

NUEVOS METODOS DE DIAGNOSTICO EN LAS AFECCIONES BACTERIANAS INTESTINALES

HÉCTOR COLICHÓN A.

El presente trabajo, constituye la culminación de una labor emprendida para encontrar un método que fácil, precisa y brevemente, permita demostrar la intervención de algún tipo o especie de *Enterobacteriaceae* en las afecciones bacterianas intestinales. La pesquisa se hace a partir de las colonias desarrolladas en las placas de aislamiento donde el material fecal fue sembrado.

La importancia de un método tal, no se discute; quien haya intentado realizar el diagnóstico bacteriológico preciso de las infecciones intestinales, como la disentería bacilar o shigelosis, la salmonelosis y otras afecciones bacterianas que son tan frecuentes entre nosotros, habrá experimentado verdaderas situaciones de incertidumbre o confusión, que pueden fácilmente hacer incurrir en el error o en la omisión, aparte del excesivo material y trabajo que consumen, razones fundamentales por las que el coprocultivo es impracticable para muchísimos laboratorios.

El nuevo método cuyo planteamiento hacemos definitivamente en el presente trabajo, tiene la particularidad de que con economía de tiempo, materiales y labor, se realiza un análisis más profundo de las colonias desarrolladas en el coprocultivo. La primera publicación que sobre este método hicimos, fue en la Revista Peruana de Pediatría, en el año de 1947, (2), trabajo realizado con la colaboración de nuestro colega I. L. Palomino.

En 1952, modificamos su fórmula en una publicación aparecida en la revista oficial de Salud Pública norteamericana (3), un arreglo posterior se hizo en el año 1953 y su publicación figura en la revista Americana de Clínica y Patología (4). En el presente trabajo creemos haber llegado al punto que nos habíamos propuesto; disponemos de un método que ha sido aplicado sistemáticamente en más de 6,000 ca-

sos, y por este estudio creemos haber contribuido a hacer realizable el coprocultivo en cualquier laboratorio dedicado al diagnóstico de rutina. Con este método llevamos a cabo el estudio de la complicación infecciosa secundaria en la Verruga Peruana, habiéndose demostrado que la *Salmonella typhimurium* intervenía con mayor frecuencia, la *Salmonella dublín*, la *Salmonella choleraesuis* le siguen en importancia. Pero, la eficiencia de la técnica no está solamente en estos hallazgos, que por cualquier técnica pueden obtenerse, sino, en que con el nuevo método pudimos descubrir la existencia de dos *Salmonellas* infectando a un solo paciente. De estos casos tuvimos cuatro para una casuística de trece verrucosos; no es fácil que con otros métodos se puede encontrar una proporción tan alta de infecciones dobles aún cuando éstas, en realidad, existen.

No es nuestro propósito hacer ponderación del valor práctico y la utilidad médica de esta nueva técnica, dejamos el veredicto final a la práctica y la investigación; solo debemos hacer notar que este nuevo método concuerda con el nuevo concepto que de la *Familia Enterobacteriaceae* debe tenerse. Actualmente se considera a esta familia como un gran círculo en cuya área se definen bioquímicamente ocho grupos. Veamos el siguiente esquema propuesto por el Communicable Disease Center, Chamblee, Ga. :

DIAGRAMA Nº 1

Según esta nueva concepción, la *Familia Enterobacteriaceae* se divide en ocho grandes grupos, cada uno de los cuales comprende a su vez numerosos tipos o especies; por ejemplo, el Grupo *Escherichia coli* comprende más de un centenar de tipos, igual sucede con el Grupo *Salmonella*. La determinación de los grupos se hace por métodos bioquímicos, para lo cual Edwards y Ewing (5) han elaborado el siguiente Cuadro de pruebas :

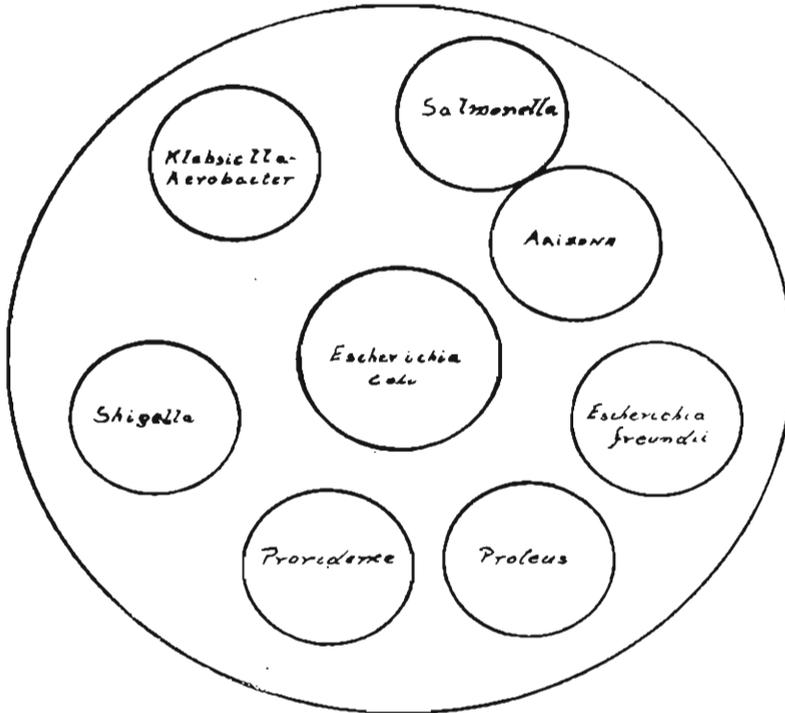
CUADRO Nº 2

De acuerdo a este Cuadro se requiere de dieciocho pruebas bioquímicas para identificar los grupos de *Enterobacteriaceae*, entre estas pruebas es posible señalar algunas de mayor importancia diferencial que otras; nosotros hemos elegido un conjunto de ellas para poder definir en forma preliminar a dichos grupos. El método de que nos ocupamos, consta de dos medios en sus respectivos tubos y que designa-

Diagrama No. 1.

