

11
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
(ZARAGOZA)

**"SELECTIVIDAD Y AUMENTO EN LA SENSIBILIDAD
DIFERENCIAL DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA
BACTERIAS ENTEROPATOGENAS".**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

MARIA DEL PILAR CEDILLO MARTINEZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

AGOSTO DE 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O .

	PAGS.
INTRODUCCION.	1 - 6
GENERALIDADES.	7
a) MEDIOS DE CULTIVO.	7 - 16
b) CLASIFICACION.	16 - 23
c) FIEBRE TIFOIDEA.	24 - 25
FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.	26 - 27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	28
OBJETIVOS.	29
HIPOTESIS DE TRABAJO.	30
MATERIAL Y EQUIPO.	31 - 33
METODOLOGIA.	34 - 36
RESULTADOS.	37 - 57
ANALISIS DE RESULTADOS.	58 - 60
CONCLUSIONES.	61 - 62
BIBLIOGRAFIA.	63 - 67

INTRODUCCION

El grado de avance del nivel de salud de un pueblo se mide por las tasas de morbilidad y mortalidad de los padecimientos infecciosos y parasitarios.

Muchos de los países desarrollados, han mejorado notablemente la expectativa de vida y el bienestar de sus habitantes por haber reducido significativamente estas enfermedades, (26,33).

Las tasas de morbilidad y mortalidad para enfermedades infecciosas guardan relación inversa con el grado de desarrollo socio-económico e industrial. En México los elevados parámetros se ven favorecidos por los altos niveles de desnutrición, por las prácticas de fecalismo al aire libre, el manejo inadecuado de los alimentos y la falta de servicios asistenciales, (26).

A pesar de los progresos logrados en los últimos años en cuanto a las condiciones sanitarias, simultáneos a la paulatina evolución del nivel de vida, las defunciones por los padecimientos infecciosos, representa la primera causa de muerte entre los niños de edad preescolar y la segunda entre los menores de un año.

El descenso persistente, aunque lento, de morbilidad y mortalidad en un país, es una consecuencia del progreso socio-económico inevitable y no resultado de un factor específico, como serían las campañas de salud entre otros. Si todos los servicios de salud se enfocaran desde un principio a la prevención, además de tomar acciones suficientemente eficaces contra los factores que influyen en la frecuencia y gravedad de estas enfermedades, dando mayor atención a la vigilancia epidemiológica de las mismas.

En este trabajo abordaremos los padecimientos gastrointestinales bacterianos. No olvidemos que el problema afecta principalmente a niños y que cualquier medida encaminada a disminuirlo, será antes que todo en beneficio de la población infantil de nuestro país, (33).

Los términos de enfermedad diarréica, diarrea y gastroenteritis suelen utilizarse como sinónimos, aunque para algunos la denominación de gastroenteritis da una idea mayor de estos cuadros de origen distinto pero que se acompañan de un cuadro sintomático semejante.

Los autores anglosajones prefieren los términos gastroenteritis o enteritis; en cambio los latinos usan más la denominación de diarrea para referirse a este grupo de padecimientos, (26).

La organización Mundial de la Salud ha substituido la clasificación que incluía gastroenteritis, colitis, enteritis, colitis ulcerosa, etc, por una más sencilla en la que solo considera las enfermedades diarreicas con desnutrición o sin ella, de este modo, se constituye un grupo de enfermedades intestinales de etiología infecciosa o parasitaria, en las que la diarrea es el síntoma principal y su carácter transmisible, una de las peculiaridades más relevantes.

De acuerdo con los expertos de la Organización Mundial de la Salud se define como diarrea a la presencia de tres o más evacuaciones líquidas o pastosas que se presentan en un período de 12 horas.

Sin embargo algunas personas consideran que se puede llamar heces diarreicas hasta a una sola evacuación intestinal líquida.

Es conveniente hablar que cada persona tiene sus hábitos y si en un momento dado, aparecen con disminución de la consistencia o aumento de la frecuencia de las evacuaciones para ese sujeto determinado, esto podría ser también considerado como diarrea. En ocasiones puede acompañarse de elementos anormales como moco, sangre, alimentos, grasas, etc, (2,26,33).

Para la clasificación de las diarreas pueden establecerse varios parámetros:

1.- Con respecto al tiempo de evolución:

Podemos hablar de diarreas agudas y diarreas crónicas. La pauta que se señala para ésta división es que la diarrea que dura más

de 12 días o dos semanas se denominan crónica de lo contrario es aguda aunque ésta es una división un tanto artificial pero que puede ser útil. Otro tipo de clasificación es el de diarreas simples en las cuales el contenido solo es material fecal o aquellas que tienen acompañantes como moco, sangre, etc.

2.- En cuanto a la etiología:

Se clasifican desde diarreas funcionales hasta diarreas infecciosas, parasitarias, diarreas por otro tipo de padecimientos del intestino grueso o delgado, por padecimientos de otras áreas del aparato digestivo o de orden sistémico.

Las preponderantes son las de carácter infeccioso, que comprenden más del 90% de las diarreas agudas.

Por su etiología, las diarreas crónicas se deben principalmente a factores gastroenterológicos y no a agentes infecciosos. Las diarreas agudas infecciosas se les clasifica en bacterianas, parasitarias, virales y de causa desconocida.

Tres son las determinantes epidemiológicas que intervienen de alguna manera en cada caso de enfermedad; el agente etiológico, el huésped y el ambiente, (33,36).

El agente etiológico tiene capacidad para persistir en el ambiente y causar al huésped alteraciones fisiopatológicas: El huésped con sus características biológicas y de comportamiento pueden aumentar o disminuir el riesgo de enfermedad y el ambiente, como medio de transmisión del agente al huésped, (26,36).

Las interpretaciones que se hacen hoy en día del panorama global del padecimiento diarréico en la niñez, temprana se encuentran dentro del marco convencional de los conceptos epidemiológicos de tiempo, lugar, persona debido a que se trata de una colección de padecimientos de causalidad variada, algunos específicos en su naturaleza, otros sugestivos y una mayoría de casos con un agente no determinado infeccioso nutricional o de otro origen, la condición es aceptada como un síndrome.

El control comunitario del padecimiento diarreico endémico en un enfoque de grupo es casi ineludible en los países en vías de desarrollo, (26,36,38).

En edades preescolares es razonable y lógica, observando que los padecimientos diarreicos ocurren a todas las edades, la incidencia es mayor entre niños menores de cinco años y la mortalidad también mayor, sobre todo en países menos desarrollados. Aún así la generalización anterior se conserva para todas las regiones.

La frecuencia y gravedad varían dependiendo en forma importante del medio ambiente social.

Para una mejor comprensión es útil hacer una distinción en los intervalos de edad:

La enteritis neonatal se restringe a los primeros 28 días de nacido, la enteritis infantil el primer año con padecimientos post neonatal distinguible y finalmente las edades preescolares de 1 a 4 años.

La separación por edades es esencial, debido a que los casos en el segundo intervalo (equivalente a un año de edad), exceden en números a cualquier otra; en la mayoría de las poblaciones, la incidencia y mortalidad posterior declinan progresivamente. Con estas diferencias propias de cada edad, los periodos de desarrollo biológico son importantes para estudiar el padecimiento diarreico del niño, (34).

Es posible hacer divisiones geográficas del mundo de acuerdo a las características sociales y culturales y al factor biológico asociado a la fuente de alimentación. Las tasas de morbilidad y mortalidad son menores en países industrializados y elevadas en áreas menos desarrolladas. La distribución por edades son básicamente las mismas aunque los patrones epidemiológicos son de comportamiento variado.

Todas las regiones industrializadas tienen un patrón endémico reconocido de padecimientos diarreicos entre niños pequeños. En

Los países industrializados, sin embargo el alto grado de sanidad ambiental y buena nutrición han contribuido a una baja incidencia en la infancia tardía y niñez temprana, siendo la mayoría de casos esporádicos con eventos aislados en brotes localizados principalmente en familias, algunas veces en vecindarios o en pequeños grupos, escuelas o instituciones, (33, 34, 35, 36).

Los agentes bacterianos causales de diarrea, se ha visto que en países en vías de desarrollo, el 20% de los casos son atribuibles a tres agentes; Shigella, Escherichia coli, Salmonella.

Escherichia coli suele predominar en el primero o segundo año de vida. La enteritis neonatal es poco común en los recién nacidos que son alimentados con leche materna, (38).

Debe tomarse en cuenta, sin embargo que en el medio rural de áreas con desarrollo solo una pequeña proporción de casos endémicos de padecimientos diarréicos puede atribuirse a un agente patógeno entérico definido, tres cuartas partes de los casos permanecen indiferenciados y que en un momento dado los casos en una comunidad son una mezcla de padecimientos y que en un tiempo razonable la mayoría de los agentes y sus tipos serológicos pueden ser identificados. En raras ocasiones, el género de un agente infeccioso puede reemplazar a otro con mayor frecuencia ya que no sucede así tratándose de una especie diferente y aún más de un tipo serológico del agente infeccioso, (38).

Como muchos padecimientos que afectan a los niños en edades tempranas, el síndrome diarréico agudo es un proceso endémico que presenta fluctuaciones. Las exacerbaciones estacionales son usuales, en los trópicos, las incidencias suceden en los meses calurosos y secos que preceden a la estación de lluvias. Otras circunstancias ambientales que inducen variaciones dentro del rango de endemicidad esperada, son los fenómenos naturales, tales como inundaciones, sequías, escasez de alimentos o una epidemia de algunos de los padecimientos transmisibles de la niñez.

Independientemente de la edad, la frecuencia de la gravedad de los padecimientos diarréicos en niños preescolares va en relación directa con el grado de desnutrición, (36).

