

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

clasif.
040.54
M188t
1980
c.1

Título:

TIPIFICACION SEROLOGICA DE CEPAS DE
SALMONELLA SP. AISLADAS EN LA
CD. DE MONTERREY Y AREAS
CIRCUNVECINAS.

▽ REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION
FINAL QUE PRESENTA

Autor: PATRICIA ELENA MAGAÑA AGUILAR

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD EN
ANALISIS CLINICOS

folio 801262
MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1980

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

A mi esposo: Juan Jesus Velarde Sánchez
por su confianza, comprensión y cariño.

A mis padres: Jorge E. Magaña Tirado
María Engracia A. de Magaña
por su amor, apoyo y enseñanzas.

A mis hermanos: María Engracia
Jorge
Germán Estanislao
Lorena Alicia
Eduardo Marcelino
por sus consejos y alegrías.

A mis maestros, compañeras y amigas.

A mi asesora: LQAC. Ma. Begoña del Carmen Cartagena P.
con admiración y cariño, por toda su ayuda brindada para
la realización de este trabajo y durante toda mi carrera.

Agradezco la valiosa ayuda que me brindaron:

Laboratorio de Analisis Clínicos de Servicio
Social Labastida-UDEM.

Departamento de Microbiología de la Facultad
de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Hospital de Ginecoobstericia del Seguro Social.

Hospital Infantil.

A mis compañeras Adriana Benavides de la Garza,
Idalia Martínez Cadena y Aurora Martínez Garza.

INDICE

	<u>Página</u>
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	11
Resultados.....	22
Discusión y Conclusiones.....	30
Resumen.....	35
Bibliografía.....	36

INTRODUCCION

Fue William Budd en 1856, quien describió la naturaleza infecciosa de la fiebre tifoidea. El primer miembro del grupo Salmonella, reconocido como patógeno al hombre fue Salmonella typhi, que fue observada por Eberth en 1880 y aislada por Gaffky en 1884. Un año después (1885), Salmon y Smith aislaron S. choleraesuis; más tarde Gaertner aisló S. enteritidis y Loeffler en 1892 aisló S. typhimurium; Schottmüller diferenció los bacilos de S. paratyphi A y S. paratyphi B en 1900; Rettger y Harvey aislaron S. pullorum en 1908. (6,12,13,15,16).

El grupo Salmonella, se encuentra dentro del reino procariota, ya que no tienen núcleo verdadero, llamado así, por no presentar la membrana nuclear, por lo cual su material hereditario cromosómico, se encuentra dentro de una sola molécula de DNA desnudo. Según la clasificación del manual bacteriológico de Bergey, se encuentran en:

Parte 8: Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos.

Familia I: Enterobacteriaceae.

Género IV: Salmonella.

Su forma es bacilar, mide de 1 a 3 micras de longitud por 0.6 micras de ancho, se presentan solas o en pares, son móviles por flagelos peritricos a excepción de S. pullorum y S. gallinarum, que son inmóviles. Son aerobios o anaerobios facultativos, su división es en un solo plano, se tiñen fácilmente con los colorantes ordinarios como: azul de metileno y fenol fuschina, al gram son gram negativos. Su temperatura favorable de crecimiento es de 37°C, el pH óptimo varía entre 6.8 a 7.6.

Están compuestos en un 75% de agua y el 25% restante de materiales orgánicos e inorgánicos. Los minerales inorgánicos como: sodio, potasio, magnesio, calcio, fierro, zinc, fósforo y azufre, tienen su mayor concentración en la pared celular; los materiales orgánicos se encargan de formar las diferentes macromoléculas o polímeros que forman a la pared celular y otras estructuras internas de estas bacterias.(11).

Su pared celular está formada por dos azúcares: N acetilglucosamina y ácido N acetilmurámico; aminoácidos como: L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico y/o lisina o ácido diaminopimélico; a la unión de estos compuestos se les llama glucopéptidos, éstos se unen transversalmente formando la estructura tridimensional de la pared celular; Wolfgang Weil, bioquímico alemán, describió a esta estructura repetitiva como: " macromolécula con forma de saco ". (6). Esta estructura se encuentra entre la membrana celular y la capa externa.(11).

La capa externa tiene una doble envoltura de fosfolípidos y es poco permeable a pequeñas moléculas con o sin carga.

La membrana celular está formada principalmente por lípidos y proteínas, éstos representan aproximadamente el 10% del peso de la bacteria. Se ha visto que también contiene carbohidratos, RNA y DNA. El principal lípido encontrado es el fosfolidiletanolamina y otros que incluyen ácidos grasos libres y glicolípidos, en donde la glicina es encontrada más frecuentemente. Esta estructura tiene como funciones

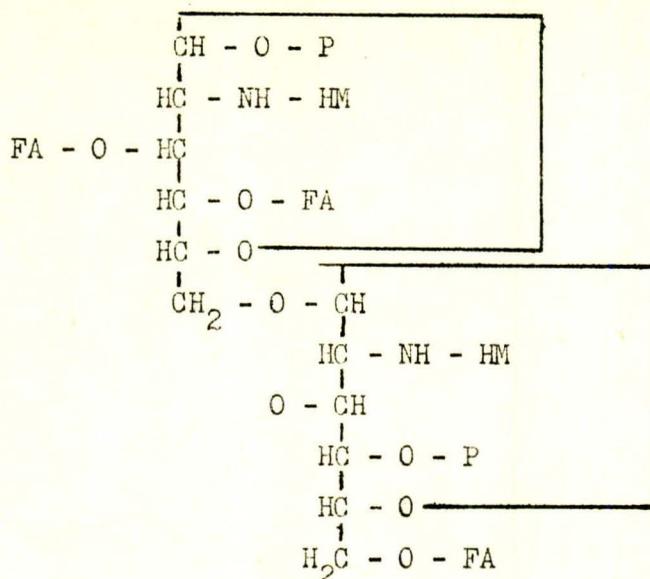
actuar como barrera semipermeable, en el transporte de macromoléculas y micromoléculas, en la producción de energía, en el transporte de electrones y es en este sitio donde se localiza la enzima que posiblemente intervenga en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. (3,4,6,11,14,16).

Los flagelos, descubiertos en 1955 por Duguid y cols., se encuentran fijados debajo de la membrana celular, es un organelo llamado gránulo basal; disposición que fue demostrada por Houwink y Van Iterson en 1950. Estos están compuestos por unidades proteínicas del grupo queratina-miosina-epidermina-fibrinógeno, llamadas flagelina, que se encuentran formando una estructura cilíndrica hueca; ésta estructura consta de una cadena de polipéptidos plegados en configuración alfa y otra con configuración beta, ambas se enlazan entre si dándole su movimiento rítmico. Cuando los flagelos se encuentran aplanados, muestran una longitud constante entre dos curvas adyacentes, a lo que se le nombra longitud de onda que es una constante típica de cada especie, esta constante fue utilizada por Leifson para clasificar a los bacilos móviles. Presentan gran resistencia a la congelación, a ciertos agentes químicos como: verde brillante, tetratoato sódico y deoxicolato sódico; pueden permanecer vivas en los medios de cultivo durante meses o años, si se les proporciona humedad. (3,4,6,11,12,14,16).