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE ENTEROBACTERIACEAE.

(Según Edwards and Ewing, 1955)



Center of dense population of biochemically similar strains represented as areas surrounded by intermediate cultures not readily classifiable as typical members of established group.

mos : "S L U" y "S M G", respectivamente. El medio "SLU" pone en juego seis pruebas en un solo tubo y son las siguientes :

Lactosa
 Sacarosa
 Urea
 Movilidad
 Indol
 Hidrógeno Sulfurado (papel).

Cuadro No. 2.

REACCIONES BIOQUIMICAS DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE BACTERIA ENTERICA

(Según Edwards and Ewing, 1955)

	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Arizona</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. freundii</i>	<i>Providencia</i>	<i>Proteus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Aerobacter cloacae</i>
Gas from glucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl Red	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Simons' Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S (TSI agar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(Reacción típica de la mayoría de tipos)

Estas pruebas se aprecian por las variaciones ocurridas en el medio, cuya interpretación será explicada más adelante. El medio "SMG" solo consta de cuatro pruebas, que son :

Glucosa
Manita
Gases
Reducción e Hidrógeno Sulfurado

El desarrollo de la bacteria en este último medio permite hacer la emulsión del germen que servirá para realizar la tipificación serológica con lo cual el diagnóstico bacteriológico queda hecho en un tiempo no mayor de 48 horas, lo cual para la práctica en la clínica es de inapreciable valor.

La siembra del espécimen fecal se hace usualmente en placas de medios sólidos, que por las sustancias inhibitoras y selectivas que

contienen, facilitan el aislamiento de colonias de bacterias patógenas que pueden encontrarse confundidas en la copiosa flora saprofita del contenido intestinal. Es muy conveniente, dada la enorme sensibilidad que suelen tener ciertos tipos de *Shigella* a dichas sustancias inhibidoras, emplear varias placas con distintos medios porque si alguna de estas cepas no crecen en una clase de medio puede hacerlo en otro, con lo cual el diagnóstico bacteriológico quedaría asegurado; sin embargo, a pesar de estas medidas se necesita emplear adicionalmente un medio desprovisto de sustancias inhibidoras donde puedan crecer todas las *Enterobacteriaceae* presentes en la muestra, un medio de esta clase también es diferencial y ofrece datos sobre las variaciones que puede experimentar la flora intestinal. El medio que para este fin hemos usado es el agar de Mc. Conkey.

Además de todas estas precauciones que tienen por fin asegurar el aislamiento de gérmenes patógenos, hemos llevado a cabo experimentos para demostrar que cuando dos medios de selectividad distinta o un medio selectivo y otro no selectivo se combinan en una misma placa de Petri, las particularidades de cada medio no se pierden, como era de esperarse. Paralela a la línea de contacto se forma una faja algo estrecha donde la acción selectiva experimenta notable modificación. Si la combinación es de un medio sin inhibidores como el Mc. Conkey con un selectivo que favorece a *Shigella* como el agar desoxycholato citrato, el hemicírculo ocupado por éste último mantiene intacta su selectividad, excepto en la faja de contacto precitada, desde donde hay una gradiente de pérdida de selectividad que se continúa en el hemicírculo del medio de Mc. Conkey. Nosotros hemos puesto en práctica cuatro medios en dos combinaciones para cada muestra. Estos medios y combinaciones son : Agar de Mc. Conkey con el desoxycholato citrato de Leifson y Agar SS con el agar verde brillante de Kristensen Lester Jurgens (6). Aunque este procedimiento tiene la aparente desventaja de reducir el área sembrable de cada medio a la mitad; la práctica ha demostrado que no es esta una desventaja si se pone en práctica una adecuada técnica de siembra.

Podemos adelantar, sin temor a equivocarnos, que este procedimiento de combinar dos medios en una placa pone en evidencia nuevos datos de utilidad diferencial que hay que saber interpretar para adelantar favorablemente en el diagnóstico rápido. Por otro lado, la atenuación de la selectividad en una estrecha área permite crecer a las bacterias patógenas de fastidioso desarrollo, evitándose, de esta manera, el riesgo de no poder aislar la bacteria patógena a pesar de estar presente en la muestra fecal, y que erróneamente puede dar lugar a

conclusiones negativas en el diagnóstico bacteriológico de las infecciones intestinales.

Antes de pasar a otro asunto debemos insistir, que las fallas en el diagnóstico bacteriológico pueden evitarse o reducirse si el espécimen fecal es tomado del enfermo adecuadamente, no debe perderse la oportunidad de hacerlo cuando el paciente inicia su padecimiento, o, en los casos crónicos cuando se intensifican las molestias intestinales; se elige de la deposición, de preferencia, las mucosidades o la parte viscosa que se depone en último término; y debe hacerse antes de administrar antibióticos porque de lo contrario se alejan artificialmente las posibilidades de aislar el agente infeccioso. Es evidente que la flora intestinal se modifica por efecto de estas drogas. Cuando, en otra oportunidad, estudiamos el efecto de la cloromicetina en la tifoidea, pudimos demostrar que con la desaparición de la sintomatología el bacilo tífico también desaparecía de las heces del paciente, pero una vez que se suprímía la droga el microbio reaparecía en las heces del paciente en recuperación.