En México la magnitud del problema de las enfermedades entéricas seguramente rebasa los límites de la información existente utilizando las reservas del caso en el quinquenio 1984-1988, las enfermedades entéricas ocuparon el segundo lugar como causa de muerte representando el 15% del total de las defunciones de la población general y más del 60% de las defunciones debidas a todas las enfermedades infecciosas y parasitarias, (26,33,38).

Abordando el asunto más analíticamente, encontramos que en 1987 las defunciones por diarrea agrupadas por edad se manifestaron prioritariamente en los Menores de 4 años siendo responsable de un 25% de las muertes. Uno de cada 4 niños fallece por diarrea, siendo la primera causa de muerte en niños de 1-4 años de edad y la segunda en los menores de un año. Es importante hacer notar que hasta ahora solo se ha referido a las defunciones sin hacer mención de la morbilidad, (38).

GENERALIDADES.

a) MEDIO DE CULTIVO:

Debido a que la mayoría de las muestras enviadas al laboratorio de microbiología contiene varias especies de bacterias mezcladas a menudo con otros microorganismos, se debe utilizar un medio de cultivo para aislar aquellas especies que pueden ser de importancia clínica. Para efectuar selecciones racionales los microbiólogos deben conocer los componentes de los medios. Por ejemplo no es suficiente saber que la fórmula de varios medios incluye sales biliares para inhibir el desarrollo de especies Gram positivas y algunas de las Gram negativas más exigentes. La concentración de las sales biliares determinan a menudo cuales bacterias serán inhibidas y en que medida podría ser selectivo un medio dado, (9,25).

Para la recuperación de enterobacterias a partir de muestras clínicas que potencialmente contienen bacterias mixtas, se dispone de tres tipos de medios:

- 1) Medios de aislamiento primarios.
- 2) Medios de aislamiento selectivo.
- 3) Caldos de enriquecimiento.

TIPOS GENERALES DE SUSTANCIAS Y COMPUESTOS USADOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO:

La siguiente es una lista de los tipos generales de sustancias y compuestos empleados en los medios selectivos, incluyendo breves comentarios sobre la función de cada uno, (25).

1) HIDROLIZADOS DE PROTEINAS: Peptona, infusión de carne, triptones, caseína. Elementos nutritivos básicos que promueven el desarrollo de la mayoría de las bacterias, específicamente suministran do las fuentes de carbono y nitrógeno necesarios para el metabolismo bacteriano.

2) HIDRATOS DE CARBONO: Los medios selectivos incluyen una variedad de disacáridos; lactosa, sacarosa y maltosa, así como hexosas; dextrosa y pentosa; xilosas con dos prótidos:

- a) Proveer una fuente accesible de carbono para producción de

8) OTROS COMPUESTOS Y SUSTANCIAS: El agar es un extracto gelatinoso de algas marinas rojas que se añade comunmente a los medios a concentraciones variables como agente solidificante. Se utilizan concentraciones de 1 a 2% para medios de cobertura, de 0.05 a 0.3% en los medios de movilidad y se añaden trazas a los caldos a fin de evitar corrientes de convección y penetración de oxígeno en las porciones anaerobias más profundas. El tiosulfato de sodio es una sustancia que se añade generalmente con el fin de proveer una fuente de azufre para la producción de gas sulfhídrico, (25).

MEDIOS DE AISLAMIENTO PRIMARIOS DE ENTEROBACTERIAS

Agar Mac Conkey.

Agar Eosina Azul de Metileno.

Agar Desoxicolato-Citrato.

Agar ENDO.

Mac Conkey describió en 1905, un medio de aislamiento primario que denominó agar rojo neutro-sales biliares, cuya fórmula fue concebida para separar los bacilos Gram Negativos entéricos de muestras que contenían especies bacterianas mixtas. Si bien en aquel tiempo todos los bacilos Gram Negativos no esporulados se designaban todavía como organismos entéricos, los microbiólogos habían reconocido ya la importancia de identificar ciertas especies que parecían ser más patógenas para el hombre que otras. Los patrones de utilización de hidratos de carbono para varias especies bacterianas eran ya conocidos al comienzo del siglo y la fermentación de lactosa en especial se consideraba un marcador importante para diferenciar estos agentes patógenos entéricos; Mac Conkey incorporó la lactosa al agar con sales biliares, junto con el indicador rojo neutro, que provee un medio visual directo para detectar la utilización de la lactosa por parte del organismo en estudio, (23, 25).

Todo organismo en estudio capaz de degradar lactosa con producción de ácidos, forman colonias rojas en agar neutro rojo sales biliares (agar Mac Conkey) debido al viraje del indicador a un pH ácido.

energía.

b) Servir de sustrato en las pruebas bioquímicas para determinar la capacidad de un microorganismo desconocido para utilizar diferentes azúcares con formación de ácido y/o gas.

3) AMORTIGUADORES: Los fosfatos monosódicos y disódicos balanceados son los más comunes. Los amortiguadores cumplen dos funciones principales:

a) Proveer el pH estándar de referencia para aquellos medios en los que se emplea un cambio de pH como punto final para detectar productos metabólicos usados en la identificación de microorganismos.

b) Proveer el pH estable que más se adapte al desarrollo de los microorganismos.

4) ENRIQUECIMIENTOS: Sangre, suero, suplementos vitamínicos y extracto de levadura. Compuestos que se añaden a los medios para promover el desarrollo de los microorganismos más exigentes. Los enriquecimientos se utilizan menos comúnmente en los medios de aislamiento de enterobacterias, ya que la mayoría de los miembros de este grupo desarrollan bastante bien.

5) INHIBIDORES: Diferentes compuestos suelen servir para inhibir el desarrollo de ciertas especies bacterianas no deseadas:

a) Colorantes como verde brillante, eosina, azida.

b) Metales pesados como bismuto.

c) Sustancias químicas como citrato, desoxicolato, selenito, alcohol feniletílico.

6) COLORANTES DE pH: Tales como fucsina, azul de metileno, rojo neutro, rojo de fenol y púrpura de bromocresol, son los más comúnmente utilizados para medir cambios de pH producidos en los medios por acción de las bacterias sobre un sustrato dado.

7) OTROS INDICADORES (No colorantes): Se pueden incluir otros indicadores para la detección de sustancias específicas, tales como iones férricos y ferrosos o precursores de sulfuros para detectar gas $H_2 S$.

Por lo tanto Mac Conkey fué uno de los primeros en idear un medio capaz no sólo de seleccionar cierto grupo de bacterias, sino también de permitir la identificación preliminar de características metabólicas y bioquímicas.

Los medios de aislamiento primarios son sólo moderadamente inhibidores y están concebidos para recuperar muchas especies diferentes de bacterias dentro de un grupo amplio.

Los medios como agar Mac Conkey, agar Eosina Azul de Metileno, agar Desoxicolato-Citrato, agar ENDO, inhiben así mismo el desarrollo de casi todas las especies de organismos Gram Negativos exigentes, no obstante, permiten el desarrollo de todas las enterobacterias y otros bacilos Gram Negativos. La elección de uno de estos cuatro medios es en gran parte cuestión de preferencia personal, si bien existen diferencias en sus propiedades inhibidores y en la apariencia de sus colonias.

Los cuatro medios tienen la facilidad y capacidad de diferenciar las especies bacterianas que utilizan lactosa de las que no la utilizan. En el agar de Mac Conkey y en el agar Desoxicolato, que contiene rojo neutro como indicador de pH, las colonias utilizadoras de lactosa aparecen rojas con la producción de ácidos. Los fuertes productores de ácidos, como Escherichia coli, forman colonias de un rojo intenso con difusión del pigmento en el agar circundante. Los productores de ácidos más débiles forman colonias rosadas, o bien claras en la periferia con centros rosados, (26, 29).

En los agares E.M.B. y ENDO, las bacterias que son grandes productoras de ácido forman colonias con brillo metálico. Muchos microbiólogos prefieren estos debido a que este brillo ayuda a identificar la Escherichia coli, sin embargo, ésta característica es inespecífica ya que otros bacilos entéricos pueden producirla y no todas las cepas de Escherichia coli poseen ésta apariencia clásica. El agar E.M.B., tiene la ventaja de revelar la naturaleza

mucoide de algunas cepas de Escherichia coli y especies de Klebsiella debido a el aumento de producción de sustancias polisacáridas en este medio, (26).

Dado que la mayoría de las cepas de Shigella y todas las Salmonelas no son inhibidas por sales biliares, son muchos los que prefieren el agar Desoxicolato-Citrato para aislar estos agentes patógenos potenciales de muestras fuertemente contaminadas tales como heces o aguas cloacales.

El agar ENDO no se utiliza comunmente en los laboratorios clínicos sino más bien ampliamente utilizados por bromatologos y epidemiologos para la recuperación e identificación preliminar de organismos entéricos a partir de alimentos y aguas, (5,25).

MEDIOS DE AISLAMIENTO SELECTIVOS.

Los medios se hacen selectivos añadiendo a sus fórmulas una variedad de inhibidores, generalmente en mayor concentración que la de los medios de aislamiento primario..

Los medios selectivos usados para el aislamiento de enterobacterias de cultivos mixtos, estan concebidos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram Positivas, retardar en grado variable el desarrollo de Escherichia coli y de otros bacilos coliformes. Esto permite la recuperación de Salmonella y Shigella a partir de muestras donde se hallan en escaso número en comparación con la concentración masiva de otros organismos entéricos.

Si bien se han formulado varios medios selectivos para su utilización en laboratorios clínicos, solo discutiremos los cuatro más comunmente empleados:

- Agar Salmonella-Shigella (SS)
- Agar Enterico Hektoen (HE)
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar Sulfito Bismuto (SB).

