

Sobre un método de selección para el aislamiento de shigelas y salmonelas*

por

Leonardo Mata**

(Recibido para su publicación el 23 de mayo de 1958)

En la práctica de encuestas epidemiológicas encaminadas a conocer diversos aspectos de las shigelosis, lo que más interesa es la obtención de datos utilizables para fines de comparación con los reportados en otras localidades. Es por ello que todas las investigaciones debieran estar basadas en métodos uniformes, lo que es todavía más importante si de laboratorio se trata, ya que pequeños cambios en las condiciones de trabajo pueden afectar significativamente los índices.

A continuación haremos algunos comentarios sobre el método de selección de BECK (1), empleado también por nosotros (6) en una encuesta sobre la incidencia de salmonelas y shigelas en poblaciones de niños de Guatemala. Referiremos también ciertos resultados que tienen interés, desde el punto de vista bacteriológico, en el aislamiento de los cultivos.

MATERIAL Y METODO

Las muestras se tomaron al azar de niños de un día a 10 años de edad por el método de la torunda rectal, con la cual se inoculó una caja de agar SS (al 2.5% de agar) y un tubo de caldo de enriquecimiento Selenito F, incubando ambos a 37°C por 24 horas. A partir del Selenito se inocularon placas de SS (indirectas) que, junto con las primeras (directas) fueron objeto de examen a las 24 horas, dejándolas luego a la temperatura del laboratorio por 24 horas más, después de lo cual se observaron otra vez para aislar las colonias

* Trabajo realizado en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala, Publicación N° INCAP E-157.

** Laboratorio Bacteriológico del Hospital San Juan de Dios y ex-becario del INCAP.

no fermentadoras de lactosa. Estas se trasplantaron, generalmente en número de cuatro, a agar TSI para observar su reacción. Las cepas cuya reacción fue típica de *Shigella* o *Salmonella* se sometieron al "proceso rápido de selección" que consistió en la inoculación de agar semisólido con manitol (medio Base Púrpura con 0,5% de agar y 1% de manitol), agar Urea de Christensen, agar Citrato de Simmons, caldo Triptona para la investigación de indol, y pruebas serológicas de aglutinación con sueros polivalentes Lederle. Por último los cultivos se enviaron a los Laboratorios del Departamento de Salud Pública del Estado de California, Estados Unidos de América, para su determinación final. Todos los ingredientes usados en la preparación de los medios de cultivo fueron de la Casa Difco y el caldo Selenito F de la Casa BBL.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE 950 CASOS EN LO CONCERNIENTE A LA EFECTIVIDAD DEL PROCESO DE SELECCIÓN

La muestra fue tomada del 6 de marzo al 23 de abril de 1956.

Entre 950 coprocultivos, 671 (70,6%) mostraron colonias no fermentadoras de lactosa; de éstos sólo 187 presentaron una o más colonias con reacción tipo *Shigella* en el TSI, de los cuales se descartaron 44 cepas por ser móviles, aerógenas o ureasa positiva; las 143 restantes fueron inmóviles y ureasa negativa pero sólo 105 aglutinaron con los sueros polivalentes, resultando finalmente 101 cultivos del género *Shigella*.

En la misma muestra, 55 casos presentaron reacción típica de *Salmonella* en el TSI, y se descartaron posteriormente 28 cultivos ureasa positiva. De las 27 cepas restantes, 19 aglutinaron con el suero polivalente y se confirmaron 6 cultivos (cuadro 1).

El método demostró ser muy eficaz ya que permite la eliminación, en poco tiempo, de gran cantidad de cultivos que dificultan la clasificación final. La habilidad de asimilar el citrato (citrato amonio o citrato de Simmons) como única fuente de carbono, a pesar de que permite separar muchas de las cepas del grupo Providencia (paracolon 29.911 de Stuart *et al.*) que se confunden a menudo con *Shigella*, demostró no ser imprescindible en nuestro método, ya que en el análisis de 950 muestras no descartamos ningún cultivo con esta prueba. Ello se debió posiblemente al hecho que los tubos se examinaron a las 24 horas, y las cepas de Providencia utilizan el citrato a los dos a más días. La investigación del indol demostró también poco efecto seleccionante en el "tamizaje", según se desprende del examen de los datos tabulados en el cuadro 1. Estas dos pruebas son de importancia en la clasificación final, puesto que la producción de indol tiene valor en la taxonomía de las shigelas y la asimilación del citrato en la de las salmonelas.