MÉTODOS

La siembra del espécimen fecal se hace en medios sólidos en placas y líquidos en tubos. La siembra en los medios sólidos tiene por objeto tener colonias convenientemente diseminadas en la superficie del medio, para estudiar sus características morfológicas y sus reacciones fisiológicas particulares. La siembra en los medios líquidos en tubos al modificar, con sus agentes inhibidores selectivos, la flora microbiana existente en el espécimen fecal, favorece el desarrollo de los agentes patógenos de las infecciones intestinales (*Salmonelas* y *Shigelas*), inhibiendo o deteniendo el desarrollo de los microbios saprofitos, particularmente los coliformes.

Placas para la Siembra del Especimen Fecal.

De los numerosos medios que se han propuesto para el aislamiento de bacterias entéricas patógenas, cuatro han sido usados extensamente en nuestros laboratorios; uno de ellos, el agar de Mc. Conkey, medio carente de sustancias inhibidoras o bacteriostáticas para bacterias entéricas, nos ha servido ventajosamente en la determinación de las variaciones o cambios que la flora *Enterobacteriaceae* puede experimentar al aumentar la proporción de colonias lactosa negativas en

relación a las lactosa positivas y en estas últimas para estudiar el incremento de colonias acuminadas o mucoides de *Klebsiella-Aerobacter* y ciertos tipos o variantes de *Escherichia coli*, el carácter mucoso de dichas colonias puede ser verificado observando también su desarrollo en el agar verde brillante y SS.

Los otros medios usados para cada caso, son los siguientes: Agar desoxycholate citrato de Leifson (7), agar SS, Difco y agar verde brillante (6) de Kristensen, Lester y Jurgens. En estos medios, muchas bacterias saprofitas coliformes son inhibidas, las colonias del Grupo *Proteus* que a pesar de los bacteriostáticos llegan a desarrollar, pierden su propiedad de reptar creciendo en forma circunscrita.

Método de dos Medios Combinados en una Placa.

El uso de los cuatro medios ya referidos en varios miles de casos nos ofreció algunos datos nuevos a la observación comparada del desarrollo de una y otra placa, lo que nos condujo a buscar un método en que dos medios de composición distinta, se les disponga en modo tal, que cada uno ocupe un hemicírculo en el área del Petri, habiendo, además, una línea de contacto en el diámetro de la placa. De este modo se ha obtenido la combinación de agar Mc. Conkey y Desoxycholate citrato y otra placa con agar SS y verde brillante.

Para obtener la combinación de agar Mc. Conkey y desoxycholate citrato, se preparan, en primer lugar, placas de agar Mc. Conkey dejando endurecer en cada una de ellas, 25 c.c. de medio; una vez endurecido éste, con un cuchillo flameado se le secciona siguiendo el diámetro de la placa Petri (9 cm.) para separar justamente la mitad del medio; el cuchillo se desvía pegándose al vidrio con el objeto de clivar y despegar la mitad que se desea sacar poniendo la placa invertida frente a un beaker donde el medio despegado se puede fundir para preparar nuevas placas. El hemicírculo que ha quedado vacío es rellenado con medio de agar desoxycholate citrato fundido y a 45°C.; el relleno se hace hasta obtener un nivel igual al del Mc. Conkey, a fin de que ambos medios se continúen sin desnivel alguno en la línea de contacto.

La otra placa de combinación de agar SS y agar verde brillante se obtiene por el mismo procedimiento, repartiendo en primer lugar, el agar SS y rellenando después con agar verde brillante fundido y a la temperatura de 45°C. Una vez que se han endurecido las placas com-

binadas se les deja secar medio día en la estufa a fin de que su superficie no tenga agua de condensación al practicar la siembra.

Siembra de las Placas Combinadas.

Del espécimen fecal se elige al fragmento o la parte que debe sembrarse en las placas, este inóculo se aplica en uno de los extremos del diámetro unión de los medios, se le dispersa en un pequeño segmento círculo que tome por igual a los dos medios y sea equivalente al cuarto o quinto del área total de la placa. Distribuido el inóculo en forma que se ha dicho, se le comienza a sembrar en el área restante por el método del agotamiento y la estría, para lo cual se frota el asa en trazos muy juntos y perpendiculares a la línea de unión de los dos medios (interfase). Al llegar a la línea media, se cambia la posición de la placa pero no del asa porque al despojarse ésta del inóculo lo dispersa mejor dando lugar a colonias diseminadas y convenientemente separadas.

REPICAJE DE COLONIAS

Medios para trasplantar y diferenciar colonias de Enterobacteriaceae

Sobre estos medios nos hemos venido ocupando en cuatro publicaciones sucesivas a partir de nuestro trabajo original que en colaboración de nuestra colega Ida Luz Palomino apareció en el año de 1947 (2). En el presente y último trabajo sobre este punto se establece definitivamente la composición y valor diferencial del medio "SLU" (sacarosa lactosa úrea), porque el "SMG" (SH², manita, glucosa) no ha experimentado modificación alguna.

Medio : " S L U "

La fórmula del medio "S L U" modificado, es la siguiente :

Proteosa peptona N° 2, Difco	10 gm.
Cloruro de Sodio, Q. P.	5 "
Indicador "I M"	10 ml.
Bacto-Agar, Difco	4.5 gm.
Agua destilada para hacer	1000 ml.

