

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



FALLA DE ORIGEN

**"DETERMINACION DE LA SELECTIVIDAD DE UN CALDO DE ENRI-
QUECIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO O RECUPERACION DE
PLESIOMONAS SHIGELLOIDES Y AEROMONAS SP."**

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN LETICIA VIVANCO DE LA PAZ
A S E S O R
Q.F.B. MARIA DEL SOCORRO PULIDO GARCIA
GUADALAJARA, JALISCO 1 9 8 8



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.

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
2.- GENERALIDADES	5
2.1 Taxonomía, Clasificación y Nomenclatura	6
2.1.1 Taxonomía	6
2.1.2 Clasificación y Nomenclatura	6
2.2 Aspectos Microbiológicos de <u>Aeromonas sp.</u>	15
2.2.1 Caracteres morfológicos y coloniales	15
2.2.2 Requerimientos para su aislamiento y cultivo	17
2.2.3 Características bioquímicas	18
2.2.4 Producción de hemólisis	21
2.2.5 Estructura antigénica y factores de patogenicidad.	22
2.3 Aspectos ecológicos y epidemiológicos de <u>Aeromonas sp</u>	23
2.4 Aspectos microbiológicos de <u>Plesiomonas shigelloides</u>	29
2.4.1 Caracteres morfológicos y coloniales	29
2.4.2 Requerimientos para su aislamiento y cultivo	30
2.4.3 Características bioquímicas	31
2.4.4 Producción de hemólisis	32
2.4.5 Estructura antigénica y factores de patogenicidad.	33
2.5 Aspectos ecológicos y epidemiológicos de <u>Plesiomonas shigelloides</u>	34
2.6 Aspectos clínicos de las infecciones causadas por -- <u>Aeromonas sp. y Plesiomonas shigelloides.</u>	36
3.- MATERIAL Y METODO	39
3.1 Procedencia y selección de cepas	39

3.2 Metodología microbiológica	39
3.2.1 Estandarización de las cepas	39
3.2.2 Inoculación en caldos de enriquecimiento	40
3.2.3 Valoración del desarrollo	46
3.2.3.1 Método turbidimétrico	46
3.2.3.2 Método por recuento de colonias	48
4.- RESULTADOS	51
5.- DISCUSION Y CONCLUSIONES	67
6.- BIBLIOGRAFIA	72

1.- INTRODUCCION

Los géneros de la familia Vibrionaceae; Aeromonas y Plesiomonas, se encuentran entre los llamados nuevos agentes productores de diarrea en el humano.

La cepa original de Aeromonas fue aislada por Ernst en 1890, de una zoonosis llamada enfermedad de la pata roja de las ranas, y no fue sino hasta la década de los años sesenta, cuando se empezaron a efectuar: numerosos aislamientos, particularmente de heces humanas (22).

Aeromonas se identificó por primera vez en 1937 a partir de huevecillos, y posteriormente se consideró parásito de peces reptiles y anfibios (26).

En 1947 Ferguson y Henderson aislaron un bacilo gram negativo anaeróbico, fermentador lento de la lactosa, que posea un antígeno O idéntico a Shigella sonnei en su fase 1 y lo llamaron grupo C-27 pero móvil a diferencia de Shigella sonnei.

Plesiomonas fue clasificada por Bader en 1954 dentro del género Pseudomonas, posteriormente en 1961 fue transferida por Ewing al género de Aeromonas (2).

Finalmente hasta 1962 Habs y Schubert crearon el género Plesiomonas, basándose en diferencias morfológicas y bioquímicas.

cas que la hacen distinta de las enterobacterias, en particular por ser oxidasa positiva y porque estos microorganismos no exhiban características de Aeromonas o Vibrio.

En base a la referencia que se hace de estos microorganismos como causantes de problemas gastrointestinales se consideró de importancia evaluar la recuperación de Aeromonas sp y Plesiomons shigelloides, a partir de los caldos de enriquecimiento convencionales como son Hajna y Selenito y establecer mediante los resultados, cual es el caldo de enriquecimiento óptimo para la recuperación de dichos géneros bacterianos, y en un momento dado recomendarlos para su utilización en Laboratorios de Diagnóstico Microbiológico.

No está documentado si los géneros de Aeromonas y Plesiomonas pueden recuperarse de los caldos de enriquecimiento ordinarios para un coprocultivo, en la clínica de diarrea de la Universidad de Houston; en la Universidad Autónoma de Guadalajara, se utilizan los caldos de enriquecimiento Hajna y Selenito para estudios de rutina de coprocultivos y algunas veces se han aislado estos géneros.

Sabemos que en un coprocultivo debe utilizarse un caldo de enriquecimiento selectivo para el aislamiento de patógenos convencionales como son los géneros de Salmonella y Shigella.

Es bien conocido que salmonella se recupera con facili-

dad de un caldo de enriquecimiento como es el Selenito, aunque también es posible recuperarla del caldo Hajna.

En el caso de Shigella, se sabe que algunas son inhibidas por Selenito, por lo que, en los estudios de diarrea de todo el mundo se utiliza preferentemente el caldo Hajna.

Algunos centros de investigación tienen inclinación por el caldo Selenito por su mayor selectividad, uno de estos Centros de Investigación es la Clínica de Diarrea de la Universidad de Houston en la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Junto con los patógenos convencionales debe investigarse la presencia de Campylobacter, Aeromonas y Plesiomonas, ya como una metodología de rutina.

No está establecido si es factible o no la recuperación de Plesiomonas shigelloides a partir de un caldo de enriquecimiento, y, en algunos casos es posible recuperar cepas de Aeromonas de los medios para Enterobacterias, como son McConckey, XLD y SS.

Tampoco está documentado si estos medios o caldos de enriquecimiento son recomendables o no para el aislamiento de Aeromonas.

La importancia y justificación de este estudio también -

se basa en que ambos géneros han sido encontrados en un mismo -
paciente; probablemente por la fuente de contaminación que es -
el agua.

El número de informes de infección general en individuos -
normales parece ir en aumento, más frecuentemente en casos de -
gastroenteritis, causadas principalmente por estos dos géneros,
por lo que es de vital importancia saber con certeza si - - -
pueden utilizarse o no tales caldos de enriquecimiento.

2.- GENERALIDADES

2.1 TAXONOMIA, CLASIFICACION Y NOMENCLATURA.2.1.1 TAXONOMIA.

BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS

FAMILIA II. VibrionaceaeGénero I. VibrioGénero II. PhotobacteriumGénero III. AeromonasGénero IV. Plesiomonas

2.1.2. CLASIFICACION Y NOMENCLATURA.

La familia Vibrionaceae se caracteriza por ser bacilos -- gram negativos, que pueden ser rectos y curvos, y su movilidad está identificada por un flagelo polar, son organismos quimioorganotróficos y anaerobios facultativos, por lo que son capaces de tener un metabolismo respiratorio y fermentativo.

La mayoría son oxidasa positiva, todos utilizan la glucosa como única o principal fuente de carbono y energía. Utilizan sales de amonio como único recurso de nitrógeno, la mayoría de los géneros requieren de 2 a 3% de cloruro de sodio o una base de agua de mar para su crecimiento óptimo.

Cuando la familia Vibrionaceae fue propuesta por Veron en 1965, su primera intención fue de agrupar un número de géneros con sus especies, las cuales fueron para la mayoría oxidasa positiva y móviles por el significado del flagelo polar.

Esta agrupación fue necesariamente significativa, ya que se llevó a cabo con el propósito de diferenciar estos organismos de la familia Enterobacteriaceae, la cual la mayoría de sus especies son oxidasa negativa y son móviles pero por un flagelo peritrico.

Subsecuente a este estudio se procedió con la fisiología comparativa y genética de miembros de las familias vibrionaceae y Enterobacteriaceae, y, establecieron que estos microorganismos comparten un número de atributos distintivos los cuales tienen un alto grado de complejidad.

Los miembros del género Aeromonas están ahora claramente diferenciados de los miembros de la familia Enterobacteriaceae y de los miembros del género Pseudomonas y Vibrio; sin embargo la clasificación de Aeromonas como un nivel específico no ha sido establecido.

En base a las características morfológicas, fisiológicas de cultivo y bioquímicas Smith en 1963 propuso un nuevo género "Necromonas" para acomodar las cepas de Aeromonas salmonicida.

El nombre de "Necromonas salmonicida" fue sugerido como --

una alternativa para las cepas con pigmento café de A. salmoni-
cida y "Necromonas achromogenes" como una alternativa a las ce-
pas "no pigmentadas de A. salmonicida". Los estudios homólogos
del DNA no aceptan esta proposición, sin embargo, desde que --
las cepas de A. salmonicida pigmentadas y no pigmentadas mos-
traron un alto grado de crecimiento homólogo con especies de -
Aeromonas móviles.

Además el nombre genérico de "Necromonas" no fue incluido
en la última edición del Manuel Bergy's y no apareció en las -
Listas Aprobatorias de los Nombres Bacterianos. En los últimos
tiempos, "N. salmonicida" y "N. achromogenes" son sinónimos -
de Aeromonas salmonicidas y sus variantes no pigmentadas.

Schubert (1967-1969) propuso la diferenciación de A. sal-
monicida en 3 sub-especies:

- A. salmonicida sub-especie salmonicida
- A. salmonicida sub-especie achromogenes
- A. salmonicida sub-especie masoucida.

Estas tres sub-especies pueden distinguirse por sus carac-
terísticas bioquímicas presentadas en la tabla 2.1.

Pero A. salmonicida sub-especie salmonicida y A. salmoni-
cida sub-especie masoucida, parecen ser grupos genéticos homó-
géneos por estudios homólogos del DNA. Sin embargo, no hay evi

dencia de que A. salmonicida sub-especie masoucida y posiblemente otros aislamientos bioquímicamente atípicos de A. salmonicida garanticen el estado de las sub-especies presentes; El nombre de estas tres sub-especies fue incluido en las listas Aprobatorias de los Nombres Bacterianos.

La clasificación de especies de Aeromonas móviles es compleja la controversia proviene de la discordancia que existe entre los puntos de vista de diferentes colaboradores. La opinión de Ewing y colaboradores en 1961, Eddy y Carpenter en -- 1964 y Mc Carthy en 1975 favorecen una sola especie de todas las Aeromonas móviles.

