

Reimpreso de la Revista del Colegio Médico de Guatemala

VOL. X

SEPTIEMBRE 1959

NUM. 3

**Revisión General de la Bacteriología
Entérica en Relación con las
Enfermedades Diarreicas**

DRA. M. DOROTHY BECK

Revisión General de la Bacteriología Entérica en Relación con las Enfermedades Diarreicas

Dra. M. DOROTHY BECK * **

Teniendo en cuenta el importante problema que las enfermedades diarreicas representan en la nosología guatemalteca, y la estrecha relación que existe entre las mismas y las enfermedades nutricionales, el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) ha estimado de interés la publicación de este trabajo, no sólo para la profesión médica y para los especialistas en laboratorio clínico, sino también para los estudiantes de medicina y para los técnicos de laboratorio en general.

Uno de los problemas en el diagnóstico de las enfermedades diarreicas lo constituye el aislamiento y la identificación de los gérmenes patógenos responsables de las mismas, y éste sólo puede ser resuelto cuando se tiene un conocimiento completo y exacto de la bacteriología entérica. Ya que en este trabajo la Doctora Beck expone los principios generales a seguir y las técnicas que deben ser empleadas con los propósitos especificados, el INCAP confía en que su publicación habrá de satisfacer la finalidad contemplada, siendo de utilidad para todas aquellas personas interesadas en este campo de acción.

La familia *Enterobacteriaceae*

El problema de las diarreas, que desde hace mucho tiempo existe no sólo en América Central sino también en muchas otras partes del mundo, no ha sido aún resuelto. Ya que la diarrea no es más que un síntoma de muchas enfermedades, las cau-

sas que la producen pueden lógicamente ser muy complejas y variadas. El interés del bacteriólogo, sin embargo, radica en aquellos casos en que se sospecha exista una etiología infecciosa. Los organismos entéricos que son de interés especial para los laboratorios de Salud Pública, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. El objetivo del presente trabajo, por lo tanto, es hacer una revisión general de este grupo de organismos, dedicando mayor atención a los miembros especiales del grupo que han sido asociados como agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas.

Definición de la familia *Enterobacteriaceae*

Breed, Murray y Hitchens (1), definen la familia *Enterobacteriaceae* en la siguiente forma: «Bacilos gram-negativos móviles con flagelos peritriánios, o no móviles. Crecen bien en medios artificiales. Todas las especies atacan la glucosa formando ácido, o ácido y gas visibles. Su composición antigenica se describe mejor como un mosaico que resulta en interrelaciones serológicas entre los varios géneros y aún entre otras familias».

Según Edwards y Ewing (2), la familia *Enterobacteriaceae* está compuesta de un gran número de tipos interrelacionados que abarcan cualquier combinación conceible de características bioquímicas compatibles con la definición de la familia. Debido a las muchas combinaciones de las propiedades bioquímicas y serológicas, es difícil establecer un método de clasificación. Sin embargo, como base para el trabajo práctico, se ha hecho necesario dividir la familia en grupos. Dentro de ésta existen centros establecidos de cepas que tienen propiedades bioquímicas similares, y son estos centros, precisamente, los que forman los grupos y géneros que se reconocen generalmente.

Grupos principales de la familia *Enterobacteriaceae*

Aún cuando la clasificación por grupos es deseable para fines prácticos, Edwards y Ewing advierten que estas agrupaciones son puramente artificiales

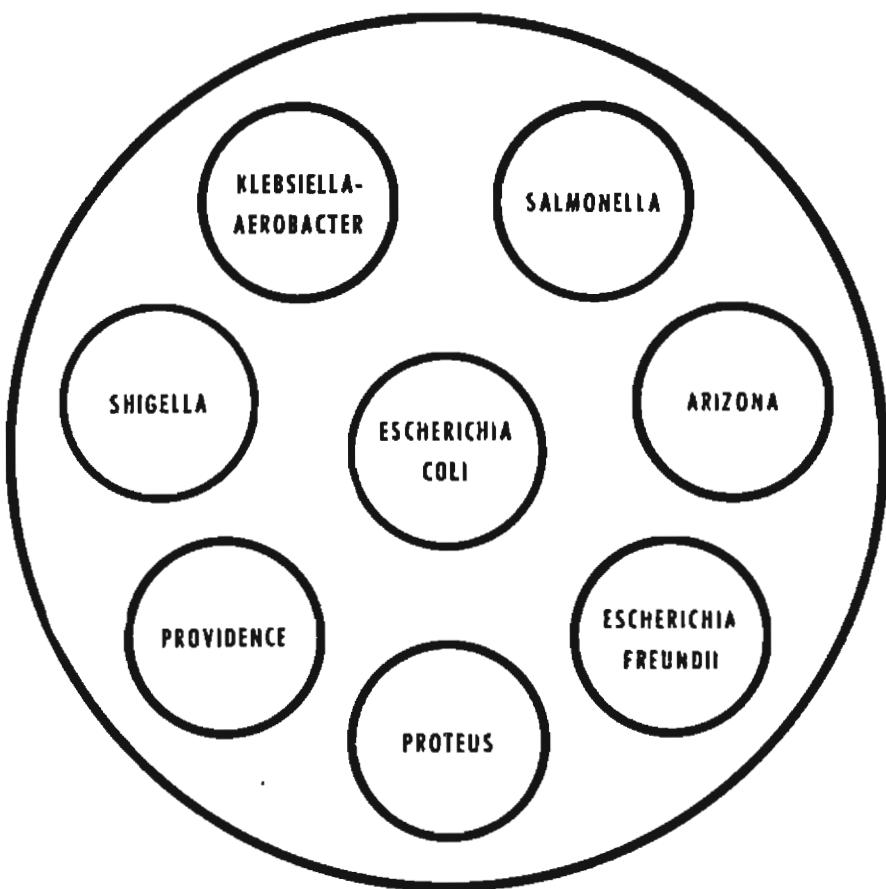
* Consultora en Bacteriología Médica para el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), asignada por la Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud, durante el período comprendido del mes de Octubre de 1955 a Marzo de 1956, y Epidemióloga del Departamento de Salud Pública del Estado de California, Estados Unidos.

** El artículo preparado originalmente en inglés fué traducido al castellano por el Licenciado Leonardo Mata Jiménez, miembro del Laboratorio Bacteriológico del Hospital "San Juan de Dios", San José de Costa Rica, durante su permanencia en el INCAP en carácter de becario, en el período comprendido de Enero a Mayo de 1956. Publicación INCAP E-188.

y que no todos los cultivos que se estudian se adaptan característicamente el uno al otro, debido a que existen muchas cepas intermedias. Dentro de los principales grupos tenemos los microorganismos de

los géneros *Shigella* y *Salmonella*, así como un número cada vez mayor de serotipos que abarca el grupo de *Escherichia coli*, todos los cuales se detallan en la Figura 1.

FIGURA 1



GRUPOS PRINCIPALES DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

Otros grupos

A menudo, otros grupos que comprende esta familia han sido considerados como causa de enfermedades entéricas, pero todavía no se tiene prueba absoluta de que tales grupos produzcan otras infecciones que no sean los casos individuales que ocasionalmente se observan y que tienen poca tendencia a diseminarse entre la población. En esta categoría están incluidas las cepas del grupo *Proteus*, así como las de los microorganismos denominados «paracolon». Cabe mencionar que la única base común para agrupar estos últimos en una sola categoría, la constituye su incapacidad de fermentar la lactosa rápidamente.

El término «Grupo paracolon» ha sido empleado durante muchos años por los bacteriólogos como una designación conveniente de los organismos cuya naturaleza exacta no ha sido determinada o comprendida. Sin embargo, Edwards y Ewing (2)

destacan que, en realidad, no existe tal grupo de bacterias.

Tanto el *Proteus* como las cepas lento-fermentadoras de lactosa han sido mencionadas porque producen colonias semejantes a las de *Shigella* y *Salmonella* en medios de aislamiento. Debido a que estas últimas no fermentan la lactosa, o si lo hacen es con cierta dilución, la lactosa ha sido usada en los medios diferenciales de aislamiento desde que se inició el estudio de las bacterias entéricas. De esta manera se ha enfocado la atención en aquellas formas que no son capaces de fermentar la lactosa o que la fermentan después de cierto tiempo. Como resultado de los estudios de *Salmonella* y de *Shigella*, se ha dedicado especial atención a la investigación de organismos que no tienen ninguna característica que los defina como formas patógenas, exceptuando su incapacidad de fermentar la lactosa. Según Edwards y Ewing (2),

esta inhabilidad de fermentar la lactosa se ha convertido en tema de interés en la investigación de las causas de las infecciones entéricas, y no ha sido sino hasta en los últimos años, que se ha llegado a comprender la falsedad de este criterio. Cada grupo o tipo debe adherirse a sus propias características como forma capaz de producir infección, mientras que su patrón bioquímico sirve solamente para indicar a qué grupo pertenece. Esta capacidad de producir infección se debe juzgar de acuerdo con estándares por completo diferentes.

Según se dijo anteriormente, entre el grupo paracolon se han incluido muchos y diversos organismos que poseen únicamente una característica común: su incapacidad de fermentar la lactosa rápidamente. El grupo al que un organismo pertenece se debe determinar mediante una combinación de pruebas bioquímicas y no con base en una sola característica. Es únicamente en esta forma que se puede adquirir un patrón bioquímico ordenado de tipos dentro de la familia. La falta de uniformidad de los métodos empleados en los diferentes laboratorios, constituye una seria dificultad en las investigaciones de las bacterias entéricas.