A pesar de la efectividad del método, siempre hay cepas que, por tener características en común con los bacilos en cuestión, soportan el proceso de se-

CUADRO 1

Proceso de selección de cepas de Shigella y Salmonella entre 950 muestras

| Medio de selección | Casos seleccionados | | | | Casos descartados | |
|---|---------------------|-------|----------------------|------------------------|-------------------|------|
| | Total | | Tipo <i>Shigella</i> | Tipo <i>Salmonella</i> | Total | % |
| | Total | % | | | | |
| Agar SS | 671 | 70,6 | 671 | 671* | 279 | 29,4 |
| Agar TSI | 242 | 36,0 | 187 | 55 | 429 | 64,0 |
| Agar Manitol semi-sólido y Agar Urea de Christensen | 170 | 70,2 | 143 | 27 | 72 | 29,8 |
| Agar Citrato de Simmons y Caldo Triptona (indol) | 170 | 100,0 | 143 | 27 | 0 | 0,0 |
| Sueros polivalentes | 124 | 72,9 | 105 | 19 | 46 | 27,1 |
| Clasificación final** | 107 | 86,3 | 101 | 6 | 17 | 13,7 |

* En este medio las cepas de *Shigella* y *Salmonella* no pueden diferenciarse.

** Al centro de clasificación se enviaron todos los cultivos ya seleccionados en el proceso, hubieran o no aglutinado en los sueros polivalentes.

lección, como sucedió con ciertos tipos de Bethesda-Ballerup (24 cultivos), Alkaescens-Dispar (18 cultivos) y "paracolon" (11 cultivos).

Las cepas del grupo Bethesda-Ballerup se confunden a menudo con las del género *Salmonella* ya que muchas de sus propiedades bioquímicas son las mismas y, además, presentan estrechas interrelaciones antigénicas (2) (8). Los Alkaescens-Dispar, por otro lado, que fueron considerados por mucho tiempo dentro del género *Shigella*, son motivo de confusión con este género. Hoy día se clasifican como cepas no móviles anaerógenas de *Escherichia coli* (3) (4). Lo mismo puede decirse de un gran número de cultivos cuya clasificación es todavía incierta y que se denominan en la rutina del laboratorio "lentos fermentadores de lactosa" o "paracolon" que no lograron descartarse mediante el proceso de "tamizaje" y, por lo tanto, pasaron inadvertidos como si se tratara de shigelas o salmonelas.

La ayuda relativa que aportó en esta encuesta la investigación del indol amerita que en el proceso mencionado se incluya otra prueba de mayor valor como es la del Cianuro de Potasio, que, de acuerdo con KAUFFMANN & MOLLER (5), es de gran utilidad para la diferenciación entre *Salmonella* y Bethesda-Ballerup, ya que la segunda puede crecer en presencia del KCN, lo que no sucede con *Salmonella*.

CUADRO 2

Comportamiento de algunas cepas de Bethesda-Ballerup, Alkaescens-Dispar y "paracolon" en el proceso de selección

| Nº de cultivos | H ₂ S | Movilidad | Manitol | Urea | Indol | Citrato | Aglutinación | |
|-------------------|------------------|-----------|---------|------|-------|---------|-----------------|-------------------|
| | | | | | | | <i>Shigella</i> | <i>Salmonella</i> |
| Bethesda-Ballerup | | | | | | | | |
| 12 | + | | | - | - | + | | ± |
| 4 | + | | | - | - | + | | ± |
| 3 | + | | | - | - | + | | - |
| Alkaescens-Dispar | | | | | | | | |
| 9 | - | - | A | - | + | - | - | |
| 5 | - | - | A | - | - | - | ± | |
| 1 | - | - | A | - | + | - | + | |
| "Paracolon" | | | | | | | | |
| 5 | - | - | NC | - | ± | - | - | |
| 2 | - | - | A | - | - | - | + | |

+ = Positivo

± = Positivo débil

- = Negativo

A = Producción de ácido

NC = No hay cambio

En lo referente a la asimilación del Citrato de Simmons, sería conveniente emplear otra prueba adicional que permita diferenciar entre Alkaescens-Dispar y *Shigella*. La asimilación del agar Glucosa-amonio podría servir, ya que los Alkaescens-Dispar lo utilizan en pocas horas, pero existe el inconveniente de que algunas cepas de *Shigella* también pueden crecer en él, sobre todo *Shigella sonnei* y *S. flexneri* 3.

Otro medio que podría emplearse en lugar del Citrato de Simmons y que permite diferenciar entre los dos grupos en cuestión es el agar Citrato BTB de Hajna que es asimilado por las cepas de Alkaescens-Dispar con el subsiguiente viraje del indicador (azul de bromotimol).

