



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

44

MEDIOS SELECTIVOS DE ENTEROBACTERIACEAS
PARA DETERMINAR SALMONELLA Y SHIGELLA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA DE LOS ANGELES FELIX VALENZUELA

MEXICO. D. F.

1973



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.

Tesis
AÑO 1973
FECHA
PROC. Hit. 98



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE SARA MANRIQUE REGIL

VOCAL MAGDALENA ACOSTA SEGURA

SECRETARIO OSCAR AMOR DODERO

1er SUPLENTE ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA

2o SUPLENTE SOCORRO CAO ROMERO

Sitio donde se desarrolló el tema:

HOSPITAL DEL NIÑO IMAN

Nombre de la sustentante:

MARIA DE LOS ANGELES FELIX VALENZUELA

Nombre de la asesora del tema:

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA

A mis queridos
Padres

A mis hermanos

A mi esposo
Por el cariño, comprensión
y ayuda que siempre me ha
dado

A la Dra. Virginia Vázquez con
sincero agradecimiento por su
valiosa ayuda en la realización
de este trabajo.

Con agradecimiento a la Q.F.B.
Magdalena Acosta Segura por su
apoyo desinteresado en el desa-
rrollo de este trabajo.

Agradezco al Hospital del Niño
de la Institución Mexicana de
Asistencia a la Niñez por las
facilidades que me brindó a --
través del Laboratorio de Bac-
teriología, para hacer posible
la realización de este trabajo.

I N D I C E

I N T R O D U C C I O N	I
C A P I T U L O I Generalidades	3
C A P I T U L O II Material y Método	8
C A P I T U L O III Resultados	19
C A P I T U L O IV Discusión	53
R E S U M E N	58
B I B L I O G R A F I A	61

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

En México, la gastroenteritis sigue siendo un problema, puesto que ocupa desde 1930 el primer lugar en las causas de mortalidad en el Distrito Federal, no obstante la aplicación de medidas efectivas de Salud Pública, que han logrado una disminución de siete veces en la mortalidad durante los últimos 10 años (1960-1970). (1, 13)

Como la población infantil es la más frecuentemente afectada, los datos proporcionados por la Secretaría de Industria y Comercio nos permiten observar tasas de mortalidad por cada 100 000 nacidos vivos registrados debida a enteritis y otras enfermedades diarreicas de 2261.72 para los menores de 1 año y de 191.66 para los niños comprendidos entre 1 y 4 años (1963 - 1971). (14)

Ya que esta enfermedad afecta un volumen elevado de población infantil, es importante conocer su etiología bacteriana, para ello es necesario obtener, mediante aislamiento, las diferentes cepas enteropatógenas en medios de cultivo e identificarlas bioquímica y serológicamente.

En la literatura se señalan como medios de cultivo útiles en el aislamiento de enteropatógenos varios de ellos, siendo considerado el mejor o los mejores según la publicación que se escoja (4). Tratando de establecer un número de medios de cultivo que permitan un mayor porcentaje de aislamientos de Salmonella typhosa, Salmonella sp., Shigella sp. y E. coli enteropatógeno se elaboró el presente trabajo que pretende dilucidar cuales serían los medios indispensables para detectar su presencia en muestras fecales.

CAPITULO I
GENERALIDADES

GENERALIDADES

Desde el descubrimiento de Koch sobre el empleo de agar para obtener medios de cultivo sólidos que permitieran el aislamiento de los diferentes tipos de bacterias presentes, se abrió un nuevo campo en el conocimiento de las propiedades bioquímicas de las bacterias, así también como en el campo de la investigación. Por lo que toca al tema que consideraremos o sea el relativo a la obtención de enteropatógenos mediante medios selectivos o de enriquecimiento, se mencionaran cronológicamente los medios utilizados de acuerdo con su aparición en la literatura (2).

Medios Sólidos.

Fué en 1886, cuando se inició el empleo de un medio conteniendo lactosa, agar y como indicador tornasol, que permitió la diferenciación de bacterias fermentadoras de lactosa de aquellas que no lo hacen (4).

El medio de Conradi - Drigalski fué ampliamente usado desde 1902, contiene púrpura de bromocresol y violeta cristal, que actúan como indicador el primero y el segundo como inhibidor de las bacterias Gram positivas, actualmente aún se utiliza en algunos laboratorios (3).

Basándose también en la capacidad de fermentación de un azúcar por las bacterias, en 1903 se señaló como un nuevo medio el de ENDO, - que contiene como indicador al sulfito de fucsina, sólo que éste presentaba el inconveniente de que las bacterias fermentadoras de lactosa producían un wire que se difundía ampliamente e impedía distinguir a las que no lo hacían (9). Dos años más tarde, se adicionó al medio, además de lo mencionado, sustancias que inhiben parcialmente el crecimiento de la flora normal intestinal. La adición de sales biliares, lactosa y rojo neutro dió origen al medio de Mac Conkey (12) modificado aún más por la adición de violeta cristal, cloruro de sodio y menor cantidad de agar en 1908 y es como actualmente se usa (3).

En 1915 se añadió otro azúcar: la sacarosa y se cambiaron los indicadores utilizados hasta entonces o sea, se emplean juntos la eosina y el azul de metileno que diferencian muy bien las bacterias —

fermentadoras de azúcares de aquellas que no lo hacen, sólo que - de este modo no se seleccionan las enteropatógenas (9).

A partir de entonces empieza la creación de nuevos medios suficientemente selectivos que inhibieran el crecimiento de la flora normal; Wilson en 1923 y posteriormente Wilson y Blair en 1926, idearon un medio útil para el aislamiento de Salmonella typhosa que lleva sulfito de bismuto como indicador y además verde brillante; el único azúcar presente es la glucosa, sus componentes no permiten el desarrollo de bacterias Gram positivas y miembros del grupo coliforme. (3)

Kristensen, Lester y Jurgens en 1925 empleando los dos azúcares ya mencionados, lactosa y sacarosa, el indicador rojo de fenol y además verde brillante, descubren la utilidad del medio verde brillante, para el aislamiento de Salmonella modificándose en 1935 su fórmula por Kauffman que eliminó la sacarosa (3).

Leifson en 1935, describe otro medio selectivo: el citrato-desoxicolato-agar; añadiendo a las sales biliares usadas anteriormente, citratos de sodio y férrico amoniacal y como indicador el rojo neutro, que no inhibe el desarrollo de Salmonella y Shigella sino únicamente de los Gram positivos (4).

Otro medio selectivo que aparece en 1942 es el de Salmonella-Shigella-agar, que contiene además de los ingredientes del agar desoxicolato-citrato, tiosulfato de sodio, verde brillante y rojo neutro como indicador. Según diferentes autores se inhibe el crecimiento de los coliformes, no así de Salmonella y Shigella, lo que permite el empleo de un inóculo bastante grande que favorece el desarrollo de éstos gérmenes (4).

Después del descubrimiento del papel patógeno de algunas cepas de E. coli como agentes etiológicos en diarreas se empieza a utilizar en 1947 un medio que favorece su crecimiento; este medio contiene además de lactosa, tergitol 7 y azul de bromotimol (3).

Muy posteriormente, en 1965, Taylor aplicó nuevos conocimientos de las propiedades bioquímicas de los enteropatógenos para disminuir los errores al seleccionar colonias lactosa negativas. Para ello - utiliza otro azúcar; la xilosa, además de lactosa y sacarosa; un aminoácido: la lisina; citrato férrico amoniacal, tiosulfato, de - soxicolato y como indicador rojo de fenol, este medio parece ser

especialmente útil para el aislamiento de *Shigella* (15). Y, finalmente, el medio de Hektoen descrito en 1968 por King y Metzger muy semejante por la presencia de sustancias que permiten la inhibición del crecimiento de la flora normal al XLD pero semejante a los tradicionales en sus principios de diferenciación, en lugar de xilosa contiene salicina y el indicador está constituido -- por azul de bromotimol e indicador de Andrade en lugar de rojo de fenol (4).

Medios Líquidos.

Con objeto de detectar enteropatógenas que se encuentran en cantidad menor en relación con las otras bacterias que constituyen la flora normal del intestino se idearon los llamados medios de enriquecimiento, que aumentan las posibilidades de que las bacterias enteropatógenas sean detectadas, ya que inhiben el desarrollo o se destruye a los generos *Escherichia* y *Enterobacter*. El primero de ellos, el tetracionato, fué usado desde 1923 por Mueller; como su nombre lo indica contiene compuestos de azufre además de sales biliares, este medio favorece el crecimiento de las enteropatógenas que serán aisladas y seleccionadas por los medios sólidos previamente descritos.

En 1935, Kauffman añadiendo verde brillante al caldo de Mueller en una proporción de 1:100 000 logró aún mejores resultados para la obtención de *Salmonella* exceptuando a *Salmonella typhosa* (10). Galton en 1952 añade una modificación más, que consiste en la adición de sulfatiazol para inhibir la invasión de *Proteus* por el "swarming" (4).

A pesar de haber sido descrito por Guth en 1916 el uso de las sales de selenio como inhibidores de diferentes especies bacterianas no -- fué sino hasta 1936 cuando Leifson vuelve a usarlas y a demostrar su utilidad en favorecer la multiplicación de enteropatógenas y hacer más efectiva su determinación, Leifson añadió además de selenito ácido de sodio, fosfatos para disminuir la toxicidad de esta sal y lactosa, habiendo obtenido muy buenos resultados para el aislamiento de *Salmonella typhosa* y demás grupos de *Salmonella* (11). Otras modificaciones han sido descritas por Knox y Cols. en 1943. Ralfe en 1946; Nagel en 1950; Zschucke en 1951 (3). Quizá las más

conocidas son las descritas por North y Bartram sobre la adición de cistina y por Silliker que añade material fecal estéril u otro compuesto inorgánico como el llamado millorganita que contiene concentraciones relativamente altas de sales inorgánicas como el cloruro de sodio, para favorecer el aislamiento de Salmonella y Shigella (3).

Hajna (1955) elaboró un medio adecuado para actuar como preservativo y como medio de enriquecimiento éste fué el caldo para Gram negativos de aquí su abreviación caldo GN, éste contiene desoxicolato y citrato que actúan como inhibidores de bacterias Gram positivas, glucosa y manitol para restringir el crecimiento de Proteus y favorecer el de las enteropatógenas (5).

Finalmente Rappaport y cols., en 1956, describen el uso del caldo de enriquecimiento cloruro de magnesio-verde malaquita que producía mejores aislamientos para Salmonella excepto S. typhosa usando como inóculo una suspensión de heces diluidas 1:1000 (3).

CAPITULO II
MATERIAL Y METODO

MATERIAL

El material sobre el cual se llevó a cabo este estudio consistió en dos tipos de muestras que se denominaron muestras grupo A y muestras grupo B.

Grupo A: estuvo constituido por 413 muestras fecales recolectadas en pacientes del Servicio de Urgencias y Consulta Externa del Hospital del Niño IMAN a partir del 7 de agosto al 20 de diciembre de 1972.