Todas estas sustancias deben ser de alta pureza. El indicador "I M" se prepara disolviendo 0.4 gm. de timol azul en 100 ml. de indicador de Andrade (4), esta preparación se guarda herméticamente tapada, en recipientes de vidrio neutro, por varios años sin que sufra alteración, el agar se remoja por una hora en el agua destilada; luego, se le disuelve al calor junto con la peptona y las sales; se ajusta la reacción a pH. 7.4 y entonces es cuando se agrega el indicador. El medio así preparado se distribuye en cantidades medidas (100 ml.) en frascos con tapas de bakelita, y, finalmente se le esteriliza a 15 libras durante 15 minutos.

Solución de Urea y Carbohidratos

Sacarosa	1 gm.
Lactosa	10 "
Urea	10 "
Aguas Destilada	100 ml.

Todas estas sustancias deben ser de alta pureza y si es posible productos Bacto (Difco). Obtenida su disolución en el agua, la mezcla es filtrada por bujía de Berkefeld para su esterilización, se le envasa asépticamente en ampollas, poniendo cantidades de 10 c.c., por ampolla, se controla esterilidad y se les guarda al abrigo de la luz.

Preparación del Medio para el Uso.

A cada 100 c.c. de medio SLU-base previamente liquefactado al calor, se agrega 10 c.c. (una ampolla) de la solución anterior (úrea y carbohidratos). Mézclase y repártase tubos del tipo serológico (10 × 100) cantidades de 2.5 c.c. por tubo. Todas estas operaciones se hacen con asepsia cuidadosa, utilizando material estéril, se les deja solidificar en posición vertical y luego los tubos se controlan a 37°C, por 24hrs. Los tubos se siembran por punción.

Medio "S M G".

Las colonias repicadas y diferenciadas en el medio anterior (SLU) son trasplantadas a este medio cuya fórmula es la siguiente :

Bacto Triptona, Difco	15 gm.
Proteosa peptona N° 2, Difco	5 "
Acetato Neutro de Plomo, Q. P.	0.5 "
Thiosulfato de sodio, Q. P.	0.2 "
Rojo de Fenol al 0.2%	15 ml.
Bacto Agar, Difco	10 gm.
Agua destilada para hacer	1000 c.c.

El indicador de rojo de Fenol se prepara disolviendo 1 g. de Rojo de Fenol-Bacto, Difco, en 40 c.c. de soda decinormal y diluyendo luego a 500 c.c. con agua destilada en balón volumétrico.

Se disuelven las peptonas y el agar con la ayuda del calor, el agar debe remojarse antes 1 hra. El acetato de plomo se disuelve previamente en pequeña cantidad de agua destilada; en esta forma se agrega al medio; con el trisulfato de sodio se procede en igual forma. Hechas estas adiciones, se ajusta el pH, a 7.4-7.5; por último, se agrega el indicador. El medio ya listo se reparte en frascos, cantidades de 100 c.c. y luego se hace la esterilización a 15 lbs. por 15 minutos.

Solución de Manita y Glucosa.

Glucosa	1 g.
Manita	10 g.
Agua destilada para hacer 100	c.c.

Los carbohidratos deben ser de alta pureza, si es posible, productos Bacto-Difco, una vez disueltos, se filtra la mezcla por bujía para su esterilización; se le envasa asépticamente en ampollas, poniendo cantidades de 10 c.c. por ampolla, se controla esterilidad y se les guarda al abrigo de la luz.

Preparación del medio para el uso :

A cada 100 c.c. de medio SMG-base, previamente liquefactado, por la ebullición se agrega 10 c.c. (una ampolla) de la solución anterior (manita glucosa). Mézclase y repártase tubos de 130 × 14 cantidades de 4 a 5 c.c. por tubo. Todas estas operaciones se hacen con asepsia cuidadosa, utilizando material estéril. Dejar solidificar en posición semiinclinada con fondo profundo y luego se controla a 37 grados c.c. por 24 hrs., se les siembra por punción y estría consecutiva.

El Coprocultivo y los pacientes estudiados

Los especímenes fecales que hemos utilizado para practicar el coprocultivo, fueron obtenidas de muestras excrementicias emitidas por los enfermos en recipientes muy limpios y tratados al final con agua hirviendo, tomando de preferencia las mucosidades o las partes viscosas, adherentes depuestas en último término por el paciente. También se han estudiado especímenes fecales obtenidos proctoscópicamente, y muy pocas veces especímenes remitidos en líquidos conservadores, porque todos los pacientes estudiados residen en Lima, o vinieron a esta ciudad para ser atendidos. Apreciable número de ellos proceden de Arequipa, Trujillo, Chiclayo, Piura, etc., en la costa. De la selva también hemos tenido algunos pacientes y de la sierra hemos atendido un número reducido.

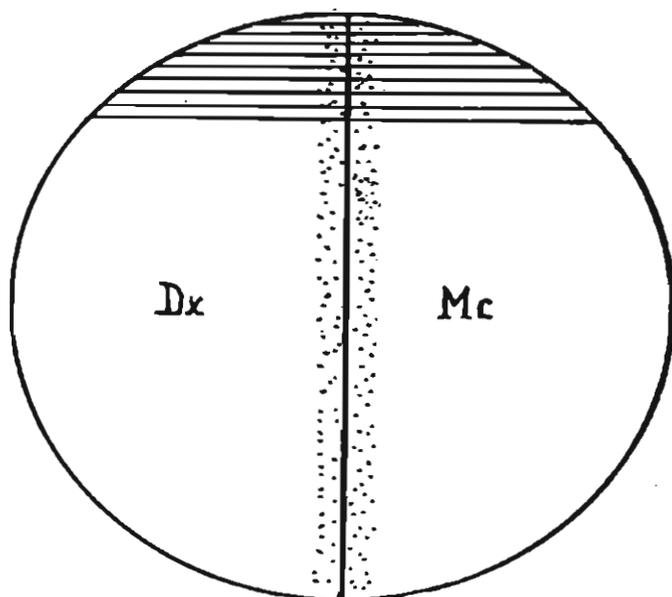
Los extranjeros residentes en el Perú ocupan un lugar importante en toda nuestra casuística, siendo el menor número norteamericanos y europeos.