También puede usarse una sencilla aglutinación en lámina con un suero anti-A-D para diferenciar entre los dos grupos.

Si se cree necesario obtener una identificación más completa que la que se obtendría al usar estos sueros comerciales y pruebas bioquímicas se recomienda enviar los cultivos a un laboratorio especializado en tal trabajo.

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL AISLAMIENTO DE 170 SHIGELAS Y 15 SALMONELAS A PARTIR DE 2.172 COPROCULTIVOS

La muestra fue recolectada del 3 de enero al 23 de abril de 1956. Sólo reportaremos datos en lo referente al origen de las cepas y período de incubación de las mismas al momento de realizar el aislamiento.

I. *Shigelas*

Se aislaron 137 de SS directo (131 a las 24 y 6 a las 48 horas de incubación) y únicamente 33 de SS indirecto (28 a las 24 y 5 a las 48 horas). Como se ve, la mayoría de los serotipos se aislaron de agar SS sin previo pasaje por el caldo de Selenito, pero hacemos notar que más del 47 por ciento de las *Shigella sonnei* y más del 30 por ciento de las *S. flexneri* 6 se aislaron de placas inoculadas a partir del medio de enriquecimiento, lo que indica claramente que el SS, usado sólo, no es ideal para el aislamiento de estos dos serotipos, requiriéndose, por lo tanto, un incremento en el número de bacilos. Queda comprobada la bondad del Selenito para el aislamiento de *S. sonnei* como ya lo había reportado THOMAS (7) y se indica además su efectividad en el caso de *S. flexneri* 6. El empleo del caldo de enriquecimiento demostró ser imprescindible ya que de no haberse empleado, aproximadamente el 20 por ciento de los cultivos habrían escapado a la identificación (cuadro 3).

II. *Salmonelas*

Dos cepas se aislaron de SS directo a las 24 horas de incubación, y 13 de SS indirecto (12 a las 24 y una a las 48 horas). Se destaca inmediatamente que el medio de enriquecimiento es más importante en la búsqueda de salmonelas que en la de shigelas. El "medio combinado de Kauffmann" se ha dicho ser muy bueno para aislar *Salmonella* pero no para *Shigella* (4), en tanto que el caldo Selenito lo es para ambos (3) por lo que fue preferido en este estudio (cuadro 4).

CUADRO 3

Sobre 170 shigelas aisladas en 2.172 cultivos: medio de cultivo y período de incubación del mismo al momento de realizar el aislamiento.

| Serotipo | Total | Agar SS | | Caldo Selenito F | |
|-------------------------------|-------|---------|--------|------------------|--------|
| | | 24 hs. | 48 hs. | 24 hs. | 48 hs. |
| TOTAL | 170 | 132 | 5 | 28 | 5 |
| <i>Shigella dysenteriae</i> 1 | 2 | 1 | 1 | | |
| 2 | 15 | 14 | 1 | | |
| 3 | 1 | 1 | | | |
| <i>Shigella flexneri</i> 1a | 4 | 4 | | | |
| 1b | 14 | 14 | | | |
| 2a | 8 | 8 | | | |
| 2b | 7 | 7 | | | |
| 3 | 12 | 12 | | | |
| 4a | 10 | 10 | | | |
| 5 | 6 | 6 | | | |
| 6 | 45 | 29 | 2 | 9 | 5 |
| <i>Shigella boydii</i> 1 | 2 | 2 | | | |
| 7 | 2 | 2 | | | |
| serotipo 792 | 1 | 1 | | | |
| <i>Shigella sonnei</i> | 41 | 21 | 1 | 19 | |

CONCLUSIONES

Del análisis del método de selección para shigelas y salmonelas basado en una muestra de 950 coprocultivos se desprende que:

1. El agar SS descartó alrededor de 29 por ciento de los casos con base en la fermentación de la lactosa.

2. El medio diferencial TSI es de enorme valor en el "tamizaje" ya que eliminó el 64 por ciento de las cepas seleccionadas en las placas de SS.

3. La acción seleccionante del par de medios Manitol semisólido y Urea de Christensen y la de los sueros polivalentes es más o menos semejante pues descartaron 29 y 27 por ciento, respectivamente, del total de cultivos seleccionados en la etapa que les antecedió.