Grupo B: constituido por 380 muestras del Servicio de Infectología de pacientes con diagnóstico clínico de probable fiebre tifoidea - durante el lapso del 5 de octubre al 20 de diciembre de 1972.

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

En todos los casos se emplearon medios deshidratados comerciales.

XILOSA - LISINA - DESOXICOLATO (XLD)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Xilosa	3.5
L-lisina	5.0
Lactosa	7.5
Sacarosa	7.5
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	3.0
Rojo de fenol	0.08
Agar (purificado)	13.5
Desoxicolato de sodio	2.5
Tiosulfato de sodio	6.8
Citrato férrico amoniacal	0.80
pH final \pm 7.4	

No se esteriliza, únicamente se disuelve en agua y se lleva a ebullición.

TERGITOL 7 AGAR (T)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Sulfato heptadecil de sodio	0.100
Polipeptona peptona	5.000
Extracto de levadura	3.000
Lactosa	10.000

agar	15.00
azul de bromotimol	0.02
pH final \pm 6.9	

Se esteriliza en autoclave a (15 libras de presión) 121°C durante 15 minutos.

MAC CONKEY (MC)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Gelisato peptona	17.00
Polipeptona peptona	3.00
Lactosa	10.00
Mezcla de sales biliares	1.50
Cloruro de sodio	5.00
Agar	13.50
Rojo neutro	0.030
Violeta cristal	0.001
pH final \pm 7.1	

Se esteriliza en autoclave a (15 lb) 121°C durante 15 minutos.

ROSINA AZUL DE METILENO (EMB)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Peptona	10.00
Lactosa	5.00
Sacarosa	5.00
Fosfato dipotásico	2.00
Agar	13.50
Rosina Y	0.40
Azul de metileno	0.065
pH \pm 7.2	

Se esteriliza en autoclave a (15 lb) 121°C durante 15 minutos.

VERDE BRILLANTE (VB)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de levadura	3.00
Polipeptona peptona	10.00
Cloruro de sodio	5.00
Lactosa	10.00
Sacarosa	10.00
Rojo de fenol	0.08

Agar	20.00
Verde brillante	12.50 mg
pH final \pm 6.9	

Se esteriliza en autoclave a (15 lb) 121°C durante 15 minutos.

SALMONELLA - SHIGELLA (SS)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Extracto de carne de res	5.00
Polipeptona peptona	5.00
Lactosa	10.00
Mezcla de sales biliares	8.50
Citrato de sodio	8.50
Tiosulfato de sodio	8.50
Citrato férrico amoniacal	1.00
Agar	13.50
Rojo neutro	0.025
Verde brillante	0.330
pH final \pm 7.0	

Se disuelve en agua, se calienta con agitación frecuente hasta que hierva durante un minuto.

AGAR TRIPTICASA SOYA (ATS)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Tripticasa peptona	15.00
Fitona peptona	5.00
Cloruro de sodio	5.00
Agar	15.00
pH final \pm 7.3	

Se esteriliza en autoclave a (15 lb) 121°C durante 15 minutos.

Todos los medios antes mencionados, después de esterilizados, se vacían en cajas de Petri estériles, de 12x100 mm, en cantidades de 20 ml en cada caja, dejándose solidificar antes de usarse. Con el propósito de obtener un mejor funcionamiento de los medios, se utilizaron dentro de un período no mayor de 48 horas después de su preparación.

CALDO TETRACIONATO (Tetra)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Polipeptona peptona	5.00
---------------------	------

Sales biliares	1.00
Carbonato de calcio	10.00
Tiosulfato de sodio	30.00

Se disuelve en agua estéril y se lleva a ebullición.

Solución yodo - yodurada

Yodo	6.00 g
Yoduro de potasio	5.00 g
Agua	20 ml

El yodo se tritura en un mortero y se le va adicionando lentamente el yoduro de potasio: ya disuelto se le agrega poco a poco el agua. Se conserva en un gotero ámbar.

CALDO GRAM NEGATIVO (GN)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Polipeptona peptona	20.00
Dextrosa	1.00
D- manitol	2.00
Citrato de sodio	5.00
Desoxicolato de sodio	0.50
Fosfato dipotásico	4.00
Cloruro de sodio	5.00
pH final \pm 7.0	

Se esteriliza a (15 lb) 121°C durante 15 minutos.

CALDO SELENITO - F (Sel)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Polipeptona peptona	5.00
Lactosa	4.00
Fosfato de sodio	10.00
Selenito ácido de sodio	4.00
pH final \pm 7.0	

Se disuelve en agua destilada

Estos medios líquidos se conservan en matraces después de esterilizar aquellos que lo necesitan o simplemente disueltos, el de tetrationato y Gram negativo se conservan a la temperatura ambiente, en cambio el de selenito se mantiene en refrigeración.

KLIGLER

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Polipeptona peptona	20.00
Lactosa	10.00
Dextrosa	1.00
Cloruro de sodio	5.00
Citrato férrico amoniaco	0.50
Tiosulfato de sodio	0.50
Agar	15.00
Rojo de fenol	0.025
pH final \pm 7.4	

Se distribuye en tubos de 13 x 100 mm y se lleva a esterilizar a (15 lb) 121°C durante 15 minutos. Se deja solidificar en forma inclinada.

SIM

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Tripticasa peptona	20.00
Tiotona peptona	6.1
Sulfato férrico amoniaco	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5

Se esteriliza en autoclave a (15 lb) 121°C durante 15 minutos, después de vaciar a tubos de 12 x 75 mm. Se deja solidificar en forma vertical.

SUEROS AGLUTINANTES

Se emplearon sueros aglutinantes comerciales.

SUEROS ANTI ESCHERICHIA COLI

Suero anti E. coli polivalente A: O26, O55, O111, O127
 Suero anti E. coli polivalente B: O86, O119, O124, O125, O126, O128
 Sueros anti específicos mono valentes: O127, O111, O55, O26, O125,
 O86, O126, O128, O119, O124

SUEROS ANTI SALMONELLA

Suero anti polivalente O

Suero anti Salmonella O grupo: A, B, C₁, C₂, D, E, Vi, F, G, H, I

SUEROS PARA LA DETECCIÓN RAPIDA DE ANTIGENOS FLAGELARES DE SALMONELLA DE ACUERDO AL METODO DE SPICER - EDWARDS.

ACRIFLAVINA. Grado Reactivo

Acriflavina 1:500

REACTIVO DE KOVACS (Prueba de Indol)

Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
p-dimetilaminobenzaldehido	10 g
Acido clorhídrico, concentrado	50 ml

Se disuelve el aldehido en alcohol y lentamente se le adiciona el ácido.

CALDO TRIPTICASA SOYA

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

Tripticasa peptona	17.00
Fitona peptona	3.00
Cloruro de sodio	5.00
Fosfato dipotásico	2.50
Dextrosa	2.50

pH final \pm 7.3

Se esteriliza a (15 lb) 121°C durante 15 minutos

MICROSCOPIO ESTEREOSCOPICO

MECHERO BUNSEN

ASAS DE PLATINO

METODO

Las muestras de heces empleadas en este estudio fueron obtenidas por duplicado, utilizando hisopos estériles que se introdujeron en el recto de los pacientes haciendo un giro con el objeto de recoger de la mucosa la mayor cantidad de muestra posible, pasándose a continuación a tubos con caldo tripticosa soya para evitar que la muestra se seque y las bacterias se mueran. Estas muestras se tomaron por los médicos y enfermeras encargadas del servicio.

GRUPO A

Las muestras fueron sembradas lo más pronto posible en cuatro placas siendo éstas las siguientes: XLD, MC, EMB y tergitol. Uno de los hisopos fué sembrado indistintamente en dos de las placas antes mencionadas y el otro hisopo se sembró en las dos placas restantes, ésto se hizo con el fin de que todas las placas tuvieran la misma oportunidad de recibir las bacterias enteropatógenas que pudieran existir en la muestra.

Una vez sembradas las placas, con el objeto de normalizar una tercera muestra, que contuviera el mismo material que las dos anteriores se introdujo un tercer hisopo en los caldos en que originalmente se colocaron los dos primeros.

A los tres tubos con los hisopos se les agregaron los medios líquidos de enriquecimiento; a uno se le añadió tetratiónato más solución yodo-yodurada, al segundo se le agregó caldo GN y al tercero selenito-F. Las placas sembradas y los tres tubos con medios de enriquecimiento se llevaron a incubar durante 18 horas a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al análisis cuidadoso mediante microscopio estereoscópico de cada una de las placas, para obtener una idea general de los diferentes tipos morfológicos de colonias, buscando la presencia de bacterias lactosa negativa; ésto se observa por la variación del indicador contenido en el medio de cultivo, las colonias que presentaron diferente morfología fueron pasadas a un tubo de Kligler sembrando en la porción inclinada por estría y en el fondo por piquete introduciendo el asa en la porción media y no en un extremo, sin esterilizar por flama el asa se procedió a sembrar el SIM por picadura. En cada caso

se tuvo la precaución de anotar de que medio se había seleccionado la colonia.

El objeto de sembrar en Kligler y SIM fué conocer algunas de las propiedades bioquímicas de las colonias elegidas, como es la producción de indol, el cual se puso de manifiesto al adicionar al tubo con SIM unas gotas de reactivo de Kovacs, virando éste su coloración a rosa si había producción de indol. Esta y otras propiedades fueron de utilidad para la selección de bacterias posiblemente enteropatógenas como Salmonella y Shigella. Las cepas seleccionadas fueron probadas en el caso de Salmonella con un suero Anti O polivalente por el método de aglutinación manual en placa; en caso de obtener aglutinación con éste se procedió a la diferenciación de grupo mediante aglutinaciones con sueros monovalentes.

Las reacciones antes mencionadas se llevaron a cabo sobre laminillas, en las que primero se hizo una suspensión de la bacteria en solución salina isotónica estéril para probar si no existía autoaglutinación, si no estaba presente se añadió una gota de suero, -- mezclándose primero con el asa y luego mecánicamente moviendo la laminilla hacia atrás y hacia adelante frente a una lámpara, observándose si había aglutinación o no; la operación anterior se repitió durante 1 a 2 minutos, evitando siempre que las gotas de suero con la suspensión de bacterias se sequen antes de leerlas ya que -- nos darían falsas positivas.

Para determinar las especies de Salmonella se siguió el método rápido de identificación de Spicer - Edwards que consiste en la determinación de los antígenos flagelares tanto los de fase 1 como los de fase 2. La técnica se basa en el empleo de siete sueros constituidos por mezclas de anticuerpos flagelares, los primeros cuatro sueros permiten la determinación e identificación de catorce antígenos flagelares, mientras que los últimos tres son sueros complementarios para la identificación de antígenos flagelares adicionales.