La elección de uno de estos medios para el aislamiento de enterobacterias depende tanto de la preferencia como de la especie a seleccionar. En general los medios selectivos se utilizan para la re -

recuperación de especies de Salmonella y Shigella de las heces de pacientes con diarrea. Virtualmente todas las especies de Salmonella desarrollan bien en presencia de sales biliares, lo cual explica porque este organismo se aísla por lo común de la vesícula biliar, particularmente en individuos portadores de Salmonella. Las sales biliares se añaden comúnmente a los medios selectivos debido a que otras especies de bacilos entéricos, incluyendo algunas cepas más exigentes de Shigella, presentan un desarrollo pobre o no en dichos medios. Los agares SS y HE que contienen concentraciones relativamente altas de sales biliares se adaptan bien para el aislamiento de Salmonella a partir de muestras muy contaminadas con otros bacilos coliformes. La mayoría de las Shigelas, desarrollan también en estos medios, si bien algunas cepas son inhibidas. El Agar XLD, con menores concentraciones de sales biliares es más efectivo para la recuperación de todas las Shigelas, particularmente luego que la muestra ha sido enriquecida durante unas horas en caldo para Gram Negativos. Sin embargo, debido a que otras especies de bacilos coliformes especialmente Escherichia coli son menos inhibidas en agar SLD, en agar SS, o el HE, se adaptan mejor al aislamiento de Salmonella y Shigella de muestras de heces sembradas directamente en placas de agar. (25).

Los agares HE y XLD se utilizan ahora ampliamente en laboratorios clínicos, no solo porque aumentan la recuperación de Salmonella y Shigella de muestras clínicas sino también porque permiten detectar una variedad de características bioquímicas que ayudan a la identificación preliminar de especies.

Los hidratos de carbono contenidos en el agar HE, son lactosa, sacarosa y salicina. Los microorganismos que utilizan estos hidratos de carbono con producción de ácido desarrollan en HE, como colonias translúcidas o verde claro, (debido al color de fondo del medio). La Klebsiella rhinocleromatis que utiliza únicamente salicina produce una sola cantidad de ácido y se puede sospechar su

sospechosa en colonias con brillo negro. El agar SB, es útil también para evidenciar aquellas cepas infrecuentes de especies de Salmonella lactosa positivas que pueden pasar inadvertidas o considerarse sin importancia en otros medios selectivos. Este medio no es ampliamente utilizado en los laboratorios clínicos debido a su alta selectividad y a su muy breve período de conservación de un solo día, (5, 25).

CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO.

Como su nombre lo indica, los caldos de enriquecimiento se usan para acrecentar el desarrollo de ciertas especies bacterianas, inhibiendo el de los microorganismos acompañantes.

Los caldos de enriquecimiento se utilizan más comúnmente en los laboratorios clínicos para el aislamiento de Salmonella y Shigella de nuestras fecales. Esto es particularmente necesario en el caso de portadores de Salmonella o en algunos casos de infección por Shigella en los que el número de microorganismos puede ser de tan solo 200 por gramo de heces, en comparación con las cantidades masivas de Escherichia coli u otros bacilos entéricos que pueden llegar a 10^9 por gramo de heces o más.

Los caldos de enriquecimiento actúan sobre la base del principio de que la flora entérica normal se mantiene en la fase de retardo del desarrollo, mientras que las especies de Salmonella y Shigella son desinhibidas y entran en una fase logarítmica normal de crecimiento. Por lo tanto, se recomienda el subcultivo del desarrollo obtenido en el caldo de enriquecimiento en uno de los medios selectivos a las 18 horas de incubación.

Los caldos más comúnmente utilizados son:

Caldo Selenito.

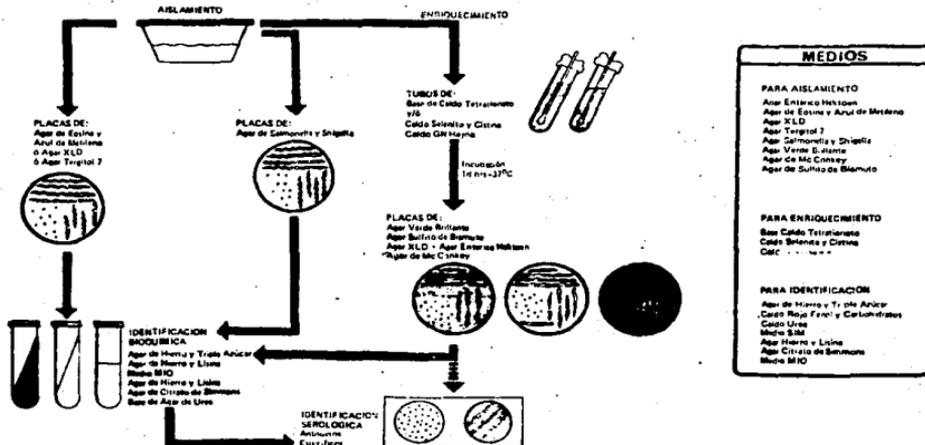
Caldo Gram Negativo.

Caldo Tetracionato.

Debido a los distintos inhibidores utilizados, estos caldos difieren en su selectividad y aplicaciones específicas, (5, 25).

COPROCULTIVO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION



MEDIOS

PARA AISLAMIENTO

Agar Enterico Hektogen
 Agar de Escala y Azul de Metileno
 Agar XLD
 Agar Tripsin 7
 Agar Salmonella y Shigella
 Agar Verde Brillante
 Agar de MacConkey
 Agar de Sulfito de Bismuto

PARA ENRIQUECIMIENTO

Base Caldo Tetratramo
 Caldo Selenita y Citina
 Caldo GN Huevo

PARA IDENTIFICACION

Agar de Horno y Tripsin Anilico
 Caldo Royal Froy y Carbonohidrat
 Caldo Lixas
 Medio RDG
 Agar Horno y Lixas
 Agar Citrato de Selenio
 Base de MHO

Los caldos Selenito y Tetratiónato son más inhibidores del desarrollo de Escherichia coli y otros bacilos Gram Negativos entéricos que el caldo Gram Negativo, por lo que se utilizan para el aislamiento de especies de Salmonella o Shigella de muestras fuertemente contaminadas tales como heces o aguas cloacales, en las que puede ser aconsejable un inóculo abundante. Sin embargo, el caldo --- Gram Negativo se utiliza con mayor frecuencia en laboratorios clínicos, pues es menos inhibidor del desarrollo de muchas de las cepas más exigentes de Shigella.

El enriquecimiento de muestras fecales en caldo Gram Negativo durante 4-6 horas y subcultivo en agar XLD, es la técnica óptica para el aislamiento de Shigella en casos sospechosos de disentería bacilar, (5, 25).

b) CLASIFICACION.

La clasificación de las enterobacterias está basada inicialmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano.

Estas enzimas involucradas en el metabolismo bacteriano pueden ser evidenciadas en medios especiales usando técnicas de cultivo -- "in vitro" en los que el sustrato sobre el que actúan las enzimas, se incorpora junto con un sistema indicador que pone manifiesto la degradación del sustrato o la presencia de un metabolito específico, (4, 45).

A pesar de usar los mismos principios básicos, existen diferentes clasificaciones de la familia Enterobacteriaceae:

a) La propuesta en 1975 en la 8va. edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. En esta las especies se integran tomando en cuenta las principales reacciones bioquímicas. (Cuadro I).

b) Clasificación de Kauffman. Se basa principalmente en las reacciones bioquímicas, serología y en algunos casos mediante fagotipía. (Cuadro 2).

c) Clasificación de Edwards y Ewing. En ella se agrupan los mi

embros de la familia en géneros, especie y biotipo sobre la base de sus semejanzas morfológicas, bioquímicas y genéticas. Toma en cuenta las pruebas bioquímicas, sensibilidad a bacteriofagos específicos, uso de antibiogramas y estudios en la hibridación del DNA de las bacterias. Siendo ésta la más usada. (Cuadro 3) (13,24,45).

d) Clasificación del Centro de Control de Enfermedades (C.D. C.).

Es la más reciente clasificación, la cual incluye algunos cambios en la taxonomía y nomenclatura de algunos organismos. Se basa en los parámetros fenotípicos, la transferencia de genes a través de los plásmidos y técnicas de hibridación del DNA. (Cuadro 4) (24, 45).

CUADRO 1 MANUAL DE BERGEY (8va. ed.) 1975.

FAMILIA: ENTEROBACTERIACEAE.

Género I: Escherichia.

Especie: E. coli.

Género II: Edwardsiella.

Especie: E. tarda.

Género III: Citrobacter.

Especies: C. intermedius.

C. freundii.

Género IV: Salmonella.

Especies: S. cholerae-suis.

S. typhi.

S. enteritidis.

S. arizonae.

Género V: Shigella.

Especies: Sh. dysenteriae.

Sh. flexneri.

Sh. boydii.

Sh. sonnei.

Género VI: Klebsiella.

Especies: K. pneumoniae.

K. ozaenae.

K. rhinoscleromatis.

Género VII: Enterobacter.

Especies: E. cloacae.

E. aerogenes.

Género VIII: Hafnia.

Especies: H. alvei.

Género IX: Serratia.

Especies: S. marcescens

S. liquefaciens.

Género X: Proteus.

Especies: P. vulgaris.

P. mirabilis.

P. morganii.

P. rettgeri.

P. inconstans.

Género XI: Yersinia.

Especies: Y. enterocolitica.

Y. pseudotuberculosis.

Y. pestis.

Género XII: Erwinia.

Especies: E. herbicola.

GUADRO 2 CLASIFICACION SEGUN KAUFF MAN 1972.