Casi todos los casos estudiados fueron de evolución crónica, en muchos de ellos la muestra obtenida fue tomada en el momento que estos pacientes presentaron sus molestias intestinales con mayor intensidad. Sin embargo, un número apreciable de coprocultivos tuvieron que realizarse cuando los pacientes se encontraban en pleno tratamiento con antibióticos. Las diarreas agudas y el síndrome disentérico acompañado de emisiones diarréicas mucosas sanguinolentas con las características del llamado "esputo rectal", son muy raras en el momento actual, en el año de 1942, tuvimos la oportunidad de verlos con mucha frecuencia, todo indica que estos cuadros agudos son tratados con sulfas o antibióticos basándose solo en el diagnóstico clínico. A nuestro laboratorio solo llegaron aquellos casos que recidivaron o se manifestaron resistentes a dichas drogas o los procesos crónicos que, en forma general, son resistentes al tratamiento antibacteriano.

.Siembra del espécimen y obtención de colonias separadas.

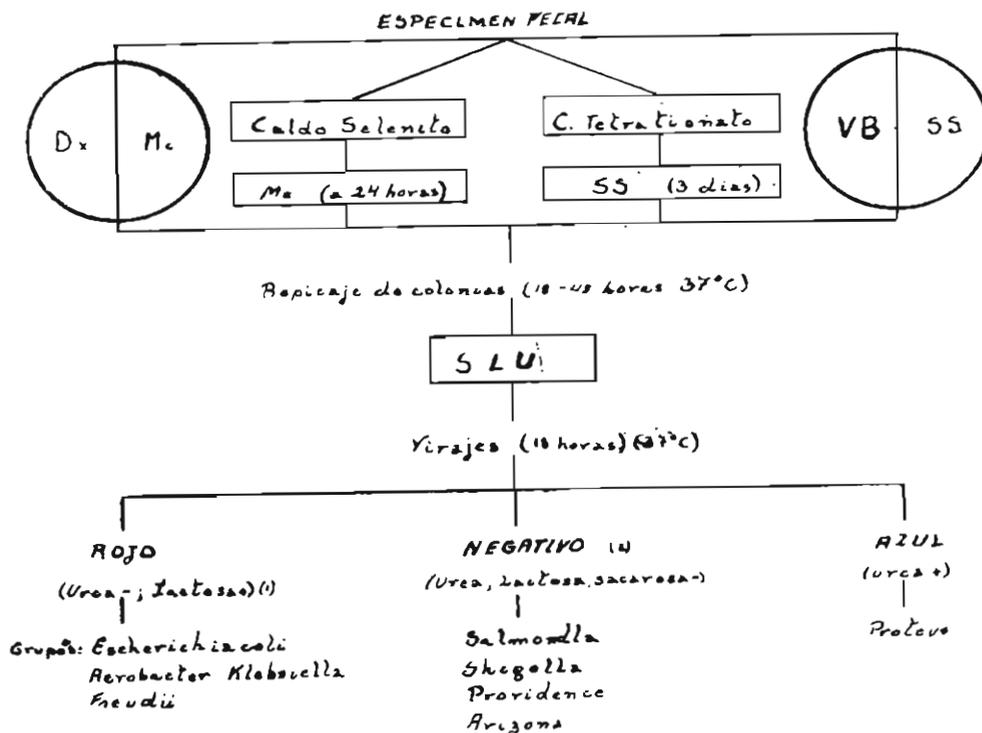
El espécimen es examinado macroscópica y microscópicamente; al hacer estas observaciones siempre se obtiene datos importantes que guían los exámenes bacteriológicos subsiguientes, particularmente la siembra en medios combinados en una placa Petri a los que nos hemos referido ya. Al elegir el inóculo o sea la parte del espécimen que debe ser sembrado, se prefiere las mucosidades o las partes menos con-

sistentes o las que se deponen en último lugar por el paciente. El inóculo se parte uniformemente en un pequeño segmento del área circular de la placa de dos medios tratando de abarcar igual porción de cada medio y conduciéndose al hacer los trazos de distribución perpendicularmente a la línea de unión o interfase. El siguiente Diagrama da una idea de este Procedimiento :



En este dibujo se trata de representar el área circular de dos medios combinados en una misma placa de Petri. El medio Agar de Mc Conkey (Mc) ocupa el hemicírculo del lado derecho y el Agar Desoxycholate Citrato de Leifson (DX) el del lado izquierdo. El diámetro vertical representa la línea de unión de los dos medios y la zona punteada es el área de interfase donde se apreciarán los cambios de selectividad derivado de la combinación. El segmento de círculo que se ha sembrado, que ocupa igual área para cada medio representará la zona de distribución del inóculo y de donde se parte en trazos juntos similares, hechos con el asa de platino, para agotar el inóculo a fin de tener colonias separadas después de incubar la placa. Después del agotamiento como queda dicho, se vuelve a reinocular solo el hemicírculo superior, partiendo del segmento del inóculo y deteniéndose solamente

Cuadro No. 3.
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PRELIMINAR DE CULTIVOS
DE ENTEROBACTERACEAE.