No forma exotoxinas, pero el complejo polisacárido-polipéptido-lípido, que posee en su pared celular actúa como endotoxina. Este lipopolisacárido está compuesto por tres estructura: un complejo lípido llamado lípido A, un polisacárido, que se encuentra unido al lípido A y una serie de unidades repetitivas terminales o cadena específica "O".

La porción del lípido A, está formado por una cadena de unidades de glucosamindisacárido, unidas por puentes de pirofosfatos; a estos puentes de pirofosfatos se les unen cadenas largas de ácidos grasos

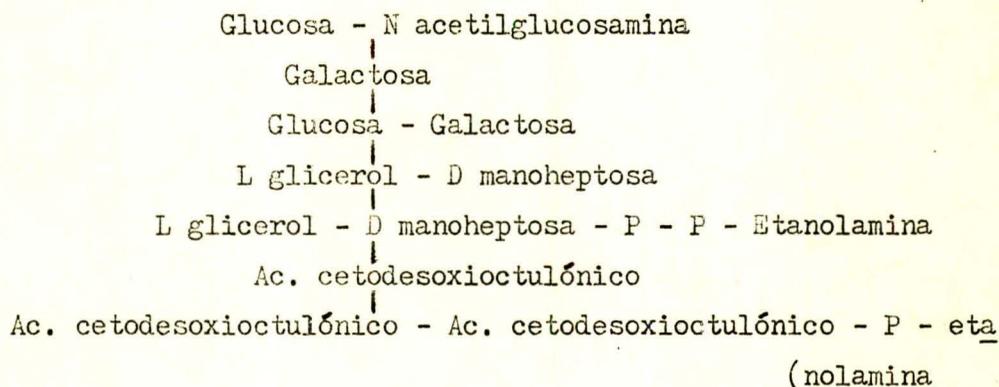
que varían según la especie; el ácido beta-hidroximirístico de 14 carbonos, siempre se encuentra presente. Su estructura es la siguiente:



FA - cadenas largas de ácidos grasos

HM - ácido beta-hidroximirístico

El centro del polisacárido es igual en todas las especies y está formado por:



El ácido cetodesoxioctulónico, se encuentra unido mediante enlace covalente al lípido A. Hay algunas heptosas que poseen fosfatidil-etanol-amida, actuando así como cofactores para la incorporación de azúcares en el núcleo de este polisacárido. Además las cadenas laterales de azúcares se encuentran unidas a las unidades repetitivas terminales

o cadena específica "O".

La cadena específica "O" consta de unidades repetitivas de manosa, galactosa, ramnosa y en algunas especies la galactosa o manosa poseen cadenas laterales de glucosa o abecuesa. La unidades repetitiva en S. enteritidis ser. typhimurium consta de los siguientes azúcares: abecuesa, manosa, ramnosa y galactosa; la de S. enteritidis ser. newington es: manosa, galactosa, ramnosa; la de S. typhi es: galactosa, manosa y ramnosa.

Se ha encontrado una substancia tóxica llamada Q, pero aún no ha sido elucidada su estructura ni su función. (4,6,12,14).

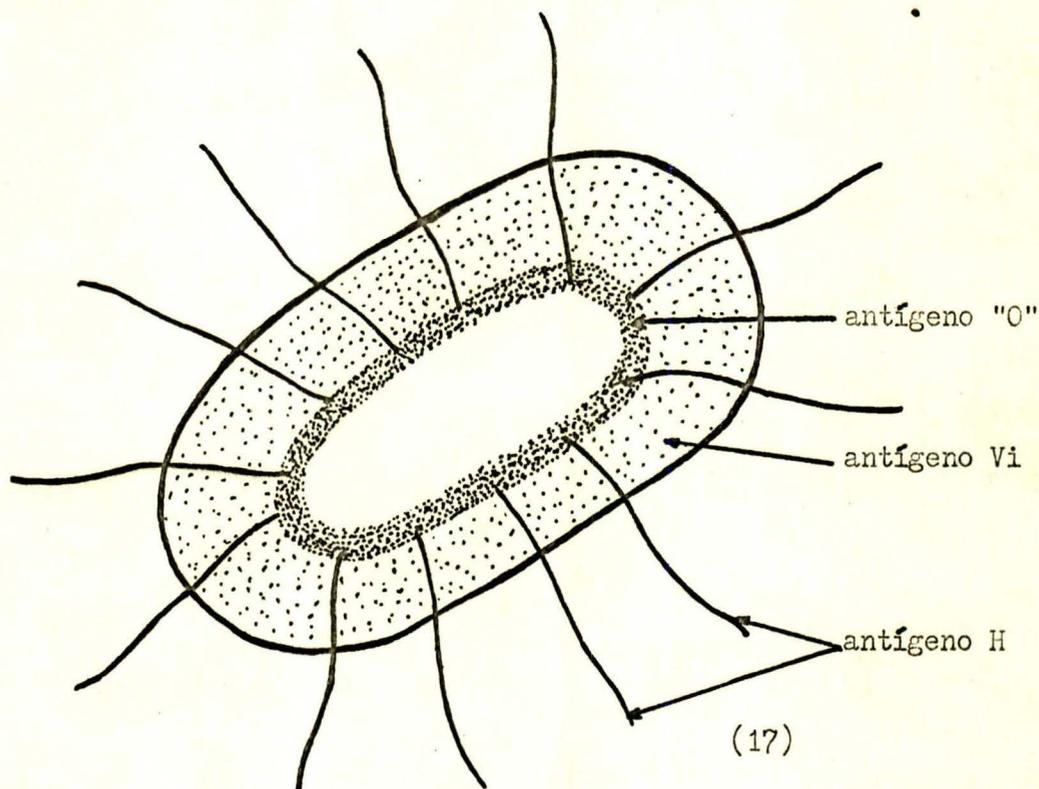
Los bacilos del grupo Salmonella, poseen tres antígenos, a excepción de S. pullorum y S. gallinarium, que son inmóviles por lo tanto, no poseen el antígeno flagelar. Fueron Smith y Reagh, en 1903, quienes descubrieron los antígenos somáticos y flagelares, más tarde Weil-Félix los llamaron antígeno "O" y antígeno H. (3,5,6,11)

El polisacárido que se encuentra en la superficie, representa el antígeno somático o antígeno "O", el cual es monofásico y cuya especificidad antigénica es dada por las unidades repetitivas terminales que se encuentran en la superficie celular, estimulando así la formación de anticuerpos aglutinables, precipitantes y protectores; pero de actividades antitóxica baja. La mayor parte de los miembros de Salmonella, contienen dos o más antígenos somáticos específicos.

