

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
MENCION MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE GASTROENTEROLOGIA BOLIVIANO – JAPONES**



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE PATOGENOS ENTERICOS DE HECES DE PALOMAS EN LA CIUDAD DE LA PAZ

ELABORADO POR:

Univ. Lizzeth Carla Miranda Sivila

**(Tesina de Grado para optar al Título de Licenciatura en Bioquímica. Mención en
Microbiología)**

LA PAZ – BOLIVIA

2006
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
MENCION MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE GASTROENTEROLOGIA BOLIVIANO – JAPONES



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE PATOGENOS ENTERICOS DE HECES DE PALOMAS EN LA CIUDAD DE LA PAZ

ELABORADO POR:

Univ. Lizzeth Carla Miranda Sivila

ASESORES:

**Dr. Luis Enrique Rodríguez Quevedo
Jefe de Laboratorio IGBJ
Alberto Benítez Reyes.
Responsable Sección Bacteriología**

**(Tesis de Grado para optar al Título de Licenciatura en Bioquímica. Mención en
Microbiología)**

**LA PAZ – BOLIVIA
2006**

DEDICATORIA

*A mi **mamita Ana**, a quien amo y admiro mucho por toda la fortaleza que tiene, y le agradezco todo, porque a ella le debo lo que soy hoy en día y por estar siempre a mi lado dándome consejos y confiando siempre en mí.*

¡Gracias por todo tu amor mamita, esto es por tí, te quiero mucho!!!

*A mi **papito Ernesto** porque siempre estaré a su lado y siempre lo querré, y a mis hermanos **Daya** y **Luis** por su paciencia y comprensión durante todo este tiempo.*

*A **Alex** (mi vidita) por estar siempre a mi lado apoyándome en todo lo que hago y haberme ayudado para que todo salga muy bien.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y por haberme dado lo mejor de este mundo mi familia.

*Muy especialmente a mi Doc querido **don Albert** por ser un gran maestro en mi formación y por sobre todo un gran amigo en todo momento y haberme tenido paciencia para que este trabajo sea una realidad.*

Al laboratorio del Instituto de Gastroenterología Boliviano-Japonés que me abrió las puertas y me dio plena libertad de trabajar en este proyecto y que siempre me incentivó a salir adelante cada día y a todo el personal del laboratorio como el Doc Rodríguez, Don Raúl, Ernesto, Pedro, Edith y Lourdes y en especial a mi Doc Chavi y al Doc Villegas grandes amigos; por crear siempre un ambiente de trabajo tan cálido y haberme enseñado tantas cosas.

A mi tío Félix por todo su apoyo y a toda mi familia por estar siempre pendiente de mi familia y en especial a mi tío Gualberto, tía Ada y mis hermanitos.

A mis docentes el Dr. Enrique Terrazas y el Dr. Miguel Estenssoro por sus conocimientos impartidos a lo largo de la carrera y hacer de esta ciencia una pasión.

A mis amigos de la U Telmis, Alexiño, Chio, Pame, Jacky, Delia y Oscarín por estar siempre a mi lado y claro a Nadia, Lu y Teddy por todo lo vivido en el internado.

RESUMEN

El presente trabajo surge como respuesta a la incógnita de conocer si la paloma tiene un papel de agente transmisor de enfermedades zoonóticas. Por lo cual, en esta investigación se estudiaron 64 muestras obtenidas de materia fecal de palomas de la Plaza Murillo por medio de un hisopado rectal, para luego enriquecer en caldo Tetracionato y hacer la resiembra en medios selectivos. La identificación bioquímica consistió en las determinaciones habituales que se siguen para la caracterización de enterobacterias. De todas las muestras procesadas; se aisló *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Proteus*, comunes saprófitos. Se llevó a cabo pruebas de aglutinación (serología) a todas las muestras que presentaron *Escherichia coli* con el objeto de identificar cepas patógenas, obteniéndose los siguientes resultados: de las 64 muestras; 16 fueron positivas para *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), patógeno entérico no muy frecuente pero importante por la capacidad de producir cuadros diarreicos (Ver cuadro N°1). A todas las muestras con *E. coli* enterotoxigénica se les realizó un antibiograma con los siguientes antibióticos: Ampicilina, Cefotaxime, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem y Sulfametoxazol-Trimetoprim por el método de difusión de Bauer- Kirby. Los resultados fueron: el 100% de las muestras presentaron resistencia frente a Ampicilina, un parámetro más para afirmar que estos aislados son de origen humano* ya que el mecanismo de infección es fecal-oral y la superpoblación lo que condiciona a un contacto mas cercano, factor importante para la diseminación de estos patógenos y las consecuentes enfermedades zoonóticas. Desde esta perspectiva es que surge la necesidad de hacer conocer a las autoridades relacionadas con el tema las consecuencias que traen estos animales para implementar en un futuro medidas para un control biológico y evitar problemas como la superpoblación y lo más importante para prevenir enfermedades.

Palabras Clave: *Columba livia*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, diarrea, resistencia antimicrobiana.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION.	1
1.1. ANTECEDENTES.	3
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	4
1.3. JUSTIFICACION.	6
1.4. MARCO TEORICO.	7
1.4.1. LAS PALOMAS.	7
1.4.1.1. Anatomía.	8
1.4.1.2. Sistema digestivo de las aves.	8
1.4.2. FLORA NORMAL GASTROINTESTINAL.	9
1.4.2.1. En granívoras.	9
1.4.2.2. Enfermedades transmisibles de aves a humanos.	10
1.4.2.2.1. Introducción.	10
1.4.2.2.2. Enterobacterias.	11
1.4.2.2.3. Características biológicas.	11
1.4.2.2.3.1. <i>Escherichia</i>.	11
1.4.2.2.3.2. Estructura antigénica.	11
1.4.2.2.3.3. Enfermedades diarreicas asociadas con	
<i>Escherichia coli</i>.	12
1.4.2.2.3.4. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.	13
1.4.2.2.3.5. Colibacilosis.	17
1.4.3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.	18
1.4.3.1. Pruebas para la detección de anticuerpos totales.	20
1.4.3.1.1. Pruebas de aglutinación directa.	20
1.4.3.1.2. Pruebas de aglutinación pasiva o indirecta.	21
1.4.4. EL DETERIORO DE MONUMENTOS NACIONALES.	22
2. OBJETIVOS.	23
2.1. OBJETIVO GENERAL.	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	23

3. DISEÑO METODOLOGICO.	24
3.1. MODELO TEORICO.	24
3.2. POBLACION.	25
3.3. METODOS DE INVESTIGACION.	25
3.3.1. TIPO DE INVESTIGACION.	25
3.3.2. METODOS, TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES.	25
3.3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.	26
3.3.3.1. MATERIALES Y EQUIPOS.	26
3.3.3.2. MEDIOS DE CULTIVO.	27
3.3.3.3. REACTIVOS.	27
3.3.4. PROCEDIMIENTOS.	28
4. RESULTADOS.	31
4.1. RESULTADO GENERAL.	31
4.2. RESULTADOS ESPECIFICOS.	32
5. DISCUSION.	35
6. CONCLUSIONES.	39
7. RECOMENDACIONES.	41
8. BIBLIOGRAFIA.	43
9. ANEXOS.	46

1. INTRODUCCIÓN

Fueron largos los procesos de adaptación en los cuales el hombre incorporó a su vida cotidiana a los animales, mecanismo conocido como domesticación. Pero este mecanismo no siempre estuvo marcado de un estado de inocuidad para el ser humano. La existencia de mecanismos que permiten la transmisión de enfermedades de animales domésticos a seres humanos que conviven en el mismo entorno es frecuente, llamándose a estas enfermedades zoonóticas. Un claro ejemplo es la enfermedad conocida como la rabia transmitida por los perros y la colibacilosis transmitida por *Escherichia coli* proveniente de palomas en este caso.

Columba livia o paloma común, que es vista como un icono de la paz, paradójicamente puede ser elemento de transmisión de muchas enfermedades para el ser humano, algunas de las cuales suelen ser de consideración, porque esta ave no solo es tolerada, sino que además es alimentada y protegida. Las plazas de diversas ciudades, en muchos países albergan a las palomas no solo como un elemento decorativo, sino también como un atractivo turístico, creando espacios de extrema cercanía y contacto directo.

Las numerosas palomas que frecuentan las plazas y otros lugares de la ciudad de La Paz, son de la forma *Columba livia* domesticada; esta presenta hábitos gregarios y sedentarios, formando grandes bandadas en busca de sus alimentos, granos, semillas y frutas, con tendencia omnívora que se acentúa en los basureros.¹

Cada día debemos de dar más importancia a la presencia de palomas en nuestra ciudad, ya que son una preocupación desde el punto de vista sanitario; porque las mismas pueden ser reservorios de agentes patógenos, que transmiten enfermedades al ser humano como histoplasmosis, salmonelosis, criptococosis, colibacilosis; ya que la vía de transmisión es de tipo fecal – oral;

siendo también portadoras de parásitos externos; tampoco debemos olvidar que si estas se encuentran cerca del área de los alimentos pueden representar un peligro para la contaminación y transmisión de enfermedades.

Por otro lado, no existen estudios desarrollados en nuestro medio con el objetivo de aislar e identificar patógenos entéricos en heces de palomas, e s así que el presente proyecto hace énfasis en la presencia de patógenos entéricos en las heces de palomas, por ser estas bacterias entéricas un vasto grupo heterogéneo de bacilos Gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales de sangre caliente; esta familia incluye muchos géneros como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros. Algunos microorganismos entéricos como *Shigella* y *Salmonella* son frecuentemente patógenos para los humanos; por otro lado *Escherichia coli* forma parte de la flora microbiana normal e incidentalmente causan diferentes patologías y son responsables de prolongados cuadros diarreicos.

1.1 ANTECEDENTES

Se realizaron estudios por la Asesoría del Medio Ambiente dependiente de la Oficialía Mayor de Desarrollo Sostenible y Territorial de la H.A.M. en coordinación con el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) y obtuvieron resultados significativos al analizar tres palomas muertas por causas desconocidas, dos vivas y quince muestras de heces.

En un examen para la búsqueda de parásitos, 13 de las 15 muestras de heces contenían *Ascaridia galli*, *Eimeria labbeana*, *Tetrameres americana* y *Capillaria caudinflata*, parásitos que pueden ser patógenos en el humano, produciéndole diarreas agudas, deshidratación, malestar y alzas térmicas.

En el cultivo fúngico fueron identificados *Penicillium sp.*, *Dreschlera sp.* y *Fusarium sp.*, hongos que pueden causar alergias fúngicas, teniendo preferencia del árbol traqueobronquial donde penetran a través de la respiración con el aire cargado a partir de heces fecales secas, produciendo en algunos casos escalofríos, alzas térmicas, cefaleas, mialgia generalizada, epistaxis y hasta la muerte de la persona.

Los estudios revelaron también la presencia de ácaros deformantes en las patas de las palomas que pueden dejarlas sin los dedos, lo que algunos médicos consultados nos informaron de la posibilidad de la transmisión de estos ácaros al ser humano.

Y en lo que concierne al presente trabajo de investigación, en el estudio de cultivo y pruebas bioquímicas para la determinación de enterobacterias, fueron aislados *Escherichia coli* y *Proteus sp.*, comunes saprófitos y parte de la flora bacteriana normal, que causan enfermedades gastrointestinales en personas de menor resistencia en el caso de *Escherichia coli*.¹

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente el problema de sobre población de palomas es una gran preocupación no solo para el medio ambiente, sino principalmente como potencial vector de patógenos responsable de muchas infecciones gastrointestinales; *Columba livia* o paloma común, constituye en la actualidad un gran conflicto urbano a nivel mundial por estar en tercer lugar entre las plagas citadinas después de los ratones y las moscas.

¿Qué puede tener de malo la presencia de estos animalitos alados y simpáticos? Pues mucho, a juzgar por las consecuencias: en estética, seguridad de inmuebles, medio ambiente y lo más importante la salud humana. La interrelación entre la población y una gran cantidad de aves en la Plaza Murillo generan preocupación, pues es posible que algunas personas puedan infectarse con los microorganismos presentes en las heces de palomas en forma accidental. También existen actitudes de la gente que visita dicha plaza que hacen que una contaminación sea posible como: las infecciones por estos microorganismos enteropatógenos se dan por un ciclo de transmisión fecal-oral, la gente alimenta a las palomas tratando en lo posible de que estas lleguen hasta sus manos, existe la venta de alimentos, granos y también se ingieren alimentos en dicha Plaza y no existen lugares donde las personas se puedan lavar las manos; y un factor muy importante es que la gran parte de la población que visita la Plaza Murillo son niños, los que no siempre tienen cuidado cuando están en contacto con estas palomas; y sobre todo la falta de conocimiento por parte de la población acerca de la capacidad de transmitir enfermedades por medio de las heces de las palomas.