Schubert (1967-1969), reconoce dos especies separadas -- con varias sub-especies y biotipos. Popoff y colaboradores en 1981, dividen las Aeromonas móviles en tres especies en base a evidencias fenotípicas y genéticas, estas tres especies son llamadas:

Aeromonas hydrophila, Aeromonas Caviae y Aeromonas sobria.

Las características diferenciales fenotípicas se indican en la tabla 2.1.

La composición del oligosacárido central de Aeromonas móviles fue analizada por Shaw y Hadder en 1978. Las cepas fueron examinadas con respecto a los residuos de monosacáridos -

hexosa y heptosa presentes en la región central de la membrana lipopolisacárida de la célula.

En base a las varias combinaciones de los residuos de hexosa y heptosa, Aeromonas móviles están en tres grupos distintos, separados, que corresponden respectivamente a A. hydrophila, A. caviae y A. sobria.

De los estudios de hibridación del DNA usando el método - S1-nucleasa (Popoff y Colab. 1981), A. hydrophila, A. caviae y A. sobria muestran homología de inter-especies DNA/DNA valuadas entre 35-50% con 8-12% de divergencia. Estos valores de hibridación del DNA son consistentes en el criterio requerido para definir grupos a niveles de especies (Brenner y Colab. --- 1972), sostienen la diferenciación entre A. hydrophila, A. caviae y A. sobria, a niveles de especie más que a niveles de sub especies.

Cada una de estas tres especies contienen más de un grupo de hibridación del DNA; 3 grupos de hibridación pueden ser delineados en A. hydrophila, 2 grupos en A. caviae, y, al menos 2 grupos en A. sobria.

Dentro de cada uno de estos grupos de hibridación, las cepas muestran valores homólogos del 70 al 97% (con un 1 a 4% de divergencia) a la cepa de referencia.

Desafortunadamente estos grupos de hibridación del DNA, dentro de especies están muy lejos de ser bioquímicamente distinguibles una de otra.

Pendiente a estudios fenotípicos posteriores parece estar el hecho de separar Aeromonas móviles hasta que el significado taxonómico de los grupos de hibridación del DNA dentro de estas especies pueda ser precisamente establecido.

Una bacteria halofílica gran negativa, aislada del intestino de un isópodo marino (*Isonoria tripunctata*) por Merkel y Traganza en 1958. En base a su flagelación polar, a la acción fermentativa de carbohidratos y a la reacción positiva de la oxidasa, fue clasificada en el género de Aeromonas como nuevas especies; "Aeromonas proteolytica" (Merkel y Colab. 1964).

Esta clasificación fue sostenida por Schubert en 1969, -- quien renombró el organismo A. hydrophila sub-especie proteolytica. Sin embargo, esta cepa difiere de las especies móviles -- de Aeromonas como sigue:

- a) Fenotípicamente: por sus requerimientos de ión sodio.
- b) Genotípicamente: por un Mol% G+C contenido del 50% de su DNA, el cual está fuera del rango reportado para Aeromonas móviles (57-62%). Estas diferencias junto con una falla en la reacción con 6 antisueros de A. hydrophila son razones convincentes para excluir A. --

hydrophila sub-especie proteolytica del género de Aeromonas.

PLESIOMONIAS:

Ferguson y Henderson en 1947 asignaron a una cepa "C-27" ahora una cepa referente a Plesiomonas shigelloides designada ATCC 14030 en "paracolon" de la familia Enterobacteriaceae, pero no se asignó un epíteto específico. El epíteto shigelloides presente específico es debido a Baker (1954), quien por la flagelación polar del organismo clasificó las especies en el género de Pseudomonas, sin embargo, distinto a Pseudomonas las especies fueron capaces de fermentar por lo que fueron transferidas al género de Aeromonas por Ewing y colaboradores en 1961.

Esto fue seguido por su transferencia al nuevo género; -- Plesiomonas, creado por Habs y Schubert en 1962.

La creación de este género fue inevitable porque las cepas de P.shigelloides no exhiben características esenciales de Aeromonas o vibrio.

Plesiomonas se caracterizan por poseer de 2 a 5 flagelos polares lofótricos, y, en el caso de Aeromonas y Vibrio los -- flagelos de sus especies son monótricos.

Plesiomonas carece de exoenzimas, mientras que Vibrio y -

Aeromonas generalmente producen lipasa, desoxirribonucleasa -- DNASA) y varias protefnas como gelatinasa y caseinasa, aunado a que Plesiomonas fermenta Inositol, mientras que esto es raro en Aeromonas y Vibrio, Plesiomonas también difiere de miembros de Aeromonas y Vibrio, por un rango limitado de fermentación de carbohidratos (Eddy y Carpenter 1965), y, por su composición en base al DNA.

Solo hay una especie en el género Plesiomonas:

Plesiomonas shigelloides; presente en pescados y otros animales acuáticos y en una variedad de mamíferos.

El Mol % G + C del DNA es 51%.

Tabla 2.1 Diferencias entre A. hydrophila, A. caviae, A. sobria, A. salmonicida y Plesiomonas shigelloides.

Carac.	A. hydrophila	A. caviae	A. sobria	A. salmonicida, subsp. achrom.	subsp. mascucida	P. shig.
Movilidad	+	+	+	-	-	+
Flagel. monotricos en medio liquido.	+	+	+	-	-	-
Flagel. lofotricos en medio liquido.	-	-	-	-	-	+
Cocobac. en pares cadenas y racimos.	-	-	-	+	+	-
Bacilos solos y pares	+	+	+	-	-	+
Pigmento café soluble	-	-	-	+	-	-
Crecimiento en caldo nutritivo a 37°C.	+	+	+	-	-	+
Producción de indol en 1% de agua pepton.	+	+	+	-	+	+
Hidrolisis esculina	+	+	-	+	-	+
crecimiento en caldo KCN	+	+	-	-	-	-
Utilización de L-Histidina y L-arginina.	+	+	-	-	-	-

Cont. tabla 2.1

Carac.	A hydrophila	A caviae	A sobria	A. salmonicida subsp. salm	achrom	masucida	P shig.
Utiliza. L-arabfnosa	+	+	-	+	-	+	-
Fermentac. salicina	+	+	-	d	d	d	-
Fermentac. sacarosa	+	+	+	-	+	+	-
Ferment. de manitol.	+	+	+	+	-	+	-
Voges-Proskauer	+	-	d	-	-	+	-
Gas de glucosa	+	-	+	+	-	+	-
H ₂ S de cisteina	+	-	+	-	-	+	-

2.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE AEROMONAS SP

2.2.1 Caracteres morfológicos y coloniales.

Son células rectas, en forma de bacilo, con terminaciones redondeadas, miden de 0.3 a 1.0 μ de diámetro por 1.0 a 3.5 μ de longitud aparecen solas, en pares o en pequeñas cadenas, son gram negativas, generalmente móviles por un flagelo polar simple, el flagelo peritrico se puede formar en medios sólidos en cultivos jóvenes, solo una especie es inmóvil *A. salmonicida*. - Son anaerobios facultativos, los carbohidratos se reducen a ácido o a ácido y gas (CO_2 , H_2). El nitrato es reducido a nitrito, son oxidasa positiva, catalasa positiva, la temperatura óptima de crecimiento es de 22 a 28°C, algunas cepas no crecen a 35°C, son resistentes a los agentes vibriostáticos; 2,4-diamino-6,7--dihidro-5H-pteridina (O-129).

Son quimiorganotróficos, usando una gran variedad de azúcares y ácidos orgánicos como fuente de carbono. Aparecen en --- aguas frescas y desagües. Algunas especies son patógenas de los sapos y pescados.

Características morfológicas de las especies de Aeromonas.

a) *A. hydrophila*: bacilos rectos, miden de 0.3 a 1.0 μ de diámetro y 1.0 a 3.5 μ de longitud, móviles por un flagelo único polar en medio líquido; el flagelo peritrico puede aparecer en medios sólidos en cultivos jóvenes, son no encapsulados. La

temperatura máxima de crecimiento es de 28°C.

En agar nutritivo las colonias son de blanco a color de ante, circulares y convexas con bordes enteros.

b) A. caviae: Las características son las indicadas para A. hydrophila.

c) A. sobria: Las características morfológicas también son las indicadas para A. hydrophila.

d) A. salmonicida: Cocobacilos gram negativos, longitud dos veces menor que su anchura, en caldo nutritivo se forman pares, cadenas y racimos en preparaciones observadas en contraste de fases, no móviles, no capsulados, se temperatura máxima de crecimiento es de 22 a 25°C, las colonias son circulares, lisas translúcidas y friables.

d₁) A. salmonicida sub-especie salmonicida: Las cepas -- producen una pigmentación café soluble en agua, en un medio que contiene 0.1% de tirosina o fenil alanina, no produce indol.

d₂) A. salmonicida sub-especie achromogenes: Las cepas -- no producen pigmento café soluble en agua, pueden producir indol.

d₃) A. salmonicida sub-especie masoucida: Las cepas no producen pigmento café soluble en agua, producen indol.

2.2.2. Requerimientos para el aislamiento y cultivo..

Las cepas de Aeromonas salmonicida pueden ser aisladas en agar tripticosa soya.

Las cajas inoculadas son incubadas a una temperatura de 22 a 25°C por 48 horas, y son revisadas para observar el desarrollo de pequeñas colonias produciendo oxidasa y pigmentación café.

A. salmonicida crece aisladamente en medios selectivos para Enterobacterias.

En ambos casos; pescados y portadores sanos, el riñón es el órgano del cual A. salmonicida es el más fácilmente aislado (generalmente en cultivos puros).

Las cepas de las especies de Aeromonas móviles han sido aisladas en agar nutritivo o en agar tripticosa soya. Las Aeromonas móviles también crecen bien en algunos medios selectivos para Enterobacterias. Las colonias son generalmente lactosa negativa en este medio, pero algunas cepas pueden desarrollar colonias con fermentación de la lactosa. El crecimiento de estas bacterias es generalmente inhibido en agar tiosulfa-

to citrato-bilis-sal-sacarosa (TCBS), este es un medio selectivo para el aislamiento de Vibrio y Cholerae.

Von Gravenitz y Zenterhofer en 1970 describieron un "medio suplementado con DNasa", basado en la producción de desoxirribonucleasa por cepas de Aeromonas.

"Shotts-Rimler agar" (Shotts y Rimler en 1970), que contiene novomicina y "Prill-Xilosa-Ampicilina agar", fueron también propuestos para el aislamiento de Aeromonas móviles.