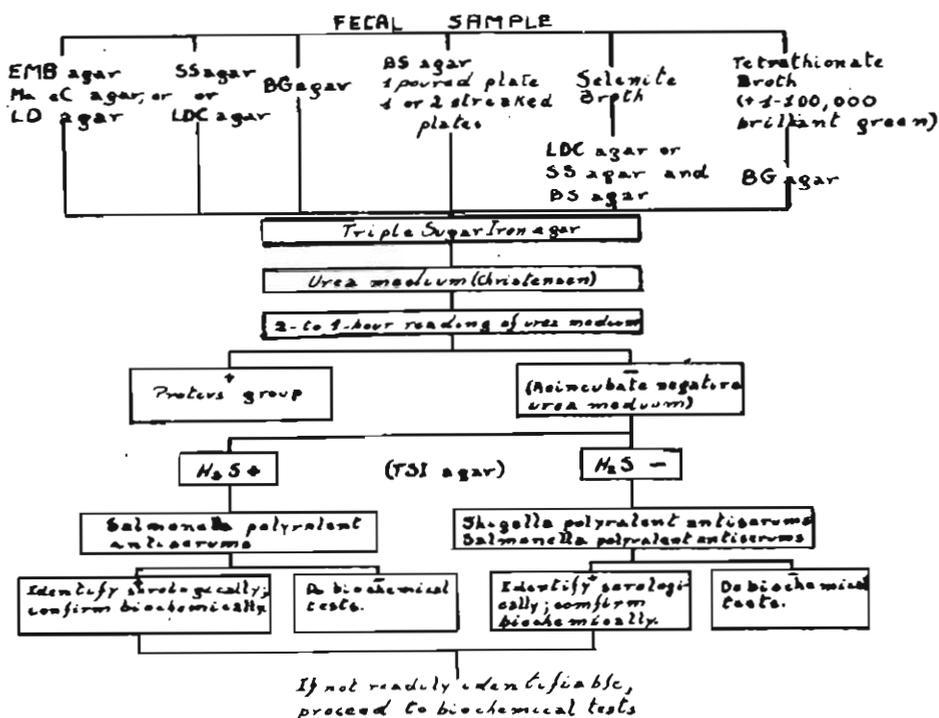
en el diámetro mayor y perpendicular a la línea de interfase. Procediendo de esta manera siempre es posible obtener colonias convenientemente separadas y en un número apreciable, como para reconocer los gérmenes sospechosos y sus diferentes tipos que pueden encontrarse presentes en el espécimen fecal.

Las placas son incubadas 20 a 24 horas a 37°C.; entonces se produce el desarrollo colonial, que en este caso se acompaña de dos clases de diferenciación: La que se deriva de la acción sobre lactosa y que se manifiesta por el viraje del indicador propio de cada medio y la que deriva de la inhibición particular de cada medio por las sustancias bacteriostáticas y selectivas que cada medio en particular contiene. Esta acción inhibitoria se modifica en la interfase o línea de unión de los dos medios. Del estudio de esta selectividad comparada y el desarrollo de ciertas colonias en el área de neutralización o interfase

Cuadro No. 4.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PRELIMINAR DE CULTIVOS SALMONELLA y SHIGELLA

(Según Edwards and Ewing, 1955)



arroja datos de importancia diferencial acerca de los cultivos presentes en el espécimen fecal que se estudia.

Las colonias que a juicio del observador deben considerarse de cultivos sospechosos se repican y subcultivan con una aguja de micrón muy fina y doblada en ángulo recto en su extremo, sembrándosele por punción a un tubo de medio de "S L U". A las 16 ó 18 horas de incubación se lee los cambios que se producen. Los cultivos que no producen cambios en el color de este medio forman uno de los principales grupos de *Enterobacteriaceae*, entre los que se encuentran la mayor parte de patógenos intestinales; a estos tubos se colocan los papeles de acetato y ácido oxálico con el fin de estudiar adicionalmente la producción de SH² e indol por esta clase de cultivos. Los cultivos que pro-

ducen viraje azul en el medio "S L U" son de *Proteus*, se subcultivan al medio "S M G" aplicándose solo el papel oxálico a este último y no al "S L U" como en los cultivos anteriores.

En el Cuadro N°3 se representa los métodos que se siguen de acuerdo al plan y métodos que se proponen en este trabajo. El Cuadro N° 4, reproduce el esquema que aparece en el Manual de *Enterobacteriaceae* publicado por Edwards y Ewing en 1955 (5) que a su vez es una reproducción de publicaciones anteriores.

RESULTADOS

El medio "S L U" y la clasificación preliminar de Enterobacteriaceae.

De las placas donde el material fecal se ha sembrado (Agar de Mc. Conkey, Descxycholate Citrate, Verde Brillante y SS) se eligen las colonias que se consideren sospechosas; el subcultivo de estas se hace en el medio "SLU" sembrándose por punción profunda en el área central, de cada medio se replica una colonia de cada tipo entre todas las sospechosas que han desarrollado. Después de incubar una noche a 37°C., se tienen los siguientes resultados :

"S L U"

Cultivos que producen viraje rojo con o sin gases.	Cultivos que no producen cambio alguno en el medio, ya sea que se forme una que otra burbuja de gas o no.	Cultivos que producen viraje azul sin que se forme gases.
<i>Escherichia freudii</i>		
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Shigella</i>	
<i>Aerobacter</i>	<i>Arizona</i>	
	<i>Providencia</i>	

Esta preclasificación está fundada en, por lo menos, seis pruebas desarrolladas por el medio SLU, estas pruebas son :

- Lactosa
- Sacarosa
- Urea
- Movilidad
- Indol (papel)
- SH²

Hay que considerar adicionalmente la producción de gases no solamente la derivada de la hidrólisis de carbohidratos sino la formación, escasas burbujas observadas en los cultivos del segundo grupo (que no viran) que no atacan lactosa ni sacarosa y sin embargo se producen estas burbujas gaseosas cuya causa se desconoce; lo único que podemos afirmar es que ningún tipo del grupo *Shigella* las produce.

