

Tesis de Posgrado

Estudio de técnicas rápidas para la investigación de propiedades bioquímicas bacterianas : Su aplicación al aislamiento y estudio de entero bacterias patógenas

Lebrun, Julio Fernando

1955

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lebrun, Julio Fernando. (1955). Estudio de técnicas rápidas para la investigación de propiedades bioquímicas bacterianas : Su aplicación al aislamiento y estudio de entero bacterias patógenas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0840_Lebrun.pdf

Cita tipo Chicago:

Lebrun, Julio Fernando. "Estudio de técnicas rápidas para la investigación de propiedades bioquímicas bacterianas : Su aplicación al aislamiento y estudio de entero bacterias patógenas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1955.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0840_Lebrun.pdf

Ministerio de Educación
Ciudad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIO DE TECNICAS RAPIDAS PARA LA INVESTIGACION DE
PROPIEDADES BIOQUIMICAS BACTERIANAS - SU APLICACION
AL AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE ENTERO BACTERIAS PATOGENAS

Julio F. Lebrun

TESIS: 840

Trabajo de Tesis para optar
al título de Doctor en Química
presentado por JULIO F. LEBRUN

RESUMEN DE TRABAJO DE TESIS PRESENTADO POR JULIO F. LEBRUN SOBRE:

ESTUDIO DE TECNICAS RAPIDAS PARA LA INVESTIGACION DE PROPIEDADES
BIOQUIMICAS BACTERIANAS - SU APLICACION AL AISLAMIENTO Y ESTUDIO
DE ENTERO BACTERIAS PATOGENAS.

1) Se ha estudiado la modificación del medio selec-
tivo SWM con el objeto de adaptarlo a una técnica rápida. Se mencio-
na el medio obtenido y los resultados de su aplicación a distintos
cultivos puros de entero bacterias patógenas más comunes.

2) Se estudió y obtuvo un medio para la determinación
rápida de indol e hidrógeno sulfurado. Se mencionan los resultados
logrados al ser aplicados a diversos cultivos puros.

3) Se han fijado las condiciones, el medio y la téc-
nica de trabajo para determinar el poder fermentativo sobre medio só-
lido en caja de petri. Se da cuenta de los resultados.

4) Se ha aplicado los medios y técnicas estudiadas a
la investigación de salmonelas en muestras de diversos orígenes. Se
establece la eficacia de cada uno de ellos en la aplicación práctica.



Res. de Tesis. 840

B. 810

Agradezco al Dr. Basíl Ferramola por concederme el honor de petrocinar esta Tesis.

Mi reconocimiento al Dr. Rogelio Trelles, Director Principal de Laboratorios de G. S. H., que permitió desarrollar este trabajo en dichos Laboratorios

Al Dr. Gevaldo Pese, mi sincero agradecimiento por haber sugerido el tema y guiado en su realización

1.-) Generalidades. El bacteriólogo, al adoptar una técnica para la investigación de bacterias patógenas, se ve frente al problema de analizar dicha técnica desde tres puntos de vista: exactitud, rapidez y comodidad.

Es completamente general que los dos primeros factores se oponen mutuamente, pues insistiendo en una exactitud máxima el informe puede demorar lo suficiente como para que el examen pierda su valor práctico. Si se sacrifica la exactitud en favor de la rapidez los resultados pueden ser desastrosos. El tercer factor no es absolutamente independiente de los otros dos, puesto que para que un dado método sea exacto o rápido ó ambas cosas debe, necesariamente, ser cómodo. En especial el estudio de las propiedades bioquímicas de un gran número de colonias de bacterias, sospechosas de ser patógenas, hace que el trabajo del bacteriólogo sea pesado y monótono.

Todo estudio bacteriológico comprende en líneas generales las siguientes etapas:

- 1.- aislamiento de bacterias
- 2.- estudio de las propiedades bioquímicas, morfológicas y tintoriales y cuando se requiera:
- 3.- estudio serológico.

Para el aislamiento se usan casi exclusivamente medios sólidos concebidos en función de las propiedades bioquímicas de las bacterias que interesa aislar y de las que comunmente existen en una dada muestra. (materia fecal, líquido cloacal, agua de río, orina, etc.) La posibilidad de existencia de varios géneros de bacterias patógenas o no patógenas obliga al uso de varios medios de aislamiento simultáneamente. Estos medios en general inhiben el desarrollo de las bacterias no patógenas que se encuentren pero no pueden impedirlo completamente. Su desarrollo está molestado por el agente selectivo en la pla-

ca de aislamiento pero puede crecer libremente en un sub-cultivo no inhibidor. Para ponerse a cubierto de esta posibilidad es necesario picar de cada placa de aislamiento varias colonias sospechosas y practicar con cada una de ellas otro aislamiento en un medio no selectivo (Agar nutritivo común).

Un nuevo problema se crea cuando se considera la concentración absoluta de bacterias patógenas en la muestra y la concentración relativa respecto de bacterias no patógenas. Este problema se resuelve con el uso de diversos medios de enriquecimiento y sembrando distintas diluciones de la muestra. Suponiendo que se siembren 5 diluciones en dos medios de enriquecimiento, aislando posteriormente en 4 medios diferentes y picando de cada uno de estos medios 5 colonias sospechosas resulta necesario estudiar las propiedades bioquímicas de 200 muestras. El uso de medios selectivos que permitan en esta etapa de la técnica, seleccionar los probables patógenos, se hace imprescindible.

Los medios selectivos, al igual que los medios de aislamiento se basan en las propiedades bioquímicas de las bacterias patógenas que interesa aislar y de las no patógenas que comúnmente existen.

La determinación de propiedades bioquímicas por medio de técnicas macroquímicas comunes son suficientemente difundidas como para ser objeto de análisis en el presente trabajo pero en cambio interesa considerar algunos aspectos de la aplicación de técnicas microquímicas rápidas y del uso de medios sólidos al estudio de las nombradas propiedades.

En los últimos 6 años se han desarrollado una gran cantidad de microtécnicas, Cook, 1948 (1); Arnold & weaver, 1948 (2); Elek, 1948 (3); Hannan & Weaver, 1950 (4); Brough, 1950 (5); Galton, Hardy & Mitchell, 1950 (6); Morse & weaver, 195a (7); Bachmann & Weaver, 1951 (8); Fabrizio & Weaver, 1951 (9); Hargrove & Weaver, 1951 (10); P. Clarke & Cowan, 1952 (11).

Las características sobresalientes de todas estas técnicas son fundamentalmente:

- 1).- Medios más concentrados respecto de los usados en la técnica macroquímica.
- 2).- Uso de pequeña cantidad de medio sembrado con gran cantidad de bacterias.
- 3).- Uso de pequeños tubos (tubos de Durham, tubos capilares) sin esterilizar ni taponar.
- 4).- Incubación en baño de agua
- 5).- Tiempo de incubación desde unos pocos minutos hasta a 6 horas.

Los resultados obtenidos por los diversos investigadores son en general concordantes con los resultados de las técnicas macroquímicas pero existen algunas excepciones. Estudiando la producción de SH_2 mediante algunos micrométodos se encuentra que las bacterias del grupo Coli son siempre SH_2 positivas, en contra de lo aceptado por la taxonomía corriente, Bergey's, 1948 (12).

El uso de medios sólidos en el estudio de las propiedades fermentativas no es un tema nuevo en el campo bacteriológico. Basta recordar los clásicos auxonogramas de Beijerinck (13).

En 1949 Knox (14) estudió la fermentación de lactosa, sacarosa y manitol y la producción de SH_2 en medio sólido. Cook y (15) Knox aplican dichos estudios en el mismo año al exámen bacteriológico de heces y Spaur & Wynne, 1951 (16), efectuaron un estudio más amplio de la fermentación de diversos azúcares en medio sólido. Las características de estas técnicas constituyen:

- 1).- Uso de papeles embebidos en el azúcar colocados en el medio base de agar.
- 2).- Posibilidad de efectuar en una sola placa las reacciones bioquímicas de varias bacterias sobre 3 o 4 azúcares con gran economía de material y de tiempo.

3).- La producción de ácido se identifica por medio de indicadores agregados al medio y la producción de gas mediante cubre-objetos que colectan las burbujas de gas ocasionando la fisura del agar.

4).- Es una técnica macroquímica.

5).- No se presentan discrepancias con respecto al clásico método de agua de peptona azucarada.

6).- Incubación durante 18-24 horas.

En 1948 Cook (17) estudió la hidrólisis de urea por acción de bacterias del género *Proteus* en medio sólido.

Toda colonia que por sus propiedades bioquímicas sea diagnosticada como patógena puede en algunos casos ser confirmada serológicamente. Es obvio destacar la utilidad de esta técnica por el carácter predominante, específico, de las reacciones serológicas.

Todas las anteriores acotaciones son comunes a la bacteriología en general. Recordaremos ahora los mismos temas pero aplicados exclusivamente a la familia Enterobacteriaceae.

2.-) Medios empleados en la investigación de Enterobacterias patógenas

Medios diferenciales. Para el aislamiento de enterobacterias existe un acuerdo casi absoluto en el uso de los siguientes 5 medios diferenciales (18):

a) Agar SS de la casa Difco (desecado). La fórmula de su composición se indica en el apéndice. Este medio requiere una cantidad grande de inóculo ya que es bastante selectivo. Las colonias sospechosas de las bacterias de los géneros Shigella y Salmonella se presentan elevadas, de alrededor de 1 mm de diámetro, lisas, incolores, a veces opacas y otras transparentes y translúcidas; contrastan con la coloración rojo central de las colonias de las bacterias fermentadoras de lactosa. Las placas se incuban 24 h. a 37° C.

b) Agar verde brillante de Krintensen, Lester y Jurgens (19) (ver fórmula en el apéndice). Las cajas con este medio deben ser

sembradas con la cantidad de material normal. Es un medio específico para las bacterias del género Salmonella y paracólicas a él relacionados. No debe investigarse Shigellas en este medio y tampoco es recomendable para el aislamiento de S. typhi. Una vez sembradas las cajas se incuban a 37°C durante 24 h. En él las bacterias del género Salmonella originan colonias opacas, ligeramente rosadas rodeadas de un medio de color rojo brillante. Las bacterias que fermentan la lactosa o la sacarosa presentan colonias amarillo-verdosas rodeadas de un medio igualmente coloreado por viraje del indicador.

c) Agar bismuto-sulfito (Agar de Wilson-Blair). También expedido en forma desecada por la casa Difco. La fórmula preconizada por Verna figure en el apéndice. Es el medio que se recomienda para el aislamiento de la S. typhi pero es posible aislar en él otros integrantes del género. Luego de una siembra abundante, las placas se incuban a 37°C durante 48 h.