Las cepas de Aeromonas pueden ser conservadas en agar -- tripticasa soya, después de la incubación para permitir un -- buen crecimiento, los cultivos deben permanecer en el refrigerador de 4 a 8°C por lo menos un mes, también deben ser conservadas en hielo seco.

2.2.3 Características bioquímicas.

Las características bioquímicas de las Aeromonas han sido estudiadas por Ewing y Colab (1961), Eddy (1960-1962), --- Smith (1963) Popoff (1969), Mc Carhy (1975) y Popoff y Veron (1976), (22).

El ácido es producido por todas las cepas de Aeromonas - poseen gelatinasa, desoxirribonucleasa, ribonucleasa y esterasa.

El sulfuro de hidrógeno no es producido del tiosulfato.

Los siguientes carbohidratos son fermentados esencialmente por A. salmonicida; arabinosa, trihalosa, galactosa, manosa y dextrosa.

Los siguientes exámenes bioquímicos son universalmente negativos para A. salmonicida; crecimiento en KCN, crecimiento en caldo nutritivo que contiene 7.5% de cloruro de sodio, ureasa, descarboxilasa ornitina (ODC), reductasa, tetratona-to y acidificación del medio conteniendo ramosa, sorbitol, lactosa, rafinosa y celulosa.

La arginina es catabolizada por A. salmonicida en un sistema de arginina-dihidrolasa (ADH). Arginina diemidase, ornitina transcarbunilasa, carbamil fosfoquinasa, carbamil fosfatasa, tri-di-adenosina y monofosfatasa han sido demostradas en extractos de células de A. salmonicida. Cepas de A. salmonicida pueden crecer en el medio químicamente definido, desarrollado por O'Leary (1956).

Los exámenes fisiológicos siguientes son universalmente positivos para especies de Aeromonas móviles:

Catalasa, hidrólisis almidón, lecitina, fosfatasa, ADH, hidrólisis de O-nitrofenil-b-D-galactopiranosida (O-NPG).

Crece en caldo nutritivo con cloruro de sodio y fermentan el manitol, trialosa, fructosa, galactosa y dextrina.

Los siguientes exámenes son universalmente negativos para Aeromonas móviles:

Pectina, ODC, triptofán, deaminasa, y fenil alanina, crecidas en agar cetrimida, crecidas en caldo nutritivo que contiene 5% de NaCl, y hay producción de ácido de sorbosa, eritrol y rafinosa.

Los siguientes compuestos sirven como recurso universal de carbono para especies de Aeromonas móviles:

D-ribosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-maltosa, D-trialosa, D-gluconato, caprilato, pelargonato, caprato, succinato, fumarato, D-L-glicerato, L-malato, glicerol, D-manitol, L-aspartato y L-glutamato.

Las características y diferencias bioquímicas son presentadas en las tablas 2.1 y 2.2

Tabla 2.2. diferencias bioquímicas de los géneros de Aeromonas, Plesiomonas, Pseudomonas y familia Enterobacteriaceae.

Prueba:	Aeromonas	Plesiomonas	Vibrios	Pseudomonas	Enterobac.
Oxidasa	+	+	+	+	-
Oxid-ferment.	F	F	F	O	F
Ferment.: sacarosa	+	-	+	NC	V
inositol	-	+	-	NC	V
manitol	+	-	+	NC	V
Citrato (Simmons)	+	-	+	+	V
Gelatina licuef.	+	-	+	+	V
Ornitina descarb.	-	+	+	+	
Lisina descarb.	-	+	+	+	V
Arginina dihidrol	+	+	-	+	V

2.2.4 Producción de hemólisis.

Aeromonas crece bien en los medios del cultivo rutinarios utilizados para el aislamiento de bacterias gram negativas; como Mc Conckey, SS, EMB y XLD, aunque se recomienda para su primer aislamiento la utilización de agar sangre ampicilina (1 mg/100ml), ya que esta bacteria produce habitualmente beta-hemólisis en sangre humana (24) preferentemente a la de borrego.

2.2.5 Estructura antigénica y factores de patogenicidad.

Aeromonas hydrophila puede causar enfermedad entérica -- por medio de la producción de enterotoxinas; en el caso de Aeromonas se acepta el hecho de que existen tres tipos de exotoxinas; enterotoxinas, hemolisinas y citotoxinas, que no siempre están presentes en la misma cepa.

Para detectar cambios en la función intestinal producidas por enterotoxinas se han utilizado diversos modelos como el ratón lactate, asa ileal del conejo y perfusión de yeyuno de rata in vivo.

Se han demostrado que existen al menos dos tipos de hemolisinas pero algunos no son claros acerca de si la toxina es citotóxica o citotónica.

La citotoxicidad no coincide con la enterotoxigenicidad, existe mayor relación entre hemolisinas y enterotoxinas.

Si bien no se conoce con exactitud su mecanismo de patogenicidad, se han descrito sustancias tóxicas obtenidas de -- cultivos de Aeromonas tales como una enterotoxina, que tiene efecto citotónico, es termolábil y muestra efecto positivo en la prueba ligada del asa del conejo, así como un incremento en la permeabilidad vascular en pruebas realizadas en la piel del conejo, y una hemolisina, una leucocidina y algunas pro--

teasas que quizá de una manera u otra intervengan en su mecanismo de patogenicidad.

2.3 ASPECTOS ECOLOGICOS Y EPIDEMIOLOGICOS

Aeromonas se considera parásito de peces, reptiles, anfibios.

En lo que se refiere a su epidemiología, este microorganismo tiene una distribución cosmopolita, la especie más común es hydrophila y como su nombre lo indica (hydro = agua, phile = atracción), tiene su hábitat natural en el agua. Se ha aislado de agua corriente o estancada, en agua salada y aún en aguas negras. Reside en desagües de piletas y se puede recuperar de tuberías de agua, consideradas fuentes potenciales de infecciones nosocomiales.

También se le ha aislado del suelo y alimentos, y su sobrevivencia parece depender de la humedad y la presencia de materia orgánica.

Las infecciones en el hombre ocurren predominantemente durante el periodo de mayo a noviembre, debido probablemente a la relación de esta bacteria con el agua.

Habitualmente la transmisión ocurre a través de ingestión de agua o alimentos contaminados o bien a través de traymas.

Aeromonas se ha aislado en 0.2 a 3.2% de heces de sujetos sin enfermedad gastrointestinal. Estos microorganismos pueden ser aislados del ambiente, especialmente durante el verano. Un número importante de Aeromonas se han aislado de aguas contaminadas (ríos), y gran parte de ellas son capaces de producir toxinas, por lo que se consideran riesgo para la salud. Además Aeromonas puede utilizarse como indicador de aguas contaminadas.

Ni A. hydrophila, ni P. shigelloides se han definido como causantes de brotes de enfermedad intestinal en huéspedes sanos. la mayor parte de las evidencias de su papel como patógeno proceden de estudios que demuestran que hay mayor número de aislamientos en heces de enfermos con diarrea que en heces de individuos testigos.

En el cuadro 2.3.1 se demuestran datos de los estudios realizados en varios países, en todos los casos el único microorganismo potencialmente patógeno aislado fué Aeromonas. Se señalan los casos que se aislaron de pacientes con diarrea sin diarrea y en los que se ignora este dato. (24).

En un estudio de 2147 niños que se llevó a cabo en el Departamento de Pediatría de la universidad de Oklahoma, durante un periodo de 20 meses, 53 cepas de Aeromonas fueron aisladas de 55 niños con diarrea. El número de aislamientos es de 2.5% para Aeromonas comparado con los valores de 4.5% para --

Shigella, 3.3% para Salmonella, 2.7% para Campylobacter y --- 0.05% para Yersinia. (25):

En 45 niños Aeromonas fué la única bacteria enteropatógena identificada. Esta bacteria también fué aislada de 2 (0.05 %) de 380 niños asintomáticos.

A pesar de la falta de propiedades virulentas identificables Aeromonas caviae fué la especie más prevalente, de acuerdo al 69% de aislamientos, ninguna de las cepas de A. caviae produjeron citotoxinas por el ensayo de Cromo liberado, y el 12.5% fueron débilmente enterotoxigénicas por el ensayo de -- los ratones lactantes.

Todas las A. sobria y el 71% de las A. hydrophila fueron positivas para ambas toxinas.

El 92% de los niños con diarrea asociada a Aeromonas fueron menores de 3 años; 84% de los casos fueron vistos entre -- los meses de mayo y octubre.

La mayoría de los niños tenían un cuadro agudo de diarrea acuosa, fiebre y vómito fueron los más comúnmente asociados con el aislamiento de A. sobria.

Ocho niños tuvieron diarrea crónica o intermitente de semanas a meses antes de la consulta; A. caviae fué la bacteria

aislada en estos casos.

Varias complicaciones posibles relacionadas a la infección intestinal de Aeromonas fueron observadas. Estas incluye ron bacteremia gram negativa, estrangulación de hernia interna, síndrome urémico hemolítico y falla a mejorar en pacientes con diarrea crónica.

Durante el período de estudio de los 20 meses se hicieron cultivos a los 2147 niños con diarrea para bacterias enteropatógenicas; 97 (4.5%) presentaron Shigella, 71 (3.3%) Salmonella, 59 (2.7%) Campylobacter, 53 (2.5%) Aeromonas y - - - 1 (0.05%) Yersinia.

De los 53 niños con Aeromonas en sus muestras, 45 tuvieron Aeromonas como única bacteria enteropatógena aislada, 5 - también tuvieron Salmonella, 2 Shigella y 1 Campylobacter. Infección concurrente ocurrió con todas las especies y con una que no pudo ser especificada.

De la mitad de julio a mitad de noviembre de 1986, a 431 niños con diarrea se les hicieron cultivos para Aeromonas; 14 (3.5%) fueron positivos. Durante el mismo período a 380 niños asintomáticos también se les hizo cultivo para Aeromonas y 2 (0.05%) fueron positivos.

De los 53 niños que se les hicieron cultivos y que se --

aislaron 55 diferentes cepas de Aeromonas, habfa un niño con inmunosupresión, el único paciente inmunocomprometido en este grupo, presentó 3 diferentes especies de Aeromonas en sus heces, durante episodios de diarrea.