En resumen la problemática actual es la superpoblación de palomas lo que condiciona la creación de focos infecciosos especialmente donde concurren niños y ancianos, los cuales además de estar en contacto muy cercano y sobrealimentarlas pueden llegar a ser los más afectados, al considerarse a la

paloma como un agente transmisor de enfermedades zoonóticas , por lo cual se deben diseñar esquemas de protocolos para realizar un aislamiento e identificación de estos patógenos entéricos en heces de palomas en la ciudad de La Paz, especialmente en la Plaza Murillo.

1.3 JUSTIFICACION

La presente investigación está referida al estudio del porcentaje de patógenos entéricos provenientes de materia fecal de palomas de la Plaza Murillo, al considerarse estas como un agente transmisor de enfermedades zoonóticas, lo que permitirá diseñar y aplicar esquemas de protocolos adecuados para el aislamiento e identificación de estos gérmenes, y de esta manera tomar medidas adecuadas, las cuales irán en directo beneficio de la población.

La motivación para esta investigación está basada en la conciencia que debemos tener los profesionales en Salud, las Autoridades de Salud y Medio Ambiente, puesto que después de no haber encontrado información en nuestro medio sobre el tema, y solo contar con algunas publicaciones de diferentes partes del mundo, las cuales no indican la existencia de patógenos entéricos en heces de palomas, especialmente *Salmonella* y especies de *Escherichia coli*; es que se plantea realizar el estudio en dicha población, lo cual nos va a permitir conocer el porcentaje de microorganismos patógenos en heces de palomas.

Así mismo los datos microbiológicos que aportará la presente investigación, permitirán ampliar, actualizar y dar a conocer a la población en general sobre el riesgo que corre nuestra ciudad y en especial nuestra salud con estas palomas, ya que estas son consideradas como reservorios de agentes patógenos causantes de patologías gastrointestinales; y a la vez servirán también para que las Autoridades de Salud y Medio Ambiente y el personal de Zoonosis tomen medidas sobre el problema de la superpoblación de palomas en especial en la Plaza Murillo, ya que este es un lugar muy concurrido, en especial por niños los fines de semana, los cuales son los más afectados por patologías como son las diarreas.

1.4. MARCO TEORICO.

1.4.1. LAS PALOMAS.

Existen muchas especies de palomas, la mayoría viven en el campo, unas pocas especies se han adaptado al ambiente de las ciudades (Zenaidura y Columba). La especie de paloma de la ciudad mas dañina es la paloma *Columba livia* domesticada.

Típicamente tienen el cuerpo gris (variantes del gris al blanco, tostado y negro), dos barras negras en las plumas alares secundarias, banda negra ancha en la cola, patas rojas; peso promedio 370 gramos, longitud promedio 28 cm. Su vida depende del alimento y los lugares que los seres humanos les proveen, muchas veces inadvertidamente.

Las palomas son mayormente granívoras e insectívoras; sobreviven de granos sueltos; también se alimentan de basuras, excremento de cuadrúpedos domésticos, completando su dieta con invertebrados. Las palomas sobreviven dentro de desvanes, campanarios, cuevas, árboles y arbustos.

Se reproducen en cualquier época de año, con reproducción mas frecuente en la primavera y verano. Son monógamas. Entre 8 a 12 días después del cruzamiento, las hembras dejan entre uno a dos huevos blancos (de 39 mm de longitud), los dos sexos incuban, la incubación dura 16 a 19 días, los pollos son cuidados por una semana y tienen la capacidad de volar a los 25 o 26 días de edad. Los pollos salen del nido a los 35 o 37 días de edad. La reproducción se da todo el año. Se ha documentado hasta 5 nidadas en un año. Es capaz de reproducirse a los 6 meses de edad. Los polluelos son alimentados con "leche" que resulta de la digestión parcial del alimento comido y regurgitado por cualquiera de los padres.

En cautiverio las palomas viven unos 15 años pero, en la naturaleza, rara vez superan los 4 años (causa= depredación, enfermedad, estrés por falta de alimento y de agua).

Varios tipos de daños son reportados: como la acumulación de excrementos que ensucian y aceleran el deterioro de edificios, estatuas y autos, y que caen sobre molestando a peatones distraídos.

Las palomas y sus excrementos pueden diseminar los patógenos que causan la ornithosis de las palomas, encefalitis, la enfermedad de Newcastle, Cryptococcosis, Toxoplasmosis, Colibacilosis y Salmonelosis. En el excremento puede haber esporas del hongo causante de la histoplasmosis. Los ectoparásitos de las palomas incluyen pulgas, piojos, ácaros garrapatas que pueden picar a seres humanos; algunos insectos que viven en los nidos, pueden a su vez ser dañinos a telas, alfombras y otros enseres.²

1.4.1.1. Anatomía.

La anatomía de las aves es un ejemplo de economía de huesos, músculos y órganos que no son necesarios. Carecen de una larga columna vertebral; no tienen dientes; su aparato urinario se halla reducido a los riñones y en cuanto a su aparato reproductor, también tienen solo los ovarios, ya que su orina la arrojan a través de la cloaca y por lo que hace a los huevos igualmente los expelen por medio de la terminación de su aparato digestivo.³

1.4.1.2. Sistema digestivo de aves

En las aves están ausentes los dientes, la amilasa salival está siempre presente y también se encuentra una pequeña cantidad de lipasa, la función de la lengua consiste en la presión, selección y

deglución de los alimentos, el esófago es algo amplio y dilatado, sirviendo así para acomodar los voluminosos alimentos sin masticar, está presente un buche bien desarrollado que cumple las funciones de almacenamiento del alimento para el remojo, humectación y maceración de los alimentos, acá en el buche no se absorben sustancias tan simples como agua, cloruro de sodio y glucosa, la duración promedio del tiempo que tiene el alimento en el buche es de dos horas; el estómago glandular segrega ácido clorhídrico y pepsina; el estómago muscular o molleja es particularmente fuerte y bien desarrollada en las aves granívoras, sin embargo este órgano no es absolutamente indispensable para la vida, su función principal consiste en el aplastamiento y pulverización de granos, cedidos por el buche y su eficacia se incrementa por la presencia en su interior de pequeños guijarros que ingiere el animal y que pueden ser considerados como sustitutos de los dientes; el intestino delgado se extiende desde la molleja al origen de los ciegos; el ciego tiene la función de absorción, en el colon se realiza la absorción de agua y proteínas de los alimentos que ahí llegan.⁴

1.4.2. FLORA NORMAL GASTROINTESTINAL .

1.4.2.1. En granívoras:

Bacterias Gram positivas en el 90%: *Bacillus*. *Lactobacillus*.
Streptococcus y *Staphylococcus*.

Bacterias Gram negativas escasas.

Levaduras (Gram positivas), escasas y sin crecimiento.⁵

1.4.2.2. Enfermedades de las Aves Transmisibles a los Humanos

1.4.2.2.1. Introducción

Los productores de pollos y gallinas así como de aves deben estar concientes que algunas enfermedades de las aves pueden ser transmitidas a los humanos. Es importante hacer notar, sin embargo, que tales enfermedades no son tan comunes como para desalentar a los productores de aves.

Para la mayoría de la gente las enfermedades de las aves no son cosa seria, pero los productores de aves deben de estar alertas y buscar asistencia médica si es necesario.

Zoonosis se refiere a enfermedades infecciosas de animales que se pueden transmitir a los humanos. Los agentes infecciosos pueden ser protozoarios, hongos, bacterias, clamidias o virus. La susceptibilidad individual y la seriedad de estas infecciones por microbios varia con la edad, estado de salud, estado inmunitario y aun cuando la intervención de terapia temprana es solicitada. La habilidad de los microorganismos para hacer que una persona se enferme varía de acuerdo a la virulencia del organismo, las dosis a la cual la persona es expuesta, así como la ruta de infección.

La clamidiosis, salmonelosis, arizonosis y colibacilosis son las infecciones más comunes. Clamidiosis, salmonelosis, encefalitis equina del este y tuberculosis aviar pueden ser enfermedades muy serias y aun de tratamiento de por vida.

1.4.2.2.2. ENTEROBACTERIAS.

Las enterobacterias están presentes en menor cantidad en la flora bacteriana normal intestinal en granívoras que en otras aves.

Dentro de este grupo están: *E. Coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Yersinia*.⁶

1.4.2.2.3. Características biológicas.

1.4.2.2.3.1. *Escherichia*: Por lo general, la *Escherichia coli* ocasiona reacciones positivas para el indol, lisina descarboxilasa y fermentación del manitol, y produce gas a partir de la glucosa. Más de 90% de las *Escherichia coli* aisladas son positivas para glucuronidasa con el empleo del sustrato 4-metilumbeliferil- -glucurónido (MUG). Los aislados de otros sitios anatómicos diferentes del aparato urinario, con propiedades características (además de las pruebas negativas de oxidasa) casi siempre se confirman como *Escherichia coli* mediante una prueba MUG positiva.

1.4.2.2.3.2. Estructura antigénica.

Las enterobacteriáceas poseen una compleja estructura antigénica. Se han clasificado más de 150 diferentes antígenos somáticos **O** (lipopolisacáridos) termoestables, más de 100 antígenos **K** (capsulares) termolábiles, y más de 50 antígenos **H** (flagelares).

Los **antígenos O** son la parte mas externa de la pared lipopolisacárida de la célula y constan de unidades repetitivas de polisacáridos. Algunos polisacáridos O contienen azúcares únicos. Los antígenos O son resistentes al calor y al alcohol, generalmente se detectan mediante aglutinación bacteriana. Los

anticuerpos a los antígenos O son predominantemente de clase IgM. Aunque cada género de enterobacteriáceas se asocia con grupos específicos O, un solo microorganismo puede ser portador de varios antígenos O. En ocasiones, los antígenos O pueden asociarse con enfermedad humana específica, por ejemplo, la *Escherichia coli* de tipos O específicos se encuentra en algunos casos de diarrea y en infecciones del aparato urinario.

Los **antígenos K** son antígenos O externos sobre algunas, pero no todas, las enterobacteriáceas. Algunos son polisacáridos, incluso los antígenos K de la *E. coli*; otros son proteínas.

Los **antígenos H** se localizan sobre los flagelos y se desnaturalizan o retiran mediante calor o alcohol. En las variedades de bacterias dotadas de motilidad se les puede conservar mediante tratamiento con formalina. Estos antígenos H se aglutinan con anticuerpos H, principalmente IgG. Los determinantes de los antígenos H son una función de la secuencia de aminoácidos en la proteína flagelar (flagelina).

1.4.2.2.3.3. Enfermedades diarreicas asociadas con *Escherichia coli*.

La *Escherichia coli* causante de diarrea es muy común en todo el mundo. Estas *Escherichia coli* se clasifican por las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en los plásmidos. De manera similar, con frecuencia las toxinas son mediadas por plásmidos o por fagos.

Existen varias categorías de *Escherichia coli* asociados a diarrea:

- *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)
- *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)
- *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)
- *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *Escherichia coli* enteroadherente agregativa (EAaggEC)
- *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC)

1.4.2.2.3.4. *E. coli* enterotoxigénica (ECET)

En los países en desarrollo las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) causan diarrea en niños, en especial en los menores de dos años y en los viajeros que pasan de áreas industrializadas a esos países. Es causa común de la “diarrea del viajero” y agente etiológico importante de diarrea en lactantes de los países en desarrollo.

Factores específicos de colonización de la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) promueven en humanos la adherencia a las células epiteliales del intestino delgado. Algunas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) producen una **exotoxina termolábil** (LT) (PM 80000) bajo control genético de un plásmido. Su subunidad B se une al gangliósido G m1 del borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado y facilita la entrada de la subunidad A (PM 26000) a la célula, donde activa la adenililciclase. Esto incrementa notablemente la concentración local del monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), que a su vez produce hipersecreción intensa y prolongada de agua y cloruros e inhibe la reabsorción de sodio. La luz intestinal se distiende con el

líquido y sobrevienen aumento de la peristalsis y diarrea que duran varios días.

Las personas residentes en regiones donde estos microorganismos son prevalentes (p.ej., algunos países en desarrollo) tal vez poseen anticuerpos y son menos susceptibles a sufrir diarrea con las nuevas exposiciones a la *Escherichia coli* productora de exotoxina termolábil (LT).

Algunas cepas de la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) producen la **enterotoxina termoestable ST_a** (PM 1 500 a 4 000) bajo control genético de un grupo heterogéneo de plásmidos. La ST_a activa la guanililciclase en las células epiteliales entéricas y estimula la secreción de líquido. Una segunda enterotoxina termoestable, la ST_b, estimula la secreción independiente de un nucleótido cíclico con acción de inicio breve *in vivo*. Muchas cepas positivas a ST_a también producen LT. Las cepas con ambas toxinas producen diarrea mas grave. Los plásmidos portadores de los genes para enterotoxinas (LT, ST) también pueden portar genes para factores de colonización que facilitan la adhesión de las cepas de *Escherichia coli* al epitelio intestinal.

Factores de colonización reconocidos se presentan con particular frecuencia en algunos serotipos. Ciertos serotipos de la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) se encuentran en todo el mundo; otros presentan distribución limitada. Potencialmente cualquier *Escherichia coli* puede adquirir un plásmido que codifique para una enterotoxina.