Las colonias típicas de S. typhi son negras, rodeadas de un halo negro o pardo negrusco que es varias veces mayor que el tamaño de la colonia. Con luz reflejada (de preferencia natural) esta zona presenta una apariencia metálica. Cuando se ha sembrado abundantemente y el número de microorganismos es muy grande, el desarrollo obtenido es de una apariencia distinta. Las colonias son de color verde. Se debe recomendar el aislamiento de ambos tipos de colonias en casos de duda. S. paratyphi B presenta colonias semejantes a las típicas de la S. typhi. S. paratyphi A, S. typhimurium, S. cholerae suis y el Proteus morgani dan colonias chatas y verdes.

d) Agar desoxicolato-citrato expedido en forma desecada por la casa B.B.L. (Baltimore Biological Laboratory, Inc.) (fórmula en el apéndice). Se debe usar abundante material ya que es un medio muy inhibitorio y luego de ser sembradas las cajas se incuban durante 24 h.

a 37°C. Se recomienda para el aislamiento de las bacterias de los géneros Salmonella y Shigella las cuales dan colonias incoloras que con-

trastan con las colonias rojo-rosadas brillantes de las fermentadoras de lactosa. Es además recomendable para el aislamiento de la S. typhi.

e) Agar Mc Conkey. Si bién en este medio pueden aislarse la mayor parte de los patógenos responsables de trastornos intestinales, su inclusión en el aislamiento directo de las muestras se debe a que es el medio ideal para el reconocimiento de las bacterias fermentadoras de la lactosa y principalmente de Esch. coli.

Debido a la importancia que han adquirido, mediante los estudios de Kauffmann y Taylor en Europa y de Edwards, Ferguson y otros en los Estados Unidos de Norteamérica, el hallazgo de determinado tipos serológicos de Esch. coli asociados a trastornos entéricos en el lactante, no debe descartarse en la búsqueda del agente etiológico de diarreas u otras afecciones de tracto intestinal de niños de no más de 2 años de edad, los tipos 026, 055, 086, 0111, 0112 del grupo coli.

Luego de la siembra de las cajas de agar Mc Conkey con una cantidad normal de inóculo estas son incubadas durante 24 h. a 37 ° C. Las bacterias fermentadoras de la lactosa presentan colonias rojas que pueden estar o nó rodeadas de una zona de bilis precipitada. Las colonias de las integrantes de los géneros Shigella y Salmonella no alteran la apariencia del medio y son incoloras y transparentes.

Medios de enriquecimiento. Dos son los medios de enriquecimiento que han resistido las críticas de los bacteriólogos: son ellos el medio de Kauffmann y el medio Selenito de Leifson.

a) Medio de Kauffmann el tetrathionato. Este medio puede adquirirse desecado bajo el nombre de "tetrathionate Broth Base" de la casa Difco. La fórmula usada en el laboratorio de O. S. N. figura en el apéndice. Se aconseja sembrar de 1 a 3 gramos en 10 ml de medio cuando se trata de materia fecal. En caso de orinas o líquidos cloacales conviene usar 10 ml de medio doble concentrado y sembrar 10 ml de la muestra, para evitar la excesiva dilución. Se incuban los tubos a 37° C aislando a las 24 h. y a las 72 h., siendo conveniente efectuar estos

aislamiento en Agar SS, Agar bismuto-sulfito y agar verde-brillante.

b) Selenito F. También se encuentra en el comercio en forma desecada (B. B. L.). En un tubo con 10-15 ml de medio se siembra 1-2 gramos de muestra sólida o un 20 % de su volumen si la muestra es líquida. La incubación es de 24 h. a 37°C aislando posteriormente en Agar bismuto-sulfito, agar desoxicolato-citrato y agar SS.

Medios selectivos. Es en esta etapa de la investigación de entero-bacterias en donde aún existe un poco de anarquía en cuanto a la elección del método y del medio. En los últimos años son varios los medios propuestos para seleccionar entero bacterias patógenas. Recordemos el medio de Russell (20) en base a doble azúcar; Kligler (21) recomienda el uso de un medio con dos azúcares, hierro y agar. Posteriormente, Hajna (22) introduce el uso de un medio con tres azúcares. En la Dirección de Laboratorios de O. S. N. se aconseja el uso del medio denominado S. V. M. que contiene 2 azúcares y urea y del cuál hablaremos más extensamente en los próximos capítulos.

En 1953 Mac Creedy (23) y Holmes utilizaron por vez primera técnicas microquímicas para un medio selectivo, usando un caldo lactosa-sacarosa adicionado de rojo fenol como indicador. Para la siembra procedíase así: 0,3 ml del medio son colocados en tubos de 10 por 75 mm, sembrados e incubados en baño de agua a 37°C. Las colonias fermentadoras de lactosa y/osacarosa podían ser descartadas en 3 horas de incubación.

Knox (14) utilizó un medio selectivo sólido que permite conocer en una placa la capacidad de fermentación sobre lactosa, manita y sacarosa al mismo tiempo que pone en evidencia la producción de SH_2 . Este método se encontrará expuesto en detalle en el capítulo que trata de fermentación en medios sólidos.

El medio SVM ya mencionado requiere una incubación de 48 h. y en el presente trabajo se ha encarado una modificación adaptando el medio a escala microquímica tratando de acortar el tiempo de

incubación.

Las pruebas bioquímicas y serológicas para entero bacterias no difieren en su técnica de las seguidas para el resto de las bacterias.

Knox (14) agrupa los métodos en base al medio selectivo en 4 tipos a los cuales habría que agregar el propio método de Knox que usa medio selectivo sólido.

Cuadro N° 1: Clasificación de los métodos de selección empleados en la investigación de enterobacterias patógenas (según Knox (14))

Orden	Técnicas			
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1er. día	Inoculación del cultivo en Mc Con Key agar en caja de Petri	Inoculación del cultivo en agua de peptona. Incubación a 37°C 6-8 h. siembra en medios con azúcares	Inoculación del cultivo en agar Mc Conkey con sacarosa y en una serie de azúcares	Inoculación del cultivo en medios con doble ó triple azúcar
2° día	Exámen de las cajas de Petri. Serología. Inoculación en medios con azúcares	Lectura de los azúcares. Serología	Lectura de los azúcares. Aglutinación. Siembra en otros azúcares	Inoculación en otros azúcares. Serología
3er. día	Lectura de los azúcares		Lectura de los azúcares	Lectura de los azúcares

Según Knox el tipo 1 es lento y exacto.

El tipo 2 parece tener la ventaja de dar rápidos resultados aunque la siembra de varias series de tubos representa tiempo consumido. Las contaminaciones pueden interferir en las lecturas.

El tipo 3 da considerable información y elimina gran cantidad de no patógenas pero está sujeto a las mismas críticas del tipo 2.

Los métodos del tipo 4 por siembra en azúcar múltiple es muy informativo pero es imposible tener certeza de la pureza de los cultivos. La técnica que emplea como medio selectivo al SVM podemos ubicarla dentro de este último tipo.

3.-) Técnicas corrientes de aislamiento y estudio de entero bacterias patógenas en material fecal.

Numerosas son las técnicas desarrolladas por diversos investigadores, todas ellas encuadradas dentro de los tipos descritos por Knox. Interesa mencionar 3 de estos esquemas por su relación con el presente trabajo.

1) Método usado por O. S. N. aplicando un medio de selección compuesto de doble azúcar y urea (SVM).

2) Método de Cook G. T. y R. Knox que usa medio selectivo sólido.

3) Método de Holmes aplicando medios selectivos con doble azúcar en escala microquímica.

1) Método de la Dirección Principal de Laboratorios de Obras Sanitarias de la Nación (18).

El esquema intercalado en la página siguiente sintetiza las distintas etapas de la técnica. De cada uno de los medios sólidos que se han sembrado, tanto en el aislamiento directo como en los distintos aislamientos efectuados a partir de los medios de enriquecimiento, se aconseja pasar un mínimo de 5 colonias sospechosas de ser patógenas a sendos tubos con el medio selectivo, el SVM, que permite descartar las bacterias del género Proteus por sus propiedades de producción de NH_3 a partir de urea y las bacterias fermentadoras de lactosa y/o sacarosa por vireje del indicador. Los tubos que después de 48 horas de incubación permanezcan inalterados deberán ser objeto de pruebas bioquímicas y estudio serológico.

Se recomiendan sólo unas pocas pruebas bioquímicas que

permiten, de acuerdo al cuadro de propiedades bioquímicas, separar fácilmente los distintos géneros de entero-bacterias confirmando luego el diagnóstico serológicamente. Estas pruebas bioquímicas son: producción de SH₂, de indol y acción fermentativa sobre sacarosa, lactosa, glucosa y manita.

La capacidad de producción de SH₂ e indol se determina conjuntamente en un tubo con agua de triptona mediante dos papeles impregnados en solución saturada de acetato de plomo, para detectar SH₂ y en solución saturada de ácido oxálico para indicar producción de indol (Reacción de Gnezda). La acción fermentativa sobre azúcares se realiza en sendos tubos de agua peptonada con el azúcar correspondiente y campanita de Durham. Al mismo tiempo que se siembran estos tubos puede efectuarse un cultivo en agar para las pruebas serológicas.

Esquema del método de la Dirección Principal de laboratorios de O. S. N.