Para su determinación es necesario disponer de microorganismos altamente móviles; para obtenerlos se sembró la cepa varias veces consecutivamente en SIM para favorecer su movilidad. Los pasos se hicieron tomando únicamente los microorganismos que emigraron a la periferia de la superficie del medio o al fondo del tubo. Cuando la movilidad fué satisfactoria se sembraron en tubos con caldo triptica-sa soya y se llevaron a incubar durante una noche. Después de este

período de incubación, se ajustaron al tubo número dos del nefelómetro de Mac Farland, que corresponde aproximadamente a una densidad de 600 millones de bacterias por cada ml, des esta suspensión se tomó 0.5 ml que se colocó en tubo de 12 x 75 mm, agregándose después un volumen igual de los sueros polivalentes antes mencionados, se incubó en baño de agua a 50°C durante una hora y posteriormente se llevaron a refrigerar durante tres horas aproximadamente; la interpretación de los resultados se hizo de acuerdo al esquema de Kauffman.

En caso de sospecha de Shigella por reacciones bioquímicas, se efectuaron aglutinaciones con sueros anti de los cuatro grupos A, B, C y D.

Ya que E. coli es una bacteria que fermenta la lactosa, las colonias que mostraban tal propiedad fueron transferidas a gelosa triplicasa soya sembrando una superficie de 1 cm² de cada colonia diferente que se observó; incubándose también 18 horas a 37°C.

Las colonias por morfología sospechosas de pertenecer al género Escherichia, así como aquellas que presentaron reacciones bioquímicas de Escherichia coli se probaron por medio de las reacciones de aglutinación en placa con una solución de acriflavina al 1:500, las que aglutinaron se consideraron como constituyentes de la flora normal del intestino y fueron descartadas, pero si la aglutinación fué negativa, se sometieron a pruebas de aglutinación con sueron polivalentes de E. coli que comprenden los grupos A y B, en caso de ser positivas se procedió al igual que en el caso de Salmonella a la identificación de especie mediante los sueros específicos monovalentes.

Enriquecimiento.- Después de haber sido incubados los hisopos en los diferentes medios de enriquecimiento cada uno de ellos fué sembrado en una placa de XLD, MC, EMB y VB incubándose posteriormente durante 18 horas a 37°C.

A continuación se procedió a seleccionar e identificar las colonias de la misma forma antes mencionada. Los tubos de Kligler fueron marcados anotando no sólo el medio en que se seleccionó la colonia sino también el medio líquido utilizado en cada caso.

GRUPO B

Las muestras fueron sembradas primeramente en tres placas: EMB, XLD

y MC; posteriormente, a los tubos conteniendo los hisopos se les adicionó medios de enriquecimiento; a uno de ellos se le agregó tetracionato (sin verde brillante) más solución yodo-yodurada y al otro selenito - F.

Las placas sembradas y los tubos con medio de enriquecimiento se llevaron a incubar durante 18 horas a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo el análisis cuidadoso mediante microscopio estereoscópico de las placas buscando la presencia de bacterias lactosa negativa cuyas colonias - viran de un modo especial el indicador contenido en el medio. De estas colonias todas aquellas morfológicamente diferentes se pasaron a un tubo de Kligler y a otro de SIM de la forma previamente descrita para las muestras del grupo A; habiendo tenido la precaución de marcarlos adecuadamente.

Los hisopos con los medios de enriquecimiento después de eliminar el sobrenadante fueron sembrados en cuatro placas: XLD, EMB, MC y SS, llevándose a incubar a 37°C durante 18 horas; transcurrido este tiempo fueron analizadas de la forma antes mencionada anotando en el tubo de Kligler también el medio líquido de enriquecimiento del cual provenía la colonia seleccionada.

Las cepas que por sus características bioquímicas se sospechó fueran de Salmonella typhosa se separaron para aglutinarlas primero con un suero polivalente y después ponerlas en contacto con suero anti grupo D y suero anti Vi; las aglutinaciones se llevaron a cabo en laminillas de la misma forma descrita para Salmonella, Shigella y Escherichia coli.

C A P I T U L O I I I

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las 413 muestras en la investigación de enteropatógenos se observan en el cuadro 1, en el que se representaron el número de coprocultivos positivos a *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enteropatógeno o sea, que se obtuvieron 73 muestras positivas de los diferentes grupos de *Salmonella* — (17.6 %), 27 de los diferentes tipos de *Shigella* (6.5 %) y 66 — tipos diferentes de *E. coli* enteropatógeno (15.9 %) haciendo todos ellos un total de 152, esto es un 36.8 % del total.

SALMONELLA

Como fué señalado en el cuadro 1, se obtuvieron 73 casos positivos de *Salmonella* de diferentes coprocultivos, y cada una de ellas se identificó en uno o varios de los medios utilizados. El cuadro 2 muestra los resultados positivos de *Salmonella*: En cultivos directos se identificaron en los medios de EMB, MC, XLD y tergitol un total de 35; usando como medio de enriquecimiento tetracionato 73; en el caso de selenito 84 y cuando se usó GN 27; dando totales para los medios selectivos de 38 aislamientos de — *Salmonella* en EMB, 53 en MC y 50 en XLD; el verde brillante sólo fué usado con medio de enriquecimiento dando un total de 69. El número de veces en que se aislaron en todos los medios utilizados fué de 219.

CUADRO I

Distribución de Cultivos Positivos a Salmonella, Shigella y E. coli enteropatógeno en 413 Coprocultivos.

Muestras	Salmonella		Shigella		<u>E. coli</u>		Total	
	Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%
413	73	17.3	27	6.5	66	15.9	152	36.8

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

CUADRO 2

Número de cultivos positivos a Salmonella distribuidos de acuerdo con los medios selectivos y de enriquecimiento utilizados

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					Total
		EMB	MG	XLD	T	VB	
Directo	-	5	10	11	9	-	35
-	Tetracionato	12	16	17	-	28	73
-	Selenito	19	21	19	-	25	84
-	Gram Negativo	2	6	3	-	16	27
Total		38	53	50	9	69	219

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

De las 219 veces que se encontró Salmonella sólo 73 de ellas fueron de diferentes muestras, por lo que para hacer un análisis de cual medio resultó ser el más eficiente para sus aislamiento se separaron estas 73 de acuerdo con la combinación que presentó el mayor número de aislamientos, ésta fué el uso de tetracionato como medio de enriquecimiento y verde brillante como selectivo (28); de las 45 restantes se seleccionaron aquellas que desarrollaron con mayor frecuencia en tetracionato con MG y se fueron eliminando cada vez las que ya habían desarrollado en las otras combinaciones o medios específicos. Los resultados se observan en el cuadro 3 que señala como un medio más conveniente para el aislamiento de Salmonella el verde brillante, siguiéndolo en frecuencia el MG, combinados estos dos con los tres medios mencionados de enriquecimiento.

CUADRO 3

Distribución de 73 cepas de Salmonella aisladas de acuerdo al medio en que se desarrollaron en mayor número.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					
		EMB	MC	XLD	T	VB	Total
Directo	-	0	6	4	1	-	11
-	Tetracionato	0	7	5	-	28	40
-	Selenito	0	5	2	-	3	10
-	Gram Negativo	0	4	0	-	2	6
Total		0	22	11	1	33	67

Nota:

5 cepas se encontraron en las combinaciones de selenito
1 cepa se encontró en selenito y GN

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

Al representar los resultados del cuadro 3 en una gráfica de barras (gráfica 2), cada una corresponde a la proporción que dieron los medios utilizados conforme al total de salmonelas. La barra - número 1 representa la proporción de cepas de Salmonella aisladas en verde brillante con tetracionato; de las otras cada una lleva una porción oscura que nos señala el número de cepas nuevas (expresado siempre en proporciones) y la parte clara una proporción acumulada de todos los medios usados representados a la izquierda de la barra. Como fué ya señalado, el medio de enriquecimiento de tetracionato combinado con verde brillante da un número considerable de aislamientos (28), siguiéndole en frecuencia con MC (7) y con XLD (5); el uso de selenito demostró aumento cuando se combi-

nó con verde brillante (7), MC (7) y con XLD (2), el caldo GN sólo proporcionó aumento combinado con verde brillante (4) y con MC (2). También se señalan los aumentos dados por la siembra directa.

El mismo cuadro 3 fué representado por una especie de histograma en el que al extremo derecho se encuentra el número de cepas de Salmonella aisladas en 16 combinaciones diferentes disminuyendo éstas en forma ascendente hasta llegar a uno; las cifras del extremo derecho varían o no a medida que las combinaciones van disminuyendo.

En el cuadro 4 se observa la distribución de las diferentes cepas de Salmonella encontradas, habiendo tomado como base para su elaboración aquellas que desarrollaron en verde brillante sin considerar los diferentes medios de enriquecimiento, debido a que fué éste en el que se aisló el mayor número.

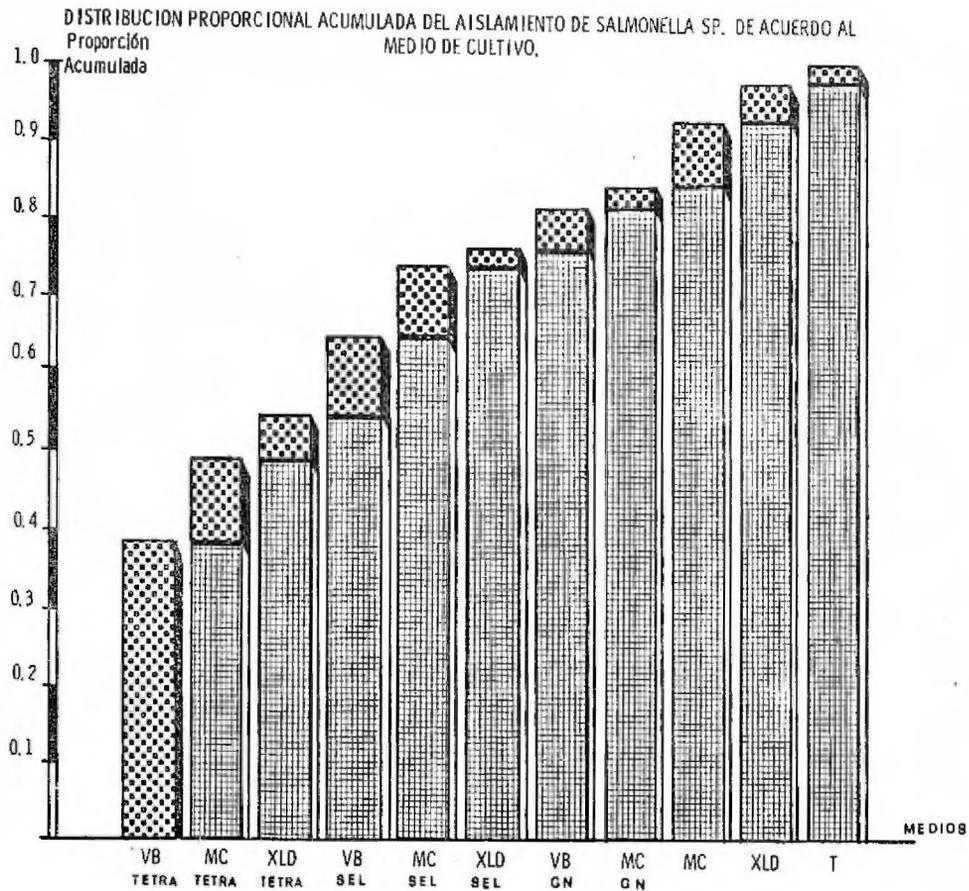
CUADRO 4

Número de salmonelas aisladas en cultivos directo y en los tres medios de enriquecimiento conforme a un medio selectivo determinado.