Se recomienda cautela en la selección y consumo de alimentos potencialmente contaminados con *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) para ayudar a prevenir la diarrea del viajero.

La profilaxia antimicrobiana puede ser eficaz, pero a veces incrementa la resistencia bacteriana a los antibióticos y tal vez no debe recomendarse en todos los casos. Una vez presente la diarrea, el tratamiento con antibióticos reduce de manera eficaz la duración de la enfermedad.⁷

Cuadro 1. Comparación de cuatro clases de *Escherichia coli* que causan diarrea

Clases de <i>E. coli</i>	Síndromes clínicos	Síndromes epidemiológicos	Serogrupos O más comunes	Relación con los enterocitos	Elaboración de toxinas	Plásmidos (tamaño)
Enterotoxigénica (ECET)	Deposiciones líquidas	Diarrea en países subdesarrollados; diarrea en adultos turistas	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128, O148, O159, O168, O169	Se adhiere por fimbrias, sin causar cambios morfológicos	Enterotoxina termolábil (LT) y/o termoestable (ST)	Si (30-70 Mdalton)
Enteroinvasora (ECEI)	Deposiciones con moco y sangre	Adultos afectados usualmente; algunos brotes de origen alimentario.	O28, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152, O164	Invaden y se multiplican dentro de los enterocitos; causan infiltración polimorfonuclear	Parecida a toxina de Shigella	Si (140 Mdalton)
Enterohemorrágica (ECEH)	Deposiciones sanguinolentas ; colitis hemorrágica	Brotos de origen alimentario	O157, O266	No invaden, adherencia mediada por fimbrias es un paso preliminar seguido por disolución de las microvellosidades	Parecida a toxina de Shigella	Si (70 Mdalton)
Enteropatógena (ECEP)	Deposiciones líquidas. Diarrea aguda y persistente	Brotos de diarrea en salas de recién nacidos; epidemias de diarrea infantil y esporádicas en comunidades; raramente diarrea en adultos	O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142	La bacteria se adhiere íntimamente a los enterocitos resultando en pérdida de microvellosidades y copamiento de la membrana alrededor de las bacterias	Parecida a toxina de Shigella	Si (55-60 Mdalton)

(OPS, Manual de Tratamiento de la diarrea, 1987) ⁸

1.4.2.2.3.5. COLIBACILOSIS

La colibacilosis es una infección causada por *Escherichia coli*, esta es una bacteria que normalmente habita el tracto intestinal de todos los animales. *Escherichia coli* es un huésped ordinario del tracto intestinal. Se convierte en patógeno cuando sus colonias proliferan de forma excesiva, como consecuencia de:

- a) Bebida de aguas contaminadas por excrementos, o por comer verduras regadas por aguas contaminadas.
- b) Por alteraciones digestivas; cambio de alimentación.
- c) Transmitido por el alimento contaminado que los padres embuchan a los pollos.

Generalmente esta enfermedad en las aves adultas no resulta mortal, ya que se desarrolla de una forma crónica, aunque pueden aparecer complicaciones con la proliferación de otras bacterias más patógenas como *Salmonella*.

Sin embargo, la *Escherichia coli* puede afectar en su forma aguda a los pichones durante los primeros días de vida, convirtiéndose en una enfermedad extremadamente violenta.

¿Cuáles son los síntomas en las aves?

Cuando el pájaro es adulto y padece la enfermedad de forma crónica se aprecian diarreas y abatimiento del pájaro.

En los pollos, en los primeros días de vida, las principales manifestaciones externas son que éstos empiezan a adelgazar, y se denota una gran palidez en la piel, en las mucosas, en el interior de la boca, el pico. El cuello se muestra delgado, en forma

de interrogación. Los intestinos se transparentan y se notan inflamados.

Es muy significativo encontrar los nidos mojados de las heces diarreicas de estas aves y ver cómo la madre está muy sucia.

Las aves mueren en unos dos días y el aspecto es cianótico, también se observa la acumulación de heces en la zona de la cloaca.

¿Cuáles son los síntomas en humanos?

Los humanos con colibacilosis usualmente manifiestan diarrea que puede complicarse con otros síndromes dependiendo del serotipo de *Escherichia coli*. Estas complicaciones pueden incluir fiebre, disentería, shock, y púrpura (pequeñas hemorragias múltiples en la piel y en las membranas de las mucosas). El periodo de incubación es de 12 horas a 5 días, aunque lo más común es de 12-72 horas. La transmisión es vía fecal-oral.

En la mayoría de los casos, en el tratamiento sintomático se requiere de fluidos y antidiarreicos. En infecciones más severas, los antibióticos tales como la tetraciclina y cloranfenicol pueden ser necesarios.⁹

1.4.3. DIAGNOSTICO SEROLOGICO.

Las pruebas serológicas constituyen un método de diagnóstico indirecto al detectar en el suero del paciente los anticuerpos formados frente al microorganismo causante de la infección.

Para detectar los anticuerpos, se enfrenta *in Vitro* una muestra de suero del paciente al microorganismo que se sospecha que esta causando la infección para ver si se produce una reacción antígeno - anticuerpo que constata la presencia de anticuerpos frente al organismo. La reacción antígeno - anticuerpo puede evidenciarse por distintas técnicas semejantes a las descritas para la detección de antígeno. Un aspecto importante es que la mayoría de estas pruebas permiten cuantificar, de un modo más o menos preciso, los anticuerpos existentes en el suero.

Las pruebas serológicas tienen una complejidad intrínseca variable. El tiempo requerido para su realización también es variable, pero la mayoría están automatizadas. Ello no obsta para que la elección de las pruebas y de las técnicas más adecuadas para el diagnóstico en cada caso, así como la interpretación de los resultados, deba depender directamente de un especialista experimentado.

Las pruebas serológicas, como ocurría en el caso de la detección de antígeno, requiere disponer de una hipótesis diagnóstica relativamente precisa, ya que el suero del paciente, por razones técnicas y económicas, no puede enfrentarse arbitrariamente a los numerosos microbios que pueden causar infección al hombre, sino a uno o unos pocos de entre los que, con mayor probabilidad, puedan estar causando la infección que se trata de diagnosticar. Así mismo, la interpretación de los resultados no debe desvincularse de los datos clínicos y epidemiológicos del enfermo, como en cualquier otro ámbito del diagnóstico microbiológico.

Las pruebas serológicas más utilizadas son las de aglutinación, inmunofluorescencia (IF) y enzimo inmunoanálisis (EIA).

1.4.3.1. Pruebas para la detección de anticuerpos totales.

1.4.3.1.1. Pruebas de aglutinación directa.

En estas pruebas se utilizan antígenos particulados; es decir, el antígeno forma parte de la superficie de microorganismos de gran tamaño (bacterias y protozoos). El antígeno se prepara como una suspensión de microorganismos, la cual tiene un aspecto lechoso y homogéneo. Al enfrentarla al suero del paciente, si en el hay anticuerpos frente a los antígenos las partículas microbianas aglutinan. Cuando la prueba se realiza en un tubo de ensayo, se produce un patrón de aglutinación característico (con el sobrenadante transparente) y al resuspender el sedimento se forman abundantes grumos.

Cuando la reacción se ha practicado en micropocillos (placas tipo "microtiter"), el patrón de aglutinación es diferente: un sedimento amplio y granulado significa reacción positiva (aglutinación) y un botón puntiforme central, reacción negativa. Estas pruebas pueden requerir hasta 18 horas de incubación.

La aglutinación también puede realizarse directamente sobre un portaobjetos, enfrentando la suspensión bacteriana al suero del enfermo; para facilitar la lectura, las bacterias pueden colorearse como en el rosa de Bengala, método empleado para el diagnóstico serológico de la brucelosis. Esta técnica en concreto resulta sencilla, rápida (minutos), sensible y específica.

Algunos anticuerpos de la clase IgG son poco aglutinantes porque tienen un pequeño tamaño y las partículas (antígenos) que se unen a cada uno de los brazos reactivos (Fab) quedan muy próximas entre sí. Si estas partículas poseen una carga eléctrica elevada, se repelen energicamente debido a su proximidad,

impidiendo la aglutinación; lo que no sucede con la IgM por su mayor tamaño. Las IgG también pueden ser más aglutinantes cuando tienen las ramas Fab cerradas, y no pueden hacer de puente entre las partículas antigénicas. Como en los dos casos anteriores, los anticuerpos se unen al antígeno, pero no forman puentes; una Ig de cabra anti – IgG humana permite establecer el puente y producir la aglutinación. Esta técnica es la prueba de Coombs.

1.4.3.1.2. Pruebas de aglutinación pasiva o indirecta.

Los antígenos solubles, que son macromoléculas libres, por su pequeño tamaño no pueden aglutinar directamente, pero pueden fijarse a la superficie de partículas como látex, gelatina, liposomas, hematíes, polipéptidos o partículas de sílice o carbón de un tamaño entre 1 y 7 μm que actúan como soportes inertes, lo que permite evidenciar la aglutinación macroscópicamente. Estas reacciones se pueden realizar tanto sobre un portaobjetos como en pocillos de placas de "microtiter". En el primer caso, suelen ser técnicas cualitativas, como por ejemplo, la técnica de látex empleada para detectar anticuerpos, frente a la rubéola o el RPR (*rapid plasma reagin*), prueba no treponémica empleada para el cribado de la sífilis, que emplea partículas de carbón como soporte de un antígeno cardiolipídico. Al igual que en la aglutinación directa, las pruebas cuantitativas suelen realizarse en pocillos, como en el caso de la hemaglutinación pasiva (hematíes con antígeno treponémico) para el diagnóstico de la sífilis, o la aglutinación indirecta empleada para detectar anticuerpos frente al micoplasma, que utiliza como soporte partículas de gelatina coloreadas.¹⁰

1.4.4. EL DETERIORO DE MONUMENTOS NACIONALES.

Los monumentos como los Palacios Ejecutivo y Legislativo, la Catedral, la Basílica de San Francisco, las estatuas de la Plaza Murillo y muchas otras más sufren el efecto del nitrato de potasio presente en los excrementos (heces fecales) de las palomas. El nitrato de potasio ocasiona un deterioro paulatino en la piedra, metales y cemento de las obras de arte y si bien se realiza periódicamente tareas de limpieza, no se puede escapar de la acción química inmediata de las heces.

El nitrato de potasio origina otra reacción química cuando al combinarse, gracias a la acción de la lluvia, con los gases emanados del transporte automóvil se convierte en escurecimientos sulfurosos, dañando aún más severamente los materiales.

Por otra parte, los cuerpos muertos y el desprendimiento de plumas ocasionan el taponamiento de bajantes pluviales y la rotura de cubiertas.¹

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

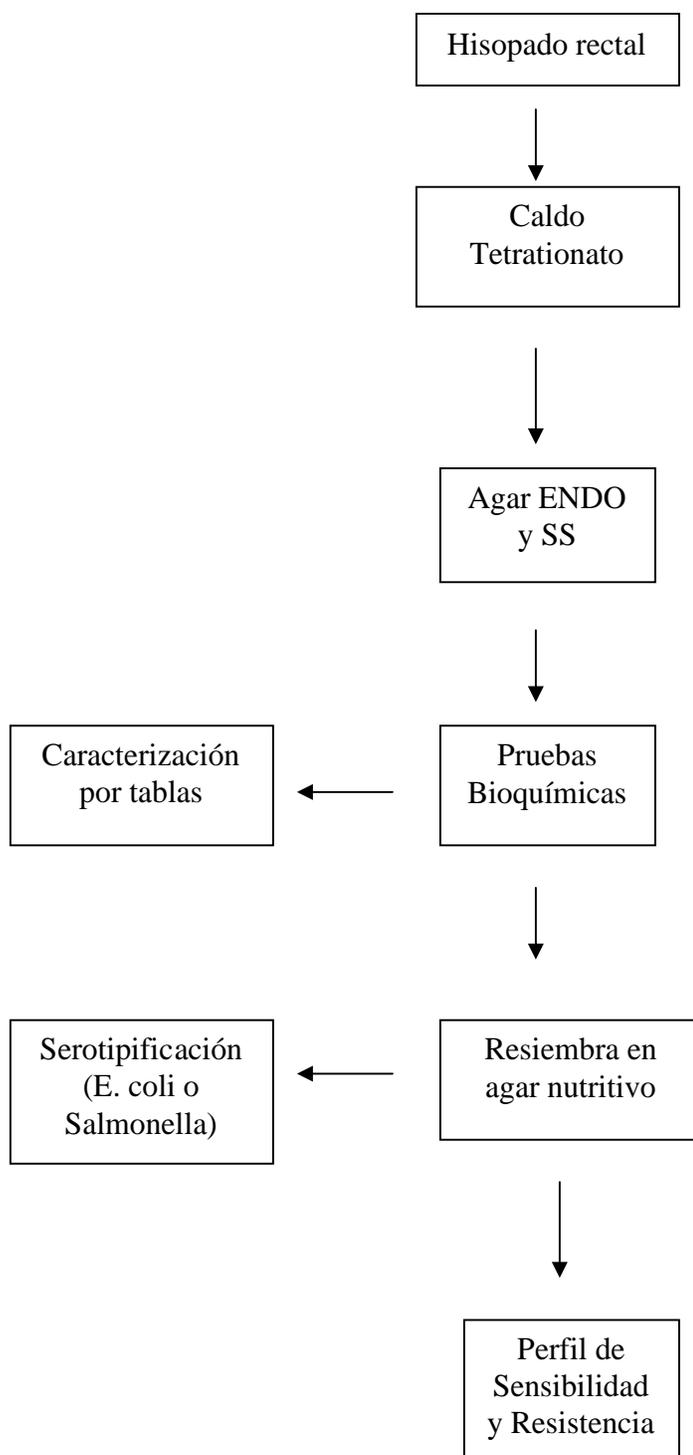
Determinar el porcentaje de patógenos entéricos en heces de palomas de enero a marzo del 2006 en la ciudad de La Paz.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar el porcentaje de microorganismos entéricos patógenos y no patógenos (flora normal).
- Determinar el porcentaje de especies patógenas por medio de serología.
- Identificar el perfil de resistencia a antibióticos de las especies enteropatógenas por medio de la prueba de difusión de Bauer-Kirby.