AISLAMIENTO DE CEPAS, PRINCIPALMENTE LAS DE LOS GENEROS SHIGELLA Y SALMONELLA

Recolección y tipo de las muestras

Al seleccionar los métodos para aislar las bacterias entéricas de las heces, se debe tener en cuenta que ciertos microorganismos como la *Shigella* pueden disminuir rápidamente en número después de que el espécimen ha dejado el cuerpo humano. Por esta razón es conveniente sembrar las muestras tan pronto como sea posible, en los llamados medios de aislamiento. En los casos en que la muestra de heces de los pacientes con diarrea aguda se puede obtener fresca, es muy ventajoso seleccionar partículas de epitelio o de mucus.

Según Hardy, Mackel, Frazier y Hamerick (3), se obtuvo un porcentaje ligeramente mayor de aislamientos de *Shigella* en muestras tomadas por hisopo rectal, sembradas de inmediato, que en el de exámenes de heces obtenidas por deposición espontánea de los mismos pacientes. Los resultados obtenidos de muestras tomadas con hisopo, de las zonas afectadas del intestino, durante el examen proctoscópico, fueron superiores a los que se lograron con especímenes frescos o mediante el uso de

hisopos rectales. Este método también demostró ser satisfactorio en los casos de disentería bacilar crónica. Sin embargo, el método del hisopo no es tan eficaz para el aislamiento de *Salmonella* como lo es para el de *Shigella*, por lo que se recomienda el uso de medios de enriquecimiento, además del examen de muestras fecales recogidas después de deposición espontánea. Los hisopos se preparan mojando un extremo de los aplicadores de madera con agua corriente, hasta una altura aproximada de dos pulgadas. Luego se envuelve la punta con algodón absorbente y se retuerce bastante para que quede bien apretado, de modo que las fibras del algodón se adhieran firmemente al aplicador humedecido, y teniendo presente que los hisopos no deben ser muy gruesos. Estos se colocan en frascos apropiados y se esterilizan en el horno, con aire caliente, durante una hora y a una temperatura de 160° C. Ya esterilizados y secos, los hisopos se usan para tomar las muestras.

Para este último propósito, el aplicador, al ser insertado, debe hacerse girar en la misma dirección en que se envolvió el algodón, es decir hacia la derecha, y al extraerse, también se debe hacer girar hacia esa misma dirección, con el fin de evitar que el algodón se desenvuelva del aplicador. En los casos en que las muestras fecales tengan que ser enviadas por correo o se deban guardar por algún tiempo antes de ser sembradas, se les agrega una solución preservativa, siendo muy satisfactorias para esta finalidad, las soluciones de salino-glicerol amortiguadas, recomendadas por Sachs y por Coleman. * Tales soluciones deben tenerse de rojo mediante el agregado de rojo fenol, para que así, al tornarse ácidas, se pueda apreciar fácilmente el cambio y puedan descartarse. Esto puede suceder si se guardan por mucho tiempo; además es conveniente recordar que la reacción ácida no es favorable para los bacilos disentéricos. Otro medio preservativo muy satisfactorio es la solución salina amortiguada con citrato de sodio y desoxicólico de sodio. Para este procedimiento se disuelve aproximadamente 1 g. de heces fecales en 8 a 10 ml. de preservativo y se mezcla perfectamente.

Dold y Ketterer (4), y Bailey y Bynoe (5), han comprobado que el secar la muestra de heces sobre trocitos de papel filtro o de papel secante, facilita mucho el envío de éstas por correo. Este método demostró ser de mucha ayuda en el Canadá, donde desde regiones remotas se tuvo que despachar cierto número de especímenes, en cuyo caso no se juzgó conveniente el uso de preservativos. También se observó que, guardando el papel filtro en la oscuridad y a la temperatura ambiente, los

* Todos los métodos y medios de cultivo empleados en el presente trabajo, se encuentran descritos más detalladamente en «Identification of Enterobacteriaceae». (Véase referencia No. 2).

organismos patógenos, en algunos casos, sobrevivían más que otras bacterias contenidas en la misma muestra.

Tiempo de recolección de muestras en relación con los síntomas de la enfermedad.

Se debe tomar en consideración el tiempo de recolección de las muestras en relación con los síntomas de la enfermedad. Edwards y Ewing (2) destacan la importancia que tiene obtener las muestras de heces en el período agudo de la enfermedad. La razón es que, en general, los organismos causantes de la diarrea se encuentran presentes en abundancia durante este período y, a menudo, son estos organismos los que predominan en las heces. A medida que los síntomas van disminuyendo, el número de los gérmenes responsables decrece de tal modo que, en cultivos tomados después de que el estado agudo ha pasado, es difícil aislar los organismos responsables de la infección, y hasta puede ocurrir el caso de que éstos no puedan ser encontrados.

Watt, Hardy y DeCapito (6), estudiaron una serie de 103 casos de disentería bacilar comprobados por cultivos durante el proceso de la enfermedad, así como en el período de la convalecencia. Rutinariamente se recogían muestras cada semana, hasta que de cada paciente se obtuvieron tres exámenes consecutivos negativos.

En la Tabla I se detalla el tiempo que tardó la infección, con síntomas, así como durante el período de la convalecencia. En todos los casos, el promedio de duración de la infección con síntomas fue de once días, y el promedio mínimo de la infección, en el período de la convalecencia, de veintisiete días. El estado de «portador» convaleciente continuó por un promedio de treinta y cuatro días. El período total de la enfermedad se dividió en dos partes aproximadamente iguales, o sea el tiempo durante el que los enfermos presentaron síntomas agudos y el período de descenso, hasta lograr su curación completa. En esta forma, la duración del estado de convalecencia del portador fue aproximadamente seis veces más largo que el estado agudo de la enfermedad, y tres veces mayor que el período de la enfermedad en su totalidad.

Procedimientos de laboratorio

Medios de enriquecimiento. — En el examen de heces siempre es recomendable usar medios de enriquecimiento, siendo particularmente necesario en el examen de presuntos «portadores», en que

los organismos pueden estar presentes en pequeño número. Dos medios de enriquecimiento muy satisfactorios para el cultivo de *Salmonella* son el caldo de selenito y el caldo de tetratónato. La adición de verde brillante y de bilis al caldo de tetratónato se recomienda para aumentar su eficacia. Aunque estos dos medios de enriquecimiento combinados han dado excelentes resultados para el aislamiento de *Salmonella*, muchos laboratoristas prefieren el caldo de selenito para uso general, ya que el tetratónato comúnmente inhibe los microorganismos *Shigella* y *Salmonella typhi*. Si las circunstancias lo permiten, es recomendable usar los dos medios, es decir, selenito y tetratónato. El caldo de selenito, sin embargo, es el medio de enriquecimiento más señalado para el cultivo de todas las formas patógenas. Estos medios, que se pueden obtener comercialmente en forma deshidratada, se distribuyen en cantidades de 8 a 10 ml. por tubo, se inoculan con aproximadamente un gramo de heces y se mezclan perfectamente. Cuando se reciben muestras de heces que contienen algún preservativo, se mezclan de 2 a 3 ml. de dicha suspensión con el contenido de cada tubo de medio de enriquecimiento. En los casos en que se usa el método del hisopo rectal, son éstos los que se colocan dentro del tubo de medio de enriquecimiento, después de haber rayado la caja de Petri que contiene el medio de aislamiento. Los tubos ya inoculados, se incuban durante un período de 16 a 18 horas, a 37° C., después de lo cual se pasa una pequeña muestra con una asa a una caja de Petri que contenga medio de aislamiento. En los procedimientos de diagnóstico se usa una o más de estas cajas, mientras que en los procedimientos que se siguen en la encuesta, sólo se utiliza media caja para cada muestra.

Medios de aislamiento en cajas de Petri. — Se han propuesto muchos medios de este tipo para el aislamiento de bacterias entéricas patógenas. Las primeras preparaciones, tales como el agar eosina-azul de metileno, el agar Endo y otras, inhiben solamente los organismos gram-positivos y contienen indicadores que distinguen las bacterias que fermentan la lactosa rápidamente de aquellas que no la atacan. Además de estos medios de aislamiento simples, existe un buen número de fórmulas que incorporan a las propiedades diferenciales de éstos, una ligera acción selectiva, debida a la adición de sales biliares, tales como los medios de MacConkey y de desoxicolato. En los medios mencionados, el crecimiento de las cepas típicas de *Escherichia coli* se inhibe hasta cierto punto, mientras que la *Shigella* y la *Salmonella* se desarrollan sin dificultad.

TABLA I

FRECUENCIA DE RECAIDAS OBSERVADAS EN «PORTADORES» EN LA FASE DE CONVALESCENCIA DE DISENTERIA INFECCIOSA PRODUCIDA POR *SHIGELLA*. COMPARACION ENTRE EL PERIODO DE LA INFECCION Y EL DE LA CONVALESCENCIA.

| OBSERVACIONES | TIPOS DE <i>SHIGELLA</i> | | | Total |
|---|--------------------------|------------------------------|--------|-------|
| | Flexner | Newcastle (Flex. VI 1953) | Sonnei | |
| CASOS: | | | | |
| Estudiados mediante cultivos en series | 57 | 28 | 18 | 103 |
| Se convirtieron en «Portadores» convalecientes | 45 | 21 | 16 | 82 |
| Porcentaje | 79% | 75% | 89% | 80% |
| No se convirtieron en «Portadores» convalecientes | 12 | 7 | 2 | 21 |
| Duración del estado de «Portador» | | | | |
| Casos estudiados | 38 | 20 | 15 | 73 |
| Duración del estado de «Portador» | | | | |
| Casos no estudiados | 7 | 1 | 1 | 9 |
| Período de la infección de <i>Shigella</i> | | | | |
| Con síntomas: | | | | |
| Total de días | 758 | 191 | 137 | 1086 |
| Promedio por caso | 13 | 7 | 8 | 11 |
| Después de convalecer: | | | | |
| Total de días | 1584 | 549 | 375 | 2508 |
| Promedio por caso * | 32 | 20 | 22 | 27 |
| Promedio por «Portador» determinado .. | 42 | 27 | 25 | 34 |

* No se consideran aquellos casos en los que no se estableció la duración del estado de «Portador».