El antígeno Vi, es un polisacárido simple, compuesto por unidades repetitivas de ácido N-acetilgalactosaminurónico, unidas mediante enlaces 1-4; sus grupos ácidos hacen que la superficie celular tenga una intensa carga negativa, proporcionándole al bacilo una resistencia hacia la digestión después de la fagocitosis, pudiendo vivir y reproducirse intracelularmente en los macrófagos y otras células fagocitarias. Su peso molecular es 1.7×10^6 . Este antígeno frecuentemente

interfiere con las aglutininas anti-"O". Es destruido por calentamiento durante una hora a 60 °C, por los ácidos y fenol; este antígeno se encuentra en las cepas que poseen mayor virulencia. Puede ser preservado por deshidratación a temperaturas de 60 - 70 °C, cuando la suspensión en alcohol es tratada "in vacuo". (2,4,6,14,5).

El antígeno flagelar o antígeno H, es de naturaleza dual, un tipo es llamado antígeno flagelar específico, el cual contribuye a la identidad inmunológica de una especie de Salmonella y el otro tipo es inespecífico, sus componentes son compartidos frecuentemente por diversas cepas de Salmonella. La disposición de sus antígenos es la que se muestra a continuación:



Los antígenos flagelares presentan tres tipos de variación en su estructura antigénica:

1) Tipo de fluctuación inmunológica, reversible, llamada variación de fase; ésta ocurre entre los antígenos flagelares específicos

e inespecíficos. Esta variación de fase puede ser:

a) Variación específica-inespecífica: en la cual un antígeno específico en fase 1, se asocia con un antígeno inespecífico en fase 2.

b) Variación alfa-beta de fase: aquí un antígeno en fase 1, se une con un antígeno α , β , en fase 2.

c) Los antígenos de ambas fases se encuentran comunmente en fase 1.

Recientes estudios de la genética de la variación de fase han demostrado que es muy compleja. Esta esta controlada por dos genes independientes, no ligados, que alternan. Estos genes fueron denominados genes H y posteriormente fueron definidos como genes estructurales para las moléculas de flagelina alternas. El gen fla, controla la presencia o ausencia de flagelos y el gen mot, afecta a la función de los flagelos una vez formados. (6,11,13,17).

La variación del antígeno "O", conocido también como antígeno somático, es llamada variación de forma y todavía no ha sido muy bien demostrada; pero se sabe que de los tres antígenos componentes del antígeno 12, llamados 12_1 , 12_2 , 12_3 , el antígeno 12_2 , es el que más varía en su desarrollo energético o débil; al igual que el antígeno 6_1 , también sufre una variación de forma. (6,11,17).

La variación V-W, que sufre el antígeno Vi, de aquellas cepas que tienden a perderlo debido a trasplantes sucesivos en medios de cultivos o cuando la forma Vi llega a ser aglutinable por antisueros O, pero aún conteniendo antígeno Vi y pasa a la forma W. Este fenómeno fue explicado por los trabajos realizados por Félix, Pitt y Kauffmann.

La disociación S-R, fue descrita por Arkwright; es una manifestación de la alteración en la morfología de la colonia, como también de la pérdida de su virulencia. Este cambio se refleja en la pérdida de especificidad de antígenos somáticos, lo cual depende de que se encuentre presente o no un hapteno polisacárido. Las colonias R son rugosas

de bordes irregulares y las S, son lisas; ambas varían también en la aglutinación de sueros específicos O y Vi, en la producción de anticuerpos, toxicidad hacia los ratones y actividad química. Los cultivos R contienen un antígeno somático no específico, que ha sido encontrado en muchas cepas de Salmonella; generalmente estas cepas son aisladas de enfermedades crónicas. La inespecificidad serológica de estas cepas es debida a la aspereza de su morfología. (2,5,6,11,13,15).

La infección se adquiere por la ingestión de alimentos, agua o leche contaminados con bacilos provenientes de las excretas del hombre o animales; la diseminación es propiciada por las moscas. Los enfermos convalescientes son importante fuente de contaminación, ya que después de recuperarse siguen excretando a estos organismos durante uno a cuatro meses, o en algunos casos durante toda la vida; a estas personas se les llama portadores crónicos y este estado se presenta sobre todo en adultos y predomina en las mujeres. Las manifestaciones clínicas más generales que se presentan son:

1) Fiebres intestinales: su período de incubación es de 7 a 20 días, su inicio es insidioso, la fiebre se mantiene alta, su duración es de varias semanas; aquí los organismos ingeridos llegan al intestino delgado, penetran en los ganglios linfáticos intestinales, van por el conducto torácico hasta llegar al torrente circulatorio, diseminándose por todo el cuerpo. Las bacterias se multiplican en el tejido linfoide de los órganos como: riñón, hígado, intestino, etc. Las lesiones que causa más comunmente son hiperplasia y necrosis del tejido linfático, hepatitis, necrosis focal en el hígado e inflamación de la vesícula biliar.

2) Septicemias: su período de incubación es variable su inicio es súbito, la fiebre sube y baja constantemente y su duración es variable; aquí hay una invasión al torrente circulatorio inmediata, generalmente sin presentarse algún síntoma intestinal, una vez que se ha diseminado, se producen supuraciones focales, abscesos, meningitis, osteomielitis, neumonía y endocarditis.

3) Gastroenteritis: los organismos ingeridos llegan al intestino

delgado, donde se multiplican después de 2 a 3 días, se presenta gran irritación de la mucosa, no hay invasión sanguínea ni diseminación o infección en otros órganos. La fiebre es baja, su duración es de 2 a 5 días y los síntomas más generales son: malestar, náuseas, diarrea al comienzo y vómitos. (2,3,25,11,12).

Dependiendo de la variación antigénica somática, los miembros del grupo Salmonella fueron divididos en grupos, designándoseles letras mayúsculas: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H e I; a cada variante antigénica se le nombró con números arábigos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, etc. A su vez estos grupos se subdividieron en especies, según la composición antigénica de sus flagelos. Los antígenos flagelares en fase 1, se les designó letras minúsculas: a, b, c, d, etc., hasta que el número de antígenos excedió el alfabeto y tuvieron que ser designados con la letra z, con subíndices: z₁, z₂, z₃, etc. A los antígenos en fase 2 se les nombró con números arábigos: 1, 2, 3, etc. Kauffmann y Mitsui, demostraron que ciertos antígenos flagelares, presentes en la fase 1, también se podrían encontrar en la fase 2, por lo cual introdujeron los términos alfa y beta a las fases. Los antígenos en fase alfa, son los que no se encuentran relacionados con los antígenos inespecíficos, éstos sólo son propios de esta fase, y los antígenos de fase beta están antigénicamente relacionados con ciertos antígenos en fase 1, que son conocidos como antígenos sujetos a variación de fase. Al antígeno Vi se le nombra de esta manera y se escribe entre paréntesis: (Vi).

