salmonella infantis (S. infantis)x
Salmonella senftenberg (S. senftenberg)*

V. REFERENCIAS.

1. Bergey S.: Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 William and Wilkin Co., Baltimore, 1984, pp. 405 516.

2. Crosa, J.H., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Brener D.J.: Polynucleotide sequence divergence in the genus Citrobacter. J. Gen. Microbiol. 83: 271-282, 1974.

3. Edwards, R.P., Ewing, H.W.: Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis. 1986.

4. Farmer, J.J.: The genus Citrobacter. En: Starr, N.P. Stolp, H. Truper, H.G. (eds.) The Prokaryotes, Vol. 2. Springer Verlag, New York, 1981, --- pp. 1141-5.

5. Sedlak, J.: Present knowledge and aspect of Citrobacter. Curr Top. Microbiol. Immunol., 62: 41-59, 1973.

6. Hodges, R.G., Degener, E.C., Barnes G.W.: Clinical Significance of Citrobacter isolates. Am. J. Clin. Pathol., 70: 3740, 1978.

7. Majtán, V., Hostacka, A., Bartkova, G., Markovic, J., Karolcek, J.: Toxic exoproducts of Citrobacter freundii. J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol., 29: 427-34, 1985.

8. Samonis, G. Hsi, H.D., Gooch, G.F., Rolston, K.V., - Bodey, G.P.: In vitro susceptibility of Citrobac ter species to various antimicrobial agents. Antimicrob. Chemother., 31: 829-30, 1987.

9. Willshaw, G.A., Smith, H.R., Anderson, E.S.: Molecu lar studies of Fime resistance plasmids particu larly in epidemic Salmonella typhimurium. Molec. Gen. Genet., 159: 111-116, 1978.

10. Shipley, P.L., Gyles, C.L., Falkow, S.: Characteri zation of plasmids that encode for the K88 -- colonization antige. Infect. Immun. 20: 559-66, 1978.

11. Bloom, B.R.: Games paratites play: Low parasites evade immune surveillance. Nature, 279: 21-6, 1979.

12. Segal, E., Hagblom, P., Seifurt, H.S., So, M.: Antigenic variation of gonococcal pilus invoves assembly of separated gene segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 2177-81, 1986.

13. Sanderson, K.E., Roth, J.R.: Linkage map of *Salmonella typhimurium*, Edition VI. Microbiol. Rev. **47**: 410;53, 1983.