Recientemente se han preparado medios muy complejos para uso en cajas de Petri, que no sólo son diferenciales sino también altamente selectivos. Ejemplos de éstos son el agar citrato desoxicolato de Leifson, el agar SS, el agar sulfito de bismuto de Wilson y Blair, y por último, el agar verde brillante-rojo fenol de Christensen, Lester y Jurgens. La mayoría de las bacterias coliformes y muchas cepas de *Proteus* son inhibidos por estos medios y de estas últimas cepas, las que llegan a desarrollarse generalmente no se extienden a través de toda la placa. Estas propiedades mejoran en grado apreciable la oportunidad de lograr satisfactoriamente el aislamiento de las bacterias entéricas patógenas. Todos los medios mencionados se pueden obtener comercialmente en forma deshidratada, asegurando así una mayor estandarización de las técnicas.

Los procedimientos a seguir en cada laboratorio para el examen de las bacterias entéricas deben estar necesariamente de acuerdo con sus propias facilidades, personal, tiempo disponible, objetivos del trabajo que ha de efectuarse, etc. Por ejemplo, el número de los diferentes tipos de medios en placas a usar, dependerá de si se está llevando a cabo una encuesta de «tamizaje» o selección de los patógenos entéricos más comunes como son la *Shigella* y la *Salmonella*, o si se trata de llevar a cabo un estudio completo de diagnóstico de casos clínicos.

Consideremos primero la encuesta. El procedimiento usado por el Doctor James Watt, Ex-Director de Estudios del Control de Disenterías del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, consiste en el uso de cultivos tomados con hisopo rectal y sembrados de inmediato en cajas de Petri con agar SS, empleando la mitad de la caja en cada muestra. Este método se usa no sólo en los estudios de la población en general, sino también cuando se trata de casos clínicos. Se reconoce que el uso de este método tiene ciertas limitaciones, ya que algunas cepas de *Shigella* son inhibidas en el medio de SS. Por esta razón, el uso de mayor variedad de medios de aislamiento es el indicado en el caso de trabajos de diagnóstico, siendo recomendable usar medios menos selectivos sobre todo cuando se considera de importancia examinar la flora de *Escherichia coli* en los casos de diarrea infantil.

El agar sulfito de bismuto se debería usar siempre, puesto que es el medio más eficiente que hasta la fecha se ha preparado para el aislamiento de la *S. typhi*. Para lograr el máximo de aislamiento,

muchos laboratoristas han encontrado que es ventajoso el uso de dos cajas de medio, una rayada con abundante material completo, o en suspensión espesa, y la otra sembrada por vaciado con 5 ml. de una suspensión espesa de heces. De los casos clínicos que excretan gran cantidad de organismos, se obtendrán colonias típicas en la caja rayada, mientras que de pacientes «portadores» que excretan pocos organismos, es más probable obtener su aislamiento de las colonias profundas de la caja sembrada por vaciado. Puesto que la *Salmonella typhi* no produce ennegrecimiento típico en el medio de agar sulfito de bismuto cuando las colonias son muy numerosas y se encuentran aglomeradas, el uso de dos o más cajas de medio es un buen procedimiento. Las cepas de *Salmonella* por lo general crecen bien en agar sulfito de bismuto; sin embargo, es común que las de *Shigella* no lleguen a desarrollarse. Puesto que el agar sulfito de bismuto es un medio inhibidor, es recomendable incubar las cajas sembradas durante 48 horas antes de descartarlas.

Para el aislamiento de las cepas de *Shigella* se pueden usar dos tipos de medio en cajas de Petri: uno puramente diferencial o medianamente selectivo, y el otro elaborado con una fórmula más selectiva. Para el primer tipo de medio se puede usar el agar MacConkey, el agar desoxicolato o bien, el agar eosina-azul de metileno; y para el segundo tipo, el agar SS o el agar citrato desoxicolato. Las cajas se deben rayar bien para obtener una buena distribución de las colonias. Esto es de especial importancia cuando se trata de trabajos de encuesta, en cuyo caso se usa sólo una caja de medio de cultivo. Un punto muy importante que se debe tener en cuenta es el de no cambiar la posición del hisopo al rayar la caja, ya que, de lo contrario, se destruye el efecto de dilución que se desea. Las cajas se deben examinar después de 24 y 48 horas de incubación, procedimiento éste que en el curso de las segundas 24 horas se puede efectuar a la temperatura ambiente.

Las cepas de *Salmonella* se pueden aislar en cualquiera de los medios ya mencionados. Muchos laboratoristas prefieren el agar SS o el agar citrato desoxicolato. Edwards y Ewing (2) manifiestan haber obtenido buenos resultados usando el agar verde brillante. Este medio es más inhibidor que las fórmulas recomendadas para la *Shigella*, y por este motivo en el medio se desarrolla una menor cantidad de organismos que es probable que enmascaren la presencia de *Salmonella*.

Algunos laboratoristas prefieren usar el agar citrato desoxicolato y el agar sulfito de bismuto des-

pués del enriquecimiento en selenito, debido a que se ha comprobado que estos medios son satisfactorios en los casos en que se toma en cuenta la *Shigella*, la *Salmonella typhi* y otras cepas de *Salmonella*.

Aislamiento de colonias. — Según se dijo anteriormente, después de 24 y de 48 horas de incubación, se debe hacer un examen minucioso de las diferentes cajas de cultivo. Aun cuando la *Shigella* y la *Salmonella* por lo general producen colonias de aspecto típico en los medios selectivos, se debe recordar que el crecimiento asociado a otros organismos puede alterar su apariencia. Por razones que aún no se han esclarecido, algunas veces también estos patógenos producen colonias de apariencia atípica; por ejemplo, muchas veces varían de color. Por consiguiente, es recomendable trasplantar por lo menos dos colonias representativas de cada tipo, con excepción de las que presentan las características francas de los organismos coliformes.

Para lograr cultivos puros, se debe tener gran cuidado al trasplantar las colonias, propósito para el cual se recomienda usar una aguja ligeramente curva y tocar únicamente el centro de la colonia seleccionada. Si es posible, se debe evitar tocar con la aguja la superficie del medio. La debida atención a este detalle dará como resultado la obtención de un número menor de casos de cultivos mixtos de las cajas sembradas con materias fecales. En los trabajos de encuesta es muy importante trasplantar un número considerable de colonias, ya que únicamente se dispone de una sola caja de medio. En este sentido se considera que es necesario el trasplante de por lo menos un total de 4 a 6 colonias al examinar el medio, a las 24 horas, y el de otras 4 a 6 colonias a las 48 horas de incubación. Las colonias que se encuentren se siembran luego en medio de TSI (azúcar triple y hierro) que consiste en el agar hierro de Kligler al cual se le ha agregado 1% de sacarosa. Este también se puede obtener comercialmente bajo el nombre de agar TSI. Este medio se distribuye en tubos inclinados, de suficiente fondo y de poca inclinación y, al inocularlos, primero se pica hasta el fondo del medio y luego se raya a lo largo de la inclinación a fin de obtener un crecimiento suficiente en la superficie.

Pruebas Bioquímicas y de Aglutinación. — Los tubos de TSI inoculados se incuban durante toda la noche y se examinan a la mañana siguiente. Los que presentan reacción ácida (de color amarillo) a través de todo el medio se descartan, ya que esta reacción es típica de los organismos que fer-

mentan rápidamente la lactosa y/o la sacarosa y, por lo tanto, tales organismos no son ni *Salmonella* ni *Shigella*. En el caso de tubos que presentan un fondo ácido pero cuya inclinación no ha variado, es decir que permanece alcalina, el cultivo debe ser trasplantado de inmediato a un medio de agar-urea. Este se inocula con abundante material en toda la superficie inclinada, pero sin picar el fondo. Los cultivos de *Proteus* producen marcada alcalinidad en el agar-urea después de 6 a 8 horas de incubación. Los tubos que contienen urea se examinan después de transcurrido este período de incubación, dejando que los tubos negativos se reincuben durante la noche. Considerando que los cultivos de *Shigella* y de *Salmonella* son ureasa-negativos, este procedimiento permite eliminar los cultivos de organismos coliformes que fermentan la lactosa o la sacarosa rápidamente, así como los de *Proteus* que tienen reacción ureasa-positiva. El resto de los cultivos se encuentran ya listos para ser examinados a fin de determinar si se trata de *Shigella*, de *Salmonella* o de bacteria paracolon.

El único método digno de confianza que existe hasta la fecha para la eliminación final de la mayor parte de las bacterias paracolon, es el estudio de sus reacciones bioquímicas. Se recomienda, por lo tanto, que antes de emprender amplios y costosos exámenes serológicos, cualesquiera cultivos que se consideren como miembros de los grupos *Salmonella* o *Shigella*, se deben confirmar como tales, valiéndose para el caso, de ciertas pruebas bioquímicas.