Muestra			
<u>Aislamiento directo</u> Agar SS. (24 h. 37°). Agar Verde brillante. (24 h. 37°C) Agar bismuto-sulfito. (48 h. 37°C) Agar Mc Conkey. (24 h. 37°C) Agar desoxicolato-citrato. (24 h.)		<u>Enriquecimiento</u> Kauffmann (24 h. 72 h. 37°C) y <u>aislamiento en:</u> Agar verd. bri. Agar SS Agar bism.-sulf. Selenito F (24h 37°C). y <u>aislamiento en:</u> Agar bism.-sulf. Agar SS Agar desox-citr.	
siembra en medio SVM 48 h. 37°C			
Medio inalterado. Pruebas bioquímicas	Indicador vi-rando al azul Bact. Proteus	indicador vi-rando al rojo	Indicador vi-rando al rojo y producción de gas
Glucosa lactosa Sacarosa Manita SH ₂ Indol		bacterias fermentadoras de lectosa y/o sacarosa	
Pruebas serológicas. Aglutinación.			

Para decidir si un cultivo que presenta las propiedades bioquímicas de salmonelas o shigelas puede por su composición serológica ser incluido en alguno de dichos géneros, es menester ejecutar una prueba de aglutinación rápida con sueros polivalentes. Se recomienda para salmonelas, la preparación de un suero polivalente somático que contenga todos los factores somáticos conocidos hasta el presente (XLII) y un suero polivalente flegelar con los factores más comunes. Para las shigelas, un suero único que contenga los factores de todos los grupos o sueros específicos para cada grupo de los que integran el género.

Las pruebas de aglutinación se realizan sobre una lámina de vidrio cuadrículada donde se coloca una gota de una suspensión espesa, obtenida a partir de un cultivo en agar nutritivo estria de no mas de 24 h. de incubación a 37°C. Se coloca una gota de suspensión por cada suero polivalente (diluido según la potencia del mismo, pero generalmente 1/10, con glicerina). Se mezclan bien ambas gotas con el suero y luego con movimiento circular de la placa de vidrio. En caso de aglutinación positiva, esta aparecerá en tiempo breve y se descartará cualquier aglutinación obtenida luego de 3 minutos de haber mezclado las gotas. La reacción es más visible si se observa sobre un fondo obscuro y con luz indirecta.

La acción de los principales géneros de entero bacterias sobre los azúcares nombrados, y la capacidad de producción de SH₂ e indol aparecen resumidas en el siguiente cuadro:

Cuadro N° 2. Propiedades bioquímicas de los principales géneros de enterobacterias patógenas.

	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Manita	SH ₂	Indol
Salmonella	AG	0	0	AG	+	0
Shigella	A	V"	V"	0+	0	+0
Arizona	AG	0	-	AG	+	0
Coli	AG	A ó AG	A ó AG	AG	0	+
Proteus	AG	0	A	0	+	+0
Grupo Bethesda						
Ballerup	AG	+0	0 +	AG	+	0

V, : variable

" : los casos positivos son fermentaciones lentas

0: algunos tipos positivos y otros negativos.

Como puede observarse, esta técnica demora entre 5 y 8 días el exámen bacteriológico de una muestra. La experiencia ha demostrado que el método resulte sumamente exacto. La diferencia fundamental con otros métodos lo constituye el uso del medio selectivo SVM. El descartar colonias no patógenas con este medio requiere un tiempo de incubación de 48 horas.

2) Método de Cook y Knox que usa medio de selección sólido.

No se trata en realidad de una técnica corriente, pero interesa mencionarla dado que se usa un medio sólido, en donde se manifiestan las propiedades de fermentación sobre manitol, sacarosa y lactosa, al mismo tiempo que la producción de SH_2 . Estas 4 reacciones permiten seleccionar en gran parte las colonias sospechosas de las placas de aislamiento. Estas reacciones son las mismas que en el método anterior y se completan con ensayos rápidos de producción de indol, hidrólisis de urea y en los casos necesarios, inoculación en otros azúcares y aglutinación. El esquema de esta técnica aparece resumido en el cuadro N° 3. El medio sólido usado en esta técnica como medio de selección se encuentra descrito con detalles en el capítulo correspondiente a fermentación en placas.

El ensayo rápido de urea mencionado por estos investigadores es el descrito por Cook. El medio es inoculado tomando material de la placa de selección e incubado a 37°C en baño de agua observando los resultados al cabo de 1 hora.

El ensayo rápido de indol se practica sobre 1 ml de agua de peptona al 2 %, inoculando gran cantidad de material tomado de la placa de selección e incubando en baño de agua a 37°C , después de 1 hora de incubación se ensaya con reactivo de Ehrlich.

Cuadro N° 3. Esquema de las técnicas de investigación de enterobacterias patógenas (según Cook y Knox).

aspecto del medio sembrado	diagnóstico presuntivo	procedimiento a seguir
Fermentación de lactosa y/o sacarosa o producción de gas.	Microorganismos no patóg.	Eliminación de posterior investigación
Fermentación de manitol con ácid. y gas	SH ₂ +	Bacterias del gén. <u>Salmonella</u>
	SH ₂ -	Probablemente bacterias paracoli.
Fermentación de manitol con producción de ácido solamente	SH ₂ +	<u>S. typhi</u>
	SH ₂ -	Bacterias del gén. <u>Shigella</u>
No fermentadores de manitol o fermentadores muy lentos	Probablemente bact. de los gén. <u>Proteus</u> y <u>Shigella</u>	Ensayo rápido de urea y si es negativo ensayos en otros azúcares. Aglutinación con suero polivalente <u>Shigella</u>

El método de Cook resulta rápido, pero no se tienen datos sobre su exactitud. Requiere el movimiento de una gran cantidad de placas que deben ser preparadas en forma especial y por lo tanto representa tiempo y material consumido.

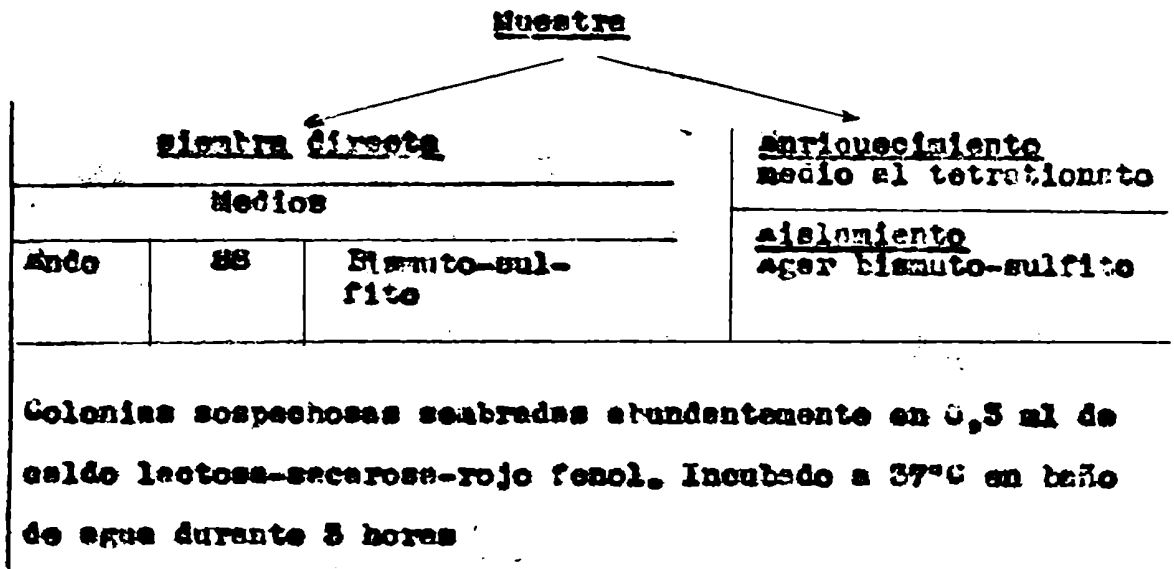
3) Método de MacCreedy y Holmes.

Esta técnica aplica un medio selectivo con doble azúcar en escala microquímica.

El método es rápido pero no descarta de las pruebas biológicas las bacterias del género Proteus, que son las más fáciles de confundir con las salmonelas y shigelas en los medios de aislamiento comúnmente usados.

El Cuadro N° 4 muestra esquemáticamente la técnica de investigación de enterobacterias patógenas según MacCreedy y Holmes.

patógenas (según McCready y Holmes)



selección
↓
movilidad y aglutinación

Pruebas bioquímicas

Para salmonelas

Glucosa
Lactosa
sacarosa
sorbitol
Salicin
Adonitol
rannosa
Kligler's
Loeffler's
Endo
Indol
Urea

Para shigelas

Glucosa
Lactosa
Sacarosa
Melitosa
Manitol
rannosa
Dulcitol
xilosa
sato
Indol
Citrato

- PARTE EXPERIMENTAL - RESULTADOS OBTENIDOS

Con el objeto de acortar el tiempo requerido en la investigación de bacterias enteras patógenas se planearon una serie de experiencias conducentes a lograr este objeto.

Es indudable que hay dos etapas que hasta el presente no es posible acelerar. Estas son las de enriquecimiento y aislamiento, sea este último directo o a partir del medio de enriquecimiento. De tal forma que la rapidez en la investigación debe orientarse a acortar el proceso de selección y a lograr técnicas rápidas de investigación de las pruebas bioquímicas (fermentación de azúcares, producción de indol, sulfhídrico, rojo de metilo y acetilmetilcarbinol).

Con este problema como objeto se desarrolló la parte experimental previa.

a) adaptación del medio SVM a la escala microtécnica.

El medio de Sarraco y Pereyra (modificado por Monteverde) (SVM), es un medio selectivo que se utiliza con el fin de seleccionar las colonias sospechosas de las placas de aislamiento directo o previo enriquecimiento.

El medio en cuestión contiene: lactosa, sacarosa, urea, peptona y dos indicadores (Andrade y azul de timol). Las bacterias de los géneros Shigella y Salmonella no producen ninguna alteración en el color del medio ni producen gas reconocible por la campanita de Durham. Por su parte los paracoli pueden acidificar con o sin producción de gas tardíamente (3-30 días). Las bacterias del género Proteus alcalinizan el medio cuyo color vira hacia el azul debido a la hidrólisis de la urea por parte de dichos microorganismos. Las bacterias fermentadoras de lactosa y/o sacarosa producen acidez con o sin gas por lo que el color del indicador vira hacia el rojo.