Debido a la gran cantidad de especies que comprende este género y al continuo descubrimiento de nuevas cepas, la nomenclatura que es aceptada hasta ahora es la de Ewing, quien dividió al género en tres especies:

Salmonella enteritidis

Salmonella typhi

Salmonella choleraesuis

Las dos últimas no contienen serotipos, pero S. enteritidis, contiene

más de 2000 serotipos; se escriben con letra itálica el género y la especie únicamente, el serotipo no requiere de este tipo de escritura.

Para la identificación de las cepas de Salmonella, se utilizan varios métodos como: tipificación por fagos y métodos serológicos. La serología es hoy, el método más utilizado para la tipificación de los miembros de este grupo; teniendo la ventaja de que los antisueros monovalentes somáticos y flagelares de fase 1 o de fase 2 se encuentran en el comercio.

Spicer y Edward, prepararon una técnica rápida para la identificación del antígeno H, usaron 4 antisueros polivalentes H y 2 antisueros monovalentes, pudiendo tipificar más de 17 antígenos flagelares. Más tarde Edward modificó estos antisueros, omitiendo el complejo L del principal antisuero, para minimizar las reacciones cruzadas. (2,5,6,12,25,13,14).

El objetivo de este trabajo es tipificar serológicamente, las cepas de Salmonella, encontradas en la ciudad de Monterrey, para conocer cuales son los tipos de la misma, que más prevalecen en nuestra comunidad, ya que la salmonelosis es, sin duda alguna, una de las más importantes enfermedades infecciosas en países como el nuestro.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas de Salmonella, utilizadas para la realización de este trabajo, fueron proporcionadas por: El Laboratorio de Analisis Clínicos de Servicio Social Labastida-UDEN, Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital de Ginecoobstetricia del Seguro Social, Hospital Infantil y por Benavides de la Garza, Martínez Cadena y Martínez Garza, quienes las aislaron de tacos comprados en locales ambulantes y establecidos de la Ciudad de Monterrey y áreas circunvecinas. El total de cepas tipificadas fue de 95, en la tabla 1, se muestra la procedencia de las mismas.

Las cepas se aislaron de las siguientes muestras: orina, sangre, heces fecales y tacos. Algunas cepas fueron aisladas desde 1977 y conservadas en silica gel y otras lo fueron desde Diciembre de 1979 hasta Abril de 1980.(tabla 2).

La tipificación por el método serológico fue realizada durante los meses de Enero a Abril de 1980, en el Laboratorio de Analisis Clínicos de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey.

Los reactivos que se utilizaron son estables deshidratados, una vez hidratados deben ser guardados de 2 a 8⁰C, y la solución resultante contiene suficiente merthiolate para conservar el antisuero en condiciones bacteriostáticas cuando son guardados a dicha temperatura y su concentración final es de 1:10,000.

La tipificación con antisueros somáticos, nos da la identificación hasta especie de los organismos del género Salmonella, y sus pruebas con antisueros flagelares nos proporcionan el serotipo. Una vez realizada la tipificación serológica, se busca en el esquema antigénico de Kauffmann-White, (tabla 3), la cepa que posee tales factores.

Al empezar a realizar la tipificación, se tomaron ciertas precauciones, tales como:

- 1) Se descartó cualquier antisuero que estuviera turbio y/o con precipitado.
- 2) El material y reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente.
- 3) Se evitó una exposición prolongada de los organismos, reactivos y placas de aglutinación, al calor fuerte de una fuente externa como: asa bacteriológica, flama del quemador y/o luz fuerte, para evitar una evaporación excesiva que pueda dar resultados falsos positivos.
- 4) En cada determinación, se corrió un control positivo y otro negativo. Para el control negativo se utilizó solución salina al 0.85%. (R-1)
- 5) Todo el material empleado se esterilizó después de ser usado.

Las 95 cepas proporcionadas, habían sido identificadas mediante pruebas bioquímicas rutinarias, como miembros del género Salmonella, sin embargo antes de realizar la tipificación serológica, el organismo aislado fué nuevamente identificado como presunto miembro del género

Salmonella, mediante pruebas bioquímicas rutinarias para tal efecto (tabla 4), las cuales deben coincidir con las presentes en la bibliografía (14). Una vez realizada esta identificación primaria, se realizó la prueba serológica, tomando el cultivo directamente del medio TSI.

TECNICAS

1.- Tratamiento preliminar:

- a) La muestra se inoculó en caldo de tripticaseína y soya, incubándose a 37°C por 24 horas.
- b) Se sembró por el método de dilución por estrías en el medio de S-S, incubándose a 37°C por 24 horas.

2.- Pruebas bioquímicas:

- a) Se tomó con un asa bacteriológica, unas colonias y se inoculó en caldo de Hajna, se incubó a 37°C por 18 horas.
- b) A partir de este caldo se inocularon los siguientes medios:
 - I) TSI
 - II) SIM
 - III) Simmons Citrato
- c) Se procedió a identificar, utilizando la tabla de Bailey-Scott. (14).

3.- Tipificación serológica:

- a) Se puso una gota del antisuero apropiado, previamente hidratado (R-2) Bacto-Salmonella "O" en un espacio de la placa de aglutinación.
- b) En el siguiente espacio, se puso una gota del reactivo R-1, para el control negativo.
- c) Se suspendió en el reactivo R-1, una pequeña porción del cultivo, procedente del medio de TSI.
- d) Igualmente, se transfirió una pequeña porción del cultivo, al espacio que contenía el antisuero y se suspendió en el mismo.
- e) Se balanceó la placa de aglutinación, en forma rotatoria, para mezclar bien los reactivos, durante 1 minuto.

- f) Se observó por luz transmitida, a partir de una fuente luminosa si hubo o no aglutinación, la cual se manifiesta por la aparición macroscópica de grumos en la concavidad de la placa.
- g) Se buscó en el esquema antigénico de Kauffmann-White (tabla 3), según la aglutinación obtenida, la especie a la cual perteneció la cepa tipificada. (fig. 1).