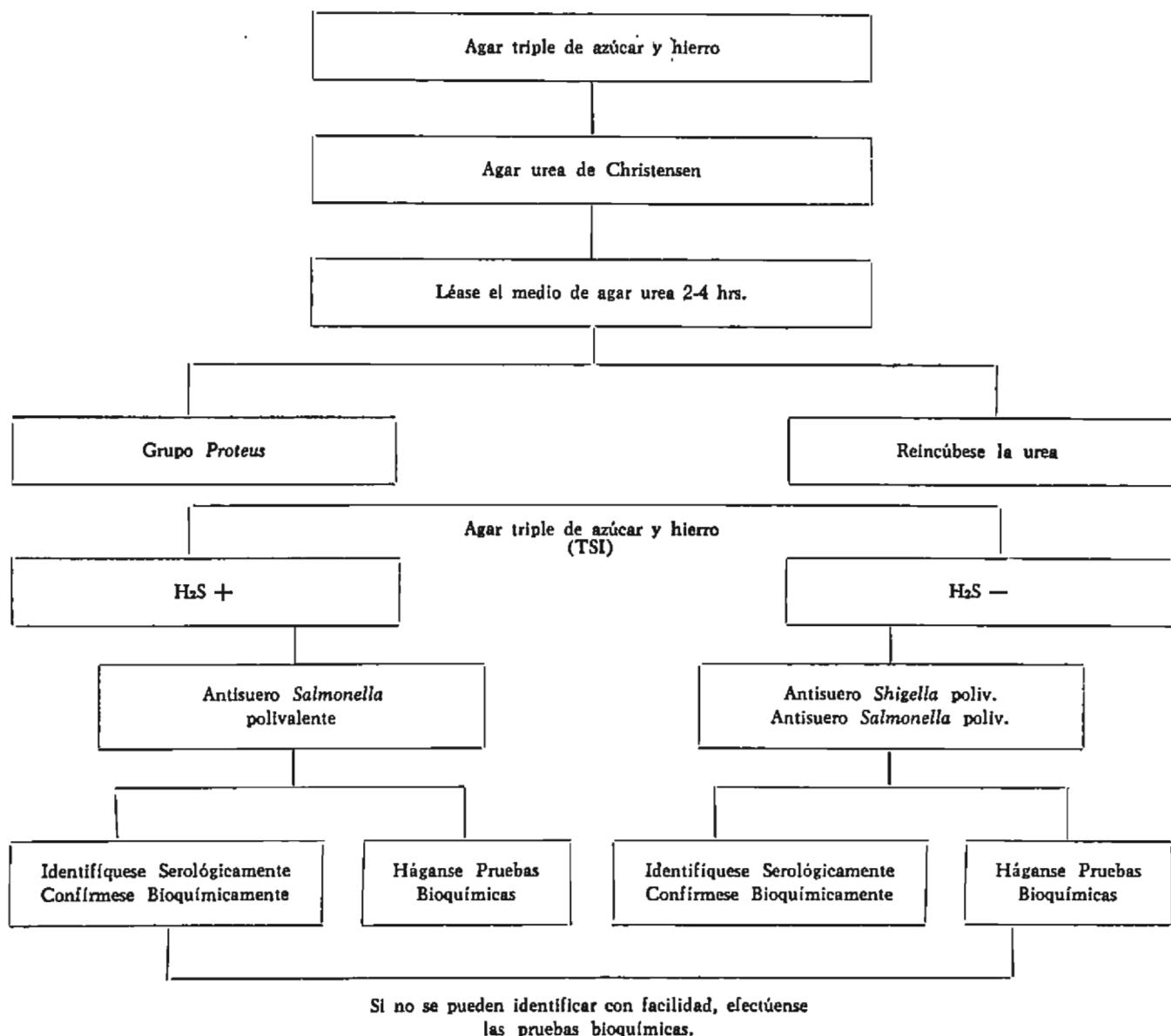
El procedimiento utilizado para la identificación de cultivos de *Salmonella* y de *Shigella* se describe en la Figura 2.

La producción de hidrógeno sulfurado se debe juzgar de acuerdo con la acción de los organismos en agar TSI, ya que el ennegrecimiento o la falta de ennegrecimiento de este medio, corresponde muy aproximadamente a la descripción clásica de los varios grupos de bacterias entéricas. La presencia de indol se establece con el reactivo de Kovac o usando papel impregnado de ácido oxálico después de cultivar la bacteria en bacto-peptona (agua peptonada) al 2%, o en bacto-triptona al 1%. La movilidad de los microorganismos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* se determina mediante el uso de un medio semisólido. Este método es mucho más exacto que el examen microscópico directo.

En el caso de los trabajos de encuesta, se sugiere usar como método el esquema modificado que se presenta en detalle en las Tablas II y III.

FIGURA 2

DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA LA IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE *Salmonella* Y DE *Shigella*



Salmonella

| | | |
|--------------------------|-------------|------------------|
| Glucosa | AG | (por lo general) |
| Lactosa | — | |
| Sacarosa | — | |
| Manitol | Innecesario | |
| Salicina | — | |
| Adonitol | — | |
| Citrato (Simmons) | d | |
| M-R | + | |
| V-P | — | |
| H ₂ S (Papel) | + | |

Shigella

| |
|----------------|
| A |
| d ² |
| d ² |
| d |
| — |
| — |
| + |
| d |

* Ocasionalmente se observa que los cultivos de *Salmonella* no llegan a producir hidrógeno sulfurado en agar TSI. Además, ciertas cepas de *Salmonella* y de *Shigella* dan aglutinación cruzada. La *S. Typhi* y la *S. gallinarum* son anaerógenas y rara vez se encuentran otros tipos de cultivos anaerógenos.

** Cuando positivas, fermentan el carbohidrato lentamente.

d: Algunas cepas positivas y otras negativas.

TABLA II
PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN O «TAMIZAJE» DE SHIGELLA Y DE SALMONELLA
A SEGUIR EN LOS TRABAJOS DE ENCUESTA

| ORGANISMOS | Agar SS | | TSI | | Manitol Movilidad | Urea | Indol | Citrato (1) | Aglutinación (2) Antisuero Shigella Grupos dys. flex. boyd. sonn. Alk-Disp. | Antisuero de Salmonella O polivalente | Destino de los cultivos | Observa- ciones |
|---|---|-------------------------------|---------------------|------------------|---|------|-------|----------------|---|---|--|----------------------------------|
| | I | F | H ₂ S | Reacción | | | | | | | | |
| Shigella | Trasplántese a las 24 y a las 48 horas | | | | Grupo A NC Grupo B — Grupo C (A Grupo D) | — | Neg. | d | | | Guárdese para agrupación final | |
| Grupo (3) Providencie | Colonias Lactosa-neg. (Blancas, rosado pálido, beige) | NC | A | — | NC | — | Neg. | + | + | | Descártese | Olor aromático |
| Salmonella excluyendo S. typhi | Colonias Lactosa-neg. | NC | A | — | (4) AG + | AG | + | Neg. | | | Guárdese para agrupación final | |
| Salmonella typhi | Colonias Lactosa-neg. | NC | A | (7) + | A | + | Neg. | Neg. | | | Guárdese para agrupación fagocítica | |
| Paracolon en general | Colonias Lactosa-neg. o Lento fermentadoras de lactosa | (NC (NC (A (NC (A | AG AG AG A | — — — — | AG | + | d | | | | Algunos dan reacción cru- izada con anti- suero poliva- lente de Salmonella | |
| Grupos especiales | Colonias Lactosa-neg. o Lento fermentadoras de lactosa | NC NC | AG AG | + — | AG AG | + | d | | | | Algunos dan reacción cru- izada con anti- suero poliva- lente de Salmonella | |
| Proteus | Colonias Lactosa-neg. | NC | AG | + | AG AG | + | d | | | | Descártese | Olor putrefacto |
| Pseudomonas | Colonias Lactosa-neg. | NC | NC | — | AG | + | | | | | Descártese | Olor aromatíco • de mareas |

1) Guárdese cuatro días después de su inoculación. Generalmente son positivas en 24 horas y unos pocos en 48 horas.

2) Aglutinación en lámina.

3) El grupo de bacterias Providencia que seemjan *Shigella* en TSI.

4) *Salmonella choleraes* es H₂S negativo.

5) Descártense presuntas *Salmonellae* que den *Indol* positivo.

6) El uso de caldo lactosado y de KCN diferenciará este grupo de la *Salmonella*. Cultivo de *E. freundii*.

A) Producción de ácido y de gas.

NC) Algunas cepas positivas y otras negativas.
d) Producción de ácido y de gas.