Tribu	Género
a) <u>Escherichiae</u>	1. <u>Escherichia</u> II. <u>Shigella</u> III. <u>Salmonella</u> IV. <u>Citrobacter</u>
b) <u>Klebsielleae</u>	1. <u>Klebsielle</u> II. <u>Enterobacter</u> III. <u>Hagnia</u> IV. <u>Serratia</u>
c) <u>Proteae</u>	1. <u>Proteus</u> II. <u>Morganella</u> III. <u>Rettgerella</u> IV. <u>Providencia.</u>

CUADRO 3

FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

Tribus	Géneros.
I.- <u>Escherichiae</u>	<u>Escherichia</u> <u>Edwardsiella</u> <u>Citrobacter</u> <u>Salmonella</u> <u>Shigella</u>
II.- <u>Klebsiellae</u>	<u>Klebsiella</u> <u>Enterobacter</u> <u>Hafnia</u> <u>Serratia</u>
III.- <u>Proteae</u>	<u>Proteus</u> <u>Providencia</u>
IV.- <u>Yersinieae</u>	<u>Yersinia</u>
V.- <u>Erwiniae</u>	<u>Erwinia</u>

Sacada del Manual de Ewing (1972)

CUATRO 4

Tribu	Géneros	Especies	Cambios	Adiciones
I.- <u>Escherichiae</u>	<u>Escherichia</u> <u>Shigella</u>	<u>coli</u> <u>dysenteriae</u> <u>flexnerii</u> <u>sonnei</u>		
II.- <u>Edwardsiellae</u>	<u>Edwardsiella</u>	<u>tarda</u>		
III.- <u>Salmonellese</u>	<u>Salmonella</u> <u>Arizona</u> <u>Citrobacter</u>	<u>choleraesuis</u> <u>typhi</u> <u>enteritidis</u> <u>hinshawii</u> <u>freundii</u>		<u>C.amal-</u> <u>naticus</u>
IV.- <u>Klebsiellae</u>	<u>Klebsiella</u> <u>Enterobacter</u> <u>Serratia</u>	<u>diversus</u> <u>pneumoniae</u> <u>ozaenae</u> <u>rhinoscleromatis</u> <u>aerogenes</u> <u>agglomerans</u> <u>hafniae</u> <u>marcescens</u> <u>liquefaciens</u> <u>rubidea</u>		<u>K.oxitoca</u> <u>E.saka -</u> <u>zaki</u>
V.- <u>Protonae</u>	<u>Proteus</u>	<u>mirabilis</u> <u>rettgeri</u>		<u>Hafnia alvei</u>
		(biotipo 4)	<u>Providencia</u>	
		(biotipo 5)	<u>rettgeri</u> <u>Providencia</u> <u>stuartii</u>	
		<u>morganii</u>	<u>Morganella</u> <u>morganii</u>	

ProvidenciaVI.- Yersiniaceae YersiniaalcalifaciensstuartiipestispseudotuberculosisenterocoliticaY. intermedia.Y. frederickseniiY. ruckeriVII.- Erwinieae ErwiniaPectobacterium

Tomado de Brenner y col (1977)

c) FIEBRE TIPOIDEA.

La fiebre tifoidea se clasifica en el grupo de fiebres entéricas de las cuales es la más estudiada. Este grupo de enfermedades puede ser producido por cualquier organismo del grupo Salmonella pero las especies más frecuentes son; S. typhi, S. paratyphi, S. choleraesuis, S. hirschfeldii.

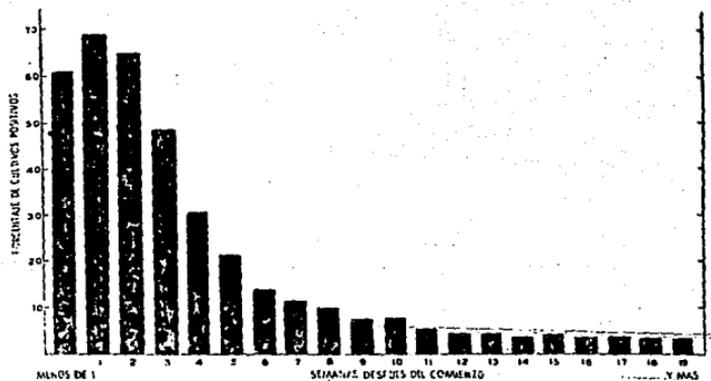
La fiebre tifoidea es producida específicamente por S. typhi. La vía de transmisión es a través de agua o alimentos contaminados o por medio de otros mecanismos como mosca, mariscos, etc. Siempre se establece la relación directa o indirecta con un enfermo agudo o portador asintomático para que se presente la enfermedad. (14,26).

Es una enfermedad aguda y febril que se presenta únicamente en el hombre, quien es a la vez el único reservorio conocido. Se caracteriza por fiebre elevada continua, cefales, malestar general, anorexia, mialgias, escalofríos, dolor abdominal, esplenomegalía y leucopenia.

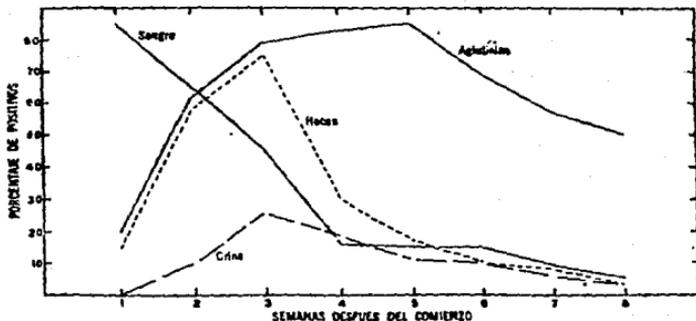
Es de curso prolongado y severo, que puede propiciar complicaciones graves como sangrado de vías digestivas alta, perforación intestinal y coagulación intravascular diseminada entre otras.

El diagnóstico presuntivo se puede establecer por datos epidemiológicos, cuadro clínico y parámetros de laboratorio y el definitivo se establece al aislar S. typhi, en mielocultivo, coprocultivo o cultivo de roseola. (ver pag. 25).

El tratamiento específico es a base de cloranfenicol aunque se ha demostrado resistencia a esta droga por varios serotipos de S. Typhi en porcentajes variables de casos y especialmente en brotes epidémicos.



Persistencia de infección por bacilo *Typhi*, según el porcentaje de cultivos fecales positivos semanales después de iniciada la enfermedad. (Datos de 374 casos en el estado de Nueva York, según Ames y Robin.)



Frecuencia aproximada de cultivos positivos de sangre, heces y orina, así como respuesta de aglutininas en la fiebre tifoidea.

FUNDAMENTACION.

El síndrome diarreico es una manifestación clínica de una patología extensa y variada cuyo origen en México se encuentra asociado en la mayor parte de los casos por agentes bacterianos ya sea de manera aislada o bien mediante una mezcla de los mismos, (33).

Entre los agentes bacterianos que se han referido como productos de diarrea se puede mencionar; Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Proteus y Klebsiella, (37).

Según los informes de la Organización Mundial de la Salud las gastroenteritis constituyen la principal causa de muerte en los países de desarrollo, representando en términos generales entre el 20% y el 30% de la mortalidad en estos países. En América Latina las tasas de mortalidad por enteritis oscilan entre el 40% y 45%, lo que revela la gran diversidad de los niveles socioeconómicos, (38).

En México, las gastroenteritis son uno de los principales motivos de consulta y de hospitalización, ocupando en la actualidad el segundo lugar entre las causas de muerte en la República. Su frecuencia se ve aumentada en medios mal saneados y en poblaciones con desnutrición prevalente; predominando en los lactantes, sobre todo durante los primeros meses de vida y disminuyendo la frecuencia en forma paulatina hasta la etapa final de la edad preescolar. En edades posteriores su incidencia es más esporádica. (38)

El huésped y el reservorio principal es el hombre, la fuente de infección más frecuente son las deyecciones fecales.

Los mecanismos de transmisión son a través del agua y bebidas con material fecal (ciclo largo), o por contacto directo a través de las manos (ciclo corto). El microorganismo durará todo el tiempo que se elimine por las heces, lo cual acontece desde unos cuantos días, hasta varias semanas, (34).

El diagnóstico de gastroenteritis es relativamente fácil. La presencia de diarrea aguda casi siempre indica la existencia de infección entérica. La comprobación de un agente infeccioso enteropató

geno sólo se puede hacer mediante estudios de laboratorio, el cual está indicado en las siguientes circunstancias:

-En los recién nacidos, en niños con desnutrición avanzada o en pacientes con inmunodepresores.

-En presencia de evacuaciones mucosanguinolentas.

-En presencia de complicaciones graves, (34).

El exámen de laboratorio utilizado es el coprocultivo por el que se logra identificar las bacterias enteropatógenas, disponiendo se de tres tipos generales de medios; 1) de aislamiento primario, 2) de aislamiento selectivo y 3) caldos de enriquecimiento, (25).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente se emplean más de dos medios de cultivo para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales bacterianas en la realización del coprocultivo, lo cual origina un mayor gasto de material y tiempo en el diagnóstico de dichas infecciones provocando a su vez un incremento en el costo del análisis. Esto afecta en gran forma al paciente, el cual debe esperar el reporte del resultado del análisis por el laboratorio para posteriormente recibir el tratamiento adecuado.

Ahora bien, a esto se suman los resultados falsos negativos que se pueden obtener, debido a la selectividad de los medios o a la baja proporción de patógenos con respecto a la flora normal que los enmascara.

Por lo tanto es necesario optimizar el análisis con el uso de un solo medio de cultivo selectivo y diferencial, que reduzca de esta forma el trabajo, tiempo y costo en la realización del análisis con un buen margen de seguridad.

En la E.N.E.P. Zaragoza se ha desarrollado un medio de cultivo que tiene una buena diferenciación pero la falta colectividad por lo que se pretende optimizarlo aumentando sus características diferenciales y selectivas.

O B J E T I V O S .