CUADRO 4

Sobre 15 salmonelas aisladas: medio de cultivo y periodo de incubación del mismo al momento de realizar el aislamiento

| Serotipo | Total | Agar SS | | Caldo Selenito F | |
|-------------------------------|-------|---------|-------|------------------|--------|
| | | 24 hs. | 48 hs | 24 hs. | 48 hs. |
| TOTAL | 15 | 2 | 0 | 12 | 1 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 3 | | | 3 | |
| <i>derby</i> | 2 | | | 2 | |
| <i>newport</i> | 2 | | | 2 | |
| <i>manhattan</i> | 1 | 1 | | | |
| <i>panama</i> | 1 | 1 | | | |
| <i>anatum</i> | 1 | | | 1 | |
| <i>give</i> | 3 | | | 3 | |
| <i>pharr</i> | 1 | | | 1 | |
| <i>atlanta</i> | 1 | | | | 1 |

4. Tanto la asimilación del Citrato como la prueba del Indol mostraron valor relativo en la eliminación de cultivos no patógenos, por lo que se recomienda la adición de otras pruebas de más utilidad (prueba del Cianuro de Potasio y sueros anti A-D respectivamente).

En cuanto al origen de las cepas y al período de incubación de los medios en el momento de aislamiento, nosotros encontramos, basados en 2.172 coprocultivos, lo siguiente:

1. Se aislaron 170 shigelas y 15 salmonelas.
2. El 80 por ciento de las shigelas se aisló del SS directamente y el 20 por ciento mediante previo enriquecimiento en caldo Selenito (placas de SS indirectas).
3. Tanto en las placas directas como en las indirectas la mayor frecuencia de aislamiento se presentó a las 24 horas de incubación.

4. Se aisló alrededor del 6 por ciento de las cepas de *Shigella* a las 48 horas de incubación (24 horas a 37°C y 24 horas a la temperatura del laboratorio) lo que demuestra la importancia de examinar cada placa por lo menos dos veces.

5. Se comprueba una vez más la bondad del Selenito en el aislamiento de *S. sonnei* puesto que más del 47 por ciento de las cepas de este serotipo se aisló gracias al caldo de enriquecimiento.

6. Se reporta la efectividad del caldo Selenito en la investigación de *S. flexneri* 6 dado que más del 30 por ciento se aisló de las placas indirectas.

7. En el aislamiento de *Salmonella* el enriquecimiento es aconsejable ya que en nuestra experiencia, de 15 cultivos, 13 se aislaron de las placas inoculadas en el caldo Selenito (placas indirectas) y sólo 2 de las placas directas.

AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su agradecimiento al Dr. Nevin S. Scrimshaw, Director del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) y al Dr. Alfonso Trejos, Jefe de Laboratorio del Hospital "San Juan de Dios", por la revisión del manuscrito original.

RESUMEN

En este trabajo se hace un comentario sobre la importancia de cada etapa de un método de selección para shigelas y salmonelas usado por nosotros, y se proponen sugerencias al mismo.

Por otra parte, se reportan ciertos datos de interés bacteriológico en lo referente al aislamiento de los cultivos. Estos son, tipo de medio de donde se aislaron las cepas y período de incubación al momento de efectuar el aislamiento.

SUMMARY

Emphasis is made on the importance of each step of the screening method for *Shigella* and *Salmonella* used by us. Some modifications are also suggested.

Other data of bacteriological interest are reported such as the type of media from which strains were isolated and the incubation period at the time of isolation.

BIBLIOGRAFIA

1. BECK, M. DORTHY
1956. A preliminary study of diarrheal diseases in Guatemala, C. A. 42 pp+7 fórmulas+9 tablas. INCAP L-62. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala.
2. CEFALÚ, M. & A. REALMUTO
1955. Ricerche su *Escherichia freundii* e considerazioni sulla sua posizione tassonomica. *Bullettino I.S.M.*, 34(3-4):195-205.

3. EDWARDS, P. R. & W. H. EWING
1955. *Identification of Enterobacteriaceæ*. vii+179 pp. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota.
4. KAUFFMANN, F.
1954. *Enterobacteriaceæ*. Segunda edición. 382 pp. Ejnar Munksgaard Publisher, Copenhagen.
5. KAUFFMANN, F. & V. MOLLER
1955. On amino acid decarboxylases of *Salmonella* types and on the KCN test. *Acta Path. et Microbiol. Scandinav.*, 36:173-178.
6. MATA, L.
1957. Estudio sobre la incidencia de shigelas en Guatemala. *Rev. Biol. Trop.*, 5(2): 211-230.
7. THOMAS, M. E.
1954. Disadvantages of the rectal swab in diagnosis of diarrhoea. *Brit. Med. J.*, 2:394-396.
8. WEST, MARY G. & P. R. EDWARDS
1954. *The Bethesda-Ballerup group of paracolon bacteria*. Monografía No. 22. Public Health Service, U.S. Government Printing Office, Washington.