De todo lo anterior surge que una vez sembrados los tubos de SVM e incubados durante 48 h. a 37°C, los tubos que deben con-

servarse en aquellos en que el medio no ha sido alterado en nada más que la turbiedad provocada por el desarrollo bacteriano.

Harnnan y Weaver obtuvieron resultados rápidos en la fermentación de diversos azúcares usando la siguiente técnica:

Medio: Difco beef heart infusión 7,5 %
Proteosa Peptona N° 3 1,0 %
PO₄H₂K 0,1 %
ClNa 0,5 %
Agua destilada
pH 7,0

Con el objeto de eliminar azúcares de la infusión de corazón la fermentaron con A. serógenes durante 24 h. a 37°C, filtrando y esterilizando luego. Como indicador usaron 5 ml de solución alcohólica de púrpura de bromocresol al 1,6 % y 5 ml de solución alcohólica de rojo fenol al 1,6 % por litro de medio. Soluciones de azúcares al 20 % fueron esterilizadas separadamente por filtración y agregadas en cantidades tales al medio de forma que resulte una concentración final del azúcar a ensayar de 5 %. Usaron tubos de 5 mm por 40 mm con 0,15 ml de medio sembrando densamente ya sea suspensiones de bacterias o material tomado de cultivos en placas. La formación de gas se ponía en evidencia por medio de una capa de 3 mm de espesor de agar al 1 % que se coloca con pipeta capilar sobre el medio ya sembrado. Esta capa de agar, al solidificarse permite coleccionar las burbujas de gas, favoreciendo al mismo tiempo la fermentación de los azúcares por mantener el medio en condiciones semi-anaeróbicas. La capa de agar también lleve una pequeña cantidad de los mismos indicadores usados en el medio para controlar si la acidificación se debe a la absorción de CO₂ o posibles contaminaciones. Se omitió así la esterilización y taponado de los pequeños tubos.

Aplicando estos principios es que se trató de modificar el medio SVM.

El medio usado fué el siguiente:

<u>Medio base:</u> Extrato de carne	6 gr
Proteosa peptone N° 3	20 gr
PO ₄ H ₂ K	2 gr
ClNa	10 gr
Azul de bromo timol (sol. al 1,6 %)	10 ml
Indicador de Andrade	30 ml
Agua destilada hasta completar a	1000 ml

El pH fué ajustado en 7,0. Separadamente se esterilizó en marmita a 100°C durante 30 minutos soluciones de sacarosa, lactosa y urea al 50 %. Luego se mezcló en la siguiente proporción:

5 ml de medio base

1 ml de solución de lactosa al 50 %

1 ml de solución de sacarosa al 50 %

1 ml de solución de urea al 50 %

2 ml de solución fisiológica estéril, que en caso de tener que realizar la inoculación con suspensión de bacterias debe omitirse para evitar la excesiva dilución del medio.

El agar para el cierre de los tubos se preparó de la siguiente manera:

Agar	1 gr
Agua destilada	100 ml
Azul de bromo timol (sol. al 1,6 %)	0,2 ml
Indicador de Andrade	0,6 ml

El método seguido fué el siguiente: en tubos de 5 mm por 50 mm se colocaron 0,15 ml del medio completo y se los mantuvo a 37°C hasta el momento de su uso. De cultivos en placa (18-24 h) se tomó con ensa la mayor cantidad posible de material proveniente de una colonias, suspendiendo luego por rotación del ansa dicho material en el medio de cultivo. Luego, con ayuda de una pipeta capilar provista de una pequeña perilla de goma, se dejó caer cuidadosamente por las paredes de los

tubos, cantidad suficiente de agar al 1 % de manera de formar una capa de más o menos 3 mm de espesor. Se incubó en baño de agua a 37°C teniendo la precaución de dejar solidificar la capa de agar antes de sumergir los tubos en el baño, pues en caso contrario el agar se mantiene sobrefundido, mezclándose finalmente con el medio.

Para tener una idea del margen de tiempo de observación necesario se ensayeron 10 cultivos pertenecientes a las principales especies de enterobacterias, posiblemente presentes en una muestra de materia fecal. Para la siembra se tomó material de cultivos en cajas de petri con agar común. Se observó que dentro de las 4 horas de incubación se podía poner en evidencia bacterias fermentadores de lactosa y/o sacarosa por viraje del indicador hacia el rojo, así como también las hidrolizantes de urea por viraje neto del indicador al color azul.

En el Cuadro N° 5 se indican los resultados obtenidos.
Cuadro N° 5. Variación producida en el medio SVM (modificado) a distintos tiempos de incubación.

bacteria sembr.	Tiempo de incubación					
	1h	2h	3h	4h	5h	6h
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. boydii</u>	0	0	0	0	0	0
Grupo Ballerup	0	0	0	0	0	0
Grupo Arizona	0	0	0	0	0	0
<u>S. gallinarum</u>	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. sonnei</u>	0	0	0	0	0	0
<u>Proteus vulgaris</u>	0	U	U	U	U	U
<u>A. aerógenes</u>	0	0	0	AG	AG	AG
<u>Esch. coli</u>	0	0	AG	AG	AG	AG
<u>S. newport</u>	0	0	0	0	0	0

Luego de estos ensayos previos, se efectuaron ensayos seriados usando varios cepes de cada especie. Teniendo en cuenta el

hecho ya largamente confirmado de la variabilidad en calidad y en cantidad de los sistemas enzimáticos bacterianos por cultivo en medios de distinta composición, se realizaron al mismo tiempo ensayos tomando material de medios que contenían azúcares y de medios que no los contenían usando, lógicamente, los comúnmente empleados en el aislamiento de enterobacterias patógenas. Paralelamente las mismas cepas se controlaron cultivándolas en el medio SWM de fórmula corriente. En todos estos ensayos los tubos usados en la técnica rápida no estaban ni esterilizados ni taponados. En los cuadros N° 6, 7, 8, 9, 10 se indican los resultados obtenidos.

De tales resultados surge que el medio SWM modificado conduce a resultados ciertos y que en un tiempo máximo de 6 horas es posible descartar los cultivos que hidrolizan urea y los que fermentan sacarosa o/y lactosa. Cuando el pasaje se ha efectuado de medios que contenían alguno de estos azúcares el tiempo que requiere poner en evidencia la capacidad de fermentación bacteriana es mucho menor que en caso contrario, resultados que confirman lo observado por muchos investigadores y mencionado anteriormente.

El medio es sencillo de preparar, se conserva bien durante varios meses y el manejo de los pequeños tubos no ofrece ninguna dificultad. Para colocar los 0,15 ml de medio conviene elegir una pipeta que en 3 o 4 gotas mida exactamente dicha cantidad ganando así en tiempo y comodidad. La colocación de la capa de agar debe efectuarse cuidadosamente de manera de evitar la formación de burbujas de aire en la interfase que dificultaría las lecturas en los casos de producción de gas. Tampoco ofrece inconveniente el tomar material de los tubos para efectuar posteriores experiencias.

Cuadro N° 6.

acción de distintos cultivos de Esch coli sobre el medio SVM (modificado) en distintos tiempos de cultivo.

Cultivo	SVM modificado														SVM común 48 h	
	Material tomado de AG							Material tomado de ALT							AG	ALT
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h		
Coli 1	0	0	a	a	a	a	A	0	A	A	A	A	A	A	A	A
Coli 2	0	0	a	a	A	A	A	0	A	A	A	A	A	A	A	A
Coli 3	0	0	g	eg	aG	aG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 4	0	0	a	a	a	A	A	0	A	A	A	A	A	A	A	A
Coli 5	0	0	g	eg	AG	AG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 6	0	0	0	eg	AG	AG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 7	0	0	g	aG	AG	AG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 8	0	0	g	aG	AG	AG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 9	0	0	0	eg	AG	AG	AG	0	eg	aG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 10	0	0	0	a	a	A	A	0	A	A	A	A	A	A	A	A
Coli 11	0	0	eg	aG	AG	AG	AG	0	eg	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 12	0	0	0	0	eg	AG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 13	0	0	eg	aG	AG	AG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 15	0	0	0	eg	AG	AG	AG	0	a	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 16	0	0	g	aG	AG	AG	AG	0	0	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 17	0	0	0	eg	AG	AG	AG	0	0	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 20	0	0	eg	AG	AG	AG	AG	0	0	eg	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 21	0	0	0	aG	aG	AG	AG	0	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
Coli 22	0	0	a	a	a	a	A	0	a	a	A	A	A	A	A	A

Referencias

0: No alteración; a: poca producción de ácido; A: gran producción de ácido; g: pequeña producción de gas; G: abundante producción de gas; AG: agar común; ALT: agar lactosa tornasol; U: hidrólisis de ureas

Cuadro N° 8

Acción de distintos cultivos del grupo Ballerup sobre el medio SVM
(modificado) en distintos tiempos de incubación.

Cultivo	SVM modificado																								SVM común		
	Material toma- do de AC								Material toma- do de ALT								Material toma- do de SS								AC	ALT	SS
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h	48 h	48 h	48 h			
Ball. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-		
Ball. 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	a	a	a	0	0	0	0	0	0	0	0	a	a	a		
Ball. 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 12	0	0	0	0	0	0	A	a	A	A	A	A	A	A	0	0	0	0	a	a	a	a	A	A	A		
Ball. 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 15	0	0	0	0	0	a	A	a	A	A	A	A	A	A	a	a	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
Ball. 16	0	0	0	0	0	a	A	0	a	A	A	A	A	A	0	0	0	0	0	A	A	A	A	A	A		
Ball. 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A	A	A	0	0	0	0	a	a	a	a	A	A	A		
Ball. 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ball. 20	0	0	0	0	0	0	0	a	A	A	A	A	A	A	0	0	0	0	0	A	A	A	A	A	A		
Ball. 20	0	0	0	0	0	0	A	0	A	A	A	A	A	A	0	0	0	A	A	A	A	A	A	A	A		

Cuadro N° 9

Acción de distintos cultivos del grupo *Bethesda* sobre el medio SVM (modificado) a distintos tiempos de incubación.