Medio Selectivo	Número de Salmonella
VB	44
MC	21
XLD	7
T	1
Total	73

Hospital del Niño IMAN
7 agosto - 20 diciembre 1972

GRAFICA 2



La gráfica 4 representa parcialmente los resultados del cuadro 4; en ella se observan dos curvas, la de línea llena que representa en proporciones acumuladas los totales de salmonelas obtenidas con verde brillante, MC y XLD independientemente del medio de enriquecimiento empleado; la línea punteada representa también en proporciones acumuladas las salmonelas aisladas en tetratiónato con verde brillante, MC y XLD; la diferencia entre las dos curvas proporciona los valores obtenidos al usar únicamente selenito, caldo GN y siembra directa.

A pesar de utilizar 16 combinaciones diferentes de medios de cultivo para el aislamiento de salmonela, se observó que 35 (0.47 %) de ellas únicamente se aislaron de un sólo medio; su distribución se puede apreciar en el cuadro 5.

CUADRO 5

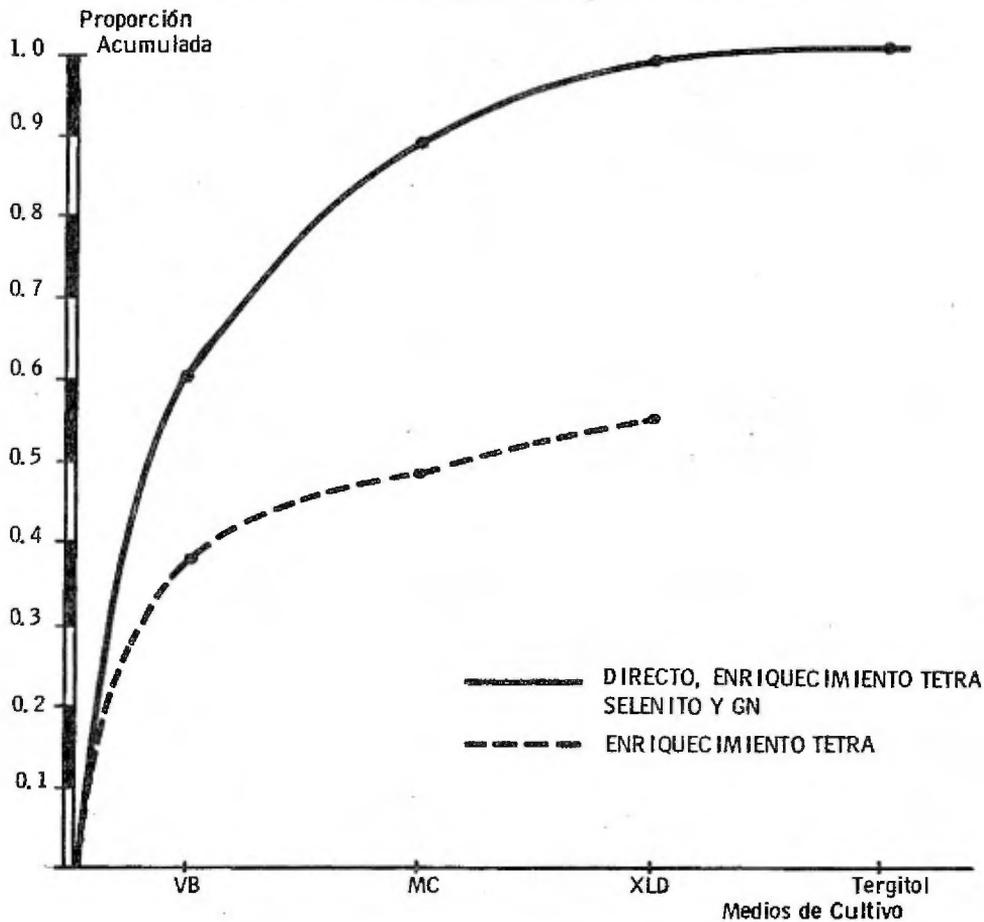
Distribución de las diferentes salmonelas que únicamente fueron aisladas en el medio indicado.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					Total
		EMB	MC	XLD	T	VB	
Directo	-	0	2	3	1	-	6
-	Tetratiónato	0	2	2	-	9	13
-	Selenito	0	5	2	-	3	10
-	Gram Negativo	0	2	0	-	4	6
Total		0	11	7	1	16	35

Hospital del Niño IMAN
7 agosto - 20 diciembre 1972

GRAFICA 4

AISLAMIENTOS DE SALMONELLA SP. DE COPROCULTIVOS EN PROPORCIONES ACUMULADAS DE ACUERDO A LOS MEDIOS SEÑALADOS.



Al hacer la determinación de los antígenos somáticos y flagelares de las 73 cepas de Salmonella aisladas, que permite su clasificación en grupo y especie, el mayor número correspondió al grupo B, esto es, 38; de éstas, resultaron 22 de las especies: typhimurium, 7 derby, 1 sandiego, 6 no fueron clasificadas y 2 no poseían antígenos flagelares; del grupo D se obtuvieron 14 clasificándolas como typhosa a 13 y una como miami; del grupo C-2 se encontraron 10, 5 newport, 1 lindenbug, 1 bonariensis, 1 probable edmonton, una con clasificación antigénica l,w z₁₀ y otra con clasificación z; del grupo G se aisló un total de 6 de las cuales 5 fueron poona y 1 no poseía antígenos flagelares; del grupo C-1 3 no fueron identificadas por haberse perdido las cepas y 1 no presentó constituyentes antigénicos flagelares. Una de las 73 solamente aglutinó con el suero polivalente pero no con los sueros monovalentes. Cuadro 6

CUADRO 6

Distribución de acuerdo al Grupo y Especie de 73 salmonelas aisladas en Coprocultivos de enfermos no sospechosos de Fiebre Tifoidea.

Grupo	typhi- murium	derby	san - diego	linden- burg	bona- riensis	edmon- ton	1,w z ₁₀	z	typho- sa	miami	poona	new- port	No clasi- ficada	Nega- tivos	Total
B	22	7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	2	38
O-2	-	-	-	1	1	1	1	1	-	-	-	5	0	0	10
D	-	-	-	-	-	-	-	-	13	1	-	-	0	0	14
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	0	1	6
O-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	4
Total	22	7	1	1	1	1	1	1	13	1	5	5	9	4	72

NOTA: Una cepa no aglutinó con los sueros específicos de grupo

Hospital del Niño IMAN

5 octubre - 20 diciembre 1972

Salmonella typhosa

Las muestras seleccionadas para la investigación específica de Salmonella typhosa, fueron aquellas de casos clínicamente sospechosos de fiebre tifoidea, aunque muchas de ellas fueron obtenidas durante el tratamiento específico. Los coprocultivos positivos S. typhosa fueron 77 de 380 muestras que corresponden a un porcentaje de 20.2 %. Cuadro 7

CUADRO 7

Número de coprocultivos positivos a Salmonella typhosa en 380 muestras estudiadas.

Muestras	Resultados			
	Positivos	%	Negativos	%
380	77	20.2	203	79.8

Hospital del Niño IMAN

5 octubre - 20 diciembre 1972

El número de veces en que S. typhosa fué aislada en los diferentes medios y sus combinaciones, están representados en el cuadro, donde se ve que se encontró 205 veces, apreciándose en una mayor frecuencia en las combinaciones del medio de enriquecimiento con selenito, esto es, 149 veces; cuando se empleó tetracionato únicamente se encontraron 37, y en la siembra directa sólo se aislaron 19. En este mismo cuadro se observa que los diferentes medios selectivos usados en siembra directa o combinados con los de enriquecimiento proporcionan 30 aislamientos con EMS, 37 con MC, 63 con XLD y 75 con SS que no fué usado más que con medios de enriquecimiento.

CUADRO 8

Número de coprocultivos positivos a Salmonella typhosa distribuidas de acuerdo a los medios de enriquecimiento y selectivos utilizados.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos				
		EMB	MC	XLD	SS	Total
Directo	-	3	7	9	-	19
	Tetracionato	6	6	10	15	37
	Selenito	21	24	44	60	149
Total		30	37	63	75	205

Hospital del Niño IMAN

5 octubre - 20 diciembre 1972

El cuadro 9 muestra la distribución de los 77 coprocultivos positivos a S. typhosa de acuerdo con las diferentes combinaciones utilizadas, tomando como base aquella en la que hubo mayor número de aislamientos (selenito con SS) que fueron 60, siguiéndole en una proporción de 10 veces menor el selenito con XLD 6; en el tetracionato con SS se aislaron cuatro de ellas, encontrándose únicamente una diferente con el empleo de tetracionato con XLD y MC directo. Una cepa fué encontrada en XLD directamente o combinado con tetracionato y 3 en diferentes combinaciones de selenito con los medios de enriquecimiento.

CUADRO 9

Distribución de 77 salmonelas aisladas de acuerdo al medio en que se encontraron en mayor número.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos				
		EMB	MC	XLD	SS	Total
Directo	-	0	1	0	-	1
-	Tetracionato	1	0	1	4	6
-	Selenito	0	0	6	60	66
Total		1	1	7	64	73

Nota:

1 cepa fué encontrada en XLD directo y tetra XLD
3 cepas fueron encontradas en las combinaciones de selenito

Hospital del Niño IMAN

5 octubre - 20 diciembre 1972

La gráfica 5 representa gráficamente en proporciones los resultados del cuadro 9. La primera barra muestra los aislamientos obtenidos con la combinación selenito-SS, las zonas oscuras de las otras barras señalan el aumento en proporciones acumuladas de los medios mencionados hacia la izquierda.

Al igual que para Salmonella, otra manera de representar los datos de la gráfica 5, es por una especie de histograma que nos indica el número de salmonelas nuevas aisladas por la adición de un medio o combinación de ellos; así se observa que 60 son obtenidas con selenito y SS en cambio 9 fueron aisladas con selenito y XLD, y selenito MC, selenito EMB, tetracionato SS añadieron 4 nuevas cepas, tetracionato XLD proporcionó 2, tetracionato MC una y la restante fué encontrada en MC, XLD y EMB aislaron cepas de Salmone -

lla typhosa que estuvieron también en otras combinaciones.

Gráfica 6

El cuadro 10 resume los resultados cuando se utilizan los diferentes medios de enriquecimiento y el selectivo indicado, el que produjo mayor número de aislamientos fué SS, siguiéndole en frecuencia XLD, EMB y MC aislaron 1 diferente.