3. DISEÑO METODOLOGICO

3.1. MODELO TEORICO.



3.2. POBLACION.

Las unidades de análisis en el presente estudio fueron 64 muestras de heces de palomas que se recolectaron por medio de hisopado rectal al azar en la Plaza Murillo de la ciudad de La Paz; las que fueron procesadas en la sección de Bacteriología del Instituto de Gastroenterología Boliviano – Japonés. El tamaño muestral se realizó mediante un muestreo de tipo no probabilístico y por conveniencia.

3.3. METODOS DE INVESTIGACION.

3.3.1. TIPO DE INVESTIGACION.

El estudio realizado es de tipo **descriptivo**, **prospectivo** y **transversal** porque proporcionará información sobre nuestra población, de acuerdo a los criterios propuestos en la presente investigación y la variable será procesada en un momento dado.

3.3.2. METODOS, TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES.

- La toma de muestra se realizó en palomas de la Plaza Murillo mediante un hisopado rectal para obtener materia fecal y luego poner este hisopo en caldo Tetratonato y llevar a incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 – 24 h.
- Luego de esta incubación se realizó la siembra de los mismos en agar ENDO y SS para llevar a incubación a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h.
- Pasadas las 24 h según el aspecto y características de las colonias sospechosas se procedió a la tipificación de los

microorganismos por medio de pruebas bioquímicas para poder clasificar a la bacteria encontrada.

- Una vez identificados los microorganismos se realizaron pruebas de serología en caso de *Escherichia coli*.
- Completada la identificación de las bacterias se les realizó los antibiogramas, para luego guardar las muestras.

3.3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

3.3.3.1. MATERIALES Y EQUIPOS.

- | | |
|---|-------------------------------------|
| ▪ Balanza analítica SARTORIUS (MC 1 Laboratory LC 220 S) JICA | ▪ Placas Petri. |
| ▪ Incubadora (27°C-37°C) EYELA (SOFT INCUBATOR SLI-1000ND) y SAKURA TOKYO JAPAN (INCUBATOR IF-3B) JICA | ▪ Pipetas de vidrio (5, 10 y 20 mL) |
| ▪ Autoclave (121°C) SAKURA (NEOCLAVE ASV-3022) JICA | ▪ Probetas (50, 100 y 200 mL) |
| ▪ Refrigerador (4°C) TOSHIBA (SF 491 J 3) e HITACHI (R – 643 M) Cooperación técnica por el Gobierno del Japón (JICA) | ▪ Matraz Erlen Meyer (500 mL) |
| ▪ Baño María. | ▪ Pinza estériles. |
| | ▪ Hisopos estériles. |
| | ▪ Mechero. |
| | ▪ Asa bacteriológica. |
| | ▪ Aguja bacteriológica. |
| | ▪ Tubos de ensayo. |
| | ▪ Gradillas. |
| | ▪ Portaobjetos. |
| | ▪ Regla o calibre. |
| | ▪ Tubos con tapa rosca. |
| | ▪ Propipetas. |

3.3.3.2. MEDIOS DE CULTIVO.

- Caldo TETRACIONATO.
- Agar ENDO.
- Agar SS.
- Agar CLED.
- Agar NUTRITIVO.
- Agar MUËLLER-HINTON.
- TSI.
- CITRATO.
- SIM.
- LIA.
- MIO.
- VP.
- UREA.

3.3.3.3. REACTIVOS.

- Agua destilada.
- Solución fisiológica.
- Escala 0.5 Mac-Farland.
- Reactivo de Kovac`s.
- Solución de Lugol.
- Solución de hidróxido de potasio al 40%.
- Solución de -naftol.
- Antisueros para *Escherichia coli*. (Antisueros *Escherichia coli*: Antisera No. I (test) No. Catálogo 312001, Antisueros O, No. Set 1470. Denka Seiken Co. Ltda.-Japón)
- Discos de antibióticos:
 - Ampicilina (Amp) 10 µg *Repycotec*
 - Cefotaxime (CTX) 30 mcg *Bioanalyse*
 - Ciprofloxacina (CIP) 5 mcg *Bioanalyse*
 - Gentamicina (CN) 10 mcg *Bioanalyse*
 - Imipenem (IPM) 10 µg *BBL*
 - Sulfamethoxazole-Trimethoprim (SXT) 23.75 µg 1.25 µg *BBL*

3.3.4. PROCEDIMIENTOS.

1ª. Sesión.

Se preparó todo el material a ser usado: esterilización de hisopos, se prepararon los reactivos de Kovac's, -naftol, hidróxido de potasio, solución de lugol, caldo Tetrionato, agar ENDO y SS y toda la batería de pruebas bioquímicas (TSI, CITRATO, SIM, LIA, MIO, VP y UREA) (**VER ANEXO Nº 1**).

2ª. Sesión.

Se fue al lugar de la toma de muestra (Plaza Murillo) y con la ayuda de Zoonosis se realizó ahí mismo el hisopado rectal a las palomas (**VER ANEXO Nº 2**) y luego se llevo este hisopo a caldo Tetrionato con 3 gotas de solución de lugol para llevar a laboratorio e incubar a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h.

3ª. Sesión.

Pasadas las 24 horas se procedió a la siembra del caldo Tetrionato a medios selectivos como agar ENDO y SS para nuevamente llevar a incubación a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h.

4ª. Sesión.

Al día siguiente según el aspecto y las características de las colonias crecidas en los medios selectivos se eligieron diferentes colonias aisladas para realizar pruebas bioquímicas y llevar a incubación a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h.

5ª. Sesión.

Luego de estas 24 h. por medio de tablas se procedió a la caracterización de los microorganismos y dependiendo de esto se hizo la resiembra de los microorganismos sospechosos del medio TSI en agar nutritivo y se llevo a incubación a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h. (**VER ANEXO Nº 1**).

6ª. Sesión.

Al día siguiente se realizaron las diferentes pruebas de serología (para *Escherichia coli*) para completar la tipificación de las bacterias encontradas. Se marcaron líneas gruesas utilizando marcadores indelebles dividiendo el portaobjetos en una serie de casillas; en la primera casilla se colocó una gota de solución salina, que sirve como control negativo y sirve de referencia en caso de observarse autoaglutinación; el antisuero en la próxima casilla y así sucesivamente; para luego tomar una pequeña cantidad de microorganismos con un asa estéril y depositarlos cerca de la gota del antisuero. El antisuero con la muestra, al igual que la solución fisiológica con la muestra, son completamente mezcladas con el asa realizando movimientos anteroposteriores, hasta una homogenización total sobre la superficie del portaobjetos. La aglutinación se produce rápidamente en pocos minutos y hay poco riesgo de que la muestra se seque en ese tiempo. Examinar la aglutinación evidente comparando cada una con el control. Una aglutinación evidente, si se halla presente, debería observarse dando la apariencia a simple vista. Después de la lectura de resultados, los portaobjetos que utilizados fueron sumergidos en solución desinfectante. Identificadas ya las especies patógenas con la ayuda de la tabla del **Anexo Nº.3** éstas nuevamente se resembraron en agar nutritivo para llevar a

incubación a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 hrs. para realizar al día siguiente el perfil de resistencia.

7ª. Sesión.

Se preparó ese mismo día agar Mueller-Hinton (**ANEXO Nº 1**) dependiendo de la cantidad de microorganismos patógenos encontrados y se llevó a atemperar el medio mientras se preparaba una suspensión con las colonias crecidas en agar nutritivo en agua estéril para comparar a la escala 0.5 de Mac-Farland. Dos horas previas a esto los discos de antibióticos ya estaban a temperatura ambiente. Una vez hecho todo se homogenizó el inóculo y se empapó un hisopo estéril en la solución que se preparó a 0.5 de Mac-Farland y se hizo rotar por las paredes del tubo para eliminar el excedente, luego se sembró suavemente sobre la superficie del medio en tres direcciones, haciendo girar la caja Petri en un ángulo de 65° , esto permitió una distribución homogénea del inóculo y se esperó 5 minutos, pasados estos se procedió a poner los discos de antibióticos con una distancia entre disco y disco de 2.5 cm y de disco al borde de la caja de 2 cm aproximadamente y nuevamente se esperaron otros 5 minutos para luego recién llevar a incubación las placas en forma invertida a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 hrs.

8ª. Sesión.

Al día siguiente con la ayuda de una regla se midieron los halos presentados y por medio de tablas de la NCCLS (**Anexo Nº. 4**) se reportaron los resultados de Sensibilidad y Resistencia. Y como paso final se procedió a redactar los resultados, discusión y conclusiones.

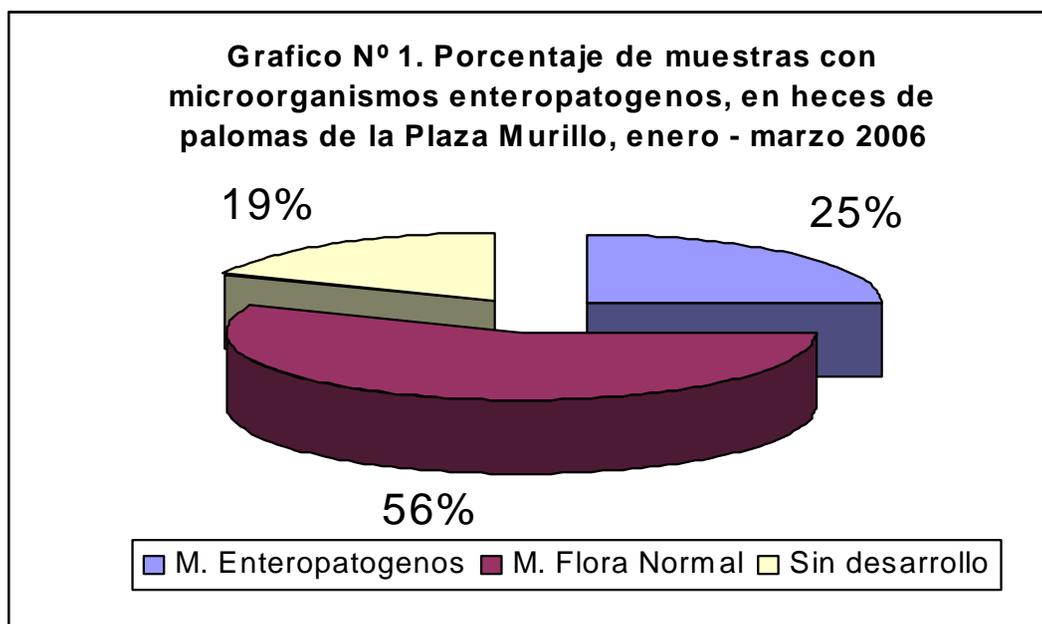
4. RESULTADOS

4.1. RESULTADO GENERAL.

La población estudiada estuvo comprendida por 64 muestras de heces de palomas, de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro N° 1. Porcentaje de muestras con microorganismos enteropatógenos, en heces de palomas de la Plaza Murillo, enero - marzo 2006

Indicador	n_i	h_i	$h_i * 100$ (%)
Microorganismo.			
M. Enteropatógenos	16	0,25	25
M. Flora Normal	36	0,56	56
Sin desarrollo	12	0,19	19
Total	64	1	100



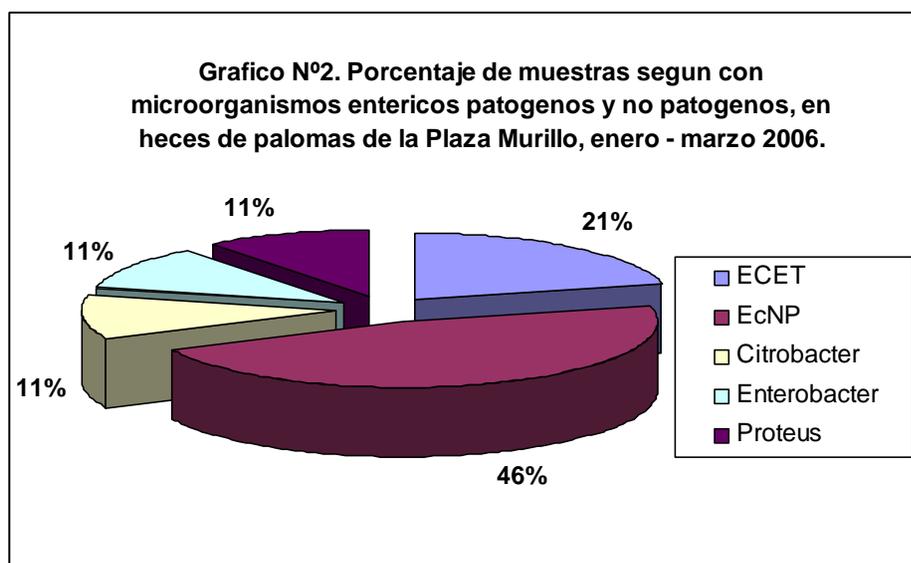
Como se puede observar en el Cuadro y Grafico N° 1, se determinó que el 25 % de las muestras en estudio presentaron microorganismos enteropatógenos (*E. coli* enterotoxigenica), además se pudo determinar que el 56 % correspondía a microorganismos de la flora normal y en el restante 19 % no hubo desarrollo.