Cuadro 2.3.1 Aislamientos de Aeromonas hydrophila
a partir de heces en diferentes tipos de población.
1958 - 1980 (26)

		Número de casos positivos (%)		
País	Año	Con diarrea	Sin diarrea	Procedencia
Dinamarca	1958	-	8/4 500(0.2)	Muestra de - referencia.
Francia	1964	-	31/4 426(0.7)	Niños 2 años
India	1970	19/387(4.9)	-	Casos de dia- rrea colerifo- rme.
Australia	1980	-	32/1 250(2.6)	Adultos hospi- talizados.
Australia	1980	79/975(8.1)	7/975(0.7)	Niños.

De los 53 niños con diarrea asociadas a Aeromonas; 73% fueron de raza blanca, 56% fueron varones, 21% fueron negros y 6% fueron de nacionalidad americana.

La distribución racial aproximada de la población étnica se encuentra en el Hospital de Oklahoma. (25).

El periodo de distribución de las infecciones en niños - se indica en el cuadro 2.3.2, el 92% son menores de 3 años; - el 75% son menores de 1 año. Siete niños tenían un año de nacidos.

De los 380 controles asintomáticos, 67% fueron menores - de 1 año y 85% fueron menores de 3 años.

La fluctuación de casos es evidente en la estación. En - el periodo de 24 meses, 84% (47 a 56) de los pacientes fueron revisados durante los meses calientes, mayo a octubre.

Cuadro 2.3.2 Periodo de distribución de acuerdo a la edad en niños con Aeromonas asociadas con diarrea.

Periodo	Número de casos
Menor de 1 mes	7 (13%)
1 a 6 meses	23 (43%)
7 a 12 meses	10 (29%)
1 a 2 años	9 (17%)
3 a 5 años	1 (2%)
6 a 10 años	0 (0%)
Mayores de 10 años	3 (6%)

2.4 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE PLESIOMONAS SHIGELLOIDES

2.4.1 Caracteres morfológicos y coloniales.

Células con terminación redondeada, rectas, en forma de varilla, miden de 0.8 a 1.0 X 3.0 μ m. Son gram negativas, móviles por flagelo polar, generalmente lofótrico, el flagelo es largo y tiene una longitud de onda que varía de 3.5 a 4.0 μ m en preparaciones teñidas.

Son anaeróbicos facultativos, quimiorganotróficos, tienen metabolismo respiratorio y fermentativo. No se observan gránulos intracelulares de poli-beta-hidroxibutirato.

Plesiomonas shigelloides crece en agar nutritivo o en agar sangre, a las 24 horas las colonias son de 1.0 a 1.5 mm de diámetro, grisáceas, brillantes y opacas, ligeramente cóncavas y una superficie lisa con bordes enteros. En cultivos viejos se observan variaciones complejas en la morfología de las colonias.

El crecimiento óptimo ocurre entre 37 y 38°C, la temperatura máxima de crecimiento fluctúa entre 40 y 44°C, mientras que la temperatura mínima es de 8°C. No hay crecimiento en caldo nutritivo conteniendo 7.5% de cloruro de sodio.

El rango de pH para el crecimiento es de 5.0-7.5, algunas cepas pueden crecer a pH de 8.0, pero a un pH de 3.0 no se observa desarrollo.

2.4.2 Requerimientos para su aislamiento y cultivo

En la mayoría de los países, los procedimientos de diagnóstico para coprocultivos, se concentran en la detección de Salmonella y Shigella; por consecuencia la mayoría de las observaciones de Plesiomonas shigelloides han sido hechas sobre el medio de desarrollo primario de Salmonella y Shigella. Sin embargo, la mayoría de estos medios no son idealmente adecuados para el cultivo de P. shigelloides porque los reactivos selectivos incorporados al medio son tóxicos para la mayoría de las cepas.

Muy buenos resultados pudieron ser obtenidos en SS agar y en agar IBB⁺. Estos últimos medios ofrecen una ventaja adicional de selectividad más alta.

El agar IBB favorece el crecimiento de P. shigelloides - por tener inositol como fuente de carbono, el cual puede ser utilizado con poca competencia de la bacteria.

Después de 48 horas de incubación, las colonias de P. shigelloides son fácilmente distinguidas de otras en cultivos mixtos; llegan a ser generalmente de 1 mm. de diámetro más --

largas que las colonias en SS, cuya apariencia con varios grados de coloración depende de las distancias con otras colonias (debido a la formación de ácido a partir de inositol en presencia de un indicador de rojo neutro).

La formación de ácido tiende a ser tan débil que aún las colonias solas darán una reacción un tanto tardía de la citocromo oxidasa después de recibir una gota del reactivo de Nadi's.

Las cepas de Plesiomonas se mantienen fácilmente por varios años en cultivos por picadura de tripticosa soya sellados con parafina.

2.4.3 Características bioquímicas.

Plesiomonas shigelloides crece en caldo peptona con turbidez uniforme, la temperatura máxima de crecimiento estriba entre los 40 y 44°C., no se presenta desarrollo en caldos nutritivos que contengan 7.5% de cloruro de sodio.

Glucosa, maltosa, trihalosa, inositol y glicerol son fermentados con ácido pero no con gas.

Los siguientes carbohidratos no son fermentados: almidón, dextrina, glicógeno, manitol, fructosa, sacarosa, arabinosa, sorbitol, inulina, melcitososa, ramnosa, xilosa, dulcitol, escu

ina, rafinosa, celobiosa, salicina y adonitol.

El catabolismo de lactosa, galactosa, manosa, salicina y cistina es variable.

La reacción del rojo de metilo es variable.

La prueba de Voges-Proskauer es negativa y la reacción del butanodiol di-hidrogenasa es negativa.

Otras pruebas negativas son: gluconato, malonato, utilización del citrato; crecen en KCN; hay producción de H_2S ; hay licuefacción de gelatina; digestión de caseína; actividad fibrinolítica; actividad de elastasa; actividad de la lecitinasa; -ureasa y fenil alanina deaminasa. No se produce hemólisis filtrable.

Hay formación de indol y hay actividad de la fosfatasa.

2.4.4. Producción de hemólisis.

Las colonias de Plesiomonas shigelloides no son beta-hemolíticas en agar sangre, y no utilizan la lactosa en agares entéricos.

2.4.5. Estructura antigénica y factores de patogenicidad

Solo algunas cepas de Plesiomonas shigelloides comparten en común el antígeno O con Shigella sonnei (Sakasaki y colab.-1959); 57 cepas estudiadas serológicamente que fueron distribuidas en 16 grupos O por Quincke, y solo uno de estos grupos mostraron una relación antigénica con Shigella sonnei. Shimada y Sakazaki, definieron 30 grupos antigénicos O incluyendo algunos grupos antigénicos somáticos encontrados también en el género Shigella y 11 antigénicos H.

Whang y Colab. en 1972 mostraron que las cepas de Plesiomonas shigelloides poseen el antígeno común de las enterobacterias.

Si bien el mecanismo de acción de P. shigelloides no está bien delucidado, se ha señalado por algunos autores la producción de una enterotoxina termolabile, pareciendo existir unanimidad respecto a que su mecanismo patogénico no es invasivo. Las características invasivas clínicas; diarrea acuosa sin sangre ni moco apoyarían esto último sugiriendo un mecanismo enterotoxigénico.

Plesiomonas ha sido asociada frecuentemente a diferentes tipos de infecciones. Se reconoce fundamentalmente que puede ser causante de gastroenteritis ya que la mayoría de los aislamientos proceden de pacientes con diarrea, sin embargo casos de meningitis, septicemias, colecistitis han sido reportados.

Con algunas excepciones P. shigelloides no ha sido aislada de heridas o procesos inflamatorios, las especies sin embargo, juegan un papel patogénico en el intestino humano, los casos de diarrea han aumentado en varios grados de severidad.

La prueba de sensibilidad antibiótica de 12 cepas de P. shigelloides indicaron sensibilidad a todos los compuestos estudiados; Ampicilina, Tetracilina, Clorafenicol, Cefalotina, - Cefotaxima, Mezosilina y Sulfametoxasol.

2.5 ASPECTOS ECOLOGICOS Y EPIDEMIOLOGICOS.

Un número de brotes epidémicos de diarrea atribuidas a - P. shigelloides como el agente causal ha sido reportado de - - Africa, India y Japón (Vandepitte y Colab., 1975-1980; Bhat y Colab., 1974; Sanyal y Colab., 1975; Tsukamoto y Colab., 1978)

Descripciones de casos aislados bien documentados, existen igualmente en climas templados. Aparentemente P. shigelloides no pertenece a la flora normal del intestino humano, solo en algunos casos el hombre se ha encontrado como portador de síntomas del organismo.

Es más frecuente que el animal sea el portador, de este modo P. shigelloides ha sido aislada del pescado y otros animales acuáticos y de algunos mamíferos como el perro, el gato.

la cabra, changos, monos, etc., algunos animales, sin embargo, desarrollan síntomas de la enfermedad.

La investigación en la ecología y epidemiología ha sido fuertemente estimulada por hallazgos accidentales del organismo en animales acuáticos de climas templados. Estos hallazgos tienen que ver con una búsqueda sistemática del organismo en el intestino del pescado en varias partes del mundo, después de que la presencia del organismo en el intestino del pescado ha sido establecida en un alto porcentaje, subsecuentemente de la detección del organismo en la superficie del agua.

Pocos aislamientos se han hecho de fuentes extraintestinales, la mayoría de las cepas de origen humano se han obtenido de heces diarreicas de pacientes habitantes de áreas tropicales y subcrupicales (Malí, Zaire, Kenya, Madagascar, Tahití, Cuba, Tailandia, India), y otros países como Japón y Australia. Los portadores son muy raros, aunque se han reportado excepciones, particularmente en áreas endémicas, como Tailandia, con porcentajes de 2 a 24%.

Las variaciones estacionales afectan el número de organismos detectables en la superficie de muestras de agua como se observó en Japón y Europa, donde los hallazgos fueron obtenidos únicamente en estación templada, esto se explica por el efecto de que la bacteria no se multiplica a temperaturas abajo de 8°C.

P. shigelloides puede aún ser aislada en cantidades declinables (bajas) después del comienzo de la estación caliente a temperaturas entre 3 y 7°C.

2.6 ASPECTOS CLINICOS DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR -- AEROMONAS SP. Y PLESIOMONAS SHIGELLOIDES.