Cultivo	SVM modificado																		SVM común				
	Material tomado de AC								Material tomado de ALT								Material tomado de SS		AC	ALT	SS		
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	24 h	48 h	48 h	48 h
Bet-Med 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet-Med 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet-Mich 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet-Na 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet-Mich II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet-Na 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beteconn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet-Med 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet-Ala 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bet.Na 14	0	0	0	0	0	a	A	0	0	a	a	a	a	A	0	0	0	a	a	a	A	A	A
Bet-Ind 6	0	0	0	0	0	a	A	0	a	a	A	A	A	A	0	a	A	A	A	A	A	A	A
Bet-Med 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro N° 10

Acción de distintos cultivos de salmonelas y shigelas sobre (modificado) en distintos tiempos de incubación.

Cultivo	SVM modificado																				
	Material tomado de AC							Material tomado de ALT							Material tomado de SS						
	1	2	3	4	5	6	24	1	2	3	4	5	6	24	1	2	3	4	5	6	24
<i>S. anatum</i> 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. anatum</i> 45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. anatum</i> 48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. anatum</i> 53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. flexnerii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. newport</i> 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. newport</i> 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. newport</i> 41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. newport</i> 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. typhimurium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. typhimurium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. typhimurium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. boydii</i> 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. flexnerii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. flexnerii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. flexnerii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. flexnerii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. sonnei</i> II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A D 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A D 06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A D 0 4	0	0	0	0	0	0	A	0	0	a	a	A	A	A	0	0	0	a	a	A	A

Cuadro N° 13

Resultados obtenidos con los medios 2 y 3 y distintos cultivos de Esch.
coli

Cultivo	Medio 2				Medio 3				Caldo triptone
	1h	1h	2h	24h	1h	2h	2h	24h	24h
Coli 1	0	+	+	+	0	0	+	+	+
Coli 2	0	+	+	+	0	+	+	+	+
Coli 3	0	+	+	+	0	+	+	+	+
Coli 4	0	0	+	+	0	0	+	+	+
Coli 5	0	+	+	+	0	0	+	+	+
Coli 6	0	+	+	+	0	0	+	+	+
Coli 7	0	+	+	+	0	0	+	+	+
Coli 8	0	+	+	+	0	0	+	+	+
Coli 9	0	0	+	+	0	0	+	+	+
Coli 10	0	0	+	+	0	0	+	+	+
Coli 11	0	+	+	+	0	+	+	+	+
Coli 12	0	0	+	+	0	0	+	+	+
Coli 13	0	+	+	+	0	+	+	+	+
Coli 15	0	+	+	+	0	0	+	+	+
Coli 16	0	0	+	+	0	0	+	+	+

Observación: En el transcurso del presente trabajo se usó siempre para determinar la presencia de indol el reactivo de Kovac cuya fórmula figura en el "apéndice"

Cuadro N° 14

Resultados obtenidos con los medios 2 y 3 y distintos cultivos de bacterias del género Shigella

Cultivo	Medio 2					Medio 3					Caldo triptona
	1h	2h	3h	4h	24h	1h	2h	3h	4h	24h	24h
<u>Sh. dysenteriae 1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. dysenteriae 2</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Sh. dysenteriae 3</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. dysenteriae 4</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. dysenteriae 5</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. boydii 1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. boydii 2</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. boydii 3</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. boydii 4</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. boydii 5</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. flexnerii 1a</u>	0	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+
<u>Sh. flexnerii 1b</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. flexnerii 2a</u>	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+
<u>Sh. flexnerii 2b</u>	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+
<u>Sh. flexnerii 3</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Sh. flexnerii 678</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. flexnerii 4</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Sh. sonnei</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

De la observación de los cuadros N° 12, 13 y 14 surge que el medio 2 es levemente mejor que el 1 y el 3 pues las reacciones son mas netas tardas el mismo tiempo. No se obtienen resultados falsos positivos con ninguno de ellos comparándolos con el método clásico del caldo de triptona. La presencia de l-triptofano acelera la producción de indol de tal forma que usando cantidades de 0,15 ml de medio en tubos de 5mm por 50mm el tiempo requerido para la investigación oscila entre unos minutos a 4 horas.

Para el ensayo de técnicas rápidas de investigación de hidrógeno sulfurado se ensayaron los medios cuya composición figura en el Cuadro N° 15

Cuadro N° 15

Composición de los medios de cultivo empleados en la investigación de hidrógeno sulfurado.

A	B	C	D
Sol. de triptona 2% pH: 6,8	Sol. de triptona 2% pH: 7,2-7,6	sol. de triptona 2% 0,01% de cistina pH: 6,8	sol. de trip. 2% 0,01% cistina pH: 7,2-7,6

Los medios que figuren en el Cuadro N° 15 fueron preparados teniendo como base el medio de Morse y Weaver (7) en cuya composición entraba la tippeptona la cuál fué reemplazada en nuestro caso por triptona.

Por ensayos previos de orientación se pudo comprobar que se tenían resultados más rápidos si se usaba 0,15 ml de medio en tubitos de 5 mm por 50 mm lo que se adoptó en todos los ensayos posteriores.

Además se ensayó siembra de dichos tubitos con material proveniente de un cultivo en caldo de 24h a 37°C y de colonias aisladas en agar nutritivo.

En todos los casos la presencia de hidrógeno sulfurado se detectó mediante un papelito impregnado de acetato de plomo y seco que se colocó entre la pared del tubo y el tapón de algodón.

En los Cuadros N° 16 y 17 figuran los resultados obtenidos.

Cuadro N° 16

Resultados obtenidos en la investigación de hidrógeno sulfurado median-
te cultivos en distintos medios sembrados a partir de colonias en agar
nutritivo.

	Medio A						Medio B						Medio C						Medio D						caldo trixtona
	$\frac{1}{2}$ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	$\frac{1}{2}$ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	$\frac{1}{2}$ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	$\frac{1}{2}$ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	24 h
<u>Arizona 44</u>	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Arizona 45</u>	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Arizona 1</u>	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
<u>Arizona 9</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
<u>Arizona 11</u>	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Arizona 15</u>	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Coli 1</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	0	+	0
<u>Coli 2</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0
<u>Coli 3</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0
<u>Coli 4</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0
<u>Coli 5</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0
<u>Coli 6</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0
<u>S. newport</u>	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>S. newport</u>	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>S. newport</u>	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>S. newport</u>	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>S. typhimur.</u>	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>S. typhimur.</u>	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Sh. dysent.</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. boydii</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. flexner.</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. flexner.</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. flexner.</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Sh. flexner.</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro N° 17

Resultados obtenidos en la investigación de hidrógeno sulfurado mediante cultivos en distintos medios sembrados a partir del caldo de 24 h a 37°C

Cultivo	Medio A						Medio B						Medio C						Medio D						Caldo triptona
	½ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	½ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	½ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	½ h	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h	24 h
<u>Arizona 44</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+
<u>Arizona 45</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+
<u>Arizona 1</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+
<u>Arizona 9</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+
<u>Arizona 11</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	+	+
<u>Arizona 15</u>	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+
<u>Coli 1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0
<u>Coli 2</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0
<u>Coli 3</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0
<u>Coli 4</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0
<u>Coli 5</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0
<u>Coli 6</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0

De los resultados expuestos se dedujo que los medios A y B permiten decidir sobre la producción de hidrógeno sulfurado dentro de las 3 horas con el hecho saliente de que el Esch. coli da hidrógeno sulfurado en 24 h.

Los medios enriquecidos con cistina acortan el tiempo de la determinación pero lo hacen tanto para las salmonelas como para el Esch. coli. El distinto pH parece no influir en la técnica. Por su parte se puede observar la influencia de la cantidad de material sembrado sobre la velocidad de producción a poco que se comparen los dos cuadros.

Con respecto a una probable diferenciación de las salmonelas y arizonas del Esch. coli se ensayó el agregado de glucosa en distintas concentraciones con el objeto de retardar la producción de hidrógeno sulfurado por parte de dicha especie. Los resultados fueron negativos.

Para evitar la confusión que introducen dichos microorganismos se seleccionó el medio B sacrificándose así la rapidez a la seguridad ya que actualmente en la bibliografía el Esch. coli es considerado hidrógeno sulfurado negativo.

Con el objeto de hacer más rápida la determinación de hidrógeno sulfurado e indol se procedió a ensayar medios que permitieran determinar dichas sustancias en el mismo cultivo. En el Cuadro N° 18 figura la concepción de dichos medios y en el Cuadro N° 19 los resultados obtenidos. En todos los casos se practicó la investigación en tubitos de 5 mm por 50 mm usando 0,15 ml de medio en cada uno.

Cuadro N° 18

Composición de los medios para la determinación conjunta del hidrógeno sulfurado y el indol.

medios		
1	2	3
Triptona 2% l-triptofano 0,03% pH: 7,4	Triptona 2% l-triptofano 0,03% S ₂ O ₃ Na ₂ 0,008% pH: 7,4	Triptona 2% S ₂ O ₃ Na ₂ 0,008% pH: 7,4

Del cuadro N° 19 surge que la presencia de S₂O₃Na₂ favorece la producción de SH₂ por parte de las bacterias de los grupos Salmonella y Arizona, no haciéndolo con el Esch. coli. El agregado de l-triptofano no interfiere en la producción de SH₂ ni afecta la velocidad de su producción. El S₂O₃Na₂ no interfiere ni en la formación ni en la velocidad de formación de indol. Se adoptó el medio 2 tomando como tiempo límite de las lecturas: 2 h. para el SH₂ y 4 h. para la investigación de indol. En estas condiciones los datos obtenidos fueron correlativos con los aportados por las técnicas clásicas.

Cuadro N° 19

Resultados obtenidos en la investigación de hidrógeno sulfurado e indol con tres medios de cultivo distintos.