Cuando se presentó aglutinación dudosa, se siguió la siguiente técnica:

- a) Si la cepa da reacción positiva con el antisuero Salmonella Vi y no presenta aglutinación con los antígenos Bacto-Salmonella "0", se realiza una suspensión densa del cultivo, esto se llevó a cabo en 0.5 ml del reactivo R-1 y tomando el cultivo del TSI.
- b) Se puso la suspensión del cultivo en agua hirviendo por 10 minutos.
- c) Se dejó enfriar.
- d) Una vez frío se volvió a analizar con antisueros Salmonella "0" factores 9 y 7 y Salmonella Vi.
- e) Si los organismos calentados no reacciona con el antisuero Vi, pero reacciona con los antisueros Bacto-Salmonella "0" factores 9 y 12, dicha cepa corresponde a S. typhi.
- f) Si dichos organismos calentados no reaccionan con el antisuero Vi y/o factor 9, pero reacciona con el antisuero "0" factor 7, esta cepa corresponde a S. enteritidis ser. paratyphi C.

Para dar un resultado plenamente satisfactorio, es necesario emplear antisueros Bacto-Salmonella "H" 5 o fase 2.

REACTIVOS

R-1 - Solución de Cloruro de Sodio al 0.85%.

Cloruro de Sodio 0.85 g.

Agua Destilada 100.00 ml

Esta solución se esterilizó a 15 lbs/pulg.² durante 15 minutos (12).

R-2 - Hidratación de antisueros.

Cloruro de Sodio al 0.85%..... 3.00 ml

Con pipeta estéril, se toman 3 ml del reactivo R-1 al cual, previamente se le confirma su esterilidad, y se deposita en el frasco que contiene el antisuero deshidratado, se cierra dicho frasco y se invierte lentamente, hasta que todo el reactivo se haya disuelto.(12).

tabla 1

Procedencia de las cepas de Salmonella sp.

Procedencia	Número de muestras.
Laboratorio de Analisis Clínicos de Servicio Social Labastida-UDEM	1
Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.	58
Hospital de Ginecoobstetricia del Seguro Social.	5
Hospital Infantil	4
Benavides de la Garza, Martínez-Cadena y Martínez-Garza.	27
Total	95

Tabla 2

Tipo de muestra y fecha de aislamiento de las cepas de Salmonella sp.

Tipo de muestra	Número de cepas aisladas *	Fecha de aislamiento
Orina	1 (1.05%)	Abril de 1980
Sangre	8 (8.42%)	1977 - 1980
Heces fecales	59 (62.10%)	1977 - 1980
Tacos	27 (28.42%)	Dic. 1979 - Abril 1980

* Expresado entre parentesis la relación porcentual del total de 95 cepas.

Tabla 3

Esquema antigénico abreviado de Kauffmann-White.

Organismo	Grupo	Antígeno somático	Antígeno flagelar	
			1	2
<u>S. enteritidis</u>				
ser. Paratyphi A	A	1,2,12	a	-
ser. Paratyphi B	B	1,4,5,12	b	1,2
var. Odense	B	1,4,12	b	1,2
ser. Java	B	1,4,5,12	b	(1,2)
ser. Stanley	B	4,5,12	d	1,2
ser. Schwarzengrund	B	1,4,12,27	d	1,7
ser. Saintpaul	B	1,4,(5),12	e,h	1,2
ser. Reading	B	4,5,12	e,h	1,5
ser. Chester	B	4,5,12	e,h	e,n,x
ser. Sandiego	B	4,5,12	e,h	e,n,z
ser. Derby	B	1,4,5,12	f,g	(1,2)
ser. California	B	4,5,12	m,t	-
ser. Typhimurium	B	1,4,5,12	i	1,2
var. Copenhagen	B	1,4,12	i	1,2
ser. Bredeney	B	1,4,12,27	l,v	1,7
ser. Heidelberg	B	(1),4,(5),12	r	1,2
<u>S. choleraesuis</u>	C ₁	6,7	c	1,5
<u>S. enteritidis</u>				
ser. Braenderup	C ₁	6,7	e,h	e,n,z
ser. Montevideo	C ₁	6,7	g,m,s	-
ser. Oranienburg	C ₁	6,7	m,t	-
ser. Thompson	C ₁	6,7,(14)	k	1,5
ser. Infantis	C ₁	6,7,(14)	r	1,5
ser. Bareilly	C ₁	6,7,(14)	y	1,5

Continuación de la tabla 3

Organismo	Grupo	Antígeno somático	Antígeno flagelar	
			Fase 1	Fase 2
ser. Litchfield	C ₂	6,8	l,v	1,2
ser. Tallahassee	C ₂	6,8	z,z	-
ser. Miami	D ₁	1,9,12	a	1,5
<u>S. Typhi</u>	D ₁	9,12,Vi	d	-
<u>S. enteritidis</u>				
ser. Berta	D ₁	9,12	f,g,t	-
ser. Enteritidis	D ₁	1,9,12	g,m	-
ser. Dublin	D ₁	1,9,12	g,p	-
ser. Panama	D ₁	1,9,12	l,v	1,5
ser. Javiana	D ₁	1,9,12	l,z	1,5
ser. Pullorum	D ₁	9,12	-	-
ser. Anatum	E ₁	3,10	e,h	1,6
ser. Meleagridis	E ₁	3,10	e,h	1,w
ser. Give	E ₁	3,10	l,v	1,7
ser. Newington	E ₂	3,15	e,h	1,6
ser. Illinois	E ₃	(3),(15),34	z	1,5
ser. Senftenberg	E ₄	1,3,19	g,s,t	-
ser. Simsbury	E ₄	1,3,19	z	-
ser. Rubidlsaw	F	11	(d),r	(d),e, n,x
ser. Poona	G ₁	(1),13,22,(36)	z	1,6
ser. Worthington	G ₂	1,13,23	z	1,w
ser. Cubana	G ₂	1,13,23	z	-
ser. Florida	H	1,6,14,25	d	1,7
ser. Madelia	H	1,6,14,25	y	1,7