La gráfica 7 representa los resultados anteriores en proporciones acumuladas entendiéndose que sólo fueron utilizados tetracionato y selenito como medios de enriquecimiento.

CUADRO 10

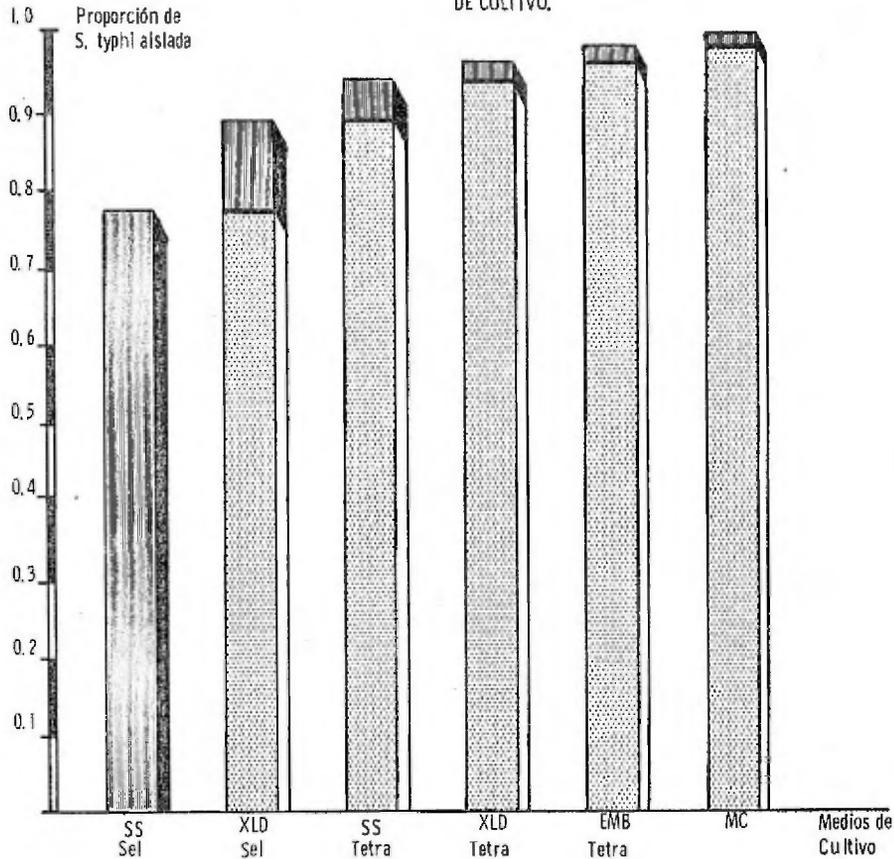
Número de cepas de Salmonella typhosa aisladas en cultivo directo y en los dos medios de enriquecimiento conforme a un medio selectivo determinado.

Medio selectivo	Número de Salmonella
SS	64
XLD	11
MC	1
EMB	1
Total	77

Hospital del Niño IMAN
5 octubre - 20 diciembre 1972

GRAFICA 5

DISTRIBUCION PROPORCIONAL ACUMULADA DEL AISLAMIENTO DE S. TYPHI DE ACUERDO AL MEDIO DE CULTIVO.



GRAFICA 6

Frecuencia de Nuevas cepas de Salmonella typhosa aisladas con distintas combinaciones de medios de cultivo.

XLD	0									
XLD	EMB	0								
XLD	EMB	MC	1							
XLD	EMB	MC	Tetra MC	1						
XLD	EMB	MC	Tetra MC	Tetra EMB	2					
XLD	EMB	MC	Tetra MC	Tetra EMB	Tetra XLD	4				
XLD	EMB	MC	Tetra MC	Tetra EMB	Tetra XLD	Tetra SS	8			
XLD	EMB	MC	Tetra MC	Tetra EMB	Tetra XLD	Tetra SS	Sel MC	8		
XLD	EMB	MC	Tetra MC	Tetra EMB	Tetra XLD	Tetra SS	Sel MC	Sel EMB	8	
XLD	EMB	MC	Tetra MC	Tetra EMB	Tetra XLD	Tetra SS	Sel MC	Sel EMB	Sel XLD	17
XLD	EMB	MC	Tetra MC	Tetra EMB	Tetra XLD	Tetra SS	Sel MC	Sel EMB	Sel XLD	Sel SS

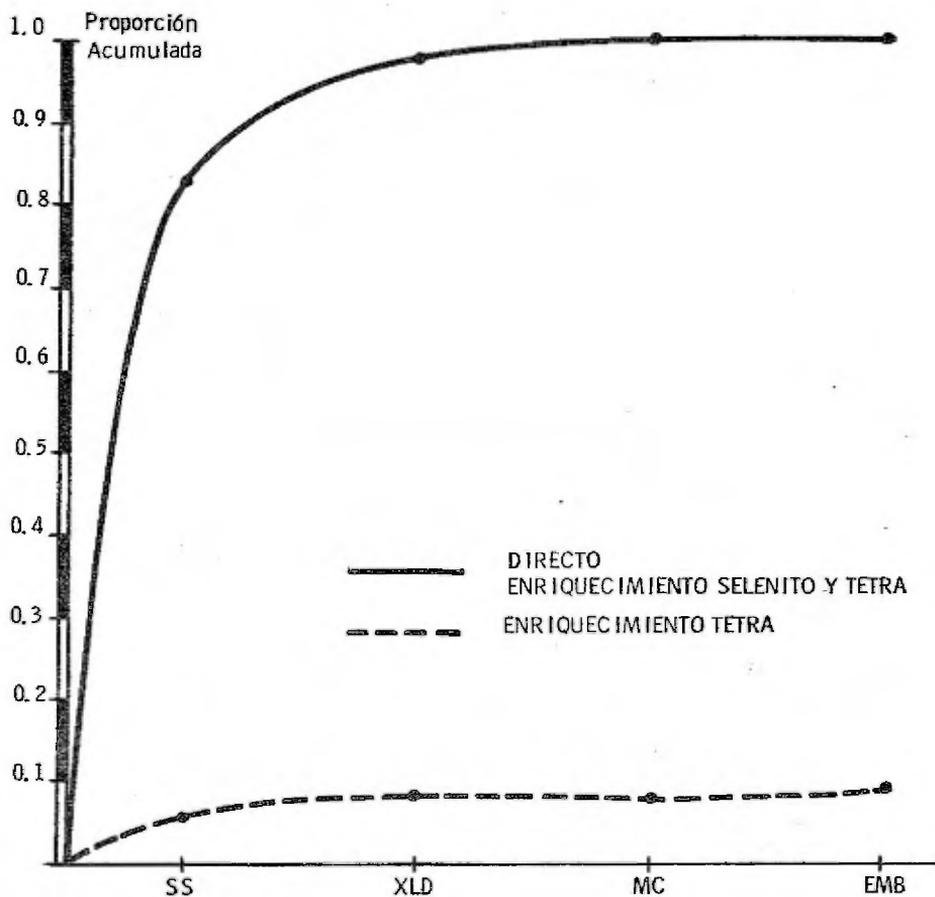
77

Hospital del Niño IMAN

5 octubre - 20 diciembre 1972

GRAFICA 7

AI SLAMI ENTOS DE SALMONELLA TYPHI DE COPRO CULTIVOS EN PROPORCIONES ACUMULADAS DE ACUERDO A LOS MEDIOS SEÑALADOS.



De todas las cepas de Salmonella aisladas algunas de ellas se encontraron únicamente en un medio selectivo o en una combinación determinada, éstas fueron 34, correspondiendo 27 al medio de selenito; el uso de tetracionato obtuvo 6 y la siembra directa una. Cuadro 11

CUADRO 11

Distribución de las diferentes Salmonella typhosa que únicamente fueron aisladas en el medio indicado.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos				
		EMB	MC	XLD	SS	Total
Directo	-	0	1	0	-	1
-	Tetracionato	1	0	1	4	6
-	Selenito	0	0	6	21	27
Total		1	1	7	25	34

Hospital del Niño IMAN
5 octubre - 20 diciembre 1972

SHIGELLA

Como fué señalado en el cuadro 1, el número de aislamientos de Shigella fué de 27 o sea el 6.1 % del total de coprocultivos. Utilizando los medios de cultivo selectivos y de enriquecimiento se obtuvieron 78 veces, distribuídas como se muestra en el cuadro 12.

El empleo de los medios de enriquecimiento produjo 4, 2, 10 aislamientos en tetracionato, selenito y caldo GN respectivamente. Considerando por otro lado los medios selectivos, Shigella sp., se encontró 16 veces en EMB, 16 en MC, 34 en XLD y 12 en tergitol independientemente, si se usaron en siembra directa o con los diferentes caldos de enriquecimiento. El mayor número de aislamientos se obtuvo en siembra directa (62 veces).

CUADRO 12

Distribución de aislamientos de Shigella en muestras de coprocultivos de acuerdo a los medios de enriquecimiento y a los medios selectivos usados.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					
		EMB	MC	XLD	T	VB	Total
Directo	-	14	13	23	12	-	62
-	Tetracionato	0	2	2	-	0	4
-	Selenito	0	1	1	-	0	2
-	Gram Negativo	2	0	8	-	0	10
Total		16	16	34	12	0	78

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

La cantidad de coprocultivos en los que se obtuvo *Shigella* sp., se distribuyó de acuerdo al medio que las detectó en mayor número (XLD), como se señala en el cuadro 13; la siembra directa seleccionó por completo a todas, no obteniéndose ningún nuevo aislamiento mediante el empleo de enriquecimiento; considerando por separado a los medios selectivos, se observó que XLD fué el que más cultivos positivos proporcionó (23) el de EMB sólo 3 y el de MC únicamente uno.

CUADRO 13

Coprocultivos positivos a *Shigella* distribuidos de acuerdo con la mayor frecuencia obtenida por los diferentes medios selectivos y de enriquecimiento.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					Total
		EMB	MC	XLD	T	VB	
Directo	-	3	1	23	0	-	27
-	Tetracionato	0	0	0	-	0	0
-	Selenito	0	0	0	-	0	0
-	Gram Negativo	0	0	0	-	0	0
Total		3	1	23	0	0	27

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

Al representar estos resultados de una manera gráfica, en proporciones acumuladas utilizando barras, se obtiene la gráfica 8. Al observarla resalta el hecho de que casi el total de aislamientos de *Shigella* se obtuvieron en el medio selectivo de XLD, representados éstos en la barra número 1; las partes oscuras de las otras dos barras indican los diferentes aislamientos que proporcionaron

los medios indicados; las zonas claras muestran en proporciones acumuladas los aislamientos logrados por los medios ya mencionados a la izquierda.

Al igual que para Salmonella se puede obtener con los resultados del cuadro 13 una especie de histograma (gráfica 9), para su elaboración se tomaron únicamente los medios selectivos usados en siembra directa, puesto que todas las combinaciones de éstos con los medios de enriquecimiento no proporcionaron ningún nuevo aislamiento. En la parte inferior del histograma se representaron los cuatro medios selectivos y a la derecha de éstos aparece el número de aislamientos obtenidos; al ascender se ve que XLD proporcionó 23, el EMB 3 y MC sólo una; esto se obtiene al efectuar una resta entre el inmediato superior y el que se desee considerar.