Cultivo	Medio 1				Medio 2				Medio 3				Caldo triptona													
	SH ₂				Indol				SH ₂				Indol													
	1	2	4	†	1	2	4	†	1	2	4	†	1	2	4	24	24									
<u>Arizona 30</u>	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	+	-	-	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0
<u>Arizona 34</u>	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	-	-	-	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0
<u>Arizona 35</u>	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	+	+	-	-	-	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0
<u>Arizona 40</u>	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	-	-	-	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0
<u>Arizona 26</u>	0	0	+	+	0	0	0	0	0	+	+	+	-	-	-	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0
<u>Arizona 46</u>	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	-	-	-	0	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0
<u>Coli 9</u>	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Coli 10</u>	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Coli 11</u>	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Coli 12</u>	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Coli 13</u>	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Coli 14</u>	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Sh. dys. 1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0
<u>Sh. dys. 2</u>	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Sh. flex. 1a</u>	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Sh. flex. 3</u>	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Sh. flex. 4</u>	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	0	0	0	-	-	-	+	0	+
<u>Sh. sonnei</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0

C) Determinación de la capacidad fermentativa en medios sólidos

En el presente trabajo este método estará destinado a estudiar la capacidad fermentativa de colonias sospechosas en SVM (modificado). Dichos cultivos deben ser ensayados frente a glucosa, lactosa, sacarosa y manitol.

Para ello se adoptó el medio descrito por Spaur y Wynne (16) que se basa en el previamente indicado por Knox en 1949 (14). Con este medio se realizaron ensayos de ajuste de la técnica que dado el número alto de variables que intervenían se elevó a 14. El indicador rojo fenol usado por Spaur y Wynne (16) fué reemplazado por rojo neutro. Por no aportar datos de interés resumiremos en lo que sigue solamente la técnica adoptada y la forma de preparación del medio.

Este está constituido por:

extracto de carne	3 gr
Proteosa Peptona N° 3	10 gr
PO ₄ HK ₂	3 gr
ClNa	5 gr
rojo neutro (sol. 1%)	1,0 ml
Agua destilada	1000 ml
Desoxicolato de sodio (solución al 10%)	20 ml

pH: 7,6

La solución de desoxicolato se agrega al resto del medio una vez que este ha sido esterilizado y enfriado a 45°C. Por tal razón el pH del medio base se ajustó con HCl teniendo en cuenta la alcalinidad de la solución de desoxicolato de sodio.

La solución de desoxicolato de sodio se preparó a partir del ácido desoxicólico en concentración tal que dé una solución al 10% de sal de sodio. Se inició la neutralización empastando con una pequeña cantidad de solución saturada de UHNa, completando luego de die-

suelto el ácido, con agua destilada al volumen necesario. La solución resultante es fuertemente alcalina y para que resulte un medio final de pH: 7,6 el pH del medio base se ajustó para obtenerlo una vez agregado a él la solución de desoxicolato de sodio.

Para la preparación de las tiras de papel impregnadas de azúcar se empleó papel muy absorbente (tipo secante) de 1 mm de espesor que se cortó en trozos de 60 mm por 3 mm. Se los colocó en tubos de ensayo agregándoles hasta cubrirlos soluciones de los respectivos hidratos de carbono en solución acuosa al 50% (excepto para manitol que se usó en concentración de 35%). El conjunto se esterilizó en autoclave abierto durante $\frac{1}{2}$ h. Se decantó la solución excedente y los papeles se volcaron en una caja de petri estéril donde se los secó a 105°C durante $\frac{1}{2}$ h. o mas en caso necesario.

Con el medio base fundido, enfriado a 45-50°C, agregado de la solución de desoxicolato se prepararon sendas cajas de petri a razón de 15-20 ml por placa. Estando aún el medio fundido y mediante pinzas se colocaron en el medio los papeles impregnados de azúcares. Cada caja recibió 4 papeles con azúcares distintos. Una vez sólido el medio las cajas se secaron en estufa a 37°C durante $\frac{1}{2}$ hora.

La siembra de las placas así preparadas se efectuó mediante un ansa de material trazando una estria continua perpendicularmente a las tiras de papel. Sobre cada placa se sembraron siempre no mas de 4 cultivos distintos. Una vez sembrada la placa, mediante una pinza se colocó un cubre objeto esterilizado sobre la zona en que la estria de cultivo cruzaba la tira de papel impregnado en glucosa.

Las cajas así sembradas se incubaron a 37°C durante 16-24 horas. Al cabo de dicho tiempo se procedió a efectuar las lecturas.

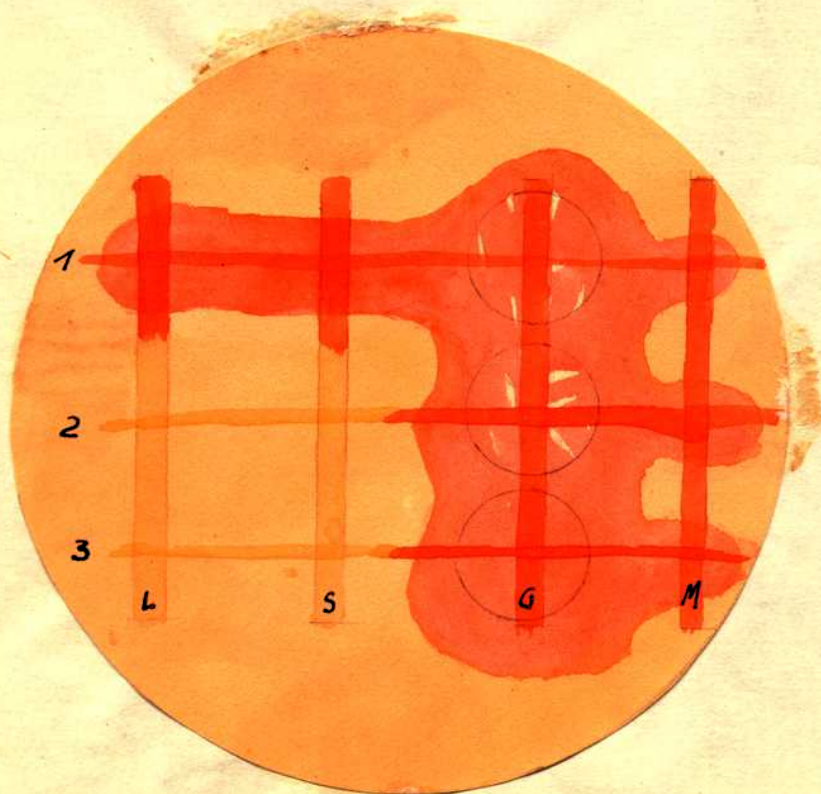
La producción de gas se observó por la presencia de burbujas dentro del agar (estrias) en la zona cubierta por los cubre objetos.

La fermentación del azúcar correspondiente vá tanto acompañada de un enrojecimiento del medio como de una precipitación del ácido desoxicólico insoluble liberado de su sal sódica por los ácidos originados en la fermentación.

Como en general en los casos en que no hay fermentación y aún en las zonas del agar en que no hay azúcar la bacteria aprovecha las proteínas del medio; ello trae como consecuencia una disminución de la acidez y la aparición de una tonalidad amarillenta del medio que hace más visible el viraje del indicador hacia el ácido y la precipitación del ácido desoxicólico en las zonas donde hay fermentación.

En la figura 1 se ha tratado de reproducir una placa con las distintas reacciones. Su lectura daría como resultado el siguiente:

	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Manitol
Cultivo 1 (<u>Esch. coli</u>)	AG	A	A	A
Cultivo 2 (<u>Salmonella</u> sp)	AG	O	O	A
Cultivo 3 (<u>Shigella</u> sp)	AQ	O	O	A



La zona roja aparece al mismo tiempo con aspecto turbio por la precipitación del ácido desoxicólico.

TENTATIVA DE SIMPLIFICACION DEL ANALISIS BACTERIOLOGICO
DE MATERIA FECAL MEDIANTE LA APLICACION DE TECNICAS RAPIDAS

De acuerdo a todo lo tratado hasta ahora sobre antecedentes, técnicas corrientes y estudio de técnicas rápidas de enterobacterias se planeó el siguiente esquema para el examen bacteriológico de muestras fecales:

Aislamiento directo: en agar SS. agar bismuto-sulfito, agar desoxicolato, agar verde brillante, agar Macconkey. (24-48 h.)

Enriquecimiento: en Kauffmann y en Selenito F. (24 y 72h.)

Siembra en medio selectivo SVM (modificado): (6 horas)

Fermentación en placa de sacarosa, lactosa, manita y glucosa: de las bacterias que no hayan alterado el medio SVM (modificado) (18-24 horas)

Ensayos rápidos de Indol y SH₂: tomando material de la placa de fermentación de azúcares. (4 horas)

Serología

Según el esquema, el tiempo total que demoraría el examen será de 52 a 154 horas, o sea aproximadamente de 2 a 6½ días. Recordemos que la técnica seguida en O. S. N. demora entre 5 y 8 días. El tiempo ha sido reducido sensiblemente y se ha conservado la exactitud del método, al mismo tiempo que se ha ganado enormemente en comodidad al determinar en una sola placa 16 reacciones (4 cultivos sobre 4 azúcares), que en las técnicas comunes requieren 16 tubos. El desarrollo en la placa de fermentación permite efectuar los ensayos de indol y SH₂ así como también el estudio serológico, evitando el inocular un tubo de agar nutritivo para estos fines. Los detalles de cada una de las fases del proceso aparecen debidamente documentados en los capítulos anteriores, del mismo modo que la preparación de los distintos medios empleados.

La aplicación de la técnica en forma completa ha sido efectuada sobre diversas muestras y los resultados obtenidos son co-

Cuadro N° 20

Procedencia y número de muestras examinadas.

Origen	Número
Líquido cloacal de Buenos Aires	29
Líquido cloacal de Tucumán	9
Materia fecal	1
Otras	7

Cuadro N° 21

Eficacia del medio SVM (modificado) sobre un total de 2311 colonias sembradas.