Aeromonas y Plesiomonas han sido relacionadas con enfermedad gastrointestinal moderada de curación espontánea; la --diarrea es acuosa, no mucoides y sin sangre en la mayoría de -- los casos, aunque, en casos graves puede ser verdosa, esponjosa y con sangre.

Se han descrito casos posiblemente adquiridos a partir -- de la ingestión de ostiones o del manejo de serpientes. No es posible calcular el periodo de incubación. La duración de la enfermedad es de 1 a 7 días en individuos normales, pero en -- infantes puede ser mayor.

En pacientes con enfermedad hepato-biliar o procesos malignos pueden presentarse complicaciones graves como sepsis.

La revisión de la lectura mostró que en este tipo de casos, aproximadamente el 40% ocurre en sujetos con leucemia, -- el 15% en personas con otra enfermedad maligna y el 30% en -- personas con hepatitis.

En la literatura española hay un caso de gastroenteritis, en el que, el único patógeno intestinal que se aisló en las heces fue Plesiomonas shigelloides.

Se trata de una persona que se le diagnosticó hepatitis - crónica activa con cirrosis y mononeuritis múltiple secundaria a crioglobulinemia mixta, por lo que estaba en tratamiento con glucocorticoides. Se le reagudiza la sintomatología en relación con su neuropatía, con dolor intenso en zonas distales de las cuatro extremidades, hiporreflexia y pérdida de fuerzas -- con atrofas musculares, refiere asimismo en los últimos días, dolor abdominal tipo cólico, y a los cuatro días de su ingreso presenta náuseas, sin vómitos y episodios diarreicos, con heces líquidas, sin sangre, ni moco, ni pus, en número de 8 a 10 defecaciones por día, precedidas de dolor cólico que se alivia con la deposición, el paciente no presentó fiebre.

En dos coprocultivos sucesivos realizados con dos días de intervalo, se aisló únicamente Plesiomonas shigelloides.

La diarrea remitió de forma espontánea a los cuatro días, sin tratamiento antibiótico, realizándose únicamente reposición hidroelectrolítica.

P. shigelloides se ha aislado fundamentalmente en las heces de pacientes con diarrea, de países tropicales y subtropicales y muy raramente en Europa, excepcionalmente se ha encon-

en individuos sanos.

Produce cuadros de gastroenteritis, que son en general leves en el adulto.

La asociación de tratamientos inmunosupresores y/o patología hepatobiliar ha sido señalada por varios autores, de aquí la importancia de hacer referencia al caso mencionado anteriormente.

En el estudio de los 53 niños con Aeromonas asociadas a diarreas que se llevó a cabo en la Universidad de Oklahoma, se mencionan los caracteres clínicos y las características de las muestras de los pacientes en estudio, por ejemplo: de los pacientes de los cuales se aisló A. caviae el 33% presentó fiebre, el 22% vómito, 11% trastornos abdominales y la muestra fue acuosa en el 69%, con sangre en el 17% y con moco en el 19%. En los que se aisló A. hydrophila, el 12.5% presentó fiebre, 50% vómito, 0% trastornos abdominales, la muestra fue acuosa en el 50% de los casos, en el 25% presentó sangre y en el 12.5% moco. Cuando la bacteria que se aisló fue A. sobria el 83% de los pacientes presentaron fiebre, el 100% vómito, el 17% trastornos abdominales, la muestra fue en el 83% acuosa, en el 17% se le encontró sangre y no contenía moco.

3.- MATERIAL Y METODO

3.1 Procedencia y selección de cepas.

Se tomaron 56 cepas puras de Aeromonas sp., y 44 de Plesiomonas shigelloides del cepario del laboratorio del hospital Angel Leaño, todas ellas aisladas de heces.

Las cepas de Aeromonas se encuentran congeladas para su -- conservación en caldo BHI-glicerol, y las cepas de Plesiomonas -- se conservan por picadura en peptona agar.

3.2 METODOLOGIA MICROBIOLOGICA

3.2.1 Estandarización de las cepas.

Se toman las cepas y se siembran en agar sangre sin anti-- biótico, esto se hace con el objeto de rejuvenecer la cepa y -- trabajar con colonias jóvenes, una vez sembradas en agar san--- gre, se incuban a 37°C por 24 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se toma de -- las colonias más aisladas, las que sean necesarias para hacer -- una suspensión en solución salina y llevar la suspensión a la -- turbidez del tubo número uno de la escala de Mc Farland, que -- tiene una concentración de 3.0×10^3 Unidades Formadoras de Co-- lonias.

Llevada la suspensión a la misma turbidez del tubo uno de Mc Farland, se hacen diluciones 1:10 y 1:100, agregando a un tubo estéril 0.1 ml. de la suspensión y 0.9 ml. de solución salina estéril para la dilución 1:10, y de esta solución se toma 0.1 ml. con 0.9 ml. de solución salina para la dilución 1:100.

3.2.2 Inoculación en caldos de enriquecimiento.

En este estudio se evaluó la selectividad de los caldos de enriquecimiento que son Hajna y Selenito para la recuperación de Aeromonas sp. y Plesiomonas shigelloides.

De la dilución 1:100 se tomó un inóculo con una asa calibrada a 0.001 ml., este inóculo se depositó en un tubo que contiene exactamente 8.0 ml. de caldo Hajna, y se tomó otro inóculo igual para depositarlo en otro tubo con 8.0 ml. de caldo Selenito.

Una vez hecha la inoculación en los diferentes caldos de enriquecimiento, se incuban a 37° por 24 horas, transcurrido este tiempo se hace la cuantificación del crecimiento bacteriano por el método turbidimétrico.

Referencias de los caldos Hajna y Selenito, utilizados para este estudio:

CALDO HAJNA PARA GRAM NEGATIVOS

Uso al que se destina:

El caldo Hajna GN es un medio líquido selectivo utilizado para el cultivo de organismos gram negativos procedentes de todos los tipos de especímenes.

El caldo Hajna GN, se prepara de acuerdo a la fórmula de Hajna que se describe en el Manual Difco. Hajna sugirió el enriquecimiento de organismos procedentes de torundas rectales en caldo Hajna GN, durante 1 a 6 horas antes de sembrar en medios sólidos.

Dicho caldo también demostró ser de utilidad en el aislamiento de organismos gram negativos procedentes de orina, coágulos de sangre, torundas impregnadas de organismos procedentes de utensilios de la comida y bebida, torundas de organismos procedentes de la garganta y a partir de especímenes de expectoración. Se recomendó una temperatura de incubación de 30°C para el cultivo de organismos gram negativos procedentes de expectoración.

Croft y Miller compararon la inoculación directa de torundas rectales, con torundas que fueron colocadas en un tubo de caldo Hajna GN, y luego se inocularon en los medios habituales después de 6 u 8 horas de incubación. Ellos informaron de más aislamientos de Shigella mediante el uso del caldo --

Hajna, que con la inoculación directa o inmediata en los medios de aislamiento.

Solo se aislaron 3 cepas de Salmonella a partir de 2,696 especímenes examinados en esta serie. Esta baja recuperación de Salmonella no indica que este caldo no consiga enriquecer estos organismos, sino que Salmonella no estaba presente en cantidades apreciables.

Hajna obtuvo 127 aislamientos de Salmonella y 105 de Shigella procedentes de 480 torundas rectales utilizando caldo GN. Croft y Miller sugirieron que este caldo de enriquecimiento sería útil para operaciones de estudio en el campo.

La triptona sirve como nutriente en el medio. El citrato sódico y el desoxicolato sódico son bactericidas para organismos gram positivos e inhiben el desarrollo de coliformas, mientras que los fosfatos sirven de buffer. La incrementada concentración de manitol sobre la dextrosa ayuda a limitar el crecimiento de Proteus y a acelerar el crecimiento de Salmonella y Shigella capaces de fermentar el manitol. Pseudomonas aeruginosa y Proteus crecerán en el medio pero no interfieren el desarrollo de Shigella o Salmonella en un cultivo mixto.

La fórmula del caldo Hajna GN, la manera de prepararse y el control de calidad se especifican en el Manual Difco.

El caldo Hajna GN sin prepararse se almacena por debajo de 30°C, una vez preparaso se almacena de 2 a 8°C.

CALDO CON SELENITO

El caldo con Selenito se recomienda como un medio de enriquecimiento en el aislamiento de Salmonella typhi y otros miembros del género Salmonella, provenientes de excremento, orina y tejidos infectados.

La fórmula de este medio es exactamente la misma que la del caldo con Selenito F, descrita por Leifson en el Manual -- Difco.

Guth, Hadre y Theodorascu observaron que E. coli era más susceptible a la toxicidad del Selenito sódico que S. typhi. Guth confirmó la observación de estos dos autores y empleó el Selenito sódico como agente selectivo en un medio de agar y en un caldo de enriquecimiento para el aislamiento de S. typhi -- del excremento.

Leifson amplió las observaciones de Guth y elaboró un -- agar con Selenito y un caldo con Selenito para emplearlos en el aislamiento de bacilos causales de fiebre tifoidea y paratifoidea, de excremento y orina y encontró que el caldo de enriquecimiento era el más prometedor.

Leifson demostró que el caldo con Selenito no era lo suficientemente tóxico para inhibir califormes y enterococos fecales. Sin embargo, los bacilos del colon se reducían en número durante las primeras 8 a 10 horas, y a partir de entonces aumentaban de modo bastante rápido.

Por el contrario, los bacilos de la tifoidea se reproducían rápidamente desde el principio. Proteus y Pseudomonas no se inhibían. Los organismos de la disentería y alcalígenos se inhibían.

Leifson observó que el medio con Selenito actuaba más eficazmente bajo una tensión de oxígeno reducida. Para proporcionar condiciones óptimas, el caldo se distribuyó en tubos, para que diera una profundidad de 6 cm. o más. Empleando el enriquecimiento en condiciones óptimas, Leifson pudo aislar muchos -- más organismos del género Salmonella que por la colocación directa en placas sin un enriquecimiento previo.

En un estudio realizado por Felsenfeld sobre los medios empleados para la recolección y conservación de excrementos para el aislamiento e identificación de Salmonella, Shigella y Protozoos intestinales, informó sobre un aumento en el número de laboratorios que empleaban el caldo con Selenito como medio de enriquecimiento.