GRAFICA 9

Frecuencia de nuevas cepas de Shigella aisladas en los distintos medios selectivos de cultivo utilizados.

T	0			
T	MC	1		
T	MC	EMB	4	
T	MC	EMB	XLD	27

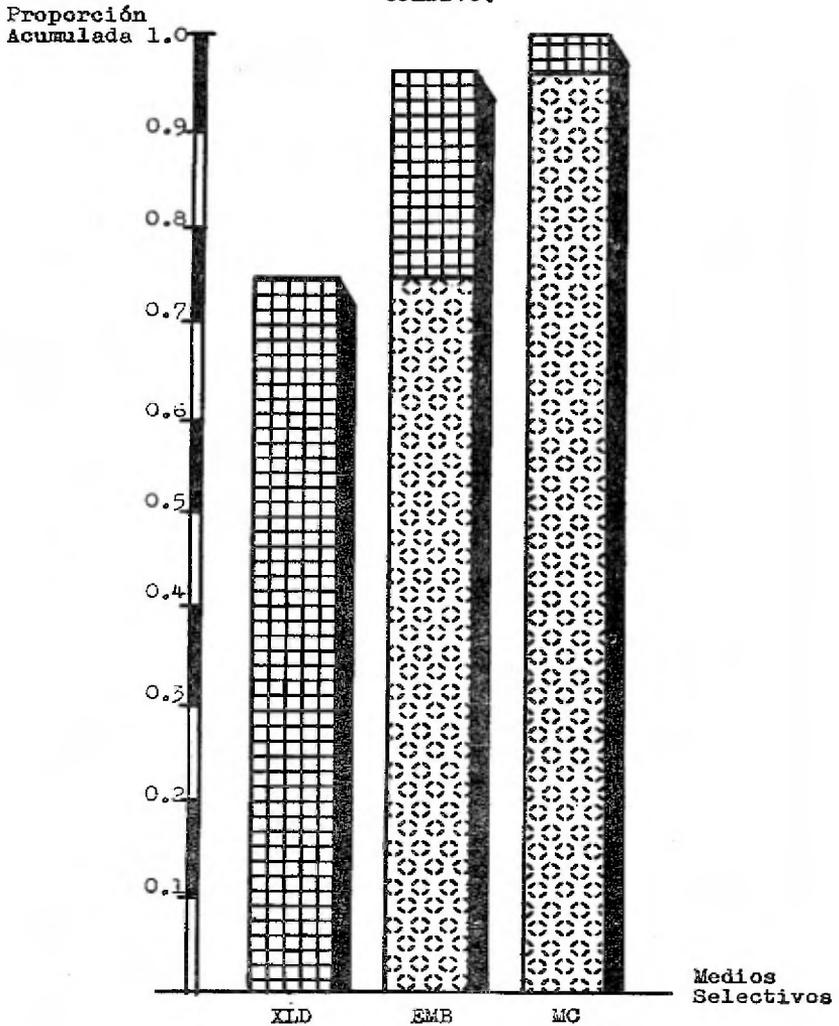
Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

Cuando se representan estos valores de otra manera, se obtiene la gráfica 10 que muestra en las abscisas los medios utilizados en siembra directa y en las ordenadas la proporción obtenida al relacionar el número de aislamientos proporcionado por cada medio y el total de Shigella; así XLD da una proporción de 0.85, el EMB 0.11 y el MC 0.09.

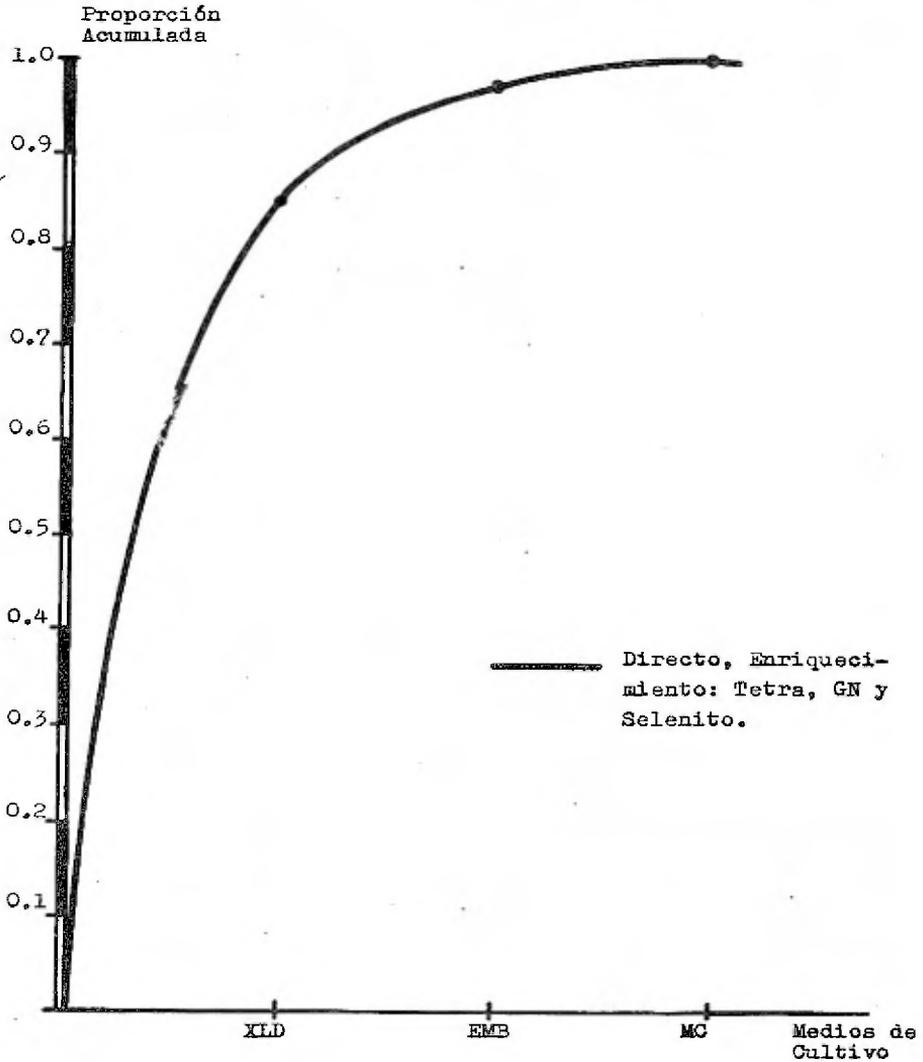
GRAFICA 8

DISTRIBUCION PROPORCIONAL ACUMULADA DEL AISLAMIENTO DE SHIGELLA SP. DE ACUERDO AL MEDIO DE CULTIVO.



GRAFICA 10

AISLAMIENTO DE SHIGELLA SP. DE COPROCULTIVOS EN PROPORCIONES ACUMULADAS DE ACUERDO A LOS MEDIOS SEÑALADOS.



De las cepas de *Shigella* aisladas hubo cuatro que solamente aparecieron en un medio determinado; el cuadro 15 muestra como se distribuyeron, observándose que se encuentran únicamente en XLD.

CUADRO 14

Distribución de las diferentes cepas de *Shigella* que únicamente fueron aisladas en el medio indicado

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					Total
		EMB	MC	XLD	T	VB	
Directo	-	0	0	4	0	-	4
-	Tetracionato	0	0	0	-	0	0
-	Selenito	0	0	0	-	0	0
-	Gram Negativo	0	0	0	-	0	0
Total		0	0	4	0	0	4

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

Una vez clasificadas por sus características bioquímicas, - las posibles *Shigella* fueron comprobadas serológicamente. El cuadro 15 relaciona el grupo y la especie encontrada. De las 27 obtenidas, 19 correspondieron al grupo B, o sea a *Shigella flexneri*, 7 al grupo D o sea *Shigella sonnei* y únicamente 1 del grupo A o sea *Sh. dysenteriae*. No se hizo clasificación de acuerdo a los tipos descritos en cada grupo.

CUADRO 15

Distribución de las cepas de Shigella de acuerdo al grupo y a la especie encontradas en 413 coprocultivos.

Grupo	dysen- teriae	flex- neri	sonnei	Total
A	1	-	-	1
B	-	19	-	19
D	-	-	7	7
Total	1	19	7	27

Hospital del Niño IMAN
7 agosto - 20 diciembre 1972

E. coli enteropatógeno

Al igual que para Salmonella y Shigella se elaboró el cuadro 16 que muestra los medios en que se aislaron E. coli enteropatógenos. El mayor número de ellos se obtuvo mediante la siembra directa 53, cuando se consideraron los medios de enriquecimiento el GN obtuvo 29, el selenito 19 y el tetracionato 14. Por otro lado, del aislamiento obtenido por los medios selectivos, sin tomar en consideración todos los de enriquecimiento, el XLD aisló 43, el EMB 30, el tergitol 20, el MC 13 y el VB 5; el número total de veces que se obtuvo E. coli enteropatógeno fué de 115.

CUADRO 16

Número de cultivos positivos a E. coli enteropatógeno distribuidos de acuerdo a los medios selectivos y de enriquecimiento utilizados.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					Total
		EMB	MC	XLD	T	VB	
Directo	-	9	4	20	20	-	53
-	Tetracionato	7	1	5	-	1	14
-	Selenito	5	5	7	-	2	19
-	Gram Negativo	12	3	11	-	3	29
Total		33	13	43	20	6	115

Hospital del Niño IMAN
7 agosto - 20 diciembre 1972

Los medios que seleccionaron E. coli enteropatógeno se muestran en el cuadro 17, que se obtuvo considerando el medio que mayor número de aislamientos proporcionó; así la siembra directa produjo 32, encontrándose casi todos en el XLD 19, 7 en tergitol, 4 en EMB y 2 en MC. Los restantes fueron obtenidos por los caldos de enriquecimiento proporcionando el caldo GN 12, el tetracionato 9 y el selenito 8. Dos de las especies de E. coli fueron encontradas en caldo GN y sus combinaciones, 2 en selenito y sus combinaciones y una en ambos. De la misma manera que cuando se consideró a los medios selectivos el XLD proporcionó mayor número de diferentes - aislamientos (28) seguido por el EMB (12), el tergitol (7), MC - (6) y VB (3).