En el Cuadro N°3 esta preclasificación es la terminación del proceso de aislamiento que comienza con el espécimen fecal.

Del medio "S L U" se pasa al medio "S M G" y de este a una, dos o tres pruebas adicionales según el caso lo requiera. Por ejemplo, tratándose del *Proteus* basta un tubo de maltosa para tener, no solo la evidencia del Grupo sino que se avanza hasta la determinación de especies. En el Cuadro N° 6, se tabulan los datos de observación en estos tres medios y que bastan para tener la identificación suficiente de las especies que integran el Grupo *Proteus*, se pueden realizar pruebas adicionales sólo con carácter confirmativo.

El ataque a la manita en el tubo SMG que caracteriza al *P. rettgeri* produce un viraje intenso y total en la masa del medio, mientras las demás especies que no atacan este carbohidrato y sólo atacan glucosa con gases producen viraje en el fondo del tubo con alcalinidad en la superficie y débil o insignificante fragmentación del medio por los escasos gases producidos, la fuerte producción de SH_2 no deja ver el viraje pero sí la pequeña fragmentación del medio.

En el Cuadro N° 5 se tabulan los datos de observación de los Grupos que viran a rojo el medio "SLU" con las pruebas adicionales en los medios "SMG", Simmons Citrato y Christensen agar úrea, con estos cuatro medios se hace la diferenciación preliminar de los Grupos: *Escherichia coli*, *Escherichia freudii*, *Klebsiella* y *Aerobacter*, las pruebas confirmativas se hacen de acuerdo al Cuadro N° 2, pero consideramos que en la práctica del diagnóstico rutinario permite pasar al uso de los sueros para la determinación de serotipos patógenos para el hombre.

En el Cuadro N° 7 se registran las pruebas que diferencian en forma preliminar los Grupos: *Salmonella*, *Shigella*, *Providencia* y *Ari-zona*. Además de los tubos "SLU" y "SMG" se requiere de: Simmons Citrato, caldo adonita y agar úrea de Christensen. Este último medio se diferencia, en la prueba de la ureasa, del "SLU", en que éste es sensible solamente a la ureasa producida por el *Proteus* y no para la de las otras Enterobacteriaceae que la producen lentamente o en pequeña

CUADRO Nº 5

GRUPOS DE ENTEROBACTERIACEAE QUE AL CRECER EN EL MEDIO "S L U" PRODUCEN VIRAJE ROJO

	E. Coli	Klebsiella	Aerobacter	Freudii
(1) Movilidad	+	-	+	+
"S L U" (2) Indol	+	-	V	-
(3) SH ₂	-	-	-	+
(4) SH ₂	-	-	-	+
"S M G" (5) Glucosa	+	+	+	+
Manita	+	+	+	+
Simmons Citrato Agar	-	+	+	+
Agar Urea de Christensen	-	X	-	-- O X

- (1) Desarrollo a partir del trazo de la puntura.
- (2) Papel de ácido oxálico.
- (3) Papel acetato de plomo.
- (4) Reducción y ennegrecimiento, generalmente acompañado de fragmentación del medio.
- (5) Viraje amarillo : Glucosa en el fondo y neutro o alcalino en la superficie; manita, viraje amarillo total.

cantidad. El agar úrea de Christensen es particularmente sensible a estas últimas que no son detectadas por el medio "SLU".

Con los datos proporcionados por estos cinco tubos y en muchos casos basta el "SLU" y "SMG" solamente, se tiene una base suficiente para usar los sueros polivalentes que confirman prematuramente a los Grupos y luego los tipos de *Shigella* y *Salmonella* que se encuentran presentes en la muestra fecal.

CUADRO Nº 6

IDENTIFICACION DE ESPECIES EN EL GRUPO UREASA POSITIVA
Y QUE PRODUCEN VIRAJE AZUL EN EL MEDIO "S L U"Especies del Grupo *Proteus*

	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. morganii</i>
Ureasa (azul) "S L U"	+	+	+	X
Movilidad (1)	+	+	+	+
Indol	—	+	+	+
SH ₂	+	+	—	—
"S M G" Glucosa (2)	+	+	+	+
Manita	—	—	+	—
Gases	+	+	—	+
Maltosa	—	+	—	—

- (1) La movilidad en el *P. morganii* es casi siempre limitada a arborescencias que parten del lugar de la punción.
- (2) El fuerte ennegrecimiento producido por las especies : *P. vulgaris* y *P. mirabilis* a veces no deja ver el viraje, entonces el ataque a la glucosa se aprecia por la débil o escasa fragmentación del medio en el fondo del tubo.

Los cultivos del Grupo Arizona tienen un comportamiento similar al de las *Salmonella* en el medio "SLU", pero el lento y moderado enrojecimiento producido en el medio por el ataque a lactosa de los primeros, la liquefacción de gelatina y su incapacidad de atacar dulcita, son tres pruebas suficientes para diferenciar Arizona de *Salmonella* en forma rápida y preliminar, lo que facilita el uso de sueros poli-

CUADRO N° 7
GRUPOS DE ENTEROBACTERIACEAE QUE NO PRODUCEN VIRAJE
EN EL MEDIO "S L U"

	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Providencia</i>	<i>Arizona</i>
"S L U"	Movilidad	+	-	(4) +
	Indol	-	V	-
	SH ₂	+	-	+
	Gases (1)	V	-	.
"S M G"	SH ₂	V	-	-
	Glucosa	+	+	+
	Manita (2)	+	V	+
	Gases (3)	+	-	+
Simmons Citrato Agar	+	-	+	+
Adonita (caldo)	-	-	+	-
Agar Urea Christensen	-	-	-	-

(.) Comportamiento aún desconocido.