Colonias eliminadas por no resultar sospechosas:	75,25 %	Eliminadas por hidrolizar urea:	75,16 %
Colonias sospechosas en el medio SVM. (modificado)	24,75 %	Eliminadas por acidificar con ó sin gas:	0,09 %
		No confirmadas por serología:	17,25 %
		Salmonelas:	17,5 %

Cuadro N° 22

Eficacia de las técnicas rápidas de determinación de indol, hidrógeno sulfurado y fermentación aplicados a 372 colonias.

Colonias sospechosas por sus propiedades bioquímicas de ser salmonelas	30,8 %	Confirmadas serologicamente:	30,3 %
		No confirmadas:	0,5 %

Cuadro N° 23

Eficacia de los medios de enriquecimiento.

	Medios		
	Kauffmann		Selenito F
	24 h.	72 h.	24 h.
Salmonelas aisladas	58	44	10
Salmonelas aisladas %	51,8	39,3	24,4
Muestras positivas	19	12	4
Muestras positivas %	100	63,1	25
Muestras positivas solo en:	6	0	0

Observación: el enriquecimiento en Selenito F se utilizó solamente en 16 de las muestras por lo que los porcentajes están tomados respecto de dicha cantidad y de las salmonelas aisladas en las mismas (41)

Cuadro N° 24

Eficacia de los medios de aislamiento sobre un total de 112 salmonelas aisladas de 19 muestras positivas.

Medios sólidos y sus combinaciones.	Muestras positivas		Muestras positivas solo en		Cultivos aislados	
	N°	%	N°	%	N°	%
SS	17	89,5	5	26,3	61	54,5
VB	11	57,9	1	0,05	38	31,2
WB	11	57,9	0	0	16	14,3
SS-VB	19	100	8	42,1	96	85,7
SS-WB	18	94,8	7	36,8	77	68,5
VB-WB	14	73,7	1	5,3	51	45,5
SS-VB-WB	19	100	19	100	112	100

DISCUSION

En el capítulo anterior se han mencionado los resultados obtenidos en los distintos ensayos efectuados. De ello ha surgido que mediante una modificación conveniente del medio SVM, este ha podido ser adaptado a la escala microtécnica de modo tal que aportó resultados definitivos dentro de las 6 horas de incubación a 37°C. Su aplicación práctica posterior a muestras de diversas procedencias ha permitido eliminar el 75 % de las colonias sembradas (Cuadro N° 21) lo que coincide con los resultados obtenidos por Peso, Leiguarda y Kempny (24) mediante el medio SVM aplicado al examen de muestras de agua del Rio de la Plata.

Del restante 25 %, solo el 7 % correspondió a salmonelas lo que da un valor algo mas bajo al obtenido por los autores nombrados (11 %). Debe indicarse que esta diferencia afecta poco al medio ya que indicaría un mayor número de falsos positivos y de ninguna forma falsos negativos.

Por lo que respecta a las técnicas de determinación de indol e hidrógeno sulfurado se llegó también a un medio que permitió identificar la producción de dichas sustancias a tiempos tan cortos como de 4 y 2 horas respectivamente. Dicho medio aportó siempre resultados ciertos y que encuadran netamente dentro de las propiedades bioquímicas de los microorganismos ensayados. Al respecto debemos decir que el Esch. coli fué capaz de producir hidrógeno sulfurado a partir de medios ricos en cistina. Esta propiedad indicaría la presencia, dentro de su equipo enzimático, de una enzima capaz de hidrolizar la cistina produciendo hidrógeno sulfurado. Esta propiedad creemos debe figurar como característica bioquímica.

De la aplicación de estas técnicas a colonias sospechosas en SVM (modificado) no resultó ningún dato falso positivo o negativo. (Cuadro N° 22)

Finalmente debemos referirnos a la determinación de la capacidad fermentativa efectuada en medio sólido.

El medio y la técnica logrados permitió sugerir un método barato, rápido y seguro para el estudio de dichas propiedades. El cuadro N° 22 permite ver que no ha dado resultados falsos cuando se lo aplicó a 379 colonias sospechosas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) Se ha estudiado la modificación del medio selectivo SVM con el objeto de adaptarlo a una técnica rápida. Se menciona el medio obtenido y los resultados de su aplicación a distintos cultivos puros de enterobacterias patógenas más comunes.

2) Se estudió y obtuvo un medio para la determinación rápida de indol e hidrógeno sulfurado. Se mencionan los resultados logrados al ser aplicados a diversos cultivos puros.

3) Se han fijado las condiciones, el medio y la técnica de trabajo para determinar el poder fermentativo sobre medio sólido en caja de petri. Se da cuenta de los resultados obtenidos.

4) Se ha aplicado los medios y técnicas estudiadas a la investigación de salmonelas en muestras de diversos origen. Se establece la eficacia de cada uno de ellos en la aplicación práctica.

A) Medios de cultivo líquidos.

I) Medio de Keuffmann Mueller

- | | |
|---|----|
| Caldo peptonado común estéril | a) |
| Carbonato de calcio estéril | b) |
| Solución de tiosulfato de sodio estéril | c) |
| Solución iodo-iodurada | d) |
| Solución de bilis de buey estéril | e) |
| Solución de verde brillante | f) |

a) Caldo peptonado común estéril

- | | |
|-------------------|---------|
| Extracto de carne | 3 gr |
| Peptona | 5 gr |
| Agua destilada | 1000 ml |

Calentar los ingredientes hasta disolución total. Ajustar el pH a 6,9 (azul de bromotimol). Calentar a ebullición, enfriar, llevar a volumen inicial, filtrar por papel de filtro y esterilizar en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

b) Carbonato de calcio estéril

Se pesa el carbonato de calcio en un erlenmeyer de 1000 ml y se esterilizan en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

c) Solución de tiosulfato de sodio estéril

- | | |
|----------------------------------|--------|
| Tiosulfato de sodio cristalizado | 50 gr |
| Agua destilada | 100 ml |

Se disuelve la sal en agua y se esteriliza en autoclave, 120°C durante 15 minutos.

d) Solución iodo-iodurada.

- | | |
|-------------------|--------|
| Iodo resublimado | 20 gr |
| Ioduro de potasio | 25 gr |
| Agua destilada | 100 ml |

Se disuelven las sustancias en agua sin esterilizar.

e) Solución de bilis de buey estéril.

Bilis de buey	10 gr
Agua destilada	100 ml

Se disuelve la Bilis en el agua y se esteriliza en autoclave, 120°C durante 15 minutos.

f) Solución de verde brillante

Verde brillante D Egl	0,5 gr
Agua destilada	100 ml

Disolver el colorante en el agua y guardar tal cual.

Medio final: se indicará la fórmula del medio de Kauffman de simple concentración para el de doble concentración duplicar las cantidades para la misma de caldo.

Caldo peptonado común estéril	a) 900 ml
Carbonato de calcio estéril	b) 90 gr
Bilis de buey estéril	c) 100 ml
Solución de verde brillante	f) 19,5 ml

Se mezcla cada uno de los componentes ya esterilizados por separado. En el caso de desearse preparar el medio de doble concentración, la cantidad de caldo peptonado permanece la misma pero en vez de ser de caldo común es de caldo de doble concentración, para lo cual se preparará con doble cantidad de componentes la fórmula a).

El medio así preparado se mantiene en heladera hasta el momento del uso; se conserva bien durante largo tiempo y el único inconveniente que puede surgir es que se concentre por evaporación. En el momento de uso, se le agrega a la cantidad a usar, el tiosulfato de sodio en solución c) y la solución iodo-iodurada d). Las cantidades a agregar de cada una figuran en la tabla siguiente:

Volumen de medio base(Sol): 100 ml; solución c): 9,5 ml; solución d): 183

Para volúmenes intermedios se hace el cálculo correspondiente teniendo en cuenta las cantidades de la tabla anterior.

II) Medio "F" al selenito

Peptona	5 gr
Lactosa	4 gr
Fosfato monosódico	10 gr
Fosfato disódico	
Selenito ácido de sodio anhidro	4 gr
Agua destilada	1000 ml

Disolver la peptona y los fosfatos en 600 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave (121°C durante 15 minutos). Disolver la lactosa y el selenito ácido de sodio en dos sendas porciones de 200 ml de agua destilada y esterilizar la primera solución por filtración (Seitz) o en su defecto por calentamiento durante 30 minutos en autoclave abierto a 100°C.

Una vez todo estéril y enfriado a unos 40°C, mezclar las tres soluciones y envasar en tubos en porciones de 10 ml, tapar con algodón y poner en autoclave abierto a 100°C durante 30 minutos.

Es conveniente para cada lote de peptona, fosfatos y selenito ácido ensayar y determinar prácticamente la cantidad de cada uno de los fosfatos que se debe de agregar para que el medio final tenga un pH 7,0.

III) Medio SVM (fórmula de Surraco y Pereyra modificada por Monteverde).

Peptona	20 gr
Urea	10 gr
Lactosa	15 gr
Sacarosa	15 gr
Indicador de Andrade	10 ml
Solución de azul de timol	3 ml
Agua destilada	1000 ml

a) Indicador de Andrade.

Fucsina ácida	0,50 gr
Agua destilada	100ml

Disolver la fucsina en el agua destilada y una vez logrado ello agregarle OHNa N en cantidad variable, que depende de la clase de fucsina empleada y que puede oscilar entre 16 y 21 ml. La cantidad a agregar que se fija en un ensayo previo con cada partida de fucsina debe ser tal que al cabo de una noche en reposo la solución tenga un color amarillo claro.

Una vez agregado el OHNa se deja en reposo una noche y se filtra si es necesario quedando lista para el uso.

b) Solución de azul de timol.

Azul de timol	1,6 gr
OHNa 0,1 N	34 gr
Agua destilada	100 ml

Disolver el colorante en el OHNa 0,1 N y luego diluir la solución con el agua destilada.

Medio final: disolver la peptona en 750 ml de agua destilada ajustar el pH a 7,07,2 filtrar se es necesario, agregar las soluciones indicadoras y esterilizar en autoclave a 120°C durante 15 minutos; la urea en 125 ml y los azúcares en otros 125 ml de agua destilada, esterilizar estos últimos por filtración y la urea en autoclave. Una vez todo estéril mezclar con cuidado para evitar contaminaciones y envasar en tubos provistos de campanita de Durham previamente esterilizados, que se colocan una vez llenos en autoclave abierto durante 30 minutos, al cabo de los cuales se los retira y deja enfriar lentamente a temperatura ambiente.