CUADRO 17

Distribución de las 66 cepas de E. coli enteropatógeno aisladas de acuerdo al medio en que se encontraron en mayor número.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					Total
		EMB	MC	XLD	T	VB	
Directo	-	4	2	19	7	-	32
-	Tetracionato	4	0	5	-	0	9
-	Selenito	1	2	5	-	0	8
-	Gram Negativo	3	2	4	-	3	12
Total		12	6	28	7	3	61

2 cepas se encontraron en las combinaciones de selenito
3 cepas se encontraron en GN y sus combinaciones

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

El cuadro 17 fué representado parcilamente en forma de gráfica de barras utilizando proporciones acumuladas; la barra uno muestra - los aislamientos obtenidos en XLD directo, las demás barras corresponden a proporciones acumuladas que se obtuvieron con el medio indicado. Gráfica 11

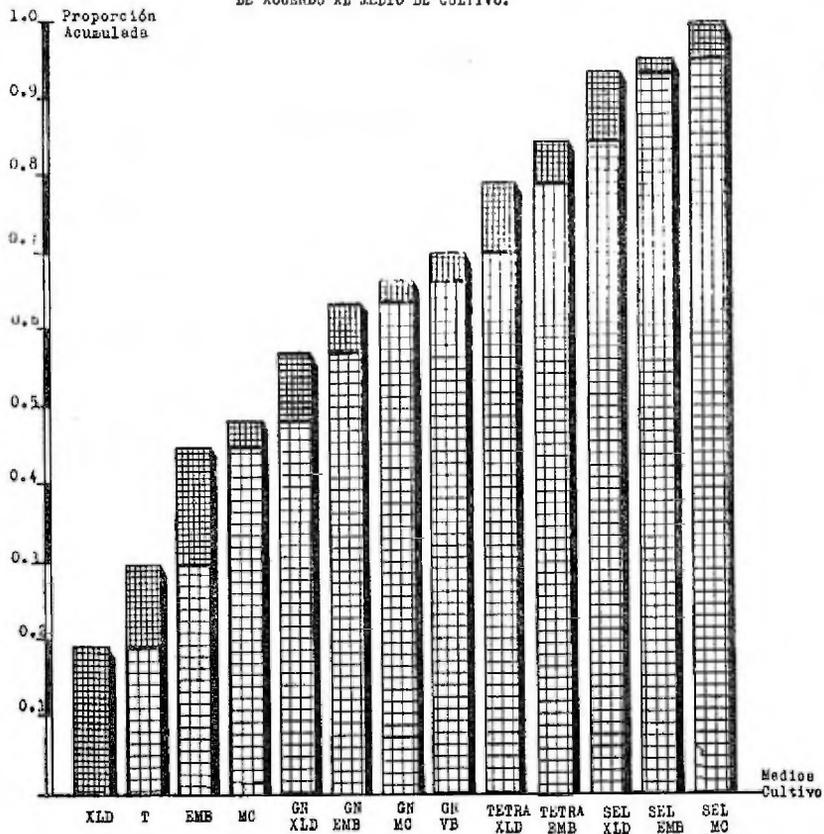
La gráfica 12 se obtuvo con los resultados de la gráfica 11, utilizando la misma forma de representación que en el caso de Salmonella y Shigella, una especie de histograma. Este permite, de otra manera, observar el aumento o no, proporcionado por la adición de un medio selectivo o la combinación de uno de enriquecimiento con los diferentes medios selectivos; así el XLD proporciona 19 aislamientos, el tergitol 7, el EMB 4, el MC 2, el GN con XLD 2, el GN con EMB 6, el GN con MC 4, el GN con VB 2, el tetracionato con XLD 3, el tetracionato con EMB 5, el tetracionato con MC 4, el tetracionato con VB al igual que selenito con VB ninguno; en tanto que selenito con EMB 6, selenito con MC 1 y selenito con VB 3.

Una representación gráfica de los resultados obtenidos mediante el uso de los medios selectivos se observa en la gráfica 13, en su elaboración se utilizaron proporciones acumulativas. La línea llena representa los resultados obtenidos en siembra directa y siembras en caldos de enriquecimiento; cuando se consideraron los resultados obtenidos únicamente con tetracionato y los mismos medios selectivos se obtuvo la línea punteada. Los datos que fueron utilizados en la elaboración de la curva (línea llena) están en el cuadro 18.

Las combinaciones de medios selectivos con medios de enriquecimiento utilizadas fueron 16, pero algunas cepas de E. coli enteropatógeno únicamente lograron aislarse en un solo medio o combinación de ellos dando un total de 39 aislamientos únicos en uno u otro medio; su distribución se observa en el cuadro 19.

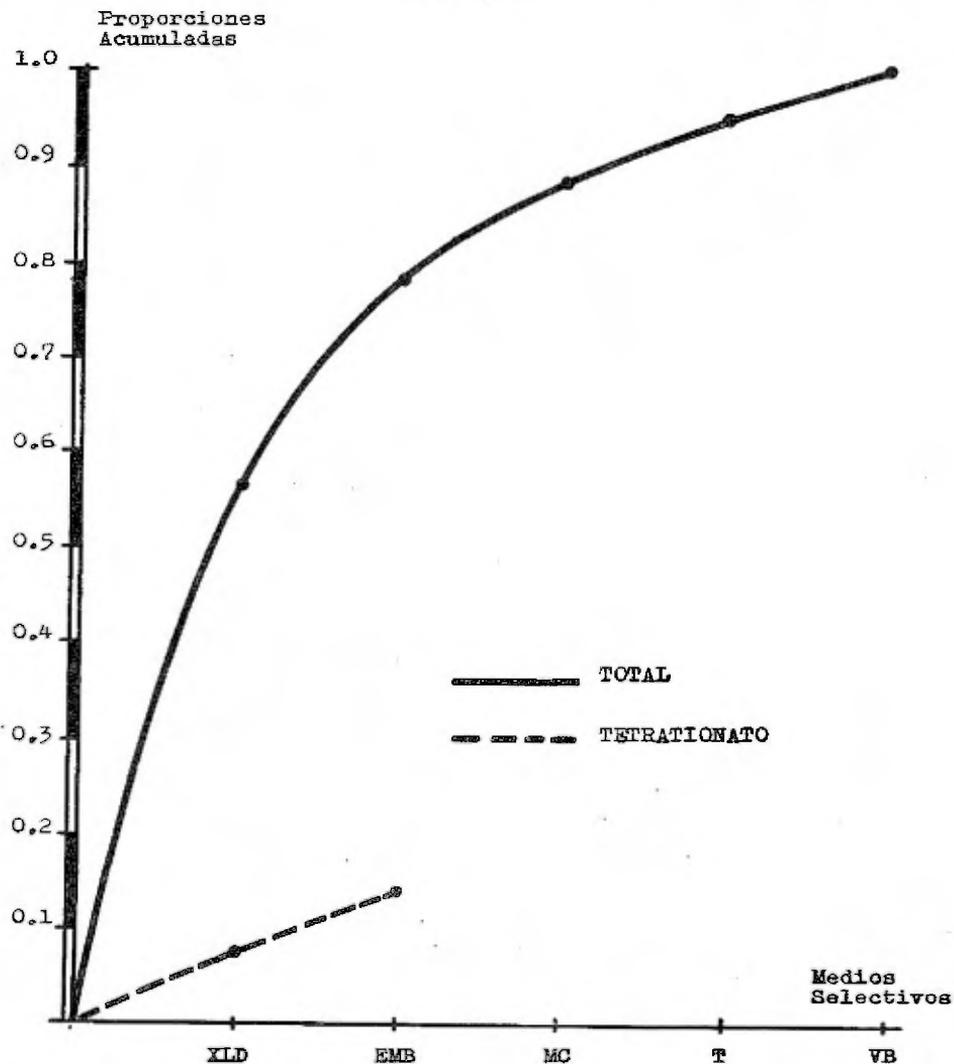
GRAFICA 11

DISTRIBUCION PROPORCIONAL ACUMULADA DEL AISLAMIENTO DE E. COLI ENTEROPATOGENO DE ACUERDO AL MEDIO DE CULTIVO.



GRAFICA 13

AISLAMIENOS DE E. COLI ENTEROPATOGENO DE COPROCUITIVOS
EN PROPORCIONES ACUMULADAS DE ACUERDO A LOS MEDIOS SE-
ÑALADOS.



CUADRO 18

Número de E. coli enteropatógenos aislados en cultivos directo y en los tres medios de enriquecimiento conforme a un medio selectivo determinado.

Medios Selectivos	Total
XLD	38
EMB	14
MC	6
T	5
VB	3
Total	66

Hospital del Niño IMAN
7 agosto - 20 diciembre 1972

CUADRO 19

Distribución de las diferentes cepas de E. coli enteropatógenos que únicamente fueron aislados en el medio indicado.

Sin Enriquecimiento	Enriquecimiento	Selectivos					Total
		EMB	MC	XLD	T	VB	
Directo	-	1	1	7	5	-	14
-	Tetracionato	3	0	2	-	0	5
-	Selenito	1	2	5	-	0	8
-	Gram Negativo	3	2	4	-	3	12
Total		8	5	18	5	3	39

Finalmente, los diferentes tipos antigénicos de E. coli obtenidos están señalados en el cuadro 20, obteniéndose 27 del grupo A, predominando el tipo 026 con 9, el 055 con 8, el 0111 con 6 y el 0127 con 4; al grupo B correspondieron 39, siendo el más frecuente el 086, siguiendo en frecuencia decreciente el 0125, 0126, 0124, 0128 y 0119.

CUADRO 20

Distribución de las cepas de E. coli enteropatógenos aislados en 413 coprocultivos según su clasificación antigénica en grupos y tipos.

Grupo	026	055	0111	0127	086	0119	0124	0125	0126	0128	Total
A	9	8	6	4							27
B					12	1	6	10	8	2	39
Total	9	8	6	4	12	1	6	10	8	2	66

Hospital del Niño IMAN

7 agosto - 20 diciembre 1972

C A P I T U L O I V

D I S C U S I O N

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio confirmaron lo observado por diferentes autores: que algunos medios de cultivo son excelentes para el aislamiento de Salmonella o Shigella; así Kauffman en 1935 y Galton informaron del aumento de los aislamientos de Salmonella de hasta 164 % mediante el uso de la combinación de caldo - tetracionato y VB (10) y en el caso de Shigella, Taylor mejora el porcentaje de aislamientos mediante un nuevo medio, XLD.

En el Laboratorio de Bacteriología en el que se llevó a cabo esta investigación el uso de la combinación de 16 medios dió como resultado un porcentaje bastante elevado en aislamientos de cepas de enteropatógenos.

En lo que se refiere a S. typhosa, como ya fué mencionado, se obtuvo un porcentaje de cultivos positivos de 20.2 que indicaría un número menor al reportado por la literatura, pero cabe enfatizar que muchos de ellos fueron obtenidos durante el tratamiento con antibióticos y algunos, de personas en contacto directo con los enfermos de fiebre tifoidea por lo que se cree el hecho muy justificado de haber obtenido un mayor número de cultivos negativos.