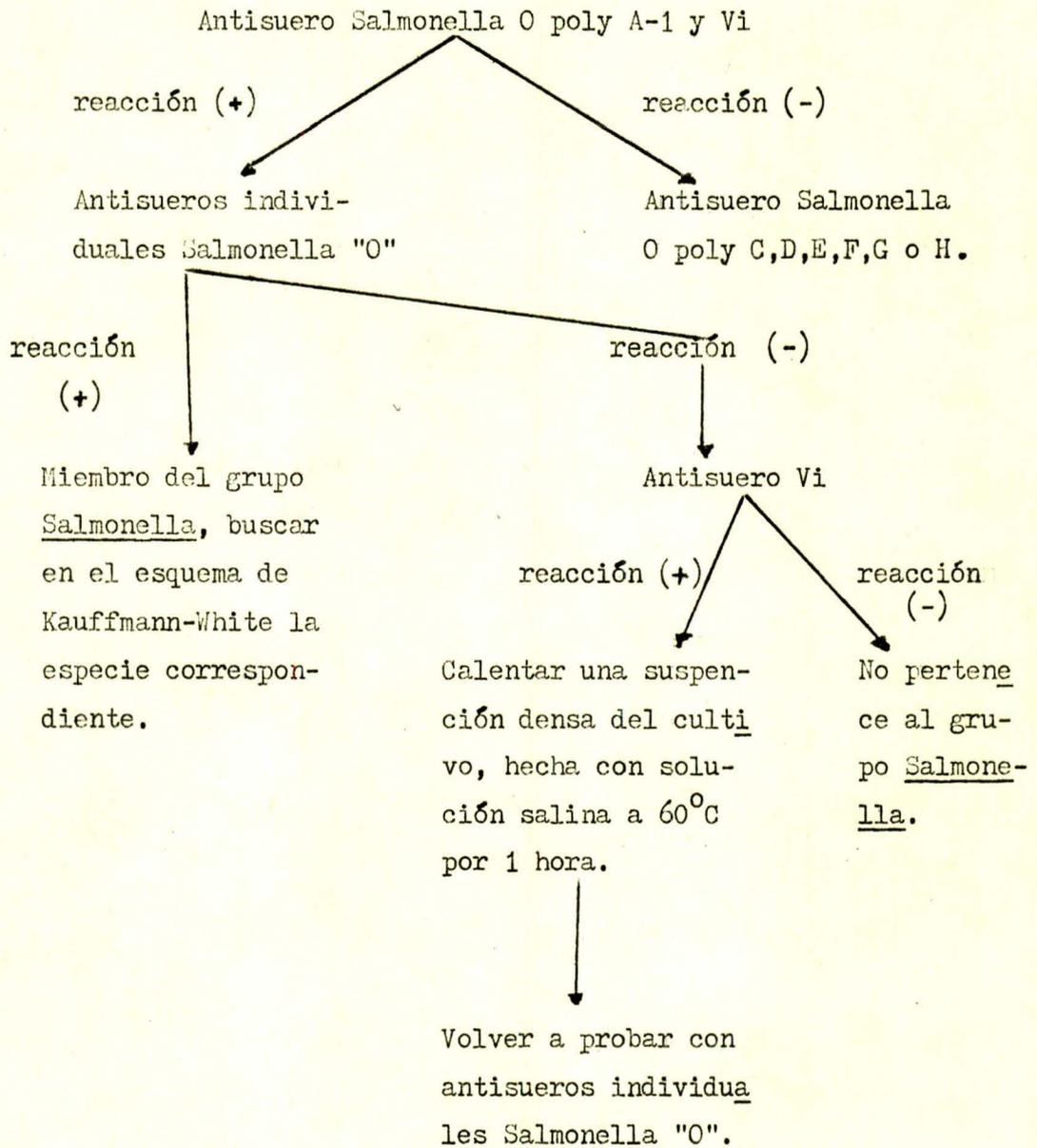
Tabla 4

Características bioquímicas del género Salmonella.

Prueba	Reacción
Producción de indol	Negativa (-)
TSI	Fermentación de glucosa, producción de H ₂ S y gas.
Simmons Citrato	Positiva (+)
SIM	Positiva (+)
Rojo de Metilo	Positiva (+)
Voges Proskauer	Negativa (-)
Ureasa	Negativa (-)

Figura 1

Diagrama de flujo para la tipificación de Salmonella sp. con anti-
sueros somáticos "O".



RESULTADOS

De las 95 cepas de Salmonella tipificadas, se observó que 90 (94.73%), correspondían a la especie de Salmonella enteritidis y las otras 5 (5.26%), fueron Salmonella typhi. (Tabla 5). Las 90 especies encontradas de S. enteritidis, provenían, 1 (1.1%) de orina, 8 (8.88%) de sangre, 56 (62.22%) de heces fecales y 25 (27.77%) de tacos. De las 5 cepas de S. typhi, 3 (60.00%), fueron aisladas de heces fecales y las 2 restantes (40.00%), de tacos; tal y como se muestra en la tabla 6.

Los grupos a los cuales pertenecieron las 90 cepas tipificadas de S. enteritidis, fueron : A, B, C₁, C₂, D₁, E₁, G₁, H e I. (Tabla 7).

En la tabla 8, se muestra una relación completa del tipo de muestra y grupos serológicos obtenidos en las 90 cepas de S. enteritidis tipificadas.

La variación en el tiempo de aislamiento de los diferentes grupos serológicos, se muestra en la tabla 9.

De las 95 cepas de Salmonella, identificadas mediante pruebas bioquímicas antes de ser tipificadas, 12 (12.63%), mostraron fermentación de la glucosa, producción de H_2S y gas, 61 (64.21%), fermentaron la glucosa, produjeron H_2S y no tuvieron producción de gas, 18 (18.94%), fermentaron la glucosa, produjeron gas, sin producción de H_2S , 1 (1.05%), fermentaron la glucosa y la lactosa, con producción de gas y H_2S y 3 (3.15%), mostraron fermentación de la glucosa y la lactosa con producción de gas y sin producción de H_2S . Estas diferencias en el comportamiento bioquímico presentado por las diferentes cepas del género Salmonella, se muestran en la tabla 10.

Tabla 5

Distribución porcentual de las especies de Salmonella encontradas.

Especie	Número y por ciento
<u>S. enteritidis</u>	90 (94.73%)
<u>S. Typhi</u>	5 (5.26%)
Total de muestras	95 (100.00%)

Tabla 6

Distribución de las cepas de S. enteritidis y S. typhi aisladas en las diferentes muestras.

Especie	Total de cepas	Tipos de muestra			
		Orina	Sangre	Heces Fecales	Tacos
<u>S. enteritidis</u>	90	1	8	56	25
<u>S. typhi</u>	5	0	0	3	2
Total de muestras	95	1	8	58	27

Tabla 7

Relación entre los grupos serológicos y cantidad de cepas de Salmonella enteritidis.

Grupo	Número de cepas	Porcentaje
A	8	8.88%
B	45	50.00%
C ₁	7	7.77%
C ₂	10	11.11%
D ₁	8	8.88%
E ₁	8	8.88%
G ₁	2	2.22%
H	1	1.11%
I	1	1.11%
Total de muestras	90	100.00%

Tabla 8

Relación de grupos serológicos y tipo de muestra de las cepas de S. enteritidis.

Tipo de muestra	Grupos									Total
	A	B	C ₁	C ₂	D ₁	E ₁	G	H	I	
Orina				1						1
Heces fecales	3	35	3	1	7	4	2	1		56
Sangre		5	1			2				8
Tacos	5	5	3	8	1	2			1	25
Total	8	45	7	10	8	8	2	1	1	90

Tabla 9

Relación de grupos serológicos de las cepas de S. enteritidis y S. typhi con su año de aislamiento.