- 1.- Reformular un medio selectivo y diferencial para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales.
- 2.- Reducir costo para el diagnóstico de dichas infecciones bacterianas.
- 3.- Disminuir el tiempo para la identificación de bacterias enteropatógenas.
- 4.- Realizar un estudio comparativo del medio de cultivo modificado, con respecto a los medios comunmente utilizados.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

Al aumentar la selectividad y la sensibilidad diferencial _
del medio de cultivo se podrá identificar presuntivamente y de _
manera rápida el agente etiológico bacteriano de infección gas -
trointestinal, reduciendo de este modo el trabajo, tiempo y cos-
to del análisis.

MATERIAL

VIDRIO.

Caja petri de vidrio.

Cubreobjetos.

Frascos de boca ancha con tapa de rosca de 1 lt.

Frascos goteros de 60 ml.

Matraz aforado de 1000 ml.

Matraz aforado de 250 ml.

Matraz aforado de 100 ml.

Matraz aforado de 50 ml.

Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.

Matraz Erlenmeyer de 250 ml.

Pipetas graduadas de 1 ml.

Pipetas graduadas de 2 ml.

Pipetas graduadas de 5 ml.

Pipetas Pasteur.

Pipetas serológicas de 0.1 ml.

Pipetas serológicas de 0.2 ml.

Portaobjetos.

Probeta graduada de 100 ml.

Termómetro de $-10-200^{\circ}\text{C}$.

Tubos de ensayo de 13 X 100.

Vasos de precipitado de 500 ml.

Vasos de precipitado de 100 ml.

Vasos de precipitado de 50 ml.

DIVERSOS.

Algodón.

Asa y portaasa bacteriológica.

Gasa.

Gradilla para tubos de ensayo.

Guantes de asbesto.
Guantes de cirujano.
Hisopos estériles.
Marcador de tinta permanente.
Masking tape.
Mechero Bunsen.
Pepel pH.
Tela de alambre con asbesto.
Tripie metálico.

EQUIPO.

Agitador magnético para tubos de ensaye VORTEX GENIE modelo K 550/G.

Autoclave

Balanza analítica METLER modelo H 80.

Balanza granateria CHAUS modelo FLOHAM PARK.

Contador de colonias SOL/BAT modelo No. 432.

Espectrofotómetro BAUSCH AND LOME modelo ESPECTRONIC 20.

Encubadora MAPSA modelo EC-334

Microscopio AMERICAN OPTICAL modelo ONE TONE.

Refrigerador MABE modelo SPACE LINE.

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

Solución de Kovac.

Lactosa. Sigma. (Reactivo analítico).

Urea. Sigma. (Reactivo analítico).

Citrato de sodio. J. T. Baker (Reactivo analítico).

Sulfato férrico amoniacal. J. T. Baker (Reactivo analítico)

Tiosulfato de sodio. J. T. Baker. (Reactivo analítico).

Agar bacteriológico. Bioxon.

Peptona de caseína. Bioxon.

Extracto de levadura. Sigma.

COLCANTES.

Cristal violeta. Merck.

Safranina. Merck.

Rojo de fenol. Merck.

MEDIOS DE CULTIVO.

Caldo BHI (BIOXON).

Agar Eosina Azul de Metileno (BIOXON).

Agar Salmonella-Shigella (BIOXON).

Agar Verde Brillante (BIOXON).

Agar-Agar (BIOXON).

DISOLVENTES.

Acetona J. T. Baker. (Reactivo analítico)

Alcohol etílico absoluto J. T. Baker. (Reactivo analítico)

Agua destilada

Agua estéril

MATERIAL BIOLÓGICO.

Cepa pura de Salmonella entérica subespecie entérica gpo.B.

Cepa pura de Shigella flexneri.

Cepa pura de Escherichia coli

Cepa pura de Klebsiella pneumoniae.

Cepa pura de Proteus vulgaris.

Cepa pura de Proteus mirabilis.

150 pacientes niños menores de 5 años, con diagnóstico de síndrome diarreico.

METODOLOGIA.

MEDIO BASE:

Agar	1.5 g
Peptona de caseína	1.5 g
Lactosa	1.0 g
Tiosulfato de sodio	0.8 g
Sulfato férrico amoniacal	0.12 g
Citrato de sodio	0.44 g
Rojo de fenol	0.02 g
Urea 2N 3.5 ml/ 500 ml.	
Agua destilada c.b.p.	100 ml

ETAPA I EVALUACION DE LA CONSISTENCIA DEL MEDIO BASE.

Se procedió a evaluar la consistencia del medio base, utilizando agar, peptona de caseína y extracto de levadura a concentraciones e inoculando cepas de Escherichia coli y Salmonella grupo B para obtener un soporte de crecimiento adecuado.

Los reactivos que se incorporaron al medio fueron:

Lactosa.

Urea.

Tiosulfato de sodio.

Sulfato férrico amoniacal.

Citrato de sodio.

Detectandose lo siguiente:

- 1) Fermentación de lactosa; observando un cambio de pH por la producción de ácidos es decir una disminución de pH.
- 2) Hidrolisis de la urea; produciendo una alcalinización y un aumento de pH en el medio.

Nota: la urea debe adicionarse en solución estéril, una vez que el medio ha sido esterilizado para evitar que se hidrolize.

Se adicionó un indicador de pH (rojo de fenol) para observar la utilización de los metabolitos Urea y Lactosa.

- 3) La producción de H_2S .

Para observar la diferenciación metabólica se utilizaron las siguientes cepas:

CEPAS	Lactosa	Urea	H ₂ S
<u>Escherichia coli</u>	+	-	-
<u>Salmonella</u> grupo B	-	-	+
<u>Proteus vulgaris</u>	-	+	+

ETAPA III SELECTIVIDAD DEL MEDIO.

Se le dió selectividad al medio con respecto a las bacterias enteropatógenas.

Se colocaron diferentes concentraciones de inhibidores de bacterias Gram positivas y se valoró su selectividad en forma individual así como en mezcla.

Los inhibidores que se utilizaron fueron los siguientes:

Laurilsulfato de sodio.

Cristal violeta.

Bisulfito de sodio.

Las cepas inoculadas fueron las siguientes:

Staphylococcus aureus (Gram positivo).

Escherichia coli. (Gram Negativo).

Proteus vulgaris. (Gram Negativo).

Salmonella grupo B. (Gram Negativo).

ETAPA IV ESTABILIDAD.

a) Lectura.

b) Almacenaje.

a) Lectura.- Se inoculó en el medio final cepas puras de Salmonella grupo B, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae, Shigelle flexneri, y se tomaron lecturas a diferentes intervalos de tiempo que van desde las 12 horas a las 24 horas a partir de la inoculación. Con el fin de observar buen desarrollo y diferenciación metabólica.

b) Almacenaje.- Se colocaron lotes del medio final a temperatura de almacenaje de 4°C probando los medios cada tres días, comparando las características diferenciales de las cepas de referencia.

ETAPA V ANALISIS DE 150 MUESTRAS EN EL MEDIO FINAL.

Se analizaron 150 muestras provenientes del Hospital Pediátrico de Ixtacalco y del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza Campus I, pertenecientes a niños menores de 5 años, los cuales tenían un diagnóstico de Síndrome diarreico, utilizando el medio final así como los medios comerciales de rutina en un coprocultivo (E.M.B., V.B.SS.)

ETAPA VI ANALISIS DE COSTOS.

Se realizó una investigación acerca del precio de los diferentes medios de cultivo (SS, y el medio formulado), tomando en cuenta diversos proveedores. Se sacó el precio promedio por litro de medio para compararlo con el de SS.

R E S U L T A D O S .

Cada uno de los resultados reportados estan dados con respecto al número que se le ha dado en el apartado correspondiente en la metodología.

Los resultados a continuacion expresados se dan bajo la siguiente relación:

- = negativo, sin crecimiento.
- =/- = crecimiento escaso.
- + = crecimiento bajo.
- ++ = crecimiento moderado.
- +++ = buen crecimiento.

- c = Diferenciación metabólica negativa.
- b = Diferenciación metabólica moderada.
- a = Diferenciación metabólica positiva.

RESULTADOS.

ETAPA I EVALUACION DE LA CONSISTENCIA DEL MEDIO BASE.

MEDIO I.- Se utiliza peptona de caseína 1.5% y extracto de levadura 1.0% solos y mezclados con el fin de obtener un soporte de crecimiento adecuado.

	A	B	C
Agar	1.5%.	1.5%.	1.5%.
Peptona de caseína	1.5%.	1.5%.	- - -
Extracto de levadura	1.0%.	---	1.0%.

CEPAS	A	B	C
<u>Escherichia coli.</u>	+++	+++	++
<u>Salmonella</u> grupo B.	+++	+++	++

MEDIO 2.- Se varía la concentración de peptona de caseína en los medios 2B, 2C, 2D. Al medio 2E se le adicionó extracto de levadura y en el medio 2F, se hizo una mezcla de peptona de caseína y extracto de levadura.

	A	B	C	D	E	F
Agar.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína	- -	1.0%	1.5%	2.0%	---	1.5%
Extracto de levadura	- -	- -	- -	- -	1.0%	1.0%

CEPAS

<u>Escherichia coli</u>	-	+++	+++	+++	++	+++
<u>Salmonella grupo B</u>	-	++	+++	+++	++	+++

ETAPA II DIFERENCIACION METABOLICA.

MEDIO 3.- Se procede a añadir lactosa en diferentes concentraciones en el medio 2C obtenido en la etapa anterior, se adicionó rojo de fenol como indicador.

	A	B	C	D	E
Agar.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Rojo de fenol	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%
Lactosa	0.3%	0.6%	0.9%	1.2%	1.5%

CEPAS	A	B	C	D	E
<u>Escherichis coli.</u>	c	b	a	a	b
<u>Salmonella grupo B</u>	c	b	a	a	b

MEDIO 4._ Ahora se varía la concentración de urea como otro metabolito utilizando una solución acuosa estéril al 40%, tomando como base el medio 2C.