4.2. RESULTADOS ESPECIFICOS.

Cuadro N° 2. Porcentaje de muestras según microorganismos entericos patógenos y no patógenos, en heces de palomas de la Plaza Murillo, enero - marzo 2006

Indicador Microorganismo.	n _i	h _i	h _i *100 (%)
ECET	16	0,21	21
EcNP	36	0,47	47
Citrobacter	8	0.107	10,7
Enterobacter	8	0.107	10,7
Proteus	8	0.107	10,7
Total	76	1,001	100

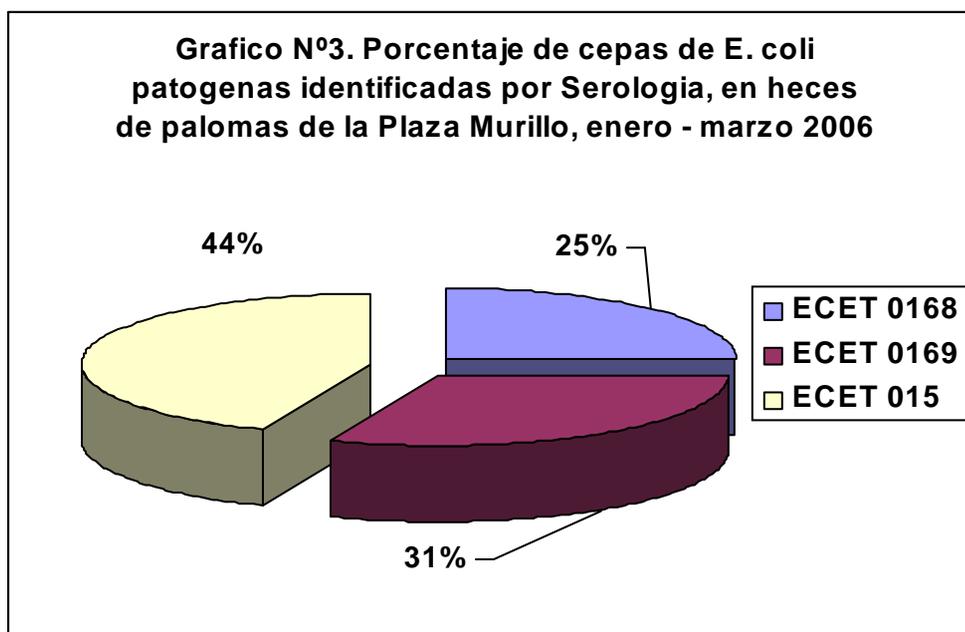
ECET: *Escherichia coli* enterotoxigenica; EcNP: *Escherichia coli* no patógena; Fuente: Datos obtenidos durante la investigación



Entre las especies patógenas se determinó solo una especie: *Escherichia coli* enterotoxigenica (21%), en relación a las no patógenas de las cuales se determinó: *Escherichia coli* No patógena 46%, *Citrobacter sp*11%, *Enterobacter* 11% y *Proteus sp*11%. Se debe mencionar que en muchos de los casos las especies no patógenas se encontraban acompañando a la especie patógena.

Cuadro N° 3. Porcentaje de especies de *E. coli* patógenas identificadas por Serología, en heces de palomas de la Plaza Murillo, enero - marzo 2006

SEROGRUPO	Antisero polivalente	Antisero monovalente	n_i	h_i	$h_i * 100$ (%)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica	IV	0168	4	0,25	25
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica	VI	0169	5	0,31	31
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica	VI	015	7	0,44	44
Total			16	1	100



De las 16 muestras patógenas aisladas que se identificaron por serología, el 100% pertenece a la especie *E. coli* enterotoxigenica (Antiseros polivalentes IV y VI) de las cuales el 44 % pertenecían al serogrupo O15, el 31 % al serogrupo O169 y el 25 % al serogrupo O168. **(VER ANEXO N° 3)**

Cuadro N° 4. Perfil de resistencia de las especies enteropatógenas identificadas por el método Kirby Bauer, en heces de palomas de la Plaza Murillo, enero - marzo 2006.

Microorganismo patógeno	n_i	Amp	GEN	SXT	IPM	CIP	CTX
ECET 0168	4	R	I	S	S	S	S
ECET 0169	5	R	I	S	S	S	S
ECET 015	7	R	I	S	S	S	S

Se identificó que del total de muestras patógenas aisladas, las 16 muestras presentaron: Resistencia a la Ampicilina (Amp), Resistencia Intermedia a la Gentamicina (GEN) y Sensibilidad a Sulfametoxazol - Trimetoprim (SXT), Imipenem (IPM), Ciprofloxacina (CIP) y Cefotaxime (CTX). **(VER ANEXO N° 4)**

5. DISCUSION.

Es importante la información existente en la actualidad acerca del rol que juega *Columba livia* y otras especies de palomas como agente transmisor de enfermedades; no se puede negar el papel que juega como vector de enfermedades infecciosas.

Hay considerables pruebas científicas de que las palomas son las "ratas voladoras" de nuestras ciudades, el espectro de organismos causantes de enfermedades asociados con estas aves es muy parecido al que se encuentra con las ratas, por ejemplo los microorganismos causantes de salmonelosis, toxoplasmosis y neumonía, las palomas son también portadoras de arañuelas y garrapatas que migran desde los áticos y otros sitios donde están los nidos causando alergias y otras enfermedades.

Hoy en día las enfermedades transmisibles presentan altas tasas de mortalidad en la ciudades capitales como se indica en el Programa Especial de Análisis de Salud emitido por la OPS / OMS en el año 2003 en Bolivia . Las enfermedades producidas por enteropatógenos producen un elevado porcentaje de morbilidad y en el presente estudio se pudo determinar que las heces de palomas constituyen un importante foco de infección para el ser humano.

En la presente investigación el porcentaje de contaminación por microorganismos enteropatógenos en palomas de la Plaza Murillo, nos muestra cifras preocupantes pues al no encontrar estudios anteriores realizados con los criterios de investigación señalados en la presente, tenemos la necesidad de discutir los resultados con investigaciones realizadas en otros países y con diferentes poblaciones de estudio, es así que en un estudio realizado en la ciudad de La Paz y Sucre, por el Dr. UTSUNOMIYA, Akiyoshi y colaboradores del Instituto de Gastroenterología Boliviano - Japonés el año 1995 con el título: **“Major Enteropathogenic Bacteria Isolated from Diarrheal patients in Bolivia: A Hospital Based Study”** se determinó que de 1234 muestras procesadas, el 30% de estas correspondían a microorganismos enteropatógenos

de las cuales 55 corresponden a *Escherichia coli* enterotoxigenica (4,4%) y de estas tras la identificación serológica se obtuvo 11 muestras con el serogrupo O6 que fue el que presentó mayor frecuencia seguida por el serogrupo O169 con 9 muestras, 5 muestras del serogrupo O168 y 2 muestras del serogrupo O15 entre otras cepas que no son de interés para nuestro estudio, este estudio de tipo multicéntrico buscó describir los patógenos mas frecuentes como causa de diarrea en nuestra ciudad y los mismos serotipos de *Escherichia coli* enterotoxigénica que han sido aisladas en esta investigación han sido identificadas como causa de diarrea en trabajos realizados a partir de heces humanas¹¹ y en relación a nuestro estudio donde se analizó 64 muestras de las cuales pudimos determinar que 16 (25%) presentaron microorganismos enteropatógenos (*E. coli* enterotoxigenica), dentro de estas se determinó que el serogrupo que presentó mayor frecuencia fue el O15 con un 44 %, el serogrupo O169 con 31 % y O168 con 25 %, esto nos confirma que las heces de palomas constituyen un mecanismo de contaminación potencial para el hombre.

En otro estudio realizado en Buenos Aires Argentina, Universidad Nacional de la Plata el año 2001 que tiene como titulo, "**Caracterización enterotoxigenica y estudio de sensibilidad antimicrobiana in Vitro de cepas de E.coli aisladas de pollos con cuadros clínicos de diarrea**". Por el Dr. MOREDO, F; VIGO G. y colaboradores se determinó un alto nivel de resistencia de las cepas estudiadas frente a la ampicilina, gentamicina, sulfametoxazol y sulfametoxazol trimetoprim , y en nuestro estudio se determinó también un alto nivel de resistencia pero solo frente a la ampicilina, otro dato muy importante ya que los serotipos aislados a partir de heces de palomas, de humanos o de otros animales presentan un perfil de resistencia similar, esto nos permite concluir que, es posible que pueda haber existido una transmisión de *Escherichia coli* enterotoxigénica de fuentes humanas a animales o a la inversa; de cualquier modo, son las mismas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica que se hallan circulando entre aves y humanos.¹²

Otros estudios realizados por la Asesoría del Medio Ambiente dependiente de la Oficialía Mayor de Desarrollo Sostenible y Territorial de la H.A.M. en coordinación con el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) analizaron tres palomas muertas por causas desconocidas, dos vivas y quince muestras de heces, obteniendo los siguientes resultados en lo que concierne al presente trabajo de investigación: en el estudio de cultivo y pruebas bioquímicas para la determinación de enterobacterias, fueron aislados *Escherichia coli* y *Proteus sp.*, comunes saprófitos y parte de la flora bacteriana normal que causan enfermedades gastrointestinales (*Escherichia coli*) en personas de menor resistencia y con alguna deficiencia inmunológica.¹

Un estudio realizado por la Agencia de Protección para la Salud (HPA) ha publicado datos epidemiológicos del Plan de Vigilancia de *Escherichia coli* durante el año 2004 en Escocia, el cual es uno de los países con mayor tasa de infecciones con *Escherichia coli* en Europa, con 210 casos en el 2004, de los cuales el 55% están asociados con exposiciones que incluyen contacto con animales (especialmente aves), o con sus heces. En el 16% de los casos, las exposiciones están asociadas al consumo de alimentos contaminados con heces de animales.¹³

El Doctor Freddy Lizón, director de Zoonosis La Paz, explica también que la ciudad puede resultar un criadero de amenazas. Los vectores son animales invertebrados que transmiten enfermedades, aunque existen vertebrados que actúan como tales; es el caso de la *Columba livia* (paloma común). Esta ave transmite la *Salmonella* y otras bacterias; a pesar del riesgo, se le ha dado medios para su sobrepoblación: hay entretechos que sirven de nidales y gracias a la gente que les da alimento en sus casas y la Plaza Murillo. Su población no puede ser controlada, pues no existe un depredador que limite su crecimiento. “En muchos países se utilizan fulminantes para espantarlas, pero en una ciudad en que se escuchan dinamitazos tan seguido, no significa nada”. Por ello Zoonosis retira huevos de las iglesias y edificios coloniales para evitar que sean empollados.¹⁴

Por último debemos señalar que la concurrencia de factores como ser la intensa interacción entre aves y la población paceña en un contexto territorial estrecho como es la Plaza Murillo, permite que sobre todo la población infantil se infecte con los agentes patógenos descritos, desarrollando un cuadro de enfermedad diarreica; también coincidimos con investigadores que muchas enfermedades pueden ser transmitidas por ingestión y contaminación de alimentos con materia fecal de palomas, ya que en medio de un constante volar de palomas las mismas generan un movimiento aéreo que suspenden partículas de toda naturaleza, pero sin lugar a dudas el hecho de buscar un contacto más íntimo con las palomas al alimentarlas y hacer que estas se posen en las manos del alimentador, crea la condición ideal para una contaminación por parte del público como así también existe la posibilidad de contaminaciones accidentales, porque no debemos olvidar que el mecanismo de infección es fecal – oral.