TABLA III
FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE — REACCIONES BIOQUÍMICAS — CLAVES¹

| | <i>Shigella</i> | <i>Salmonella</i> | <i>Arizona</i> | <i>E. coli</i> ⁴ | <i>E. freundii</i> ⁵ | <i>Klebsiella</i> | <i>Proteus</i> | Providencia | <i>A o AG</i> |
|--------------------|-----------------|-------------------|----------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------|-------------|---------------|
| TSI (Fondo) | A | AG | AG | AG | AG | AG | AG | A o AG | NC |
| (Superficie) | NC | NC | NC | A | A o NC | A | NC | NC | NC |
| (H ₂ S) | + | + | + | — | + | — | — | — | — |
| Indol | — | — | — | + | — | — | — | — | — |
| Movilidad | d | d | d | + | + | + | + | + | d |
| Urea | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Citrato | — | — | — | + | — | — | — | — | d |
| Voges Proskauer | — | — | — | + | — | — | — | — | d |
| Rojo de meti'o | — | — | — | + | — | — | — | — | d |
| KCN | — | — | — | — | — | — | — | — | d |
| Gas de glucosa | — | — | — | + | — | — | — | — | d |
| Lactosa | — | — | — | — | — | — | — | — | d |
| Sacarosa | — | — | — | — | — | — | — | — | d |
| Salicina | — | — | — | — | — | — | — | — | d |
| Mannitol | — | d | — | — | — | — | — | — | d |
| Dulci ol | d | d | d | — | — | — | — | — | d |
| Gelatina | — | — | — | — | — | — | — | — | d |

1. (Véase notas explicativas de los símbolos usados en la Tabla II)

2. Algunas cepas H₂S negativas

3. *Shigella sonnei* fermenta la lactosa lentamente

4. *E. coli* incluye la cepa Alkalescens-Dispar

5. *E. freundii* incluye la cepa Bethesda Ballerup

— = lento e irregularmente positivo
X = lento e irregularmente positivo

GRUPOS SELECCIONADOS DE BACTERIAS ENTERICAS

El procedimiento que se usa para el aislamiento de las bacterias entéricas, ya fue discutido en el capítulo anterior, considerándose varios medios de aislamiento, así como otros de enriquecimiento, habiéndose tenido en cuenta las pruebas bioquímicas en general. En esta sección se tiene el propósito de considerar algunos grupos específicos de la familia *Enterobacteriaceae*, a saber: la *Shigella*, la *Salmonella* y ciertas cepas del grupo *Escherichia coli*, específicamente asociadas con las diarreas o que epidemiológicamente se relacionan con las mismas.

Shigella

Nos referimos al primero de estos grupos, es decir, al género *Shigella*. En el año de 1950, la Comisión designada al estudio de la *Shigella* por el Sub-Comité de *Enterobacteriaceae* (7) de la Asociación Internacional de Microbiólogos, recomendó la siguiente definición: «El género *Shigella* consiste de bacterias gram-negativas, aeróbicas, no móviles y no esporulantes, que se semejan a la *Shigella dysenteriae* (bacilo de Shiga) en sus propiedades morfológicas y de coloración. Todos los miembros de este grupo fermentan la glucosa, algunos fermentan el manitol y, con pocas excepciones, todos son organismos no productores de gas en la presencia de substancias fermentables. No acidifican la salicina ni el adonitol; no crecen en el medio de agar citrato de Simmons, no hidrolizan la urea ni licúan la gelatina. La lactosa es fermentada por la *Shigella sonnei*, pero solamente después de una incubación prolongada. Todos los miembros de este género tienen una estructura antigénica con base a la cual pueden ser identificados.

Los cultivos que son anaerógenos, H_2S negativos (en el medio diferencial TSI) y ureasa-negativos, se seleccionan para examinarlos como posibles *Shigellae*. Se debe tener presente que pequeñas cantidades de gas a lo largo de la inoculación o en el fondo del tubo de TSI, no son suficiente prueba para eliminar el cultivo, sobre todo si no hay pruebas de producción de hidrógeno sulfurado. Ciertas variantes bioquímicas de la *Shigella flexneri* (6) (Newcastle y Manchester) producen gas, algunas veces en cantidades suficientes como para que éste se haga aparente en el medio de agar TSI. Sin embargo, no se conocen cultivos de *Shigella* que produzcan ennegrecimiento en agar TSI o en agar hierro de Kligler durante el período corriente de incubación de 20 a 24 horas. Puesto que los cul-

tivos de *Shigella* no son móviles, un sencillo examen usando para el caso un medio semi-sólido, eliminará muchos cultivos extraños.

Algunas veces se encuentran en las heces, microorganismos del grupo *Alcaligenes*. Este grupo no fermenta la glucosa, pero se le confunde en ciertas ocasiones con *Shigella* porque produce marcada alcalinidad en la superficie inclinada del medio de agar TSI, dando así la impresión de que hay ácido en el fondo. Los miembros del grupo *Pseudomonas* producen marcada alcalinidad en la superficie inclinada del TSI, pero en este caso el medio, a menudo, tiene un matiz purpúreo causado por la difusión de los pigmentos. Los cultivos de *Pseudomonas* tienen, además, un olor aromático característico.

El manitol ayuda a subdividir en grupos el género *Shigella*. Los miembros del grupo A (*Sh. dysenteriae*) no utilizan este substrato, mientras que los grupos B, C y D (*Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei*, respectivamente) lo fermentan, salvo en muy pocas excepciones. En los trabajos de encuesta se puede incorporar manitol en el medio de movilidad, eliminando así un paso en el procedimiento de selección o «tamizaje».

El hecho de que los cultivos de *Shigella sonnei* fermentan la lactosa y ocasionalmente atacan la sacarosa después de 48 horas o más, sirve para distinguir este microorganismo. El promedio de tiempo requerido por los cultivos de *Shigella sonnei* para fermentar la lactosa es de 6 a 7 días. Si los tubos de medio que contienen lactosa y sacarosa se tapan con un corcho, la fermentación por lo general se acelera.

La fermentación rápida de la lactosa o de la sacarosa, es decir, dentro de las primeras 24 horas, generalmente indica que el cultivo no es del tipo *Shigella*. La presencia de gas proporciona también una prueba auxiliar.

Los miembros del género *Shigella* no utilizan la salicina ni el adonitol, y los cultivos que producen ácido en presencia de estas substancias, se pueden eliminar como posibles *Shigellae*. Ninguno de los tipos de *Shigella* descritos crece en agar citrato de Simmons, por lo que este medio es muy útil para separar los paracolon, que sí son capaces de usar el citrato.

Algunas veces se confunden los miembros del grupo *Providencia* con *Shigellae* porque a menudo no usan el manitol y pueden ser anaerógenos. Este

grupo se puede excluir con base en su movilidad, su uso del citrato de sodio y su fermentación positiva del adonitol y negativa del inositol.

Según se observa en la Tabla IV, el grupo «A» se compone de *Shigella dysenteriae* serotipos del 1 al 8, que son organismos que no utilizan el manitol.

El grupo «B» está compuesto de aquellos organismos que anteriormente se denominaban *Shigella paradysenteriae* *Flexner*, y que hoy día se conocen como *Shigella flexneri*, serotipos del 1 al 6. Por lo general el manitol es fermentado por miembros de este grupo, aun cuando se sabe que hay ciertas excepciones.

TABLA IV

CLASIFICACION REVISADA Y NOMENCLATURA DE LOS ORGANISMOS DEL GENERO SHIGELLA *

| | NOMENCLATURA | |
|--|--|--|
| | Tipo Anterior | Tipo Actual |
| GRUPO "A" (<u>dysenteriae</u>) | <u><i>S. dysenteriae</i></u> <u><i>S. ambigua</i></u> Sach's Q. 771 Sach's Q. 1167 Sach's Q. 1030 Sach's Q. 454 Sach's Q. 902 | <u><i>S. dysenteriae</i></u> 1 <u><i>S. dysenteriae</i></u> 2 <u><i>S. dysenteriae</i></u> 3 <u><i>S. dysenteriae</i></u> 4 <u><i>S. dysenteriae</i></u> 5 <u><i>S. dysenteriae</i></u> 6 <u><i>S. dysenteriae</i></u> 7 <u><i>S. dysenteriae</i></u> 8 |
| GRUPO "B" (<u>flexneri</u>) | <u><i>S. flexneri</i></u> I <u><i>S. flexneri</i></u> II <u><i>S. flexneri</i></u> III <u><i>S. flexneri</i></u> IV (Boyd 103) <u><i>S. rabaunlensis</i></u> <u><i>S. flexneri</i></u> V (Boyd P. 119) <u><i>S. flexneri</i></u> VI (Boyd 88) <u><i>S. flexneri</i></u> VII <u><i>S. flexneri</i></u> VIII | <u><i>S. flexneri</i></u> 1a <u><i>S. flexneri</i></u> 2a <u><i>S. flexneri</i></u> 3 <u><i>S. flexneri</i></u> 4a <u><i>S. flexneri</i></u> 4c <u><i>S. flexneri</i></u> 5 <u><i>S. flexneri</i></u> 6 variante "X" variante "Y" |
| GRUPO "C" (<u>boydii</u>) | <u><i>S. flexneri</i></u> IX (Boyd 170) <u><i>S. flexneri</i></u> X (Boyd P. 288) <u><i>S. flexneri</i></u> XI (Boyd D. 1) <u><i>S. flexneri</i></u> XIV (Boyd P. 274) <u><i>S. flexneri</i></u> XIII (Boyd P. 143) <u><i>S. flexneri</i></u> XII (Boyd D. 19) <u><i>S. etouiae</i></u> (Cepa Lavington) | <u><i>S. boydii</i></u> 1 <u><i>S. boydii</i></u> 2 <u><i>S. boydii</i></u> 3 <u><i>S. boydii</i></u> 4 <u><i>S. boydii</i></u> 5 <u><i>S. boydii</i></u> 6 <u><i>S. boydii</i></u> 7 |
| GRUPO "D" (<u>Sonnei</u>) | <u><i>S. sonnei</i></u> | <u><i>S. sonnei</i></u> |

* Recomendada por el Subcomité de Estudios de Enterobacteriaceae, Publicado en las Memorias del V Congreso de Microbiología celebrado en Río de Janeiro, Brasil, en el año de 1951.

El grupo «C» lo constituyen los serotipos *Shigella boydii*. Bioquímicamente, los miembros de este grupo son similares a los del grupo de *Shigella flexneri*, pero no tienen relación serológica de importancia con los serotipos de aquel grupo.