(1) Formación de pequeñas burbujas en el medio sin que los carbohidratos sean atacados. Se desconoce su causa.

(2) El ataque de este carbohidrato se expresa en el medio por fuerte viraje o gran fragmentación del agar. Cuando no es atacado el viraje puede ser mínimo y en el fondo, la fragmentación ínfima.

(3) La *S. typhi*, *S. gallinarum*, *S. sendai* y otras *Salmonella* o sus variedades pueden no producir gases. Algunas *Shigella* (*Flexneri*, *dysenteriae*) pueden producir gases.

(4) Las cepas de este grupo hacen virar este medio con cierta lentitud. La *Shigella sonnei* más lento aún.

valentes, somáticos y flagelares que conducen a identificar tipos en los Grupos : *Arizona* y *Salmonella*.

Los cultivos de *Pseudomonas* y *Alcaligenes* se les diferencia de las anteriores por la propiedad muy peculiar que poseen estos cultivos para crecer solo en la superficie o en las partes próximas a la superficie del tubo "SLU", principalmente los primeros tramos de la picadura, en la parte profunda del medio estos gérmenes no crecen o lo hacen en forma tan exigua que el desarrollo no se nota. Este fenómeno no se presenta en ningún cultivo de *Enterobacteriaceae* y es de suma utilidad para determinar la presencia de bacilo pirocánico o *Alcaligenes*. El bacilo pirocánico (*Pseudomonas aeruginosa*) produce además de alcalinidad moderada, su propio pigmento en la superficie del medio "SLU" lo cual sirve para diferenciarlo del *Alcaligenes*.

Además de los Grupos bioquímicamente definidos en la Familia *Enterobacteriaceae* a los que nos hemos ya referido, son muy frecuentes en nuestro medio numerosos cultivos de *Enterobacteriaceae* que no encuadran en dichos grupos. Estos cultivos, muchos de los cuales, bajo toda evidencia, intervienen en frecuentes procesos patológicos intestinales, los designamos, provisionalmente de acuerdo a la nomenclatura y esquema taxonómico de Borman, Stuart y Wheeler (1) como *Paracolon*. No empleando el nombre *Paracolobactrum* indicado por estos autores sino sencillamente y de acuerdo a la costumbre : *Paracolon*.

RESUMEN

Las últimas modificaciones efectuadas en el medio "SLU" hacen que este medio desempeñe un rol fundamental en la diferenciación pre-minal y básica que se requiere para la pesquisa de las formas patógenas de *Enterobacteriaceae* en la práctica del diagnóstico de las afecciones bacterianas intestinales.

De una manera general, todas las *Enterobacteriaceae* que se cultivan en este medio pueden dar lugar a tres clases de cambios de acuerdo a sus propiedades fisiológicas : Primero, cultivos que producen viraje azul sin gases. Segundo, los que hacen virar al medio a un color rojo y; tercero, los que no producen modificación o cambio alguno, excepto escasas burbujas gaseosas. En estas tres variaciones se agrupan todas las *Enterobacteriaceae*, el primero comprende al *Proteus* solamente; el segundo a *E. Coli*, *E. freudii*, *Klebsiella* y *Aerobacter* y; el tercero, a los Grupos : *Salmonella*, *Arizona*, *Providence* y *Shigella*. La

diferenciación de cada Grupo dentro de cada variación se hace con la ayuda de otras pruebas ya señaladas en los Cuadros precedentes.

Se propone un método para colocar dos medios en una sola placa de Petri, porque la combinación de propiedades de un medio selectivo de una clase con otro de distinta selectividad, trae consigo nuevas observaciones y datos diferenciales de suma utilidad en la práctica del aislamiento y el diagnóstico bacteriológico. Esta disposición trae consigo una nueva área próxima a la línea de unión de los dos medios donde pueden aparecer colonias que no crecen en las áreas propias de cada medio selectivo. Cuando la combinación es de un medio selectivo con otro no selectivo, esta zona es una área de selectividad intermedia que resulta conveniente para el aislamiento de agentes microbianos patógenos que pueden ser inhibidos en los medios selectivos.

La combinación de dos medios en una misma placa y la siembra equivalente en las áreas respectivas ocupadas por cada medio, arroja nuevos datos acerca de la identidad de los cultivos por la observación comparada de su inhibición o su desarrollo.

REFERENCIAS

- 1.—Borman, E. K., Staurt, C. A. and Wheeler, K. M. : J. Of. Bact. 46, 351, 1944.
- 2.—Colichón Arbulú, H. y Palomino, I. L. : Rev. Per. Pediatría, 11, 3, 1947.
- 3.—Colichón Arbulú, H. : Publ. Health Report, 67, 401, 1952.
- 4.—Colichón Arbulú, H. : Amer. J. Clin. Path. 23, 506-511, 1953.
- 5.—Edwards, Ph. R. and Ewing, W. H. : Identification of *Enterobacteriaceae*". 1955. Comm. Disease Center. Enteric Unit. Chamblee Ga. U. S. A.
- 7.—Leifson, E. : J. Path. and Bact., 40, 581, 1935.
- 6.—Kristensen, M., Lester, V. and Jurgens, A. : Brit. J. Exp. Path. 6, 291, 1925.