Finalmente, el control biológico de la población de palomas es parte de la solución al problema planteado, sin embargo por muchos factores como problemas de costos, oposición de la población que defiende a las palomas, entidades defensoras de los animales, puede ser de difícil ejecución y el camino para detener esta cadena, debe ser el de socializar los resultados obtenidos por esta investigación, y a través de ello educar a nuestra población sobre el riesgo que corren al desarrollar prácticas muy comunes que pueden ser simpáticas, pero no por ello dejan de ser altamente peligrosas para la salud.

6. CONCLUSIONES.

Los microorganismos enteropatógenos constituyen uno de los grandes problemas de la sociedad boliviana, agravado por la contaminación de miles de palomas que se encuentran en nuestras ciudades a consecuencia de la escasa educación, falta de higiene de la población y un desinterés por parte de las autoridades ambientales y de salud en relación a este tipo de problemas.

La presente investigación pudo determinar que el 25 % del total de las muestras en estudio presentaron **microorganismos enteropatógenos**, y tras haber realizado la identificación de **especies patógenas** se determinó solo una especie: *Escherichia coli* enterotoxigenica en un 21%, en relación a las **no patógenas** de las cuales se determinó: *Escherichia coli* No patógena en un 46%, *Citrobacter sp* en un 11%, *Enterobacter* en un 11% y *Proteus sp* también en un 11%.

Además, de las 16 muestras patógenas aisladas que se **identificaron por serología**, el 100% pertenecía a la especie *Escherichia coli* enterotoxigenica (Antisueros polivalentes IV y VI) de las cuales el 44 % pertenecían al serogrupo O15, el 31 % al serogrupo O169 y el 25 % al serogrupo O168.

Así también se realizó el **antibiograma** (método de Difusión de Bauer-Kirby) de las muestras patógenas aisladas, de las cuales, las 16 muestras presentaron: Resistencia a la Ampicilina (Amp), Resistencia Intermedia a la Gentamicina (GEN) y Sensibilidad a Sulfametoxazol - Trimetoprim (SXT), Imipenem (IPM), Ciprofloxacina (CIP), Cefotaxime (CTX).

Todos los resultados obtenidos en la presente investigación proporcionarán una fuente de datos para posteriores investigaciones relacionadas con el tema, y permitirán hacer conocer, ampliar y actualizar los conocimientos que se tienen en nuestro medio sobre los enteropatógenos provenientes de heces de palomas causantes de patologías gástricas y los cuales serán la base para posteriores

estudios moleculares como PCR para la determinación de enterotoxinas, y todo esto solo irá en directo beneficio de la población paceña y contribuirá a la prevención de muchas enfermedades que pueden llevar incluso a la muerte.

7. RECOMENDACIONES.

Actualmente el problema de las palomas es una gran preocupación para la Comisión del Medio Ambiente de la Alcaldía y los profesionales en salud, ya que el deterioro de monumentos, las molestias ocasionadas a la población y el potencial patógeno de las palomas han causado el malestar de las autoridades, medidas ineficientes como el transporte de las palomas y su envenenamiento que fueron tomados en forma clandestina, pueden ser consideradas radicales, inhumanas y despectivas.

No podemos permitir que se las elimine a sangre fría pero debemos abrir los ojos a los problemas que traen en nuestras ciudades, es el deber de los profesionales en salud y autoridades proponer buscar soluciones que reduzcan de modo incruento la población sin erradicarla, eliminando las practicas ineficientes ya señaladas e ideas peligrosas para la gente como su fumigación, quedan posibles acciones que limiten progresivamente la población pacaña de palomas domesticas. Dificultar la reproducción tiene que ser el medio mas eficaz de control poblacional.

Finalmente, el control biológico de la población de palomas es parte de la solución al problema planteado, sin embargo por muchos factores como problemas de costos, oposición de la población que defiende a las palomas, entidades defensoras de los animales, puede ser de difícil ejecución y el camino para detener esta cadena, debe ser el de socializar los resultados obtenidos por esta investigación, y a través de ello educar a nuestra población sobre el riesgo que corren al desarrollar prácticas muy comunes que pueden ser simpáticas, pero no por ello dejan de ser altamente peligrosas para la salud.

Una concientización social es imprescindible para educar a la gente sobre la manera de no promover el crecimiento desmesurado de la población de palomas en la ciudad. Antes de todo debe ser limitada la disponibilidad de alimentos

(Restaurantes que dejan sus desperdicios al aire libre, basureros, mercados y gente que las alimenta)

Un programa explicativo de la situación, sus potenciales peligros y las posibles formas de controlarla que explique también la necesidad de captura de especímenes para monitoreo sanitario debe ser implementado.

8. BIBLIOGRAFIA.

1. **Aves y conservación en Bolivia No. 1.** (Actas del IV Encuentro Boliviano para la conservación de las aves del 25 al 27 de Octubre de 1997 Tarija - Bolivia) PROMETA (Protección del medio ambiente Tarija) y Armonio / Bird life con la colaboración de la Colección Boliviana de Fauna. Auspicio de la Embajada Real de los Países Bajos. EL PAÍS.
2. http://www.lamolina.edu.pe/profesores/wdale/ent_med_vet/2/PLAGAS%20PESTS%20M%C3%89DICAS%20VETERINARIAS.%20AVES%20PLAGAS.%20VERSION%2001.T15.%20WILLIAM%20E.%20DALE.%20PHD.pdf
3. http://www.birdsofyucatan.com/spanish/las_aves.html
4. <http://ww.ilustrados.com/publicaciones/EpZypupuZyDWvmLiWT.php>
5. <http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Exoticos/DIGESTIVOAVES.htm>
6. <http://www.elagricultor.com/frontpage/ganaderia/articulosaves/enfermedadesavestransmisibles.htm>
7. BROOKS, BUTEL y MORSE. **Microbiología médica de Jawets, Melnick y Adelberg.** 17^a. ed. México, D.F.-Santafé de Bogotá. El Manual Moderno, 2002.
8. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Manual de tratamiento de la diarrea.** Serie PALTEX para ejecutores de programas de salud. Número 13. Washington, D.C., 1987.
9. [http://www.vetjg.com/shared/php/page.php?page=artic_medicina_aviar_16_bacterias.](http://www.vetjg.com/shared/php/page.php?page=artic_medicina_aviar_16_bacterias)
10. PRATS, Guillem. **Microbiología Clínica.** Buenos Aires; Madrid. Editorial Médica Panamericana, 2005.
11. UTSUNOMIYA, Akiyoshi; ELIO-CALVO, Daniel; et al. **“Major Enteropathogenic Bacteria Isolated from Diarrheal Patients in Bolivia: A Hospital- Based Study”**. Datos obtenidos del Instituto de Gastroenterología Boliviano – Japonés. Microbiol. Inmunol., 39 (11), 845 – 851, 1995.
12. MOREDO, F.; VIGO, G.; et al. **“Caracterización enterotoxigénica y estudio de sensibilidad antimicrobiana in Vitro de cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollos con cuadros clínicos de diarrea”**. Universidad

Nacional de La Plata, datos obtenidos en:http://www2.udec.cl/*ofem/remedica/VOL2/diarrea.htm . Cátedra de Microbiología y Area de Inmunoquímica y Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

13. http://www.elika.net/pub_elikaberri.asp?boletin=148#noticia7
14. Datos obtenidos de la Revista **ESCAPE**, 22 de Mayo de 2005, pags.18-19. LA RAZON.
15. ACHA, Pedro y SZYFRES, Boris. **ZOONOSIS y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.** 2ª. ed. Washington, D.C. OPS/OMS, 1986.
16. Baltimore Biological Laboratory, INC. **Medios de Cultivo, Materiales e Instrumentos para Laboratorios de Microbiología.** 1ª. ed. en español. Colón, Panamá. BBL. 1959 pags.
17. CARPENTER, Philip. **Inmunología y serología.** 1ª. ed. México, D.F. LA PRENSA MÉDICA MEXICANA, 1963 .
18. CATALOGO DE MEIOS DE CULTURA. bioBRÁS DIAGNÓSTICOS. Inter Science Ltda.5a. edición. Junio/2001.
19. DAMIANI y REVOLLO. **Manual de procedimientos para aislamiento e identificación de patógenos entéricos.** Instituto nacional de Laboratorios de Salud “Dr. Néstor Morales Villazón”, INLASA, OPS/OMS. La Paz – Bolivia, 2005.
20. Instituto de Gastroenterología Boliviano-Japonés. **Preparación de medios.** Sección Bacteriología.
21. JOKLIK, Wolfgang; WILLET, Hilda y AMOS, Bernard. **Zinsser, Microbiología.** 20ª. ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 1994.
22. KONEMAN, ALLEN, DOWELL, AJNDA, SOMMER S y WINN. **Diagnóstico microbiológico.** 3a. ed. Buenos Aires - Argentina. Editorial Médica Panamericana, 1992.

23. MAC FADDIN, Jean. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** Argentina, Brasil, Colombia, Chile, España, México y Venezuela. Panamericana, 1990.
24. ROSE, Noel y FRIEDMAN, Herman. **El laboratorio en inmunología clínica.** 2ª. ed. Buenos Aires – Argentina. Editorial Médica Panamericana, 1984.
25. TRIGOSO, DAMIANI y JAUREGUI. **Infecciones nosocomiales causadas por bacilos Gram negativos: el impacto de la resistencia antimicrobiana en Bolivia.** 1ª. ed. Bolivia. INLASA y Ministerio de Salud y Deportes. 2005.
26. TRIGOSO, TORRICO, RIERA y AGUILAR. **Manual de procedimientos bacteriológicos en sensibilidad y resistencia antimicrobiana.** 1ª. ed. Ministerio de Salud y Deportes, OPS/OMS, INLASA. La Paz – Bolivia, 2003.
27. UTSUNOMIYA, ELIO-CALVO, BENITEZ y SANZETENEA. **Manual de diagnóstico de enteropatógenos.** Instituto de Gastroenterología Boliviano-Japonés. JICA (Agencia de Cooperación Internacional del Japón)

ANEXOS

ANEXO N° 1. Preparación de medios de cultivo.

CALDO BASE CON TETRATIONATO

Marca: Becton Dickinson – Difco

El caldo base con Tetrionato y solución yodo-yodurada, se emplea como un medio de enriquecimiento selectivo para aislar la *Salmonella* de heces fecales, orina, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Las sales del medio y el yodo inhiben muchas otras bacterias.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona de carne.....	2.5
Peptona de caseína.....	2.5
Sales biliares.....	1.0
Carbonato de calcio.....	10.0
Tiosulfato de sodio.....	30.0

Preparación. Se suspenden 46 g. del polvo en un litro de agua destilada. Mézclase bien y caliéntese hasta su ebullición. Se enfría a 45° C o menos, y se agregan 20 mL. de una solución de yoduro. Mézclase y distribúyase en porciones de 10 mL. en tubos estériles. No se caliente después de haber agregado la solución de yoduro. El caldo base con Tetrionato se puede guardar durante algún tiempo, pero el medio ya completo se debe emplear el mismo día de su preparación.

Solución Yodo-Yodurada (Solución de Lugol)

Yodo.....6 g.

Yoduro de potasio.....5 g.

Agua.....20 mL.

Usos. El caldo con Tetracionato ya completo, se emplea como medio de enriquecimiento para la investigación de bacilos entéricos del género Salmonella. Uno o dos gramos de heces fecales, productos alimenticios sospechosos u otros materiales, se mezclan con 10 mL del caldo y la mezcla se incuba durante 12 a 24 horas. A partir del cultivo enriquecimiento, posteriormente se siembran placas en estría con agar con Desoxicolato, agar de Mac-Conkey, agar con Verde Brillante, u otros medios diferenciales.

Aspecto del medio preparado: suspensión blanca lechosa.

AGAR DE ENDO

Marca: Becton Dickinson – Difco

El agar de Endo es un medio sólido para la investigación de colibacilos y otros microorganismos entéricos. El sulfito de sodio y la fucsina básica inhiben el crecimiento de las bacterias grampositivas.

Formula en gramos por litro de agua destilada:

Fosfato Dipotásico.....	3.5
Peptona (Thiotone).....	10.0
Agar.....	15.0
Lactosa.....	10.0
Sulfito de sodio.....	2.5
Fucsina básica.....	0.5

pH final 7.4 ±

Preparación. Se suspenden 41.5 g. del polvo en un litro de agua destilada. Déjese reposar durante 5 minutos y mézclese bien. Se calienta agitando de cuando en cuando e hirviendo durante 2 minutos. Distribúyase y esterilícese a 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos. El medio se debe dejar enfriar hasta 45° C suspendiéndose el precipitado mediante una rotación suave de los tubos antes de emplearlos. Se recomienda preparar el medio a mitad que se necesite.

Usos. El agar de Endo se puede emplear como un medio en placas para determinar la presencia de organismos coniformes en el agua, leches u otros materiales de importancia sanitaria. Las colonias de bacilos coniformes que fermentan la lactosa aparecen color de rosa, en tanto que las de otros bacilos entericos incluyendo Salmonellas y Shigellas son incoloras.