El grupo «D» comprende solamente la *Shigella sonnei*. Estos microorganismos se semejan a los miembros de los grupos «B» y «C» en cuanto a sus reacciones bioquímicas, excepto que los cultivos de *Shigella sonnei* utilizan la lactosa después de una incubación prolongada.

Por recomendación de la Comisión designada para el estudio de la *Shigella*, los microorganismos conocidos anteriormente como *Shigella dispar* y

Shigella alkalescens e incluidos en el grupo *Shigella* por Ewing (8), fueron suprimidos de tal grupo e incorporados al grupo Alkalescens-Dispar (A-D). Las reacciones de indol son uniformes en cada serotipo de los cuatro grupos mencionados.

Las cepas de *Shigella* de serotipo reconocido no alcalinizan el medio de citrato, mientras que muchos cultivos que pertenecen a los grupos A-D, así como la *Escherichia coli*, sí lo alcalinizan.

Hay dos métodos de que pueden disponer los laboratorios para resolver el problema de la identificación de los cultivos, cuya elección constituye un problema que cada uno de ellos debe resolver.

El primer método es el siguiente. A los cultivos de reacción típica en TSI, ureasa-negativos, se les

puede hacer la prueba de aglutinación usando varios antisueros de *Shigella* (Grupos A, B, C y D) y la técnica de aglutinación en lámina. Primero se puede emplear un suero polivalente y, después antisueros monoespecíficos. Una reacción positiva en el antisuero polivalente es prueba que sugiere que el cultivo es del tipo *Shigella*. De la misma manera, si hay aglutinación en uno de los sueros monovalentes, esto indica el tipo a que pertenece el cultivo.

Después de llevar a cabo estas pruebas se pueden efectuar exámenes bioquímicos para confirmar los resultados, ya que se ha encontrado que algunas bacterias de otros grupos se aglutan con ciertos antisueros de *Shigella*. Mas aún, cualquier cultivo que dé una reacción típica en el medio TSI, que sea negativo en el medio de urea y que no se aglutine en los antisueros de *Shigella*, debe ser estudiado mediante pruebas bioquímicas. Tal cultivo puede ser una de las *Shigellae* menos comunes, un nuevo tipo de *Shigella* o un miembro de otro género.

Aquellos cultivos que parezcan ser Shigella y en los que la aglutinación sea muy pobre o no exista, deben ponerse a prueba a fin de determinar la presencia de substancias termolábiles inhibidoras. Esto se puede llevar a cabo calentando una suspensión de bacterias en baño de maría a 100° C. por espacio de 15 a 30 minutos; después de este tratamiento se repite la prueba serológica. Las substancias que inhiben la aglutinación por lo general están presentes en los miembros de los grupos A-D y de *E. coli*, pero también se pueden presentar en serotipos de *Shigella*.

El segundo método consiste en someter a pruebas bioquímicas los cultivos ureasa-negativos, antes de efectuar los exámenes serológicos. Este método, aún cuando es un poco lento, permite una apreciable economía en el uso de antisueros.

En la identificación de cualquier bacteria entérica desconocida no se puede confiar por completo en la serología, y tampoco se puede hacer una identificación basándose sólo en las reacciones bioquímicas. Ambos métodos deben emplearse para una identificación exacta, ya que las reacciones bioquímicas se usan para establecer el grupo y el subgrupo al que pertenece un cultivo, mientras que la serología se emplea para determinar el serotipo.

Los cultivos aislados de *Escherichia coli* que no utilizan la lactosa o la sacarosa rápidamente y que, por lo tanto, dan la apariencia de *Shigella* en el

medio de TSI, podrían ser causa de error si se les examinara solamente por métodos serológicos.

Los antígenos «O» de 11 serotipos de *Shigella* son idénticos a los antígenos «O» de grupos *Escherichia coli* o a los de bacterias coliformes intermedias. También existen estrechas relaciones antigenicas «O» recíprocas entre 19 serotipos de *Shigella* y grupos de antígenos «O» de *Escherichia coli*.

La clasificación definitiva exacta de los organismos se debe hacer en un centro de clasificación reconocido, ya que éste es un procedimiento lento y costoso para un laboratorio pequeño.

Los cuatro grupos (A-B-C-D) del género *Shigella* mencionados anteriormente, se consideran como agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas. El grupo *Alkalescens-Dispar* (A-D) no se considera como tal.

La distribución de los serotipos de *Shigella* varía de acuerdo con las estaciones y con el área geográfica de cada localidad. Las *Shigellae* son patógenas en los seres humanos y no se encuentran en los animales domésticos ni en las aves de corral, etc., como sucede en el caso de la *Salmonella*. Tales organismos se encuentran en los casos clínicos de enfermedades diarreicas así como en las personas que sufren de infecciones subclínicas. Su distribución en los seres humanos, según la edad, llama la atención. Watt y Hardy (9) en el curso de su estudio, encontraron que los cultivos positivos en las infecciones subclínicas eran bajos en los niños lactantes, uniformes y elevados en el grupo de edad de 1 a 9 años, y ligeramente inferiores en los niños mayores y en los adultos. Sin embargo, casi todos los niños menores de un año que tenían cultivos positivos de *Shigella* manifestaron síntomas clínicos; los casos presentaron tendencia a ser severos y antes de contar con la quimioterapia específica, muchos de éstos fueron fatales. La frecuencia total fue más alta en el segundo año de vida, aunque las infecciones fatales fueron menos comunes, y más corrientes los casos clínicamente benignos así como las infecciones subclínicas. Con el aumento de edad se observó un descenso en la severidad de la enfermedad y un ascenso en la proporción relativa de las infecciones subclínicas.

Tanto los «portadores» como los casos subclínicos y los clínicos, se consideran como fuentes de infección. La transmisión probablemente se efectúa de persona a persona y, por lo general, cuando un foco de infección se presenta en una casa, en el curso de 3 a 4 semanas todos los miembros de la

familia resultan infectados. Esto da como resultado que por cada caso infeccioso conocido, haya numerosos portadores no reconocidos. Con base en estos hallazgos no es extraño que las enfermedades endémicas diarreicas comúnmente se consideren como casos esporádicos. Estas infecciones que aparentemente no están relacionadas entre sí, pueden haber surgido de una sola fuente o bien formar parte de una serie de infecciones no descubiertas.

Otros medios probables de diseminación, tales como el agua, las excretas, los alimentos y las moscas, así como la poca higiene personal y general, las condiciones económicas y la aglomeración en los hogares, han sido objeto de estudio de parte de diversos investigadores. No se ha llegado a encontrar evidencia de diseminación a través del agua o de la leche, y sólo ocasionalmente se ha podido señalar otras substancias alimenticias como los factores responsables de los casos endémicos. En 26 epidemias que Hardy y Watt (9) investigaron, solamente se encontró un caso en el que la fuente de infección fue atribuida a provisiones alimenticias infectadas. La presencia de moscas, la disposición inadecuada de excretas, la falta de higiene personal y el espacio reducido en los hogares, constituyen factores que se asocian con un mayor número de trastornos diarreicos. Las moscas, juntamente con la disposición defectuosa de las excretas, son medios potenciales de diseminación.

Salmonella

El segundo grupo específico de la familia *Enterobacteriaceae* por considerar, es el género *Salmonella*. Para diagnosticar debidamente los organismos que guardan semejanza con la *Salmonella*, en el medio de agar TSI, es necesario, primero, estudiar las características del género. Es difícil proporcionar una definición exacta de éste, ya que constantemente se describen cultivos que, desde el punto de vista serológico pertenecen al grupo, pero que poseen características bioquímicas especiales.

El género *Salmonella*, según Edwards y Ewing (2), se define en los siguientes términos: «Formas generalmente móviles aunque puede haber formas no móviles; producen ácido y gas en la presencia de glucosa, de maltosa, de manita y de sorbitol (salvo en los casos de *Salmonella typhi* y *S. gallinarum*, las que no producen gas). No atacan la lactosa, la sacarosa ni la salicina; no coagulan la leche, no forman indol ni licúan la gelatina. Todas las especies conocidas son patógenas para los animales de sangre caliente, incluyendo el hombre, causan intoxicaciones alimenticias e infecciones

entericas. Ciertas formas se pueden encontrar en los reptiles. Algunas o todas las especies pueden vivir en los alimentos en estado de descomposición».

Existen algunas cepas excepcionales, pero para fines prácticos se puede decir que cualquier bacteria que fermente la lactosa, la sacarosa, la salicina o el adonitol, o que produzca indol en cantidades susceptibles de determinar por los métodos corrientes, puede excluirse de inmediato del género *Salmonella*. Además, los cultivos de *Salmonella* son ureasa-negativos aún después de 24 a 48 horas de incubación. Ciertos organismos paracolon que no dan muestras de actividad de ureasa después del período de incubación corto empleado para localizar los cultivos de *Proteus*, producirán una alcalinidad franca en el medio, después de 24 a 48 horas de incubación. Muchos de tales cultivos son miembros del grupo *Escherichia freundii*, (conocidos también como Paracolon-Bethesda o como miembros del grupo Bethesda-Ballerup). Estos organismos atacan lentamente la lactosa, la sacarosa y la salicina, o bien no la atacan. Los cultivos se deben incubar por espacio de 30 días antes de ser descartados. Sin embargo, se puede reducir este período, tapando los tubos con corchos parafinados después de 24 horas de incubación.