Los cuadros y las gráficas muestran el aislamiento de los diferentes enteropatógenos en los diversos medios de cultivo, observándose en el caso de Salmonella, Shigella y E. coli enteropatógeno la obtención del mismo germen, tanto desde la siembra directa como en los medios selectivos utilizados después del enriquecimiento; sin embargo también se observó que 35 de 73 cepas de Salmonella única - mente se aislaron en un sólo medio como lo indica el cuadro 5, en el caso de Shigella fueron 4 de 27, tratándose de S. typhosa 34 de 77 cepas aisladas y para E. coli enteropatógeno 39 de 66; por lo que se cree que la presencia de enteropatógenos no puede ser determinada utilizando un medio único sino que se requieren varios; así, si se utilizara únicamente XLD obtendríamos 4 salmonelas de las 73 cepas aisladas, 23 Shigella sp. y 19 E. coli enteropatógeno de los 152 cultivos positivos obtenidos o sea un porcentaje de 30.26; XLD combinado con tetracionato proporcionó 5 cepas diferentes de Salmonella sp., ninguna cepa de Shigella sp., y 5 cepas de E. coli enteropatógeno o sea 6.57 %; XLD más selenito proporcionó 2 cepas de Salmonella sp., cero de Shigella y 5 de E. coli enteropatógeno lo

que hace un porcentaje de 4.60; con XLD más GN se obtuvieron cero cepas de Salmonella sp., cero de Shigella y 4 de E. coli enteropatógeno o sea 2.65 %.

Si el medio que se utilizara fuera MC, las cepas aisladas en siembra directa hubieran sido 6 de Salmonella sp., 1 de Shigella y 2 de E. coli enteropatógeno haciendo un total de cepas aisladas de 9 que corresponde a un porcentaje de 5.92; MC combinado con tetracionato proporcionó 7 cepas de Salmonella diferentes; cero de Shigella y cero de E. coli enteropatógeno o sea 4.60 %; MC con selenito detectó únicamente 5 cepas de Salmonella sp., cero de Shigella y 2 de E. coli enteropatógeno haciendo un porcentaje igual al anterior; MC más GN proporcionó 4 cepas de Salmonella sp., cero de Shigella y 2 de E. coli enteropatógeno, el porcentaje de aislamientos fué de 3.94. El tergitol, que únicamente se usó en siembra directa, proporcionó 1 cepa diferente de Salmonella sp., cero de Shigella y 7 de E. coli enteropatógeno o sea un porcentaje de 5.26.

EMB no proporcionó ningún aislamiento nuevo en el caso de Salmonella y E. coli enteropatógeno pero en el caso de Shigella fueron 3 las cepas diferentes detectadas con dicho medio, por lo que se considera un gasto excesivo para el poco rendimiento que produce.

Al usar tetracionato como caldo de enriquecimiento más los tres medios selectivos se obtuvieron 40 cepas de Salmonella, cero de Shigella y 9 de E. coli enteropatógeno o sea un porcentaje de 32.23. Selenito combinado con los medios selectivos proporcionó 10 cepas de Salmonella, cero de Shigella y 8 de E. coli enteropatógeno haciendo un porcentaje de 11.84. Si el caldo de enriquecimiento es GN, las cepas aisladas son: para Salmonella 6, para Shigella cero y para E. coli enteropatógeno 12 o sea 11.84 %.

Usando las 16 combinaciones o sean 5 medios diferentes en placa y 3 líquidos de enriquecimiento se obtuvieron 152 enteropatógenos diferentes de las 413 muestras fecales trabajadas; en el caso de usarse sólo la siembra directa se obtendrían en este lote de coprocultivos sólo 70 casos de bacterias enteropatógenas (Salmonella, Shigella y E. coli enteropatógeno) o sea 52.63 %, si a esta siembra se añade el tetracionato sembrado en VB, MC, XLD y EMB se obtendrían 119 o sea 78.29 % si a estas cepas aisladas se le adicionan las detectadas en selenito y sus combinaciones obtendríamos 127 (83.42 %). Las ganancias aportadas al utilizar GN sembrado en las cuatro placas ya

mencionadas se limitaron casi exclusivamente a detectar E. coli enteropatógeno y en lo que se refiere a *Salmonella* sp. la ganancia fué bastante pequeña; únicamente 6 cepas diferentes.

Al observar los datos proporcionados anteriormente destaca el hecho de que todas las cepas de *Shigella* aisladas, fueron detectadas únicamente en siembra directa, ésto se debe a su gran labilidad por lo que las características de los medios de aislamiento deben de ser muy especiales, es decir, que no contengan sustancias nocivas a ellas, no soportando la presencia de inhibidores muy poderosos o en altas concentraciones como lo son el verde brillante, yodo o sales de selenio que constituyen la base de los medios de enriquecimiento; de una manera semejante la ausencia de E. coli enteropatógeno en los caldos de enriquecimiento puede deberse probablemente a la misma razón. Por consiguiente además de lo ya expresado, la siembra directa es indispensable en la elaboración de un coprocultivo. Por el contrario en el caso de *Salmonella* sp. y S. typhosa la mayoría de ellas fueron aisladas en resiembras de medios de enriquecimiento que contienen sustancias que inhiben en parte las bacterias constituyentes de la flora normal que pudieran enmascarar la presencia de bacterias enteropatógenas. Así pues la mayoría de las cepas de *Salmonella* sp. se aislaron en VB y tetracionato siendo éste un medio que contiene suficiente inhibidor y en lo que se refiere a S. typhosa casi el total de cepas identificadas se obtuvieron de SS y selenito, conteniendo el SS como inhibidor además de verde brillante una mezcla de sales biliares.

Por todo lo anterior, lo ideal sería que se utilizaran los 5 medios en placa y los tres medios líquidos de enriquecimiento con sus combinaciones, pero debido muchas veces a la cantidad de trabajo existente en los laboratorios clínicos ésto es imposible; por los datos obtenidos en el presente trabajo se recomienda la siembra directa en tergitol, MC y XLD que proporcionaron 63 de las 152 cepas de enteropatógenas identificadas o sea 41.44 %, seguida de la siembra en medios selectivos VB, MC y XLD del caldo de enriquecimiento tetracionato, estas combinaciones proporcionaron 45 cepas nuevas o sea un aumento de 29.60 %.

En cuanto a S. typhosa, la siembra directa aportó únicamente una cepa, cuando las muestras fueron sembradas en medio líquido de enriquecimiento tetracionato y resembradas en los medios selectivos de

EMB, XLD y SS se identificaron 6 nuevas cepas pero al usar selenito y resembrar en SS las cepas diferentes identificadas fueron 60 del total de 77 aisladas.

Como puede observarse lo más útil para evitar fallas en el aislamiento de S. typhosa es especificar si se sospecha clínicamente de fiebre tifoidea con objeto de sembrar la muestra en selenito y SS además de los otros medios o mejor aún sembrar todos los coprocultivos tanto en selenito como en tetracionato y SS.

La explicación de que algunas cepas crezcan indistintamente en los diversos medios de cultivo probablemente es debida a sus requerimientos esenciales nutricionales, deficiencias o dependencias genéticas condicionadas, algunas por fenotipos característicos constitutivos o debidas a mutaciones (6). También deben tenerse en cuenta otros mecanismos de pérdida o ganancia en nuevas características genéticas debidas a los múltiples cambios a que las Enterobacteriaceas están sujetas debido a los fenómenos de transducción, conjugación y quizá alguno o varios cuya naturaleza aún se desconoce (7, 8).

R E S U M E N

RESUMEN

Se investigó la presencia de bacterias enteropatógenas en 413 muestras fecales utilizando 16 diferentes combinaciones de medios de cultivo que incluyeron siembras directas y siembras de enriquecimiento obteniéndose un total de 152 cepas enteropatógenas. La siembra directa proporcionó 70 cepas diferentes o sea 52.63 %; el empleo de siembra directa más tetracionato en los tres medios selectivos detectaron 119 o sea 78.29 %; cultivo directo más selenito con sus respectivas combinaciones proporcionaron 88 nuevas cepas o sea 57.89 % y GN sembrado en las tres placas ya mencionadas, más la siembra directa dieron un total de 88 cepas, se aisló casi exclusivamente E. coli enteropatógeno.

El EMB detectó cepas de Salmonella que fueron encontradas en los demás medios por lo que no se considera indispensable su uso, si se emplean los ya mencionados.

Se encontró Salmonella sp. en un mayor número de casos al utilizar VB más tetracionato. Las cepas de Shigella se aislaron de siembras directas en XLD, así como E. coli enteropatógeno también en siembra directa de XLD; en lo que se refiere a S. typhosa los resultados mostraron que el empleo de selenito y SS es el más adecuado.

Se sugiere la posibilidad de utilizar por lo menos tres medios en placa para siembra directa: XLD, MC y tergitol, seguido de la siembra en un caldo de enriquecimiento tetracionato resemebrándolo posteriormente en VB, XLD y MC para encontrar un mayor número de enteropatógenos.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arroyo, P. y G. Reyes. 1973. Tendencia de la mortalidad post-neonatal y del segundo año de la vida en el Distrito Federal en el período 1963 - 1970. XXXVI Reunión de la Asociación de Investigación Pediátrica. pp. 96 - 108. México
- 2.- Davis, B.D., R. Dulbecco. 1970. Microbiology. A Harper International Edition. pp. 90 - 91. New York
- 3.- DIFCO Manual, 9th Ed., 1964. DIFCO Laboratories. pp. 199 - 250 Michigan, U.S.A.
- 4.- Edwards, P.R. and W.H. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceas. 3rd Ed. Burgess Publishing Company. pp. 7 - 19. Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
- 5.- Hajna, A.A. 1955. A new enrichment broth medium from Gram-negative organisms of the intestinal group. Public Health Lab., 13: 83 - 89
- 6.- Hayes, W. 1965. The expression of mutations. The genetics of bacteria and their viruses. John Wiley and Sons Inc. pp. 199 - 218. New York
- 7.- Hayes, W. 1965. Transduction. The genetics of bacteria and their viruses. John Wiley and Sons Inc. pp. 523 - 550. N.Y.
- 8.- Hayes, W. 1965. Conjugation. The genetics of Bacteria and their viruses. John Wiley and Sons Inc. pp. 551-593. New York
- 9.- Holt-Harris, J.E. and O. Teague. 1916. A new culture medium for the isolation of Bacillus typhosus from stools. J. Inf. - Dis., 18: 596 - 600
- 10.-Kauffman, F. 1966. The Bacteriology of Enterobacteriaceas. Copenhagen: Munksgaard.
- 11.- Leifson, E. 1936. New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (Salmonella) bacilli. Am. J. Hyg., 24: 423 - 432
- 12.- Mac Conkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. J. Hyg., 2: 333 - 379
- 13.- Secretaría de Industria y Comercio. 1971. Mortalidad por enteritis y otras enfermedades diarreicas en menores de 1 año. Distrito Federal. 1963 - 1971. México

- 14.- Secretaría de Industria y Comercio. 1971. Mortalidad por enteritis y otras enfermedades diarreicas en menores de 1 a 4 años. Distrito Federal. 1963 - 1971. México
- 15.- Taylor, W.I. 1965. Isolation of Shigellae. A.J. Clin. Path., 44: 471 - 475

"TESIS ESTRELLA"

TELS: 521-20-73

526-01-76