Jenghem, Hal y Pomeroy manifestaron en un informe del co-

mité que en un estudio comparativo realizado desde Octubre de 1946 hasta Febrero de 1950, el agar con Sulfito de Bismuto y el SS agar (agar para Salmonella y Shigella), permitían un mayor número de aislamientos específicos de S. pollorum y S. gallinarum. Estos medios selectivos escogidos, suprimían el desarrollo de coliformes. El enriquecimiento de las muestras -- con caldo con Selenito, con el beteadado sobre agar con Sulfito de Bismuto, dió el mayor número de aislamientos, seguido por el agar SS y después por el agar Mac Conckey.

El caldo con Selenito produjo un mayor número de aislamientos con éxito, del que consiguió con caldo de Tetratona-

to.

En el exámen de muestras fecales, el caldo con Selenito, se inocula añadiendo 2 ml. de una suspensión fecal, en tubos con 8 ml. del medio. Después de mezclar bien, los tubos se incuban a 37°C, durante un período de 18 a 24 horas. Para el exámen de tejidos infectados, se maceran de 1 a 2 gramos del material, en una cantidad de 10 a 15 ml. de caldo con Selenito, utilizando para ello una pipeta o una varilla de agitación estéril antes de realizar la incubación.

Para el exámen de orina, el caldo con Selenito deberá prepararse en concentración doble y colocarse en tubos de 5 a 7.5 ml. Este caldo se inocula con un volumen igual a la muestra de orina y se incuba según lo descrito anteriormente.

Después de incubar se vierte cierta cantidad del cultivo enriquecido sobre una placa de agar con Sulfito de Bismuto y una cantidad similar sobre una placa de agar SS. Estas placas se incuban a 37°C y se examinan de 18 a 24 horas. La placa de agar con Sulfito de Bismuto debe incubarse por 48 horas antes de deshecharla como negativa.

3.2.3 Valoración del desarrollo.

3.2.3.1. Método turbidimétrico:

Hay varios métodos de cuantificación bacteriana como son: Cuenta directa (microscópica) de bacterias, Método de Recuento en cámara; estos métodos indican la población total, que incluyen células vivas y muertas. Este dato suele ser útil pero por lo regular es más interesante conocer la población de microorganismos vivos.

Los microorganismos vivos se cuentan o estiman solamente por un método que depende de la actividad vital valorable; multiplicación celular, la fermentación de la lactosa o la digestión de la celulosa. Suelen emplearse dos métodos de cultivo, esto es; el recuento por dilución y el recuento de colonias. El postulado básico que fundamentan ambos métodos es que si -- cualquier célula viable (viva) inoculada en un medio reciente se multiplicará y producirá datos de crecimiento de fácil con cimiento como son: Turbidez, presencia de ácido o de gas en el

caldo, colonias en agar. Esta presuposición no siempre se justifica, especialmente con cantidades muy pequeñas de bacterias, y constituye la fuente de error que reconocen los bacteriólogos.

No obstante los resultados obtenidos por exámenes repetidos para una muestra dada son bastante reproducibles, en forma tal que los métodos tienen la ventaja de uniformidad, aunque no de exactitud.

Otro método de cuantificación bacteriana es el de turbidimetría con el cual puede precisarse con bastante exactitud el número de bacterias, y con mayor facilidad, al estimar el grado de turbidez de la suspensión.

Suele utilizarse un espectrofotómetro, y se lee la transmitancia de luz (T), o la densidad óptica (OD) Absorbancia ($OD = -\log T$) en la escala de galvanómetro.

El valor de T varía según la longitud de la vía luminosa a través de la suspensión, según el solvente, la longitud de onda de la luz y la índole y estado físico del organismo, así como en función del número de bacterias. Por lo tanto, es necesario eliminar o estandarizar todas las variables, excepto la última.

Se utilizan cubetas adecuadas y el instrumento se ajusta

para una absorbancia luminosa a 0,000 a través de un solvente sin bacterias, esto se establece empíricamente, luego se ensaya la suspensión en condiciones idénticas y se lee su Densidad Óptica o absorbancia.

La turbidimetría es más eficaz con suspensiones de densidad moderada. Indicará la cantidad total de células o bacterias vivas o muertas.

La lectura de la absorbancia en caldo Hajna se realizó a una longitud de onda de 430 nm, con blanco de caldo respectivo estéril, y en caldo Selenito se llevó a cabo a 400 nm contra un blanco de caldo Selenito sin inocular, esto es, debido a -- que el Selenito tiene mayor intensidad de color que el caldo Hajna por lo que a menor longitud de onda mayor es el paso de la luz.

3.2.3.2 Método por recuento de colonias.

Este método se basa en la presuposición de que cada bacteria inculada en un medio de agar nutritivo o en su superficie, se multiplicará y producirá una colonia visible, en consecuencia el número de colonias será el mismo que el número de bacterias viables inculadas en el agar. Por ejemplo: un mililitro de una muestra original que contenga 100 bacterias por ml. se espera producirá 100 colonias, número que puede contarse sin problemas, una muestra que contenga 2.5×10^6 bacterias

/ml. proporcionará una placa demasiado poblada para contarse aún más, los productos metabólicos de las bacterias inhibirán el desarrollo de las colonias vecinas.

Conviene diluir dicha muestra, y cultivar en placa 1 ml. de una solución a 10^4 (esto es 1:10,000), el número de colonias obtenido será de 250, y se multiplicará por 10^4 , recíproca de la dilución para saber el número de bacterias por ml. de la muestra original.

Suelen prepararse además de la placa en estudio, dos o tres placas más de muestras de cada una de las diluciones en los límites críticos anticipados. Los cultivos en placa de la dilución que proporciona de 30 a 300 colonias pueden contarse fácilmente y con exactitud el promedio multiplicado por la recíproca de la dilución. da un resultado que se expresa "bacterias por mililitro". Las otras placas de cultivo muestran ciertas discrepancias atribuidas a la distribución irregular de bacterias, errores al maniobrar con pipetas y contar, y otros factores. El error normal en el recuento de placa puede ser incluso 10 por 100.

El método de placa proporciona un recuento mínimo de bacterias viables. Algunos microorganismos suelen aparecer en --acúmulos que no se disgregan al preparar las diluciones y en consecuencia cada acúmulo produce una colonia. Aún más bacterias individuales pueden quedar atrapadas en agar, tan cerca-

nas entre sí que sus colonias se unan y se les cuente como una sola.

Los métodos de dilución y de recuento de colonias para estimar las poblaciones, se emplean ampliamente si se desea hacer un recuento del número de bacterias vivas.

Conviene insistir que no puede confiarse por entero en un método de cultivo para obtener una estimación exacta del número total de microorganismos en una población heterogénea desde el punto de vista fisiológico, dado que ningún medio de cultivo o grupo de condiciones de incubación permiten el crecimiento de todos los tipos de bacterias, los microorganismos con gran especificidad nutricional necesitan ingredientes especiales del medio; algunas bacterias son inhibidas por sustancias que facilitan el crecimiento de otras.

4.- RESULTADOS

Se procesaron 100 cepas puras en total, 44 fueron de Plesiomonas shigelloides y 56 de Aeromonas sp.

Como se mencionó anteriormente, las cepas de Plesiomonas shigelloides se encontraban conservadas en agar peptona, y las cepas de Aeromonas sp. congeladas en BHI-glicerol, se tomaron dichas cepas para su estudio por el método ya descrito.

Las 44 cepas de Plesiomonas shigelloides procesadas en caldo Hajna, con un inóculo inicial de 3.75×10^2 UFC/ml., se incubaron a 37°C, por 24 horas.

Transcurrido este tiempo se observó que: en 41 de las 44 cepas: en estudio presentaron crecimiento uniforme, corroborando la lectura turbidimétrica en absorbancia con la escala de McFarland.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 4.1

En este estudio no se pudo trabajar con el método de cuantificación de colonias debido a que el desarrollo en el medio de XLD, de las colonias que desarrollaron en el medio de enriquecimiento tratados en este estudio fue tan grande que las colonias se tomaron como incontables, aún cuando se les hicieron diluciones; 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1: 100,000, pero el número

de colonias no correlacionó con las diluciones, ya que se to
mó en cuenta el hecho de que a mayor dilución la probabili--
dad de error también se incrementa, por lo que se descartó -
este método y solo se prosiguió con la técnica de turbidime-
tría.

Las cepas que se estudiaron por el método de recuento -
de colonias y los resultados obtenidos de dichas cepas se in
dican en la tabla 4.2.

Las concentraciones de los tubos en la escala de Mac -- Farland se encuentran de la siguiente manera:

ESCALA DE MAC FARLAND

Tubo No. 1	=	3.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 2	=	6.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 3	=	9.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 4	=	12.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 5	=	15.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 6	=	18.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 7	=	21.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 8	=	24.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 9	=	27.0	x	10 ⁸	UFC/ml
Tubo No. 10	=	30.0	x	10 ⁸	UFC/ml.

TABLA 4.1

RESULTADOS DE LA VALORACION DEL CRECIMIENTO DE PLESIOMONAS SHIGELLOIDES EN CALDO HAJNA DESPUES DE 24 HRS. DE INCUBACION A 37°C. CON UN INOCULO INICIAL DE 3.75×10^2 UFC/ml.