Otro grupo de organismos que está estrechamente relacionado con el de la *Salmonella* es el grupo *Arizona*, formado por bacterias capaces de fermentar la lactosa. Con excepción de esta fermentación y la liquefacción de la gelatina, las reacciones bioquímicas son idénticas a las del grupo *Salmonella*. Puesto que las cepas *Arizona* están relacionadas bioquímica y serológicamente con el grupo *Salmonella*, a menudo se confunden con éste. Según Edwards y Ewing (2) tales errores no son serios, ya que estos organismos producen enfermedades clínicamente similares y se deben tomar las mismas precauciones para prevenir la transmisión de las infecciones. En los reptiles, en las aves, en los mamíferos y en el hombre, se han aislado cepas que son capaces de producir en ellos, infecciones graves y hasta fatales.

La mayoría de las cepas de *Salmonella*, con la excepción de *S. typhi*, producen gas y abundante sulfuro de hidrógeno en agar TSI. Además de ser anaerógenos, ciertos cultivos de *S. typhi* no producen suficiente sulfuro de hidrógeno para ennegrecer el medio de agar TSI. Hay también algunas otras cepas que no producen H_2S , como sucede en el caso de *S. cholerasuis*, *S. paratyphi*, *S. berta* y ciertas cepas de *S. senftenberg*. El suero *Salmonella* polivalente, se puede usar para identificar cultivos que

tienen las reacciones bioquímicas del género *Salmonella*, o bien en el caso de que se efectúe la prueba de la urea y se encuentre que ésta es negativa. En estos casos también la cantidad de suero de que dispone el laboratorio, es el factor que determina el procedimiento a seguir. La experiencia de Edwards y Ewing (2) ha demostrado que si el suero polivalente usado es un suero O puro que contiene aglutininas para *Salmonella* O de los grupos A hasta E₄, y para antígeno VI, del 98 al 99% de los tipos de *Salmonella* aislados del hombre, pertenecen a alguno de estos grupos.

El número cada vez mayor de tipos de *Salmonella* (más de 350 hasta la fecha) y los numerosos sueros para diagnóstico que el reconocimiento de todos ellos requiere, no permite que en un laboratorio corriente se efectúe la clasificación serológica completa de *Salmonella*. Por esta razón, es que los trabajos finales se deben llevar a cabo en un centro de clasificación reconocido.

Después de la aglutinación polivalente, los cultivos deben ser confirmados por medio de pruebas bioquímicas, si es que éstas no se han hecho anteriormente. Este curso de acción es necesario, ya que cierto número de cepas de *Shigellae* y de *paracolon* son aglutinadas por sueros polivalentes. Sin embargo, si se obtiene una aglutinación típica y los resultados bioquímicos preliminares son característicos, es justificable notificar «tipo *Salmonella* indeterminado».

Es muy importante identificar con exactitud los tipos *Salmonella* que en especial se adaptan al hombre, cuya diseminación se produce de persona a persona, ocasionando infecciones entéricas graves y que tienden a convertirse en endémicas, debido a la existencia de los numerosos «portadores» que éstas tienen como resultado.

Entre estos tipos tenemos la *Salmonella typhi*, la *S. paratyphi A*, la *S. paratyphi B*, la *S. paratyphi C* y la *S. sendai*. Se sabe que la *S. paratyphi A* y la *S. paratyphi C* no son comunes en los Estados Unidos y que la *S. sendai* sólo se ha hallado en el Oriente. Sin embargo, estos tipos constituyen importantes patógenos de los seres humanos en diversas partes del mundo, lo que hace necesaria su identificación a fin de poder controlarlos con eficiencia y prontitud en cuanto aparecen. El tipo *S. choleraesuis* se debería identificar con exactitud, ya que muy a menudo produce en el hombre un cuadro septicémico. También es imperativo identificar el *S. typhimurium*, puesto que con gran frecuencia y, más que cualquier otro tipo de *Salmonella*, es causa de gastroenteritis aguda en los humanos.

En la Tabla V se presenta la distribución de los tipos de *Salmonella* en California, Estados Unidos. De 65 brotes estudiados, 37 se debieron a *S. typhimurium*, 7 a *S. newport*, 8 a *S. Montevideo*, y los 13 restantes a otras 11 cepas, según el detalle que proporciona esa Tabla. La distribución de las distintas cepas de *Salmonella* varía según la localización geográfica aun cuando, aparentemente, el tipo más común es el de *S. typhimurium*.

Las infecciones por *Salmonella* se encuentran muy diseminadas en el reino animal, y en Estados Unidos las aves de corral constituyen una de las principales víctimas de la infección. La mayor parte de los tipos de *Salmonella* encontrados en las aves también pueden producir enfermedades en el hombre, hecho que implica un serio peligro para las personas que tienen a su cuidado aves infectadas.

En Florida, Estados Unidos, Hardy y colaboradores (10) aislaron *Salmonella* en cerdos, mientras que de 65 brotes epidémicos estudiados en California, (véase Tabla VI) los que fueron producidos por el consumo de alimentos, se encontró que 40 de éstos tenían relación epidemiológica directa con los brotes. El consumo de pavos infectados fue responsable de 10 de estos brotes; 8 se debieron a productos alimenticios rellenos de crema (en muchos de cuyos casos también se utilizaron huevos para su preparación); 4 más se debieron a la carne, otros 4 al consumo de pollos, y 3 más a huevos (uno de estos casos a huevo de pavo, otro a huevo de pato y el tercero al consumo de huevos desecados).

En la propagación de las infecciones salmonellosas, los portadores humanos, en especial los de *S. typhi*, de *S. paratyphi A*, y de *S. paratyphi B*, constituyen un factor importante, siendo la primera de éstas, la especie que produce el mayor número de «portadores crónicos». Se ha encontrado sin embargo, que los pacientes infectados con otros tipos de *Salmonella* a quienes se les exige exámenes de heces periódicos, en la mayoría de los casos dejan de ser portadores espontáneamente en el término de 30 a 90 días, aun cuando, desde luego, hay excepciones. Un caso muy interesante fue el de un niño de 6 semanas de edad que durante más de 14 meses fue portador de *Salmonella bredeney* en el que se aisló repetidamente (en el curso de 11 exámenes) dicha bacteria.

Escherichia coli

El tercer grupo de organismos que se ha asociado epidemiológicamente con las enfermedades diarreicas, lo constituyen ciertas cepas de *Escherichia coli*. Edwards y Ewing (2) dicen lo siguiente: «Desde

TABLA V
BROTES DE EPIDEMIAS DEBIDOS A *Salmonella* *

| Tipo de <i>Salmonella</i> | No. de Brotes | No. de Casos con Complicaciones |
|------------------------------|---------------|---------------------------------|
| <i>typhimurium</i> | 37 | 639 |
| <i>newport</i> | 7 | 220 |
| <i>montevideo</i> | 8 | 175 |
| <i>enteritis</i> | 2 | 17 |
| <i>muenchen</i> | 2 | 29 |
| <i>oranienburg</i> | 1 | 18 |
| IV, V: e, h | 1 | 34 |
| <i>anatum</i> | 1 | 68 |
| <i>newport y derby</i> | 1 | 55 |
| <i>cholearaesuis</i> | 1 | 11 |
| <i>san diego</i> | 1 | 4 |
| <i>give</i> | 1 | 11 |
| <i>dublin</i> | 1 | 67 |
| <i>bredney</i> | 1 | 2 |
| TOTAL | 65 | 1350 |

* Estudio llevado a cabo por el Departamento de Salud Pública del Estado de California, Estados Unidos, de 1945 a 1954.

hace 40 años o más, los investigadores han venido estudiando cultivos de *Escherichia coli* aislados de casos de gastroenteritis infantil, en los que no se llegaron a encontrar patógenos conocidos, tales como los miembros de los grupos *Salmonella* o *Shigella*.

Los resultados de las investigaciones hechas anteriormente no fueron concluyentes, debido a que solamente se usaron métodos bioquímicos para establecer diferencias entre las cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños lactantes con enfermedades diarreicas y los cultivos obtenidos de sujetos normales.

Según parece, Bray (11) y Bray y Beavan (12), fueron los primeros en señalar la asociación entre un serotipo especial de *Escherichia coli* y los brotes de diarrea infantil. En general, hay ciertos principios que se deben aplicar a las investigaciones de *E. coli* patógenos. El material para los cultivos se debe obtener antes de iniciar el tratamiento con antibióticos, pudiendo tomar los especímenes de las evacuaciones recién emitidas en el pañal o bien por medio de hisopo rectal.

Si se tienen que dejar las heces u otro material durante varias horas antes de que sean inoculados en medios de cultivo, o si se van a enviar por correo, las muestras deben emulsificarse en la forma ya mencionada en un medio de preservación tal co-

mo el de salino-glicerol amortiguado, o bien ser congeladas. En este sentido cabe mencionar que Neter y colaboradores (13) lograron aislar *Escherichia coli* O 111:B4, de especímenes que habían estado bajo congelación durante un período de 5 años.

Aislamiento. — En general, los tipos de *E. coli* asociados con las enfermedades diarreicas no crecen en los medios altamente selectivos, usados comúnmente para el aislamiento de *Salmonella* y de *Shigella*, por lo que se debe emplear un medio menos inhibidor y diferencial, como es el de agar-MacConkey, o el agar eosina-azul de metileno.

Además, se debe inocular una placa de agar sangre con una pequeña porción de inóculo de heces, debido a que en algunos casos, según informan Edwards y Ewing (2), los tipos de *E. coli* asociados con las diarreas infantiles crecen en placas de agar sangre, lo que no sucede al usar agar MacConkey como medio de cultivo.

En la Figura 3 se describen los métodos a seguir para el examen de especímenes en los casos de diarrea infantil.