<u>S. enteritidis</u> Grupos	Número y año de aislamiento			
	1977	1978	1979	1980
A				8
B	7	8	21	9
C ₁		1	2	4
C ₂			3	7
D ₁	1	1	4	2
E ₁		3	3	2
G			2	
H		1		
I				1
<u>S. typhi</u>	1	1	2	1
Total	9	15	37	34

Tabla 10

Variación en la fermentación de azúcares, producción de H_2S y gas de las diferentes cepas de Salmonella tipificada.

TSI	Número y por ciento *
Fermentación de la glucosa, producción de H_2S y gas.	12 (12.63%)
Fermentación de la glucosa y producción de gas, sin H_2S	18 (18.95%)
Fermentación de la glucosa y producción de H_2S sin gas	61 (64.21%)
Fermentación de la glucosa y lactosa con producción de gas y H_2S .	1 (1.05%)
Fermentación de la glucosa y lactosa con producción de gas sin H_2S .	3 (3.15%)

* Relación porcentual del total de 95 muestras.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La tipificación por el método serológico es muy útil para la identificación plena de la cepa de Salmonella, éste debe de emplearse en cualquier laboratorio bacteriológico para proporcionar una información completa, dando así una valiosa orientación al médico.

Su técnica es rápida y confiable, sin embargo en algunos casos la aglutinación se observó dudosa, principalmente con S. typhi, que posee antígeno Vi, el cual interfiere en la aglutinación de los antígenos somáticos "O", viéndose la necesidad de hacer una suspensión densa y calentarla, para destruir dicho antígeno y poder así, efectuar la tipificación de los antígenos somáticos. Si el cultivo calentado continuara reaccionando con el antisuero Vi y no reaccionara con antisuero "O", lo más probable es que sea un miembro del grupo Citrobacter, lo cual puede ser confirmado mediante pruebas bio-

químicas, específicamente la de KCN y lisina descarboxilasa, tal y como lo sugiere el laboratorio Difco, (12).

En ocasiones se puede presentar una reacción dudosa, independiente del antígeno Vi, en especies diferentes a S. typhi, para la cual es necesario seguir cualesquiera de estas orientaciones:

- a) Cuando es empleado el antisuero poly O grupos y una reacción negativa es obtenida con poly C, D, E, F y G el organismo es considerado como no del género Salmonella y se podría comprobar con pruebas bioquímicas.
- b) Si se obtiene resultado negativo con el antisuero poly A o poly B, esta cepa puede probarse con Bacto-Salmonella antisuero Vi.
- c) Cuando el grupo poly A-1 Salmonella es empleado y se obtiene una reacción negativa, el organismo puede ser considerado presuntivamente como no perteneciente al serogrupo A-1 Salmonella, lo cual podría confirmarse con pruebas bioquímicas y si estas demuestran que puede ser Salmonella, quiere decir que no corresponde al grupo A-1.
- d) Cuando se emplea el antisuero poly A-1 y Vi (los cuales se encuentran mezclados) y da una reacción positiva, pero no reacciona con antisuero somático específico, se emplea antisuero Bacto-Salmonella Vi, si la aglutinación no es observada, dicho organismo se le considera como no perteneciente al grupo Salmonella, ya que especies como Citrobacter sp. y Arizona sp. pueden aglutinar con algunos antisueros somáticos para Salmonella pero no con el Vi, esto debe ser confirmado con pruebas bioquímicas.

Se recomienda también para tal efecto, seguir las instrucciones que sugiere el laboratorio del cual provienen los antisueros comprados.

Las cepas de Salmonella aisladas de tacos, presentaron un poco de complicación al efectuarse la tipificación, ya que no se podía observar con claridad la aglutinación, debido a que poseían grasa, probablemente adquirida del alimento del cual fue obtenida, para solucionar tal complicación, se hicieron de 2 a 3 resiembras en medio S-S y después de realizar esto, si se pudo observar la aglutinación .

Por lo que podemos observar en la tabla 10, 91 de las cepas estudiadas, no fermentaron la lactosa, tal y como William Burrows lo dice: "el grupo Salmonella, se caracteriza bioquímicamente por no fermentar la lactosa" (6,18). De las 91 cepas no fermentadoras, 58 fueron aisladas en el transcurso de 1977-1978. Sin embargo, se obtuvieron 4 cepas que si fermentaron la lactosa lo cual concuerda con estudios recientes realizados por Rappold, Bolderdijk y D'Aqust (10). Estas cepas fueron aisladas en 1980 y todas provenían de tacos (1), lo cual significa que las cepas aisladas recientemente, estan presentando ya, una importante variación en su metabolismo, debido a:

- 1) mutación: la cual considero de poca importancia debido a que la probabilidad para que cualquier gen bacteriano sufra una mutación es mínima, o sea, 1 de cada 10^8 ó 10^9 bacterias mutan. (6).
- 2) transferencia de plásmidos: ésta puede realizarse por conjugación o transducción, la conjugación se efectúa entre dos células de sexo opuesto y en la transducción es mediada por virus bacterianos o bacteriófagos, los cuales son numerosos y se presentan con especificidad amplia o estrecha, por lo cual la considero de mayor importancia.

Siendo las enfermedades diarreicas agudas un gran problema, sobre todo en países subdesarrollados, la Organización Mundial de la Salud se ha reunido con el propósito de formular un programa para el control de dichas enfermedades. (19). Conociendo que una de las enfermedades más importante en México es la salmonelosis, por lo que se han realizados numerosos estudios como el de Bessudo y cols., quienes demostraron que entre los individuos que sufren tal padecimiento un 3% son portadores crónicos y persisten en la eliminación de la especie patógena durante toda su vida. (2,20,22).

Tomando en cuenta que los manipuladores de alimentos son fuente de transmisión de gran potencia, se recalca pues la importancia que tiene el que el taco funciones como vehículo para la transmisión de Salmonella, lo cual comprobamos con lo dicho por los doctores Curi de

Montbrun y Ciecarelli: "el control en las salmonelosis no tifoideas resulta más difícil, pues su transmisión presenta eslabones variados de diferentes vulnerabilidades, entre los que destacan los alimentos de origen animal y los manipuladores de alimentos".(9,19).

Siendo pues el hombre el único huésped natural de S. typhi, se vuelve a reafirmar la importancia que tiene el reconocimiento y seguimiento de portadores, ya sean convalescientes o crónicos, ya que estos representan el eslabón más importante en la cadena epidemiológica de la fiebre tifoidea.(8,9,25).

Con lo que respecta a los portadores de los diferentes serotipos de S. enteritidis, es más difícil su control ya que aparte del hombre, se presentan múltiples reservorios animales como: caballos, perros, gatos, aves de corral, etc.(8,7,9,17,23). Tal y como se puede apreciar en la tabla 7, el grupo que más se aisló fue el B, en la tabla 8, se observa que fue la muestra clínica de heces fecales, donde mayor resultado positivo se obtuvieron, en la tabla 9, se da una relación entre el año de aislamiento y el grupo encontrado, tomando en cuenta estos datos obtenidos, puedo decir que de las muestras examinadas desde 1977 el causante de la mayoría de las enfermedades salmonelósicas, son los diferentes serotipos del grupo B.