IV) Caldo nutritivo

Ver medio I) solución a)

V) Caldo triptona

Triptona	10 gr
ClNa	5 gr
Agua destilada	1000 ml

Calentar hasta disolver, filtrar en caliente y ajustar el pH a 7,0 en frío. Distribuir en tubos y esterilizar a 120°C durante 20'

B) Medios de cultivo sólidos.

I) Medio de Kristensen-Lester y Jurgens. Agar verde brillante (modificado por Hormaeche).

Extracto de carne	5 gr
Peptona	5 gr
ClNa	5 gr
Sacarosa (uso bacteriológico)	10 gr
Lactosa (Uso bacteriológico)	10 gr
Solución de rojo fenol a)	40 ml
Agar	25 gr
Agua destilada	1000 ml

a) Solución de rojo fenol

Hidróxido de sodio 0,1 N	40 ml
rojo fenol	1 gr
Agua destilada	460 ml

Para la preparación del medio se disuelven todas las sustancias con excepción de la sacarosa y la lactosa. Se funden en autoclave abierto, se ajusta el pH a 7,0-7,2 se filtra y se esteriliza en autoclave (121°C durante 15 minutos). Al medio, recién fundido y aún caliente se le agregan los azúcares en solución esterilizada ya sea por filtración o por tyndalización. A cada litro de medio se le agregan 2,5 ml de solución acuosa de verde brillante (DBgl) al 0,5%, se agita bien, se reparte en erlenmeyers estériles y se guarda en la cámara fría. A medida que se necesite se funde el contenido y se distribuye en cajas de petri estériles que se usan previa solidificación y se cede en estufa de 55°C durante 20 minutos.

II) Agar SS. (fórmula del Laboratorio Difco).

Extracto de carne	5 gr
Proteosa-peptona	5 gr
Lactosa	10 gr
Sales biliares N° 3	8,5 gr
Citrato de sodio	8,5 gr.

Citrato de hierro	1,0 gr
Agar	17 gr
Rojo neutro	0,025 gr
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes, excepto el colorante, en autoclave abierto; una vez todo disuelto, ajustar a pH 7,0-7,1 agregarle el rojo neutro y esterilizar una vez envasado en porciones de 200 ml a 120°C durante 15 minutos.

III) Agar Mc Conkey. (Método F. IV.j de los Métodos de análisis de O. S. N.)

Taurocolato de sodio comercial	5 gr
Peptona	20 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Agar	20 gr
Agua destilada l	1000 ml

Calentar en autoclave abierto hasta disolución de todos los componentes, enfriar a 50°C y ajustar el pH a 7,6-7,8 usando como indicador el rojo fenol. Agregar luego una clara de huevo por cada tres litros de medio, llevar al autoclave a 115°C durante 15 minutos. filtrar en caliente y ajustar la reacción nuevamente a pH 7,3 a 50°C e a pH 7,5 a la temperatura ambiente. Agregar 10 gr de lactosa y 10 ml de solución acuosa de rojo neutro al 1 %. Mezclar y distribuir en erlenmeyers y esterilizar en autoclave (115°C durante 15 minutos). Guardar en cámara fría hasta el momento del uso. Se funde entonces el contenido de un erlenmeyer y se vierte en sendas cajas de petri estériles. Dichas cajas podrán ser usadas luego de solidificadas y secadas durante 1 hora en estufa de 45°C

IV) Agar bismuto-sulfito de Wilson y Blair.

(Fórmula propuesta por el Dr. L. Verna)

a) Agar base

Beato peptona	10 gr
Extracto de carne	5 gr.

Cloruro de sodio	5 gr
Agar	40 gr
Agua destilada	1000 ml

Calentar a vapor lento, hasta disolución, ajustar el pH a 7,0, filtrar, envasar en porciones de 100 ml y esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

b) Solución de citrato de bismuto.

Suspender 30 gr de citrato de bismuto en 25 ml de agua destilada y agregarle gota a gota y agitando, 10-12 ml de solución de amoníaco d: 0,893 (o su equivalente d:0,91). Llevar a 250 ml con agua destilada.

c) Mezcla de bismuto-sulfito-glucosa-fosfato

A 250 ml de solución de citrato de bismuto b), agregarle 39,6 gr de sulfito de sodio anhidro disueltos en 500 ml de agua destilada. Hervir y agregar entonces 100 gr de $PO_4HNa_2 \cdot 12H_2O$. Enfriar la mezcla y agregarle solución fría de glucosa. Esta solución se obtendrá disolviendo 50 gr de glucosa en 250 ml de agua destilada hirviendo. La mezcla total se mantiene bien durante unos meses.

d) Mezcla de citrato férrico y verde brillante.

Se prepara mezclando las dos soluciones siguientes y en las cantidades indicadas:

Solución 1% de citrato de hierro (acuosa) 200 ml

Solución 1% de verde brillante (acuosa) 25 ml

Medio final: En el momento del uso se funde el contenido de un metracito con 100 ml de agar base y se le agregan las cantidades que se indican de soluciones c) y d); se mezcla y vierte en cajas de petri estériles.

Agar base fundido y enfriado a 60°C 100 ml

Solución c) 20 ml

Solución d) 4,5 ml

Secar las placas una vez solidificadas durante 30 minutos a 37°C

p-aminostil-benzaldehyde	5 gr
Alcohol amlic	75 ml
HCl concentrate	25 ml

HELIOGRAFIA

- (1) Cook, G. T. : Urease and other biochemical reactions of the Proteus group. J. Path. Bact., 60: 171-181, (1948)
- (2) Arnold, W. M., Jun. & Weaver, R. H. Quick microtechniques for the identification of cultures. I. Indole production. J. Lab. Clin. Med. 33, 1334, (1948)
- (3) Elek, S. D. Rapid identification of Proteus. J. Path. Bact. 60 183, (1948)
- (4) Hannan, J. & Weaver, R. H. Quick microtechnics for identification of cultures. II. Fermentations J. Lab. Clin. Med. 33, 1388. (1948).
- (5) Brough, F. K. A rapid microtechnique for the determination of nitrate reduction by micro-organisms. J. Bact. 60, 365. (1950)
- (6) Galton, M. M. , Hardy, A. V. & Mitchell, R. B. The public health laboratory diagnosis of enteric infections. Amr. J. Trop. Med. 30, 77. (1950)
- (7) Morse, M. L. & Weaver, R. H. Rapid microtechnics for identification of cultures. III. Hydrogen sulfide production. Amer. J. Clin. Path. 20, 481. (1950)
- (8) Baehmann, E. & Weaver, R. H. Rapid microtechnics for identification of cultures. V. Reduction of nitrates to nitrites. Amer. J. Clin. Path. 21, 195. (1951)
- (9) Fabrizio, A. & Weaver, R. H. Rapid microtechnics for identification of cultures. IV. Acetylmethylcarbinol production. Amer. J. Clin. Path. 21, 192. (1951)
- (10) Hargrove, R. E. & Weaver, R. H. Rapid microtechnics for identification of cultures. VI. Citrate utilization. Amer. J. Clin. Path. 21, 286. (1951)

- (11) Clarke, P. H. and Cowan S. T. Biochemical methods for bacteriology. *Journal of General Microbiology*, 6, 187-197. (1952)
- (12) Bergey David H. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. (1948)
- (13) Henick T. *Molds, Yeast and Actinomycetes*.
- (14) Knox R. A screening plate for the rapid identification of faecal organisms. *J. Path. Bact.*, 61; 343-351, (1949)
- (15) Cook, G. T. and R. Knox. Bacteriological examination of faeces *J. Path. Bact.*, 61: 353-358. (1949)
- (16) Spaur, C. L., and E. S. Wynne. A plate method for determining fermentation patterns of enteric bacteria. *Texas Rep. Biol. and Med.*, 9: 353-355. (1951)
- (17) Cook, G. T. Urease and other biochemical reactions of the Proteus group. *J. Path. Bact.*, 60: 171-181. (1948)
- (18) Obras Sanitarias de la Nación. Dirección Principal de Laboratorios Centro Nacional de Salmonelas. Instrucciones para el Aislamiento de bacterias Entericas.
- (19) Ver (18)
- (20) Russell, F. F. The Isolation of Typhoid Bacilli from Urine and Feces with Description of a New Double Sugar Tube Medium. *J. Med. Research* 20: 217- (1911)
- (21) Kligler, I. J. Modifications of Culture Media Used in the isolation and differentiation of Typhoid, Dysentery, and Allied Bacilli. *J. Exper. Med.* 28- 319. (1918)
- (22) Hajna, A. A. Triple-sugar Iron Agar medium for the Identification of the intestinal Group of Bacteria. *J. Bact.* 49:516, (1945)
- (23) Mac Cready, R. A., M.D., y Holmes M. B. A Time-Saving method for the identification of the Enteric Pathogens. *Amre. J. of Public Health*. 43, 3. (1953)
- (24) Pese O. A., Leiguarda. R. H. Investigación de Bacterias patógenas en el Río de la Plata. 131: 101. (1949) *Rev. de O. S. N.*

INDICE CONTENIDA

	Pag.
ANTECEDENTES	1
1) Generalidades	1
2) Medios empleados en la investigación de Entero bacterias patógenas	4
3) Técnicas corrientes de aislamiento y estudio de Entero bacterias patógenas	9
PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS OBTENIDOS	15
A) Adaptación del medio SVM a escala microquímica	15
B) Ensayos de técnicas rápidas de investigación de indol y sulfhídrico	25
C) Determinación de la capacidad fermentativa en medios sólidos	33
TENTATIVA DE SIMPLIFICACION DEL ANALISIS BACTERIOLOGICO DE MATERIA FECAL MEDIANTE LA APLICACION DE TECNICAS RAPIDAS.	36
DISCUSION	39
RESUMEN Y CONCLUSIONES	41
APENDICE	42
BIBLIOGRAFIA	50

-----0-----

M. F. F. F.
[Signature]