Como resultado de los múltiples estudios llevados a cabo, se han asociado los siguientes serotipos de *Escherichia coli* con las diarreas:

O 26:B6
O 55:B5
O 86a:B7
O 111:B4
O 112a:B11
O 112c:B11

O 119:B14
O 124:B17
O 125:B15
O 126:B16
O 127:B8
O 128:B12

La primera cepa que se logró aislar fue la O 111 y la segunda, la O 55. Desde 1945 los cultivos de *E. coli* O 111:B4 y O 55:B5 han sido aislados tanto en el curso de epidemias como en casos esporádicos de diarrea infantil investigados en casi todo el mundo. En los últimos años, otros serotipos tales como la *E. coli* O 127:B8 y la O 128:B12 parecen

ser de mayor importancia. La cepa O 127:B8 ha sido aislada en muchas partes de Estados Unidos, del Canadá y de México, mientras que el serotipo *E. coli* O 128:B12 ha sido aislado en el Reino Unido así como en pequeños brotes observados en Estados Unidos. En forma similar, Ewing y colaboradores (14) han aislado repetidamente *E. coli* O 124:B17,

FIGURA 8

METODOS A SEGUIR PARA EL EXAMEN DE ESPECIMENES EN LOS CASOS DE DIARREA INFANTIL

Muestra de Heces

Congélese la porción requerida para el examen de virus.

Cajas con medio de cultivo y medio de enriquecimiento para *Shigella* y *Salmonella*.

Agar EMB
Agar MacConkey
Agar sangre

Preservativo salino glicerol amortiguado.

Sométase a prueba 10 o más colonias individuales en antisuero *E. coli*.

Trasplántense 3 o más colonias a inclinado de agar.

Prepárense suspensiones densas en una solución de NaCl al 0.5% y pruébese con antisuero *E. coli* en lámina. Si hay aglutinación, caliéntese la suspensión de 20 a 30 minutos a 100° C, y hágase una nueva prueba con el antisuero.

Pruebas bioquímicas para *E. coli*.
Glucosa ácido y gas ¹
Lactosa " y "
Sacarosa " y "
 H_2S (en TSI) negativo
Urea negativo
Indol positivo
Rojo de metilo positivo
Voges-Proskauer negativo
Citrato de
Simmons no crece ²
Movilidad positiva o negativa

1 Algunas cepas de *E. coli* son anaerógenas.

2 Ciertas cepas de *E. coli* necesitan más de 24 horas para producir gas en lactosa.

3 Ocionalmente ciertas cepas que, por lo demás son típicas, pueden crecer en agar citrato de Simmons. Generalmente tales reacciones son de acción retardada.

tanto en casos individuales como en el curso de brotes de gastroenteritis y de diarrea aguda observados en niños y en personas adultas.

Muchos investigadores creen que estos tipos de *E. coli* son los agentes causantes de las epidemias de diarreas infantiles y, en efecto, el estudio de casos y de contagios en un determinado brote llevado a cabo por Smith en 1953 (15), demostró que todas las cepas aisladas pertenecían al mismo tipo serológico y aún al mismo subtipo de *E. coli*, hecho indicativo de que estos organismos eran los agentes etiológicos de la enfermedad.

La *Escherichia coli* O 26 ha sido aislada de niños lactantes con infecciones y de terneros también infectados, y recientemente otro tipo, el O 119, ha sido igualmente aislado de niños y de terneros que padecían de enteritis. Esta estrecha relación entre las cepas aisladas de los animales y de los humanos, puede ser de importancia en la epidemiología de la enfermedad.

El papel que otros agentes desempeñan en las enfermedades diarreicas clínicas.

Aun cuando ciertos grupos tales como los de *Proteus*, *Providence* y *Bethesda-Ballerup* han sido asociados con casos esporádicos de enfermedades diarreicas y con brotes epidémicos, es difícil evaluar la verdadera importancia que éstos tienen en la actualidad.

En el estudio de las enfermedades diarreicas en general, siempre existe un grupo de casos en los que no se logra aislar ningún agente etiológico conocido. Tales casos comúnmente se clasifican como gastroenteritis no bacteriana, y se designa el agente etiológico como un virus.

En lo que respecta a este asunto, por el momento tal vez bastaría recomendar que, una vez se hayan eliminado los casos producidos por bacterias patógenas conocidas, se lleven a cabo nuevos estudios en el campo virológico, recomendación que, cabe decir, ya está siendo puesta en práctica en algunas instituciones especializadas.

TABLA VI

RELACION EPIDEMIOLOGICA ENTRE EL CONSUMO DE ALIMENTOS Y BROTES EPIDEMICOS DEBIDO A TIPOS DE SALMONELLA *

| Alimentos | TOTAL | | typhimurium | | montevideo | | newport | | Otros | |
|---------------------------------|-----------|-------------|-------------|------------|------------|------------|----------|------------|-----------|------------|
| | Brotes | Casos | Brotes | Casos | Brotes | Casos | Brotes | Casos | Brotes | Casos |
| Pavo | 10 | 368 | 4 | 153 | — | — | 2 | 68 | 4 | 147 |
| Productos con crema | 8 | 114 | 6 | 67 | 1 | 7 | 1 | 40 | — | — |
| Carne | 4 | 270 | 1 | 182 | — | — | 1 | 3 | 2 | 85 |
| Pollos | 4 | 187 | — | — | 2 | 138 | 1 | 27 | 1 | 22 |
| Helados | 4 | 53 | 2 | 36 | 1 | 10 | — | — | 1 | 7 |
| Helados con huevo de pato | 1 | 30 | 1 | 30 | — | — | — | — | — | — |
| Helados con huevo de pavo | 1 | 6 | 1 | 6 | — | — | — | — | — | — |
| Carne cocida enlatada | 1 | 7 | — | — | 1 | 7 | — | — | — | — |
| Ensalada de papa | 1 | 34 | — | — | — | — | — | — | 1 | 34 |
| Huevos desecados | 1 | 6 | — | — | 1 | 6 | — | — | — | — |
| Leche en polvo | 1 | 2 | — | — | — | — | — | — | 1 | 2 |
| Otros productos | 4 | 59 | 3 | 54 | — | — | — | — | — | — |
| Desconocidos | 25 | 214 | 19 | 110 | 2 | 7 | 2 | 82 | 3 | 19 |
| TOTAL | 65 | 1350 | 36 | 626 | 8 | 175 | 7 | 220 | 13 | 316 |

* Estudio llevado a cabo por el Departamento de Salud Pública del Estado de California, Estados Unidos, de 1945 a 1954.

REFERENCIAS

1. Breed, R. S., Murray, E. G. D. y Hitchens, A. P.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 6th Edition, Baltimore, Williams and Wilkins, 1948.
2. Edwards, P. R. y Ewing, W. H.: Identification of Enterobacteriaceae. Monograph. Minnesota, Burgess Publishing Co., 1955.
3. Hardy, A. V., Mackel, D. C., Frazier, D. D. y Hamerick, D.: The Relative Efficacy of Cultures for *Shigella*. U. S. Armed Forces Medical Journal 4: 393-394, 1953.
4. Dold, H. y Ketterer, M.: Vergleichende Untersuchungen: über die Lebensdauer (Nachweisbarkeit) der Bakterien der T.P.E. Gruppe (B. *typhi*, B. *paratyphi*, B. Schottmüller, B. *enteritidis* Gärtners und Breslau) und der Bakterien der Ruhrgruppe in flüssigem und an Filterpapier angetrocknetem Stuhlmaterial. Ztschr. f Hyg. u Infectionskr. 125: 444, 1944.
5. Bailey, W. R. y Bynoe, E. T.: «Filter Paper» Method for Collecting and Transporting Stools to Laboratory for Enteric Bacteriological Examination. Canad. J. Pub. Health, 44: 468-475, 1953.
6. Watt, J., Hardy, A. V. y DeCapito, T.: Studies of the Acute Diarrheal Diseases. VII. Carriers of *Shigella Dysenteriae*. Pub. Health Rep. 57: 524-529, 1942.
7. Enterobacteriaceae Subcommittee Reports. Internat. Bull. Bact. Nomen. Taxon., 4: 1, 1954.
8. Ewing, W. H.: *Shigella* Nomenclature. J. Bact. 57: 633-638, 1949.
9. Watt, J. y Hardy, A. V.: Studies on the Acute Diarrheal Diseases. XIII. Cultural Surveys of Normal Populations. Pub. Health Reports 60: 261-273, 1945.
10. Hardy, A. V., Galton, M. M. y Lowery, W. O.: *Salmonella* in Fresh and Smoked Pork Sausage. J. Infect. Dis. 95: 232-235, 1954.
11. Bray, J.: Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of *Bact. coli* neapolitanum from Summer Diarrhoea of Infants. J. Path. Bact. 57: 239-247, 1945.
12. Bray, J. y Beavan, T.E.D. Slide Agglutination of *Bacterium coli* var. neapolitanum in Summer Diarrhoea. J. Path. Bact. 60: 395-401, 1948.
13. Neter, E., Korns, R. F. y Trusell, R. E.: Association of *Escherichia coli* serogroup O 111 with Two Hospital Outbreaks of Epidemic Diarrhea of the Newborn Infant in New York State during 1947. Pediatrics, 12: 377-383, 1953.
14. Ewing, W. H. y Gravatti, J. L.: J. Bact. 53, 191, 1947. Citado por Edwards P. R. y Ewing W. H. en «Identification of Enterobacteriaceae». Véase Referencia No. 2.
15. Smith, J.: Association of Serological Types of *Bacterium coli* with Infantile Gastroenteritis. J. Path. Bact. 66: 503-511, 1953.