	A	B	C	D	E	F	G
Agar..	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de							
caseína.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Rojo de fenol	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%
Urea.	0.0%	0.1%	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1.0%

CEPAS

<u>Escherichia coli</u>	c	b	a	a	c	c	c
	-	+	+++	+++	+	-	-
<u>Salmonella grupo B</u>	c	b	a	a	c	c	c
	-	+	+++	+++	+	-	-

A partir del medio 2C, se prepararon los siguientes medios variando las concentraciones de tiosulfato de sodio, citrato de sodio, sulfato férrico amoniacal, utilizando las siguientes concentraciones con el fin de observar la producción de H₂S.

Tiosulfato de sodio	0.8%
Citrato de sodio	0.44%
Sulfato férrico amoniacal	0.12%

MEDIO 5 I. Variando las concentraciones de tiosulfato de sodio y manteniendo constante las cantidades de citrato de sodio y sulfato férrico amoniacal.

	A	B	C	D
Agar.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Citrato de sodio.	0.44%	0.44%	0.44%	0.44%
Sulfato férrico amoniacal	0.12%	0.12%	0.12%	0.12%
Tiosulfato de sodio	0.4%	0.6%	0.8%	1.0%

CEPES

<u>Escherichia coli.</u>	a	a	a	a
<u>Escherichia coli</u>	a	a	a	a
<u>Salmonella grupo B.</u>	b	a	a	a

MEDIO 5 II. Variando ahora la concentración de citrato de sodio y manteniendo constante sulfato férrico amoniacal y tiosulfato de sodio.

	A	B	C	D
Agar.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Sulfato férrico amoniacal	0.12%	0.12%	0.12%	0.12%
Tiosulfato de sodio	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%
Citrato de sodio.	0.36%	0.44%	0.52%	0.60%
CEPAS	A	B	C	D
<u>Escherichia coli</u>	a	a	a	a
<u>Proteus vulgaris.</u>	a	a	a	a
<u>Salmonella grupo B.</u>	a	a	a	a

MEDIO 5 III. Variar la concentración de sulfato férrico amoniacal y mantener constantes las cantidades de tiosulfato de sodio y citrato de sodio.

	A	B	C	D
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Tiosulfato de sodio.	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%
Citrato de sodio.	0.44%	0.44%	0.44%	0.44%
Sulfato férrico amoniacal.	0.08%	0.10%	0.12%	0.14%

CEPAS	A	B	C	D
<u>Escherichia coli.</u>	a	a	a	a
Proteus vulgaris.	a	a	a	a
<u>Salmonella grupo B.</u>	a	a	a	a

De las cantidades obtenidas de los medios anteriores (5 I, 5 II, 5 III) se procede a variar las concentraciones nuevamente de tiosulfato de sodio, citrato de sodio, sulfato férrico amoniacal con el fin de optimizar la detección de H_2S .

Tiosulfato de sodio	0.60%
Citrato de sodio	0.44%
Sulfato férrico amoniacal.	0.10%

MEDIO 5 IV._ Variando las concentraciones de tiosulfato de sodio.

	A	B	C	D
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Citrato de sodio.	0.44%	0.44%	0.44%	0.44%
Sulfato férrico amoniacal.	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
Tiosulfato de sodio.	0.20%	0.40%	0.60%	0.80%

CEPAS	A	B	C	D
<u>Escherichia coli</u>	a	a	a	a
<u>Proteus vulgaris</u>	b	b	a	a
<u>Salmonella grupo B</u>	b	b	a	a

MEDIO 5 V.- Variando las concentraciones de citrato de sodio.

Agar.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Pentona de caseina.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Tiosulfato de sodio	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%
Sulfato férrico amoniacal.	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
Citrato de sodio.	0.38%	0.40%	0.42%	0.44%

CEPAS

<u>Escherichia coli.</u>	b	a	a	a
<u>Proteus vulgaris.</u>	b	a	a	a
<u>Salmonella grupo B.</u>	b	a	a	a

MEDIO 5 VI.- Variando las concentraciones de sulfato férrico amoniacal.

	A	B	C	D	E
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Tiosulfato de sodio.	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%
Citrato de sodio	0.44%	0.44%	0.44%	0.44%	0.44%
Sulfato férrico amoniacal	0.06%	0.07%	0.08%	0.09%	0.10%

CEPAS	A	B	C	D	E
<u>Escherichia coli.</u>	b	a	a	a	a
<u>Proteus vulgaris.</u>	b	a	a	a	a
<u>Salmonella grupo B.</u>	b	a	a	a	a

MEDIO 6.- Ahora mezclamos las cantidades adecuadas que se encontraron en los medios anteriores (5V, 5V, 5VI,) para observar el efecto en los cambios de coloración del medio al mezclar los metabolitos lactosa y urea.

	A	B	C	D
Agar.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Tiosulfato de sodio.	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%
Citrato de sodio.	0.40%	0.40%	0.40%	0.40%
Sulfato férrico amoniacal.	0.07%	0.07%	0.07%	0.07%
Urea.	---	---	0.2%	0.2%
Lactosa.	---	0.90%	---	0.90%
Rojó de fenol.	---	0.02%	0.02%	0.02%

CEPAS	A	B	C	D
<u>E. coli</u> + <u>P. vulgaris</u> .	c	b	b	b
E. coli + <u>S. grupo B</u>	a	a	a	a
<u>E. coli</u> + <u>P. vulgaris</u> + <u>S. grupo B</u>	c	b	b	b

ETAPA III SELECTIVIDAD DEL MEDIO.

Medio 7.- Se utiliza lauril sulfato de sodio en diferentes concentraciones como inhibidor de Gram (+).

	A	B	C
Agar.	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%
Tiosulfato de sodio	0.60%	0.60%	0.60%
Citrato de sodio.	0.40%	0.40%	0.40%
Sulfato férrico amoniacal.	0.07%	0.07%	0.07%
Urea.	0.2%	0.2%	0.2%
Lactosa.	0.9%	0.9%	0.9%
Rojo de fenol	0.02%	0.02%	0.02%
Lauril sulfato de sodio.	0.005%	0.01%	0.02%
CEPAS.	A	B	C
<u>Staphylococcus aureus.</u>	-	b	-
<u>Escherichia coli.</u>	+++	+++	+++
<u>Proteus vulgaris.</u>	+++	+++	+++
<u>Salmonella grupo B</u>	+++	+++	+++

MEDIO B.- Se utiliza cristal violeta en diferentes concentraciones como inhibidor de Gram (+)

	A	B	C
Agar	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%
Tiosulfato de sodio	0.60%	0.60%	0.60%
Citrato de sodio	0.40%	0.40%	0.40%
Sulfato férrico amoniacal.	0.07%	0.07%	0.07%
Urea.	0.2%	0.2%	0.2%
Lactosa	0.9%	0.9%	0.9%
Rojo de fenol	0.02%	0.02%	0.02%
Cristal violeta	0.0001%	0.0002%	0.0004%

CEPÁS	A	B	C
<u>Staphylococcus aureus.</u>	-	-	-
<u>Escherichia coli.</u>	+++	+++	+++
<u>Proteus vulgaris.</u>	+++	+++	+++
<u>Salmonella grupo B.</u>	+++	+++	+++

MEDIO 9.- Se utiliza bisulfito de sodio en diferentes concentraciones como inhibidor de Gram(+).

	A	B	C
Agar.	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%	1.5%	1.5%
Tiosulfato de sodio.	0.60%	0.60%	0.60%
Citrato de sodio.	0.40%	0.40%	0.40%
Sulfato férrico amoniacal.	0.07%	0.07%	0.07%
Urea.	0.2%	0.2%	0.2%
Lactosa.	0.9%	0.9%	0.9%
Rojo de fenol	0.02%	0.02%	0.02%
Bisulfito de sodio.	0.005%	0.01%	0.02%
CEPAS	A	B	C
<u>Staphylococcus aureus.</u>	-	-	-
<u>Escherichia coli.</u>	++	++	++
<u>Proteus vulgaris.</u>	++	++	++
<u>Salmonella grupo B.</u>	++	++	+/-

MEMIO 10.- Una vez obtenida la concentración de lauril sulfato de sodio como inhibidor de Gram (+), se procedio a inocular mezclas de las cepas puras para observar su actividad.

Agar.	1.5%
Peptona de caseína.	1.5%
Tiosulfato de sodio.	0.60%
Uitrato de sodio.	0.40%
Sulfato férrico amoniacal.	0.07%
Urea.	0.2%
Lactosa.	0.9%
Mojó de fenol	0.02%
Lauril sulfato de sodio.	0.005%

CEPAS

	A
<u>E. coli</u> + <u>P. vulgaris</u> + <u>S. grupo B</u> + <u>Staph. aureus</u> .	a
<u>E. coli</u> + <u>S. grupo B</u>	a
<u>E. coli</u> + <u>P. vulgaris</u> .	a
<u>S. grupo B</u> + <u>P. vulgaris</u> .	a
<u>E. coli</u> + <u>P. vulgaris</u> + <u>S. grupo B</u> + <u>Shig. flexneri</u> + <u>K. pneumoniae</u> .	

MEDIO 11.- Tomando como medio final (MEDIO 10), preparar 6 medios a los cuales algunos contendran extracto de levadura y otros - peptona de caseina, para observar el Swarming de Proteus y la producción de H_2S .

	A	B	C	D	E	F
Agar	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Peptona de caseina.	1.5%	1.5%	---	1.5%	---	---
Tiosulfato de sodio.	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%	0.60%
Citrato de sodio.	0.40%	0.40%	0.40%	0.40%	0.40%	0.40%
Sulfato férrico amoniacal.	0.07%	0.07%	0.07%	0.07%	0.07%	0.07%
Urea.	0.2%	0.2%	0.2%	---	---	0.2%
Lactosa.	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
Hojo de fenol.	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.2%
Lauril sulfato de sodio	0.005%	0.005%	0.005%	0.005%	0.005%	0.005%
Extracto de levadura.	---	0.5%	1.0%	---	1.5%	1.5%

En este medio se probaron: Proteus vulgaris y Salmonella grupo B.