Aspecto del medio preparado: rosa.

AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA

Marca: bioBrás

Código: 415330

Lote: 010

El agar para Salmonellas y Shigellas es un medio diferencial selectivo para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, especialmente los que pertenecen a los géneros *Shigella* y *Salmonella*.

Formula en gramos por litro de agua destilada:

Extracto de carne de res.....	5.0
Peptona de caseína.....	2.5
Peptona de carne.....	2.5
Lactosa.....	10.0
Mezcla de sales biliares.....	8.5
Citrato de sodio.....	8.5
Tiosulfato de sodio.....	8.5
Citrato férrico amoniacal.....	1.0
Agar.....	13.5
Verde brillante.....	0.00033
Rojo neutro.....	0.025

pH final 7.0 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Se suspenden 60 g. del polvo en un litro de agua destilada. Déjese reposar durante 5 minutos y mézclase hasta que se obtenga una suspensión homogénea. Se calienta agitando de cuando en cuando y se hierve durante 1 minuto para disolverlo. No se esterilice en autoclave.

Enfríese de 45 a 50° C y distribúyase en cajas de Petri, empleando 20 mL. por placa. Se deja solidificar el medio parcialmente destapado. Identificar y almacenar a 2-8°C.

Usos. El agar para Salmonella y Shigella puede inocularse con heces fecales, torundas rectales, orina u otros materiales que se sospeche contengan bacilos entéricos. Se recomienda inocular al mismo tiempo una placa de un medio con sales biliares puras, con menor poder inhibitorio, tal como el agar con Desoxicolato o el agar Lactosado. Incúbese durante 18 a 24 horas. Las colonias de especies que no fermentan la lactosa son incoloras, en tanto que las de coliformes u otros organismos que si la fermentan son rosadas o rojas.

Aspecto del medio preparado: rosa anaranjado.

AGAR TSI

AGAR CON TRES AZÚCARES Y HIERRO

Marca: BBL

Lote: DODRZB

El agar con tres azúcares y hierro lo ideó Hajna para diferenciar los bacilos entéricos gramnegativos por su capacidad de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (SH₂).

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Digesto pancreático de caseína.....	10.0
Digesto péptico de tejido animal.....	10.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Lactosa.....	10.0
Sacarosa.....	10.0
Glucosa (Dextrosa).....	1.0
Sulfato férrico amónico.....	0.2
Tiosulfato de sodio.....	0.2
Rojo fenol.....	0.025
Agar.....	13.0

pH final 7.3 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Se suspenden 59.4 g. del polvo en un litro de agua destilada. Mézclase bien y caliéntese agitando de vez en cuando. Hiérvase durante 1 o 2 minutos para disolver. Distribúyase en tubos de ensayo, llenándolos hasta su tercera parte. Esterilícese a no más de 118° C durante 15 a 17 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada, de tal manera que produzcan fondos profundos. Identificar y almacenar a 2-8 °C.

Usos. El agar TSI inclinado se debe inocular a partir de las colonias seleccionadas o de otras fuentes apropiadas. El cultivo se puede estriar en la porción inclinada y picar en el fondo profundo. Los cultivos se leen después de 18 a 48 horas de incubación.

La formación de ácido se indica por el cambio a amarillo del color del rojo de fenol. La sacarosa permite la separación de los proteus, como el vulgaris, de las Salmonellas. Los organismos que fermentan la lactosa y/o la sacarosa (coliformes, paracolon y Proteus) producen una superficie inclinada amarilla y por ello no se pueden confundir con otros.

Los miembros del género Salmonella que son positivos a la glucosa y negativos a la lactosa, producen el enrojecimiento de la superficie inclinada y la acidificación del fondo en los tubos de agar.

Interpretaciones.

A) Utilización del hidrato de carbono.

1. Fermentación de la glucosa solamente.

a) En pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo.

b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo.

1. Si también se produce gas SH₂ el precipitado negro puede ocultar la acidez.
2. Existe acidez en la capa profunda, que se registra como tal.

2. Fermentación, tanto de la glucosa como de la lactosa.

a) Pico de flauta. Reacción ácida. Color amarillo.

b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo.

1. El *Citrobacter freundii* produce también SH₂ además de fermentar ambos hidratos de carbono.
2. Sin embargo, existe una condición ácida en la capa profunda, que se registra como tal aunque no se observe.

3. No fermentación de la glucosa ni de la lactosa (no entéricos)

a) Pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo.

b) Capa profunda.

1. Organismo aeróbico. No se observa crecimiento. No hay cambio de color. El color es el mismo del tubo no inoculado. Color anaranjado rojizo. Si no hay seguridad, comparar con el tubo no inoculado.
2. Organismo facultativo. Reacción alcalina. Color rojo.

4. No fermenta ni la glucosa ni la lactosa; bastante común.

a) Pico de flauta.

1. Crecimiento solamente.
2. No hay cambio de color; el mismo del tubo no inoculado.

b) Capa profunda.

1. Crecimiento solamente.
2. No hay cambio de color; el mismo del tubo no inoculado.

B) Producción de gas.

1. Aerogénico.

a) Producción de gases: CO₂ y H₂.

b) Se manifiesta por lo siguiente:

1. Una sola burbuja de gas.
2. Burbujas en el medio.

3. Desdoblamiento del medio.
4. Desplazamiento completo del medio del fondo del tubo, dejando un área clara.
5. Ligera muesca del medio en el costado del tubo.

2. Anaerogénico: no hay producción de gases.

C) Producción de ácido sulfhídrico (SH₂): la presencia de un precipitado negro (sulfuro ferroso) se manifiesta por:

1. Un color negro distribuido por toda la capa profunda y que enmascara la acidez; puede haber una ligera evidencia en el pico de flauta.
2. Un anillo negro cerca de la parte superior de la capa profunda.
3. Un precipitado negro distribuido por la capa profunda, pero que no oculta totalmente la acidez.

Buscar siempre las tres características: 1) fermentación de los hidratos de carbono; 2) producción de gases (CO₂ y H₂), y 3) producción de SH₂. Registrar todas las observaciones.

Aspecto del medio preparado: naranja rojizo.

AGAR CITRATO DE SIMMONS

Marca: Becton Dickinson - Difco

El agar citratado de Simmons se usa para diferenciar las bacterias entéricas gramnegativas, basándose en la capacidad de los microorganismos de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad. Algunas bacterias pueden obtener energía de una forma que no es la fermentación de hidratos de carbono utilizando citrato como única fuente de carbono. La evaluación de esta característica es importante en la identificación de muchas Enterobacteriaceae. La utilización de citrato se detecta en un medio con citrato por la producción de productos intermedios alcalinos. El medio incluye citrato de sodio, un anión, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con la producción de amoniaco (NH_3), llevando a la alcalinización del medio a partir de la conversión del NH_3 en hidróxido de amonio (NH_4OH). El indicador es azul de bromotimol, que es amarillo con un pH menor de 6 y azul con un pH por encima de 7.6.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Fosfato monoamónico.....	1.0
Fosfato dipotásico.....	1.0
Citrato de sodio.....	2.0
Sulfato de magnesio.....	0.2
Cloruro de sodio.....	5.0
Azul de bromotimol.....	0.08
Agar.....	15.0

pH final 6.8 ± 0.1 a 25°C

Preparación. Se suspenden 25.3g del polvo en un litro de agua destilada. Déjese remojar durante 5 a 10 minutos. Se mezcla bien y se calienta suavemente agitando de vez en cuando hasta que el medio hierva durante 1 o 2 minutos. Distribúyase en tubos y esterilícese en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Se deja enfriar en posición inclinada, aunque también se puede emplear como medio en placas. Identificar y almacenar a 2-8°C.

Usos. Se pueden hacer cultivos en placa, o si se prefiere el medio inclinado, se inocula estriando la superficie y picando el fondo. Solo los organismos que utilizan el citrato como única fuente de carbono crecen en el agar citratado de Simmons. La aparición de un crecimiento visible va acompañado en general de un cambio alcalino (azul) del indicador.

Interpretaciones.

1. Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta.
2. Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color (verde).

Controles.

Control positivo: *Enterobacter aerogenes*

Control negativo: *Escherichia coli*

Aspecto del medio preparado: verde.

MEDIO SIM

Marca: Difco

Lote: 94923

El medio SIM se emplea para determinar la movilidad de flagelados, producción de SH_2 por la utilización de cisteína-HCl, producción de ácido indol-pilúvico (IPA) por la utilización del triptófano y la detección de la reacción el indol con el reactivo de Kovac`s.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona.....	30.0
Extracto de carne.....	3.0
Citrato férrico amónico.....	0.2
Tiosulfato de sodio.....	0.025
Agar.....	3.0

pH final 7.3 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Se suspenden 36 g. del material seco en un litro de agua destilada. Mézclase bien y cuando se obtenga la suspensión uniforme, caliéntese agitando de cuando en cuando y hiérvase durante un minuto o hasta su disolución. Se distribuye y esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Identificar y almacenar a $2-8^\circ\text{C}$.

Usos. El medio SIM es útil para la identificación habitual de bacilos entéricos. Ordinariamente se reparte en tubos de ensayo llenos hasta la mitad, que se inoculan con aguja por piquete en el centro, hasta la mitad de su profundidad. Se incuban durante 18 a 24 horas o por tiempo mayor. La reacción de sulfuros se indica por el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de inoculación.

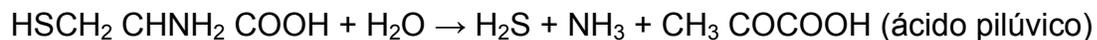
Su alto contenido en Trypticase lo hace ideal para la producción de indol. La movilidad se evidencia por el crecimiento lejos de la línea de inoculación.

Interpretaciones.

A) Motilidad.

1. Prueba positiva (motilidad): los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad. Pueden mostrar un crecimiento en estrías vellosas.
2. Prueba negativa (sin motilidad): crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra; el medio circundante se mantiene claro.
3. Medio de control (no inoculado): no hay crecimiento, el medio se mantiene incoloro y claro.

B) Acido sulfhídrico.



1. Positivo: se observa ennegrecimiento del medio.

a) Siguiendo la línea de inoculación.

b) En toda la capa superficial.

2. Negativo: no se observa ennegrecimiento.

C) Acido indol-pilúvico (IPA)

Triptófano → ácido indol-pilúvico + Fe (color café, en presencia de oxígeno, solo en la superficie del medio)

D) Indol.

Triptófano → (triptofanasa) → indol

Indol + Kovac`s (p-dimetilaminobenz-alaldehido) → roindol (color rojo claro)

1. Prueba positiva: un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica.
2. Prueba negativa: no se produce color en la capa alcohólica; toma el color del reactivo de Kovac`s (amarillo).
3. Variable: un color anaranjado en la superficie del medio debido a desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser un precursor de la formación de indol.

Aspecto del medio preparado: ámbar claro.

CALDO LISINA DESCARBOXILASA DE FALKOW (LIA)

Marca: Becton Dickinson

Código: 4311363

Lote: 1000BODHLA

El objetivo de esta prueba es medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar a la lisina y formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Peptona.....	5.0
Citrato de hierro y amonio.....	0.5
Extracto de levadura.....	3.0
Glucosa (Dextrosa).....	1.0
L-lisina.....	10.0
Tiosulfato de sodio.....	0.04
Púrpura de bromocresol.....	0.02
Agar.....	13.5

pH final 6.7 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Pesar exactamente 4.95 gramos del medio en 150 mL de agua destilada. Ebulir por 1 minuto. No autoclavar. Homogeneizar y dispensar en tubos de ensayo, en volumen de 3mL. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Identificar y almacenar a 2-8 °C.

Usos. En un primer paso casi todos los microorganismos descomponen la glucosa; el pH del medio vira hacia el rango ácido (bajo 6.0) y cambia a color amarillo. La reacción de descarboxilación de aminoácidos comienza de un rango ácido. La reacción produce aminas y el pH del medio vira hacia la alcalinidad y el color cambia hacia púrpura.

Interpretaciones.

1. Prueba positiva: púrpura turbio a un púrpura amarillento apagado (producido por la cadaverina)
2. Prueba negativa: color amarillo claro y brillante (solamente fermentado por la glucosa).

Aspecto del medio preparado: lila.

Agar MIO

Marca: Acumedia

Código: 7389A

Lote: 0101-104

Este medio es utilizado para la identificación de enterobacterias con base en la motilidad, actividad de ornitina descarboxilasa y producción de indol.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Digesto enzimático de gelatina.....	10.0
Digesto enzimático de caseína.....	10.0
Extracto de levadura.....	3.0
Dextrosa.....	1.0
Púrpura de bromocresol.....	0.002
L-ornitina.....	5.0
Agar.....	2.0

pH final 6.5 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Disolver 31 gramos de medio en 1 litro de agua destilada. Ebulir por 1 minuto. No autoclavar. Homogeneizar y dispensar en tubos de ensayo, en volumen de 3 mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Identificar y almacenar a 2-8°C.