No. Cepa	Condición de la muestra	Lectura Turbidimétrica en absorbancia ($\lambda = 430 \text{ nm}$)	Lectura con escala de Mac Farland.
1	+	0.368	Tubo No. 6
2	+	0.404	Tubo No. 6
3	-	0.396	Tubo No. 6
4	+	0.340	Tubo No. 6
5	+	0.353	Tubo No. 6
6	+	0.370	Tubo No. 6
7	+	0.358	Tubo No. 6
8	+	1.009	Tubo No. 10
9	+	0.355	Tubo No. 6
10	-	0.821	Tubo No. 9
11	+	0.287	Tubo No. 5
12	+	0.375	Tubo No. 6
13	-	0.377	Tubo No. 6
14	+	0.300	Tubo No. 6
15	+	0.352	Tubo No. 6
16	+	0.289	Tubo No. 5
17	+	0.360	Tubo No. 6
18	+	0.338	Tubo No. 6
19	+	0.341	Tubo No. 6
20	+	0.306	Tubo No. 6
21	+	0.141	Tubo No. 3
22	+	0.338	Tubo No. 6
23	+	0.320	Tubo No. 6
24	d	0.320	Tubo No. 6
25	+ Aero y Ples	0.340	Tubo No. 6
26	+	0.342	Tubo No. 6

No. cepa	Condición de la muestra	Lectura turbidimétrica en Absorbancia ($\lambda = 430 \text{ nm}$)	Lectura con escala de Mac Farland.
27	+	0,382	Tubo No. 6
28	+	0,366	Tubo No. 6
29	+	0,420	Tubo No. 7
30	+	0,374	Tubo No. 6
31	+	0,371	Tubo No. 6
32	+	0,367	Tubo No. 6
33	+	0,340	Tubo No. 6
34	+	0,382	Tubo No. 6
35	+	0,357	Tubo No. 6
36	+	0,364	Tubo No. 6
37	+ Aero. y Ples.	0,343	Tubo No. 6
38	+	0,402	Tubo No. 6
39	+	0,372	Tubo No. 6
40	+	0,297	Tubo No. 6
41	+	0,339	Tubo No. 6
42	+	0,317	Tubo No. 6
43	+	0,303	Tubo No. 6
44	+	0,348	Tubo No. 6

CONDICION DE LA MUESTRA: + Heces diarreicas
 - Heces formadas
 d Dato desconocido;

En base a los resultados reportados en la tabla 4.1, observamos que la mayoría de las lecturas en absorbancia corresponden en la escala de Mac Farlan al tubo No. 6 o sea al que contiene una concentración de 18×10^8 UFC/ml., esto nos indica que el desarrollo en la mayoría de las cepas inoculadas en el caldo de enriquecimiento Hajna fue uniforme.

Algunas cepas como la número 8 y 10 tuvieron una lectura de absorbancia muy elevada, pero analizando estas cepas con -- pruebas bioquímicas se comprobó que fueron contaminadas con -- Pseudomonas en la manipulación para su estudio.

Observamos que la cepa número 21 presenta una absorbancia muy baja comparada con la mayoría (abs. = 0.141), pero como se lo se observó una cepa, no se considera significativo.

Las cepas 17 y 18 se sembraron en XLD para recuento de colonias después de la incubación en caldo H₂S se hicieron diluciones, se hizo la siembra en XLD, se incubaron 24 hrs. a -- 39°C., los resultados se reportan en la tabla 4.2.

TABLA 4.2

CUANTIFICACION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN PLACA DE PLESIOMO
NAS SINGELLOIDES SEMBRADAS EN XLD E INCUBADAS A 37°C POR 24 -
 HORAS CON UNA DILUCION 1:100,000.

No. CEPA	CONDICION DE LA MUESTRA	LECTURA EN ABSORBANCIA	CONTEO EN PLACA DIL. 1:100,000	EQUIVALENCIA EN UFC.	LECTURA TUBO DE MAC FARLAND.
17	+	0.360	178 col.	1.78×10^7	Tubo No. 6
18	+	0.338	171 col.	1.71×10^7	Tubo No. 6

El conteo en placa nos indica el número de bacterias viables, comparando la equivalencia en UFC con la escala de Mac - Farland, vemos que ésta concentración es menor que el tubo número 1 de la escala, sin embargo, la lectura de la absorbancia de la cepa inoculada en caldo Haina nos corresponde al tubo número 6 de dicha escala, lo que nos indica que la mayoría de las bacterias se encuentran muertas.

RESULTADOS DE LA VALORACION DE PLESIOMONAS SHIGELLOI
DES EN CALDO SELENITO DESPUES DE 24 HORAS DE INCUBA-
CION A 37°C. CON UN INOCULO INICIAL DE 3.75×10^2 --
UFC/ml.

Se procesaron 44 cepas de Plesiomonas Shigelloides con -
la metodología anteriormente descrita.

El desarrollo de las 44 cepas en caldo Selenito fue nega-
tivo habiéndose utilizado el mismo inóculo que en caldo Han-
na.

Además las cepas, 21, 22, 23, 24 y 25 se inocularon con
una concentración de 3.75×10^4 UFC/ml., que provenfa directa-
mente de una concentración bacteriana del tubo número 1 de --
Mc Farland tomándose el inóculo con asa calibrada a 0,001 ml.
y aún así a una concentración mayor, ninguna de estas cepas -
presentó desarrollo.

Las cepas número 8 y 10 presentaron desarrollo en caldo
Selenito pero como ya se mencionó, dichas cepas fueron conta-
minadas en su manipulación por Pseudomonas.

AEROMONAS EN CALDO HAJNA.

Se procesaron 56 cepas de Aeromonas sp. en caldo Hajna, con un inóculo inicial llevado a una concentración de 3.75×10^2 durante 24 horas de incubación a 37°C.

De estas 56 cepas solo desarrollaron 23, o sea el 41%, - las cuales se pueden subdividir en 4 grupos: tabla (4.3).

- a) Aquellas que no presentaron desarrollo.
- b) Aquellas cuya concentración se estima entre los tubos 1 y 2 de la escala de Mac Farland, en este grupo solo se encuentran 4 cepas o sea un 17.4%.
- c) Aquellas cuya concentración se estima entre los tubos 3 al 9 de dicha escala, en este grupo desarrollaron 15 cepas o sea el 65.2%.
- d) Aquellas cuya concentración es mayor o igual del tubo 10 - de la escala, las cuales fueron 4 cepas y corresponden al 17.4% del total de las cepas que presentaron desarrollo.

AEROMONAS EN CALDO SELENITO

De las 56 cepas procesadas de Aeromonas sp. en caldo Selenito con un inóculo inicial que corresponde a una concentración de 3.75×10^2 incubadas a 37°C durante 24 horas, solo desarrollaron 10 cepas o sea el 17.9% pero solo 2 (3.7%) tuvieron

ron un valor significativo de crecimiento bacteriano.

Estas 10 cepas desarrollaron también en caldo Hajna con un valor mucho más representativo de reproducción bacteriana.

Los resultados de las 56 cepas de Aeromonas sp. procesadas en ambos medios de enriquecimiento se indican en las tablas 4.3 y 4.4 A.

TABLA 4.3

RESULTADOS DE LA VALORACION DEL CRECIMIENTO DE AERO
MORAS SP. EN CALDO HAJNA DESPUES DE 24 HORAS DE IN-
CUBACION A 37°C CON UN INOCULO INICIAL DE 3.75×10^2 UFC/ml.

No. CEPA	CONDICION DE LA MUESTRA	LECTURA TURBIDIMETRICA EN ABSORBANCIA ($\lambda = 430$) nm)	INTERPRETACION DEL DESARROLLO	GP
1	+	0.006	NEG.	a
2	+	0.009	NEG.	a
3	-	0.002	NEG.	a
4	+	0.015	NEG.	a
5	+	0.015	NEG.	a
6	-	0.009	NEG.	a
7	-	0.282	POS.	c
8	+	0.077	POS.	b
9	+	0.240	POS.	c
10	+	0.019	NEG.	a
11	-	0.630	POS.	d
12	+	0.396	POS.	c
13	+	0.808	POS.	d
14	-	0.399	POS.	c
15	-	0.018	NEG.	a
16	+	0.244	POS.	c
17	-	0.025	NEG.	a
18	+	0.000	NEG.	a
19	-	0.014	NEG.	a
20	+	0.021	NEG.	a
21	+	0.015	NEG.	a
22	+	0.126	POS.	b
23	+	0.009	NEG.	a
24	+	0.017	NEG.	a
25	-	0.698	POS	d

No. CEPA	CONDICION DE LA MUESTRA	LECTURA TURBIDIMETRICA EN ABSORBANCIA ($\lambda = 430 \text{ nm}$)	INTERPRETACION DEL DESARROLLO	G.P
26	-	0.014	NEG.	a
27	-	0.300	POS.	c
28	+	0.163	POS.	c
29	+	0.021	NEG.	a
30	+	0.000	NEG.	a
31	+	0.000	NEG.	a
32	+	0.000	NEG.	a
33	+	0.000	POS.	c
34	+	0.387	POS.	c
35	+	0.352	POS.	d
36	+	0.675	NEG.	a
37	-	0.000	NEG.	a
38	-	0.000	POS.	c
39	+	0.337	POS.	c
40	-	0.328	POS.	c
41	+	0.329	POS.	c
42	+	0.319	POS.	c
43	+	0.071	NEG.	a
44	+	0.000	NEG.	a
45	+	0.000	NEG.	a
46	+	0.000	POS.	b
47	-	0.125	NEG.	a
48	-	0.00	NEG.	a
49	+	0.000	POS.	c
50	-	0.530	NEG.	a
51	d	0.005	NEG.	a
52	+	0.012	POS.	c
53	+	0.366	NEG.	a
54	-	0.008	NEG.	a
55	+	0.000	NEG.	a
56	+	0.000	NEG.	a

TOTAL POS. = 23

TOTAL NEG. = 33

CONDICION DE LA MUESTRA: + heces diarréicas
- heces formadas
d dato desconocido.

- INTERPRETACION DEL GRUPO: a. Corresponde al grupo en el cual no se presentó desarrollo.
- b. Corresponde al grupo que presentó una concentración entre los tubos 1 y 2 de la escala de -- Mac, Farland.
- c. Corresponde al grupo que presentó desarrollo con una concentración similar al tubo 4 en adelante de la escala de Mac. --- Farland.
- d. Corresponde al grupo que presentó desarrollo con una concentración mayor al tubo 10 de la escala de Mac Farland.

La interpretación de los tubos que corresponden al grupo b que presentaron una concentración bacteriana similar al tubo No. 1 y 2 de la escala de Mac Farland, nos indica que - la bacteria logra reproducirse en cantidades tan pequeñas -- que no le permitieran competir con otros géneros bacterianos que tienden a reproducirse de una manera abundante.

TABLA 4.3.1

RESULTADOS DE LA CORRELACION DE CEPAS DE AEROMONAS
SP. DE ACUERDO A SU PROCEDENCIA DE HECES DIARREICAS
 O FORMADAS CON EL DESARROLLO EN CALDO HAJNA.

TOTAL DE CEPAS:		DESARROLLO EN CALDO HAJNA (%)	
		POSITIVO	NEGATIVO
Heces diarreicas	38	15 (39.5%)	23 (60.5%)
Heces formadas	17	8 (47%)	9 (53%)

TABLA 4.4

RESULTADOS DE LA VALORACION DEL CRECIMIENTO DE AEROMONAS SP. EN CALDO SELENITO DESPUES DE 24 HORAS DE INCUBACION A 37°C. CON UN INOCULO INICIAL DE 3.75×10^2 UFC/ml.