En si, la importancia de los portadores radica en que son el principal foco de transmisión de las diversas salmonelosis, pudiéndose demostrar esto, con el presente estudio, ya que se obtuvo una cierta relación entre el año de aislamiento de las cepas y la frecuencia con que cada serotipo se presentó, encontrándose que en los años de 1977-1980, aunque prevalecieron los diferentes serotipos de S. enteritidis grupo B, en el último año (1980), la diversidad de grupos fue aún mayor, ya que los serotipos del grupo A y C₂, mostraron una frecuencia casi tan elevada como los del grupo B.

Es importante mencionar que, el índice mayor de cepas del grupo A,

provinieron de tacos, y que este grupo no se le aisló durante 1977-1978 de las diversas muestras clínicas (orina, heces fecales y sangre). Pero en 1980 fueron aisladas 3 de éstas cepas, de heces fecales.

Tomando en cuenta todo cuanto se ha mencionado, se concluye que, la mayoría de los casos de salmonelosis en las muestras examinadas, son causadas por los diferentes serotipos de S. enteritidis grupo B, lograndose tal conclusión utilizando el método serológico antes descrito.

La serotipificación de las diversas cepas de Salmonella sp., ayudaría a:

- 1) Llegar al reconocimiento de la distribución y prevalencia de las diferentes serovariedades de Salmonella en nuestra comunidad.
- 2) Al reconocimiento de las fuentes (reservorios), de las diferentes salmonelosis, lo cual podría llevar a la erradicación del microorganismo, cuando la fuente sea otro mamífero diferente al hombre ó cuando él mismo sea el único portador.
- 3) A elegir el farmaco adecuado para el tratamiento a personas que padezcan estas enfermedades infecciosas.

RESUMEN

Se tipificaron 95 cepas de Salmonella sp. recolectadas desde 1977 - 1980, en la Ciudad de Monterrey, Nuevo León y áreas circunvecinas para conocer a que especie pertenecían. La tipificación se realizó por el método serológico, con antisueros somáticos "0", observando si presentaban o no aglutinación.

Los resultados obtenidos se encuentran esquematizados por medio de tablas en donde se muestra la relación de la frecuencia encontrada entre S. enteritidis y S. typhi, los grupos serológicos de mayor incidencia, el tipo de muestra clínica de donde fueron aislados, las cepas obtenidas a partir de muestras de tacos, todo esto con respecto a su año de aislamiento.

Estos resultados muestran que los organismos patógenos causantes de la mayoría de las salmonelosis en las muestras examinadas son los diferentes serotipos de la especie S. enteritidis, siendo el serogrupo B el que tuvo mayor incidencia.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Benavides de la Garza A., Martínez, I., Martínez, a., 1980. Aislamiento e Identificación de Salmonella en productos cárnicos. Reporte de evaluación final U. de M.
- 2.- Bessudo, B. et. al, 1979. Investigación de portadores de Salmonella typhi en México. Bol. Of. Saint. Panam., 86: 56-60.
- 3.- Brack, D., 1976. Biología de los Microorganismos. Ediciones Omega.
- 4.- Bryan, A. et. al, 1971. Bacteriología Principios y Practicas, 6a. ed. C.E.C.S.A.
- 5.- Burdon, W., y Williams, R., P., 1974. Microbiología, Ed. Publicaciones Culturales S.A.

- 6.- Burrows, W., 1974. Tratado de Microbiología, 20a. ed., Nueva Editorial Interamericana.
- 7.- Cardono, A., M., et. al, 1973. Salmonella grupo E aisladas en Chile. Rev. Lat. Microbiol., 15: 1-4.
- 8.- Curi de Montbrun, S.E., Ciecarelli, A., S., 1979. Salmonella en algunos tipos de productos carneos. Bol. Of. Sanit. Panam., 87: 224-229.
- 9.- Curi de Montbrun, S., E., y D. F., Jimenez, 1978. Salmonella en manipuladores de alimentos de hospitales. Bol. Of. Sanit. Panam, 85: 498-503
- 10.- D'Agust, J. Y., 1977. Limitations of lysine-iron-cystine neutral red broth in presumptive identification of Salmonellae, Applied and Environmental Microbiology, 34: 595-596.
- 11.- Davis, B.D., et. al, 1973. Microbiology, 2a. ed., Harper and Row.
- 12.- Difco laboratories, 1977, Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbial and Clinical Laboratory Procedures, Detroit, Michigan.
- 13.- Divo, A., 1971. Microbiología Médica. 2a. ed., Editorial Interamericana.
- 14.- Finegold, S. M. et. al, 1978. Diagnostic Microbiology Bailey's and Scott, 5th. ed., Mosby Co.,
- 15.- Frankel, S. et. al, 1970. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, 7th. ed., Mosby Co.

- 16.- Hickmon, F. W. y J. J., Farmer, 1978. Salmonella typhi: identification, antibiograms, serology and bacteriophage typing. Topics in Microbiology, 44: 1149-1159.
- 17.- Jawetz, E., et. al, 1977. Manual de Microbiología Médica, 7a. ed., Editorial El Manual Moderno S. A.
- 18.- Kent, P. T. et. al, 1980. Salmonellae in foods and feeds, U. S. Department of Health Service Center of Disease Control, Atlanta, Georgia.
- 19.- Organización Mundial de la Salud, 1979. Formulación de un programa para el control de las enfermedades diarreicas. Bol. Of. Saint. Panam., 87: 156-162.
- 20.- Parrilla C., M. C., et. al, 1978. Incidencia de Salmonella en productos cárneos. Salud Pública de México, 20: 569-574.
- 21.- Rappold, H. y Bolderdijk, R., F., 1979. Modified lysine-iron agar for isolation of Salmonella from food. Applied and Environmental Microbiology, 38: 162-163.
- 22.- Rodríguez-Leiva, M., 1979. Typhoid Fever 1979 a new perspective and old disease. J. Infect. Dis.
- 23.- Schelatto, F., et. al, 1975. Características de las cepas de Salmonella typhimurium multirresistentes productoras de infecciones cruzadas en hospitales pediátricos. Revista Latinoamericana de Microbiología, 17: 9-16.
- 24.- Smith, C., et. al, 1971. Microbiología de Zinsser, 4a. ed., UTEHA.
- 25.- Surveillance Summary, 1980. Human Salmonella isolates, Morbidi

ty and Mortality Weekly Report, 28: 618-619.

26.- Warren W., J., and Harneck, R., B., 1979. Immunization against typhoid fever. Revista Médica, Annuals Reviews Inc, 130: 457-472.

801262