MEDIO	PRODUCCION DE H_2S	OBSERVACION DE SWARMING.
A	+++	-
B	++	+
C	++	+
D	+	++
E	++	++
F	++	+++

Tomando como medio final aquel que contiene los siguientes componentes:

MEDIO FINAL

Agar	1.5g.
Peptona de caseína.	1.5g.
Tiosulfato de sodio.	0.60g.
Citrato de sodio	0.40g.
Sulfato férrico amoniacal.	0.07g.
Urea.	0.2g.
Lactosa.	0.9g.
Rojo de fenol	0.02g.
Lauril sulfato de sodio.	0.005g.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

La morfología que presentan las colonias de las bacterias más comunes es la siguiente, de acuerdo con la etapa de estabilidad - (almacenaje).

Las colonias de Escherichia coli presentan la siguiente morfología; son amarillas de aproximadamente 0.5 mm, circulares, convexas, lisas, brillantes.

Las colonias de Proteus son colonias rosas de aproximadamente 0.5 mm, circulares, convexas, lisas, brillantes.

Las colonias de Salmonella miden de 0.2-0.5 mm, lancas con centro negro, es decir con la periferia clara, lisas, convexas, circulares, brillantes.

Las colonias de Shigella miden aproximadamente 0.5 mm, tienen un tono blanco, es decir claras, lisas, brillantes, circulares.

Las colonias de Klebsiella miden aproximadamente de 0.4-0.6 mm, lisas, circulares, convexas, brillantes, tienen un tono blanco-amarillento, mucoides.

Las colonias de Citrobacter miden aproximadamente 0.5 mm, tienen un color amarillo, lisas, brillantes, un poco planas, circulares.

ETAPA V ANALISIS DE 150 MUESTRAS EN EL MEDIO FINAL.

Se analizaron 150 muestras provenientes del Hospital Pediátrico de Iztacalco y del Laboratorio de Análisis clínicos de la E.N. E.P. Zaragoza Campus I, pertenecientes a niños menores de 5 años - los cuales presentaban a la exploración del médico las siguientes características; diarrea de color amarillo líquida, fétida, con moco, sin o con sangre, pujo, de 12-15 evacuaciones al día, abdomen globoso, blando, depresible, ruidos peristálticos, síndrome fébril, algunos con anemia, deshidratación. Las ordenes médicas para el estudio de laboratorio (coprocultivo), Indicando como diagnóstico "Síndrome Diarreico"

Se utilizó el Medio final así como los medios comerciales de rutina en un coprocultivo (EMB, VB, SS), y a cada una de las cepas aisladas se les realizaron las bioquímicas (Citrato, SIM, NIO, LIA, TSI,).

Encontrando la siguiente frecuencia de los microorganismos predominantes en los diferentes medios de cultivo fué:

	MEDIO FINAL.	EMB	VB	SS
<u>Escherichia coli.</u>	53	53	53	52
<u>Enterobacter serogenes.</u>	20	15	17	19
<u>Proteus vulgaris.</u>	16	10	12	10
<u>Proteus mirabilis.</u>	10	6	3	2
<u>Salmonella grupo B.</u>	6	3	1	6
<u>Klebsiella pneumoniae.</u>	8	8	8	6
<u>Citrobacter freundii</u>	37	27	10	17
<u>Shigella flexneri</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
TOTAL.	150	126	101	113

ETAPA VI ANALISIS DE COSTOS.

Se realizó una investigación acerca del precio de los diferentes medios de cultivo (SS, VB, EMB, Medio Final), tomando en cuenta diversos proveedores. Sacando el precio promedio por litro, para compararlo con respecto a los otros medios comerciales.

EMB	14,500.00 pesos.
VB.	18,170.00 pesos.
SS.	14,600.00 pesos.
Medio Formulado.	8,200.00 pesos.

ANALISIS DE RESULTADOS.

En los dos primeros medios se observa que la peptona de caseína es un elemento nutritivo básico que promueve el desarrollo bacteriano, suministrando fuentes de carbono y nitrógeno para el metabolismo bacteriano. En el medio dos se adicionó extracto de levadura y peptona de caseína a diferentes concentraciones, encontrando que el medio más adecuado es el que contiene peptona de caseína con una concentración de 1.5% también a la concentración de 2.0% pero se eligió la de 1.5% ya que lo que se desea es optimizar las cantidades del medio.

Una vez obtenida la consistencia adecuada para el medio, se procedió a dar características metabólicas, utilizando la lactosa que es de gran utilidad para la diferenciación de microorganismos "patógenos" en tracto gastrointestinal (generalmente no fermentadores de lactosa), de los no patógenos, ayudados con el rojo de fenol al 0.02% que es un indicador ácido-base con un rango de pH de viraje (6.4 - 8.2). Encontrando que con concentración de 0.9% como lo muestra el medio 3C hay una buena diferenciación metabólica.

Otro metabolito que se adicionó fue la urea, para poder diferenciar los microorganismos que poseen la enzima ureasa, es decir aquellos que tienen la capacidad de hidrolizar la urea, esto es importante porque los microorganismos "patógenos" no poseen la enzima ureasa.

La producción de amoníaco produce alcalinidad en el medio provocando un cambio de color en el medio, el cual tiene un color anaranjado que cambia a rosa por dicha alcalinidad.

Se observó que a concentraciones mayores de urea se inhibe el desarrollo bacteriano y que a concentraciones menores, no hay diferenciación metabólica.

Encontrando que con una concentración de 0.2% como se observa en el medio 4C, existe una buena diferenciación metabólica.

Para observar la producción de H_2S se probaron los siguientes reactivos:

Tiosulfato de sodio.

Citrato de sodio.

Sulfato férrico amoniacal.

Observando que la concentración de tiosulfato de sodio adecuada fué de 0.5% ya que este provee una fuente de azufre para la producción de H_2S , como se observó en el medio 5 IV C.

Para el sulfato férrico amoniacal la concentración adecuada fué 0.07% como se observa en el medio 5 VI B, el cual es el indicador de la producción de H_2S , ya que al reaccionar forma el precipitado negro de sulfato ferroso.

Y por último se utilizó citrato de sodio que con una concentración de 0.4% como se observa en el medio 5 V B, con el cual se aumentó la sensibilidad del medio para la producción de H_2S .

De los reactivos anteriores se observó que a concentraciones siguientes también se observaba buena producción de H_2S , pero se tomaron en cuenta las concentraciones mínimas a las que se obtenía una adecuada producción de H_2S , debido a que se trata de abatir el costo del medio.

Es preciso mencionar que cada metabolito y reactivos fueron probados individualmente primero, para después ser incorporados en el medio que se obtuvo en la primera etapa y se inocularon mezclas de las cepas de referencia para observar el efecto de los cambios de coloración y la producción de H_2S como se observa en el medio 6 D.

Una vez que se obtuvo una buena diferenciación metabólica se procedió a inhibir los Gram positivos.

Encontrando que el inhibidor fué el laurilsulfato de sodio con una concentración de 0.005%, como se puede observar en el medio 7 A y a la vez se observa que el inocular la capa de Proteus se inhibe el swarming de éste.

Por otra parte se pretendía usar extracto de levadura en lugar de peptona de caseína, pero se observó que aunque aumenta la sensibilidad a la producción de H_2S , también favorece el swarming de Prote-

us como se observa en el medio 11F.

Por lo que se tomó como medio final el que contenía peptona _
de caseína (medio 11 A).

Mientras que la estabilidad del medio se realizó durante un _
mes observando resultados satisfactorios, ya que se observó que re
basa el período de los medios comerciales, que es un promedio de _
tres semanas.

Posteriormente el medio formulado fué comparado con los medios
comerciales (EMB, VB, SS.), utilizando muestras clínicas y reali
zando pruebas bio-químicas (Citrato, SIM, LIA, MIO, TSI.), a las _
bacterias aisladas, observando que se tiene un aislamiento semejan
te al de los medios comerciales, de acuerdo con los resultados ob-
tenidos. Encontrando que el medio formulado puede considerarse de _
mediana selectividad y buena diferenciación metabólica para su uso
con muestras clínicas.

Con respecto al costo del medio de cultivo formulado fué com-
parado con otros medios de cultivo comerciales (EMB, VB, SS.) ob-
servando que dicho medio es más económico que los otros y que pue-
de ser de gran utilidad en la rutina del Laboratorio para el estu-
dio de Coprocultivo, en lugar de los medios comerciales general -
mente usados (EMB, VB, SS,) debido a sus propiedades de mediana se
lectividad y buena diferenciación metabólica.

CONCLUSIONES .

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que existe una buena relación entre el medio formulado y los medios comerciales (FKB, VE, SS.) como se observó en los resultados obtenidos al realizar las muestras clínicas, encontrando que es un medio que puede auxiliar para el aislamiento de bacterias enteropatógenas causantes de enfermedades gastrointestinales como son:

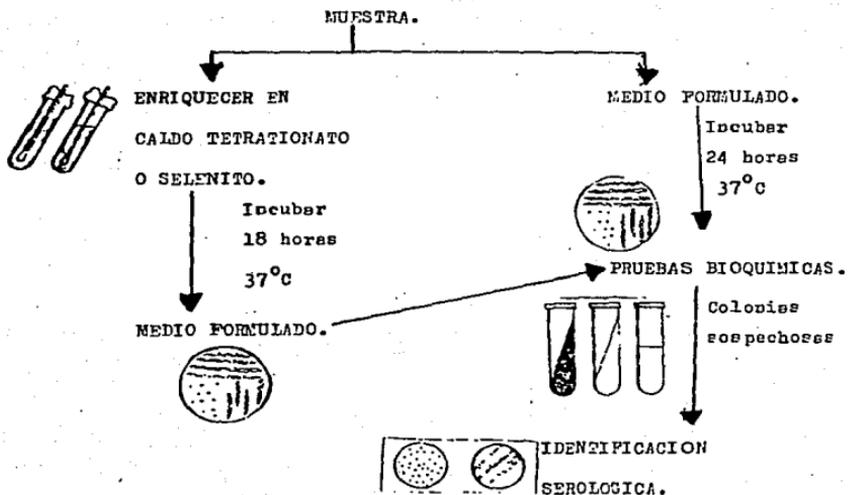
Salmonella; Lactosa (-), Urea (-), H_2S (+).