No. Cepa	CASO ESTUDIO	CONDICION	LECTURA TURBIDIMETRICA EN ABSORVANCIA ($\lambda = 400$ nm)	INTERPRETACION DEL DESARROLLO
7	FP-417	-	0.021	NEG.
11	FP-27	+	0.119	POS.
12	IP-176	+	0.031	NEG.
13	IP-90	+	0.208	POS.
16	FP-397	-	0.025	NEG.
22	FP-17B	+	0.037	NEG.
25	FP-416	-	0.041	NEG.
27	1069	-	0.029	NEG.
34	IP-121	+	0.021	NEG.
40	1105	-	0.019	NEG.

El resto de las cepas no presentaron desarrollo. Las cepas que presentan una lectura de absorvancia menor de 0.070 nm. se consideraron como negativas, ya que corresponden a una concentración bacteriana menor al tubo número 1 de la escala de Mac Farland.

De las 25 cepas que presentaron desarrollo en caldo Hájna a 11 de ellas se les hicieron pruebas bioquímicas para identificar la especie y saber si había alguna relación de especies de Aeromonas en el desarrollo de dicho caldo de enriquecimiento.

Los resultados de dos de las pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de Aeromonas se indican en la tabla 4.5

TABLA 4.5

No. CEPA	GAS DE GLUCOSA	HIDROLISIS ESCULINA	ESPECIES	CRECIMIENTO EN HAJNA	CRECIMIENTO EN SELENITO
29	+	-	A. sobria	NEG.	NEG.
34	+	-	A. sobria	POS.	NEG.
36	+	-	A. sobria	POS.	NEG.
37	+	+	A. hydrophila	NEG.	NEG.
38	+	-	A. sobria	NEG.	NEG.
39	+	-	A. sobria	POS.	NEG.
40	+	+	A. sobria	POS.	NEG.
42	+	+	A. Hydrophila	POS.	NEG.
43	+	-	A. sobria	POS.	NEG.
44	+	-	A. sobria	NEG.	NEG.
48	-	+	A. caviae	NEG.	NEG.

Aún cuando se observa la predominancia de Aeromonas sobria no es posible basarse en la especie para indicar si hay predilección o no de especie por el caldo de enriquecimiento.

5.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Está comprobado que Plesiomonas shigelloides puede recuperarse muy fácilmente del caldo de enriquecimiento Hajna, con una elevada concentración, lo cual nos indica que esta bacteria puede competir ampliamente con cualquiera que presente desarrollo en un coprocultivo ordinario y se quiera recuperar de dicho caldo de enriquecimiento.

Observaremos que, debido a la alta concentración que presentaron estas cepas se produjo una sobre población bacteriana, por lo que se realizó una cuantificación bacteriana en placa, esto no dió resultado debido a que aún cuando la concentración bacteriana es elevada el número de bacterias viables está disminuido, por lo tanto se recomienda que la lectura se haga antes de transcurridas las 24 horas de incubación, esto para evitar lo más posible la muerte de estos microorganismos, esto es si se quiere determinar el número de bacterias viables.

Calculando los porcentajes de viabilidad vemos que: $0.98\% \frac{1.78 \times 10^7}{18 \times 10^8}$ corresponden a la cepa número 17 y $0.95\% \frac{1.71 \times 10^7}{18 \times 10^8}$ a la cepa número 18 (tabla 4.2), se considera un porcentaje de viabilidad muy bajo, lo cual nos sugiere que las resiembras se efectúen ordinariamente antes de transcurridas las 24 horas de incubación en caldo Hajna, para evitar que las bacterias lleguen a la fase de muerte.

Las cepas provenientes tanto de heces diarreicas como formadas, presentaron un desarrollo similar en caldo Hajna, descartando la posibilidad de relacionar la patogenicidad de una cepa con la resistencia o susceptibilidad a los inhibidores de dicho caldo.

Sin embargo, estos microorganismos no pueden recuperarse del caldo de enriquecimiento Selenito.

El porcentaje de recuperación de Aeromonas sp. a partir de los caldos de enriquecimiento Hajna y Selenito fue bajo (41% y 3.57%) respectivamente.

Una explicación de estos resultados pudiera ser, el conocimiento de que algunas cepas de Aeromonas sp. son inhibidas por las sales biliares, las cuales se encuentran presentes en ambos caldos.

Se hizo una correlación de las cepas de Aeromonas sp. de acuerdo a la condición de la muestra ya sean heces diarreicas o formadas, con el desarrollo en caldo Hajna (tabla 4.3.1), -- con el fin de observar una probable asociación de patogenicidad con la resistencia o susceptibilidad a las sales biliares contenidas en este caldo; basándose en que anteriormente se obtuvo aislamiento de Aeromonas sp. de vias biliares en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Angel Leaño (caso no publicado), además de otros casos similares, y se encontraron --

porcentajes muy similares en ambos tipos de cepas, lo cual descarta dicha posibilidad de asociación.

El crecimiento bacteriano que se presentó en caldo Hajna fue uniforme en el 98% de las cepas procesadas de Plesiomonas shigelloides, esto es basándonos en las lecturas obtenidas en absorbancia y en base a la escala de Mac Farland.

La cantidad de Unidades Formadoras de Colonias después de 24 horas de incubación en caldo Hajna es lo suficientemente alta para recuperarlas en la resiembra de un coprocultivo.

Esta reproducción le permite competir con otros géneros bacterianos de heces procesadas en cultivos ordinarios.

Plesiomonas shigelloides no presentó desarrollo en caldo Selenito, por lo que no debe utilizarse dicho caldo en la metodología de rutina para coprocultivo si se desea recuperar dicho microorganismo.

El porcentaje de recuperación de Aeromonas sp. fue menor de un 50% (41%) por lo que no se recomienda el uso de dicho caldo de enriquecimiento (Hajna) para el aislamiento de este género ya que el porcentaje de pérdida es superior al de recuperación, además dentro de este bajo porcentaje, algunas de las cepas presentaron muy poco desarrollo (grupo b), lo cual indica una baja competitividad de Aeromonas sp. con la flora

bacteriana de heces, evitando así su aislamiento.

En caldo Selenito solo 2 cepas presentaron valores significativos de crecimiento bacteriano, por lo que no se recomienda como caldo de enriquecimiento para la recuperación de Aeromonas.

CONCLUSION FINAL

Para la recuperación de Plesiomonas shigelloides, a partir de heces fecales puede y debe utilizarse el caldo de enriquecimiento Hajna.

Para la recuperación de Aeromonas sp. no deben utilizarse ninguno de los dos caldos de enriquecimiento evaluados en este estudio sino un primoaislamiento selectivo.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allen, D.A., B et al. 1983. Aeromonas media, a new species isolated from river water, Int. J. Syst Bacteriol 33:599-604
- 2.- Arai, T., N. et al. 1980. A surven of Plesiomonas shigelloides from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. J. Hyg, 84:202-211.
- 3.- Bergey's Manual of Determination Bacteriology. 1986. -- Williams & Wilkins.
- 4.- Antimicrobial Agente and Chemotherapy, July 1985. p. 151-153.
- 5.- Cowan y Steel's. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. CECSA. Segunda edición.
- 6.- Davis, W.A., et al. 1978. Human Aeromonas infections a -- review of the literature and case report of endocarditis Medicine, 57:267-277
- 7.- Davis, Dulbeco, Eisen et. al. Tratado de Microbiología. Salvat. Segunda edición.
- 8.- Elmer W. Koneman y Colab. 1983. Diagnóstico Microbiológico. Junin 831- Buenos Aires, Argentina.
- 9.- Hugh R. Lefson E. 1953. The taxonomic significance of -- fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates

- by various gram-negative bacteria. J. Bacteriol 66:24.
- 10.- Janda, J.M. et al. Biotyping of Aeromonas isolates as a correlate to delineating a Species-associated disease -- Spectrum. J. Clin. Microbiol. 19:44-47.
 - 11.- Janda, J. M. et al 1983. Aeromonas species in clinical microbiology: significance, epidemiology, and application. --- Diag. Microbiology Infection. Dis. 1:221-228.
 - 12.- Janda J. M. Reitano M. Bottone EJ. 1984. Biotyping of -- Aeromonas isolates as a correlate to delineating a species-associated.
 - 13.- Lennet. E., et al. 1985. Manual of Clinical Microbiology Fourth Edition. E.U.A. American Society for Microbiology.
 - 14.- Mandell, Douglas, Bennet. 1979. Principles and Practice - of Infection Disease. Vol. 2.
 - 15.- Pathak, A., J.R. et al. 1983. Neonatal septicemia and meningitis due to Plesiomonas shigelloides. Pediatrics. -- 71:389-391.
 - 16.- Pediatric Infection Disease. J. 7:53-57, 1988 Vol. 7 - No. 1 Venusto H.
 - 17.- Philip. L. Carpenter. Microbiología. 1979. Cuarta edición
 - 18.- Poonoff HY, Veron M 1976. A taxonomic study of Aeromonas - hydrophila Aeromonas punctata group J. Gen Microbiol. --

94:11.

- 19.- Popoff My, Coynault C, Kiredjian M, Lemelin M. 1981. Polynucleotide sequence relatedness among motile Aeromonas sp. Curr Microbiol. 5:109.
- 20.- Pitarangsi, C., P. et al. 1982. Enteropathogenicity of Aeromonas hydrophila and Plesiomonas shigelloides: prevalence among individuals without diarrhea in Thailand. Infection Immun. 35:666-673.
- 21.- Von Graevenitz, A., and. Bucher. 1983. Evaluation of differential and selective media for isolation of Aeromonas and Plesiomonas sp. from human feces J. Clinical Microbiology 17:16-21.
- 22.- Von Graevenitz, A. and L. Zenterhofer. 1970. The detection of Aeromonas hydrophila in stool specimen. Healt Laboratory Sci. 7:124-127.
- 23.- O.P. DAYLY; S.W. Joseph, et al Association of Aeromonas sobria with human infection; Journal of clinical microbiology. Vol. 13 No. 4, Jan. 1981. 769-777.
- 24.- M.D. and Denise A. Pickett, Ms. Aeromonas. Associated - gastroenteritis in children Pediatric. Infect. Dis. J. Vol. 7; 53-57 No. 1 1988.
- 25.- MSP Celia Glez. B y Colab. Aeromonas y Plesiomonas Infec tologia. Año V No. 6 Jun. 1985. 164-168.