Shigella; Lactosa (-), Urea (-), H_2S (-).

Escherichia coli; Lactosa (+), Urea (-), H_2S (-), está es de gran importancia clínica en niños menores de 2 años, ya que es uno de los principales causantes de las diarreas.

El medio formulado posee las siguientes características:

- a) Posee una gran sensibilidad para la diferenciación metabólica de lactosa y urea.
- b) Tiene mayor sensibilidad para la detección de H_2S que el medio SS.
- c) Inhibe el swarming de especies de *Proteus* aumentando su selectividad.
- d) El medio puede sustituir a los 3 medios usuales,
- e) El medio puede ser usado para depositar la muestra directa, así como para la resiembra de los coprocultivos.
- f) Se considera un medio de bajo costo.
- g) Posee una estabilidad de 40 días después de su preparación.
- h) Permite una identificación presuntiva del microorganismo patógeno en las muestras clínicas.
- i) Se sugiere la siguiente metodología para el uso del medio formulado en coprocultivos.



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

- 1.- Alvarado A. "Frecuencia de Microorganismos patógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda". Bol. Méd. Hosp. Infant. - Mex. Vol. 42, No. 6, pp 359. JUN. 1985.
- 2.- Alvarez Galvan M. y Vargas Hernández L. "Aislamiento y caracterización de cepas enteropatógenicas de E. coli". Tesis de la U.N.A.M., Méx., 1984.
- 3.- Bailey-Scott. "Diagnóstico Microbiológico", 6th ed., Editorial Médica Panamericana, Argentina, pp. 210-256, 1983.
- 4.- Braude, I.A., "Microbiología Clínica., Editorial Panamericana, Buenos Aires. pp. 384, 1984.
- 5.- Bioxon. "Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico", Tomo I, pp. 89-96, 1980.
- 6.- Bojalil J. J. "Microbiología Médica", Tomo I, 1a. ed. Editorial Méndez Ote, México, pp. 495-525, 1981.
- 7.- Carpenter, "Microbiología", 4ta. ed. Editorial Interamericana, México. pp. 405-410. 1986.
- 8.- Cepelia. B., "Nociones Elementales de Microbiología Médica", Cap. 14, Ed. Francisco Méndez Cervantes, México, pp. 155-177, 1978.
- 9.- Davis. D. "Tratado de Microbiología". 2a. edición, Editores Salvat, Barcelona, pp. 778-804, 1985.
- 10.- Edwards y Ewing. "Isolation and Preliminary Identification" 4th. ed. Charper 3, pp. 28-34. 1985.
- 11.- Edward P.R. and T. H. Ewing. "Identification of Enterobacteriaceae". 3er. ed. Burgess Publishing Co. Kinneapolis. Pag. 182 - 184 . 1978.
- 12.- Farmer J. "Biochemical Identification of News Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens",

13.- Félix Valenzuela M.A. A. "Medios Selectivos de Enterobacteriaceas para determinar Salmonella y Shigella". Tesis de la U.N.A.M. 1986.

14.- Freeman. B. "Tratado de Microbiología de Burrows", 21a. edición, Ed. Interamericana, México, pp. 429-445. 1983.

15.- Gillies, R. R. "An evaluation of two composite media for preliminary identification of Shigella and Salmonella. "Am. J. Clin. Pathol. 9:368-371. 1985.

16.- González. C. "Disenteria por bacilo de Shiga en México", Sa lud Pública de México, Vol. 13. No. 3, pp. 295-299, Mayo 1971.

17.- Gooch, W. M. and G. A. HILL "Comparison of Micro-ID and API 20E in a rapid identification of Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol 15:885-890, 1982.

18.- Gordon. J. "The practical applicatuon of the direct oxidase reaction in bacteriology", J. Pathol. Bacteriol., 21: 185.190, 1928.

19.- Hartel P.C. et.al. "Microtechnique for isolating fecal coliforms soil"., Appl. Environ. Microbiol. AUG 46(2), pp. 518-520, 1983.

20.- Hyg. "Isolation and identification of Enterobacteriaceae", Zentralbl Bakteriol Microbio. march 254 (1), pp. 1-25, 1984. (GER).

21.- Hickman B. "Leminorella, a new genus of Enterobacteriaceae; Identification of Lemnorella richardii sp. nov. Found in Clinical - specimens", J. Clin. Microbiol. 21. No. 1. pp. 234-239. Feb. 1985.

22.- J. Stephen Thompson and Alexander A. Borezk. "Use of a single tube medium, o- Nitrophenyl - B-D-Galactopyranoside-Phenilalanine- Methylidaz Sulfato, for screening of pathogenic members of the Family Enterobacteriaceae". Journal of Clinical Microbiology, pp. 136-137. July 1984.

23.- Kauffmann F. "The bacteriology of Enterobacteriaceae", Public Health Service a Center For Disease Control Atlanta Ga. U.S.A. pp.263-268,1966.

- 24.- Kelly T. "Enterobacteriaceae", Manual of Clinical Microbiology 4th. ed. Chapter 3., pp. 263-277. 1985.
- 25.- Koneman. E. "Diagnóstico Microbiológico", 1a. ed., Editorial Panamericana, Buenos Aires. pp. 154-185. 1985.
- 26.- Kumate J. "Manual de Infectología", 7a. ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México, p.p. 34-54. 1980.
- 27.- Larry K. "Pecal leucocitos in Enteric Infections", University of Texas Medical School at Houston and Hospital Infantil de México. pp. 562-565. 1978.
- 28.- Larry K. "Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and México. Journal of Pediatrics, Vol. 93., No. 3, pp. 383-388. Sep. 1978.
- 29.- Lennette. E. "Manual of Clinical Microbiology", Ed. Lennette, American Society for Microbiology, Chapter 16, pp. 195-217. 1970.
- 30.- Mac Faddin. J. "Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria", 2a. ed., Editorial London, Williams, Wilkins, Baltimore, pp. 27, 94, 103-111. 1980.
- 31.- Morales M. "Frecuencia de Campylobacter fetus ss jejuni y Yersinia enterocolitica en niños con diarrea aguda", Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. Vol. 41, No. 2, pp. 86-89. Feb. 1984.
- 32.- Malloly P.J. et.al. "Comparison of four rapid methods for identification of Enterobacteriaceae from blood culture", J. Clin. Microbiol., March 17 (3), pp. 493-499, 1985.
- 33.- González Saldaña, Noe Torrales, Gómez Barreto. "Infectología Clínica", 2a. ed. Editorial Trillas, México. pp. 148-190. 1985.
- 34.- Olarte J. "Etiopatogenia de las diarreas infecciosas", Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. Vol. 42. No. 1, pp. 66-72. Enero. 1985.
- 35.- Qverman T. "Comparison of the API Rapid E four hour system for the identification of routine clinical isolates of the Enterobac-

teriaceas J. of Microbio. Vol. 21, No. 4, pp. 542-545. Apr. 1985.

36.- Olarte. E. "El papel de las bacterias en la etiología de las diarreas infecciosas infantiles en la ciudad de México," Rev. Instit. Salubr. Enferm. Trop. Vol. 24. No. 1 - 4, México, enero - dic. 1979.

37.- Pérez P. "Relación entre cuadro diarreico y estudio nutricional en niños", Año V, No. 8, pp. 218-222, Infectología, Agosto - 1985.

38.- Pérez, N. "Epifemiología de las bacterias", Gaceta Médica de Méx., Tomo LXXXIX, No. 3, pp. 173-183, Marzo. 1969.

39.- Peter G. Hartel and Charles Hadedorns, "Microtechnique for isolation fecal coliforms from soil", Applied and Environmental Microbiology, pp. 518-520, Aug. 1983.

40.- Sánchez A. "Comparación entre rehidratación oral y parenteral en niños deshidratados por gastroenteritis". Bol. Med. Hosp. Inf. Mex., Vol. 42, No. 1, pp. 16-20, Enero 1985.

41.- Thompson. J. S. et al., Use of single tube medium O-nitro-fenilbeta- D - galactopyranoside - phenilalanine sulfate for screening of pathogenic, J. Clin. Microbiol, Jul 20 (1), pp. 137-140, 1984.

42.- Vega F. "El vómito como indicador clínico de la diarrea por rotavirus", Bol. Med. Hosp. Infant. Méx., Vol. 42, No. 3, pp. 169 - 174, Marzo 1985.

43.- Wolpert. E. "Estudio del paciente con diarrea" Atención Médica pp. 44-62, Jul 1986.

44.- Wrigt. R. G. "Anew selective and differential agar medium for E. coli and coliforms organisms, Jun. 56 (3), pp. 381-388, 1984.

45.- Academia de profesores de Bacteriología Médica. "Manual de Bacteriología Médica", Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N., 4a. edición, pp 24-66, 1983.

46.- Wathen - Grady. B. R. Davis and G.K. Morris. "Addition of three new serotypes of Shigella boydii to the Shigella Schema "Journal of Clinical Microbiology, pp 123-129. Jan 1985.