Usos. Los cultivos son inoculados por punción e incubados por 18-24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las reacciones de motilidad y de ornitina descarboxilasa son vistas antes de colocar el reactivo de Kovac`s. La motilidad se indica por turbidez del medio o por crecimiento difuso a partir de la línea de inoculación. La ornitina descarboxilasa se indica por un color púrpura del medio. La ornitina negativa produce un color amarillo en el fondo del tubo, que puede ser púrpura al final. Para la prueba del indol adicionar 3-5 gotas del reactivo de Kovac`s y agitar suavemente el tubo. La aparición de un color rosa o rojo es interpretada como prueba positiva de indol.

Interpretaciones.

1. Prueba positiva: color púrpura.
2. Prueba negativa: color amarillo en el fondo.

Aspecto del medio preparado: lila.

REACTIVO DE KOVAC`S

Disolver 1 gramo de p-dimetilaminobenz-aldehido en 75 mL de alcohol amílico (o iso-amílico) y añadir 25 mL de HCl concentrado, para su utilización se debe agregar 5 gotas de reactivo de Kovac`s directamente a un tubo incubado de 24 a 48 hrs. y luego agitar suavemente el tubo.

El indol (benzilpirrol), es un producto de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias poseedoras de la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y deaminar triptófano con producción de indol. Esta es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos y es particularmente útil para diferenciar *Escherichia coli* que es positiva de miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* que son negativas.

Fundamento. La prueba de indol se basa en la formación de un complejo de color rosa cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehido. Esta es la sustancia química activa en los reactivos de Kovac`s y Ehrlich. Deberá usarse un medio rico en triptófano.

En la práctica se emplean medios combinados como sulfuro-indol-motilidad (SIM), motilidad-indol-ornitina (MIO).

Interpretación. La aparición de un color rosado fucsia en la interfase del reactivo y el caldo (o medio) pocos segundos de haber agregado 5 gotas del reactivo es indicativo de la presencia de indol y constituye una prueba positiva.

Controles.

Control positivo: *Escherichia coli*

Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*

CALDO DE VOGES-PROSKAUER (VP)

Elaboración propia.

Voges y Proskauer, fueron los primeros en observar la reacción de color rojo producida por los medios de cultivo apropiados luego del tratamiento con hidróxido de potasio. Más tarde se descubrió que el producto activo en el medio formado por metabolismo bacteriano era acetil-metil-carbinol, un producto de la vía del butileno glicol. El ácido pirúvico, un compuesto fundamental formado en la degradación fermentativa de la glucosa, es metabolizado a través de cierto número de vías metabólicas, según los sistemas enzimáticos de las diferentes bacterias. Una de estas vías da como resultado la producción de acetoína (acetil-metil-carbinol). Microorganismos como miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* producen acetoína como producto final principal del metabolismo de la glucosa. En presencia de oxígeno atmosférico e hidróxido de potasio al 40%, la acetoína es convertida en diacetilo y el α -naftol sirve como catalizador para producir un complejo de color rojo. El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Polipeptona.....	7
Glucosa.....	5
Fosfato dipotásico.....	5

pH final 6.8 ± 0.1 a 25°C

Preparación. Disolver la fórmula en 1000 mL de agua destilada. Homogeneizar y dispensar en tubos de ensayo, en volumen de 3 mL. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Identificar y almacenar a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Usos. Después de incubar toda la noche estos tubos se añadirán 3 gotas del reactivo **A** y 3 gotas del reactivo **B**; una reacción positiva (color rojo) aparece en el curso de 5 minutos.

Acetoína + O → diacetil + H₂O

Diacetil + KOH + material grupo guanidino (incluida en la peptona) + α-naftol → presencia de color rojizo o rosado.

Interpretaciones.

1. Reacción VP positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína)
2. Reacción VP negativa: color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aún así la reacción es negativa (debido a la reacción de los reactivos al mezclarse).

Controles.

Control positivo: *Klebsiella pneumoniae*

Control negativo: *Escherichia coli*

Aspecto del medio preparado: Ámbar claro.

REACTIVO A

(Hidróxido de Potasio, 40%, agente oxidante)

Hidróxido de potasio.....40 g

Agua destilada.....100 mL

Preparación. Pesar rápidamente el hidróxido de potasio y disolverlo en menos de 100 mL de agua destilada en un vaso. Este reactivo es muy higroscópico. Colocar el vaso en un baño de agua fría circulante para controlar la temperatura. Enfriar y trasvasar la solución de KOH a un frasco volumétrico de 100 mL agregando agua destilada, c.s.p. 100 mL. Guardar en un frasco para reactivos de vidrio recubierto de polietileno o parafina y rotular correctamente. Este KOH puede ser sustituido por hidróxido de sodio NaOH al 40%. El KOH y el NaOH son soluciones sumamente cáusticas; evitar el contacto con la piel para impedir dolorosas quemaduras.

REACTIVO B

(α -naftol , 5%, intensificador del color)

α -naftol (I-naftol).....5 g

Alcohol etílico (absoluto).....100 mL

Preparación. Disolver el α -naftol en menos de 100 mL de alcohol etílico absoluto. Trasvasar la solución a un frasco volumétrico de 100 mL y agregar alcohol etílico absoluto, c.s.p. 100 mL. Guardar en un frasco para reactivos rotulado correctamente.

CALDO UREA

Marca: Scharlau Microbiology

Lote: 9564

El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea siguiendo la reacción química. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, dando como resultado alcalinización y aumento del pH del medio.

Preparación. Disolver 19 gramos de medio en 950 mL de agua destilada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50-55°C. Añadir en forma aséptica 50 mL de una solución de urea al 40%. Mezclar y distribuir en forma aséptica en tubos de ensayo a 0.5 mL por tubo. El pH final es 6.8 ± 0.2 a 25°C. Identificar y almacenar a 2-8°C. (La urea se descompone con el calentamiento).

Interpretaciones.

1. Reacción positiva: color rojo rosado intenso en todo el caldo. Solamente especies de *Proteus*.
2. Reacción negativa: no se produce cambio de color (amarillo anaranjado).
- 3.

Controles.

Control positivo: *Proteus sp*

Control negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922

Aspecto del medio preparado: naranja claro.

AGAR CLED

Marca: Difco

Este medio es utilizado para el cultivo y conteo de Bacterias Gram (+) y Gram (-) en urocultivos. El medio presenta la ventaja de impedir la formación de un “velo o película” de *Proteus* en su superficie.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Bacto Beef Extract.....	3.0
Bacto Peptone.....	4.0
Bacto Tryptone.....	4.0
Bacto L-Cystine.....	0.128
Bacto Lactose.....	10.0
Bacto Agar.....	15.0
Bacto BromThymol Blue.....	0.02

pH final 7.3 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Rehidratar el medio suspendiendo 36 gramos en 1 litro de agua destilada o desionizada. Calentar hasta el punto de ebullición para disolver completamente. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C. Identificar y almacenar a 2-8°C.

Aspecto del medio preparado: verde.

AGAR MÜELLER HINTON

Marca: Biobrás Diagnósticos

Orden: 415802

Lote: 0000003475

Medio rico en nutrientes recomendado para la realización de antibiogramas, por la técnica de difusión de discos, descrita por la NCCLS.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Hidrolizado ácido de caseína.....	17.5
Extracto de carne.....	2.0
Amido de batata.....	1.5
Agar bacteriológico.....	17.0

pH final 7.4 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Disolver 38 gramos en 1 litro de agua destilada. Hidratar por 10-15 minutos. Mezclar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar hasta 45 a 50°C . Para preparar agar sangre agregar asépticamente 5% de sangre de carnero defibrinada estéril. Para preparar agar chocolate agregar 500 mL de una solución de hemoglobina al 2% estéril a 500 mL del medio con concentración doble ($38\text{ g} \rightarrow 500\text{ mL}$). Luego calentar el agar sangre a 80°C por 10 minutos hasta que el medio adquiera un color chocolate. Homogeneizar y poner de 20-25 mL por cada caja Petri. Si no fuera a usar el mismo día, guardar el medio sin sangre a $2-4^{\circ}\text{C}$ en forma invertida. El medio preparado vale por una semana.

Aspecto del medio preparado: levemente opalescente o de color ámbar.

PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR BAUER-KIRBY

Procedimiento:

El procedimiento de Bauer-Kirby estandarizado por la NCCLS sigue la siguiente secuencia:

- Preparación de inóculo.
- Estandarización del inóculo.
- Inoculación en placas de agar.
- Aplicación de discos de antibióticos.
- Incubación de las placas de agar.
- Medición de halos de inhibición.
- Interpretación de resultados según normas de la NCCLS.

Preparación del inóculo.

1. Método de suspensión directa:

- Cultivo fresco con 18-24 horas de incubación.

Seleccionar 3 a 5 colonias de la misma morfología, tocando la parte superior de cada colonia con un anza, transferir las colonias directamente en: Solución Fisiológica o Caldo Mueller-Hinton e inmediatamente sembrar en el medio de cultivo.

B. Estandarización del inóculo.

Con el patrón de turbidez = 0.5 Mc Farland
= $1.5 - 2 \times 10^8$ UFC/mL

Para estandarizar el inóculo por comparación con el patrón de turbidez, debe transferirse el patrón en un tubo que tenga las mismas características del tubo donde se preparará la suspensión bacteriana a estudiar, utilizar además una tarjeta blanca con rayas negras de diferente grosor que permiten servir de contraste para la comparación simultánea del patrón y el inóculo.

C. Características del crecimiento.

Para sembrar el inóculo debe utilizarse el medio de cultivo adecuado en el que desarrollará el microorganismo, así para:

- Bacterias de rápido desarrollo: Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Vibrio cholerae*, etc. sembrar en Agar Mueller-Hinton.

D. Inoculación de las placas.

Homogenizar el inóculo, introducir un hisopo estéril en la suspensión, hacer rotar por las paredes del tubo para eliminar el excedente, luego sembrar suavemente sobre la superficie del medio en tres direcciones, haciendo girar la caja petri en un ángulo de 65°, esto permitirá una distribución homogénea del inóculo.

E. Aplicación de discos de antibióticos.

- Sacar los antimicrobianos dos horas antes para que adquieran la temperatura ambiente antes de ser utilizados
- No usar más de 6 discos para placas de 100 mm, ni más de 12 discos por placa de 150 mm de diámetro, (suficiente un representante por familia de antibióticos), mayor número de discos provoca superposición de halos de inhibición que dificultan la lectura.
- Verificar la carga de discos a utilizar de acuerdo al microorganismo.
- Colocar los discos sobre la superficie del agar, presionar ligeramente sobre el disco para que no se despegue.
- La distancia entre disco y disco debe ser de 2.5 cm y de disco al borde de la caja de 2 cm.
- Una vez colocado el disco no debe ser removido, pues inmediatamente difunde el antimicrobiano sobre al agar.

F. Incubación de las placas.

- Después de colocados los discos, incubar las placas de agar en forma invertida en estufa a 35°C.

G. Medida de zonas de inhibición.

Antes de realizar las lecturas de zonas de inhibición debemos verificar:

- Que el crecimiento sea confluyente (uniforme) de no ser así repetir la prueba.
- Medir el área que muestre inhibición a ojo desnudo.
- Las zonas de inhibición deben ser uniformes y circulares.

- Medir con regla o calibre sosteniendo la caja petri en forma invertida, sobre un fondo oscuro y con luz reflejada.
- Cualquier deformación producida en los halos, deberá estudiarse para detectar mecanismos de resistencia que estuviera exhibiéndose, para inferir la Resistencia o Sensibilidad a determinados antimicrobianos.
- Colonias mayores en área de inhibición deben ser subcultivadas y reidentificadas.
- Algunos microorganismos muestran un leve crecimiento dentro la zona de inhibición de cotrimoxazol, trimetoprima y otras sulfonamidas (doble halo), leer el halo externo no el interno.
- En *Proteus mirabilis* ignorar el “swarming” o invasión de la zona de inhibición.

H. Interpretación de resultados.

Utilizar las tablas de la NCCLS, cada grupo de microorganismos tiene una tabla específica que va desde la Tabla 2A a 2I. Estas tablas se actualizan una vez por año. Para la interpretación existen tres categorías:

- Sensible.
- Intermedio.
- Resistente.

AGAR NUTRITIVO

Marca: Biobrás Diagnósticos

Orden: 415534

Lote: 0000000949

Medio de uso general en laboratorio, indicado para cultivo de gérmenes poco exigentes. Puede ser usado en bacteriología sanitaria, humana e industrial.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

Agar bacteriológico.....	15.0
Cloruro de sodio.....	8.0
Extracto de carne.....	3.0
Peptona de gelatina.....	5.0

pH final 6.8 ± 0.2 a 25°C

Preparación. Disolver 31 gramos en 1 litro de agua destilada. Hidratar por 10-15 minutos. Mezclar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar hasta 45-50°C. Distribuir 15-20 mL por cada placa de Petri estéril. Si no fuera usado el mismo día, almacenar de 2-8°C en posición invertida. El medio preparado es válido por 6.8 semanas.

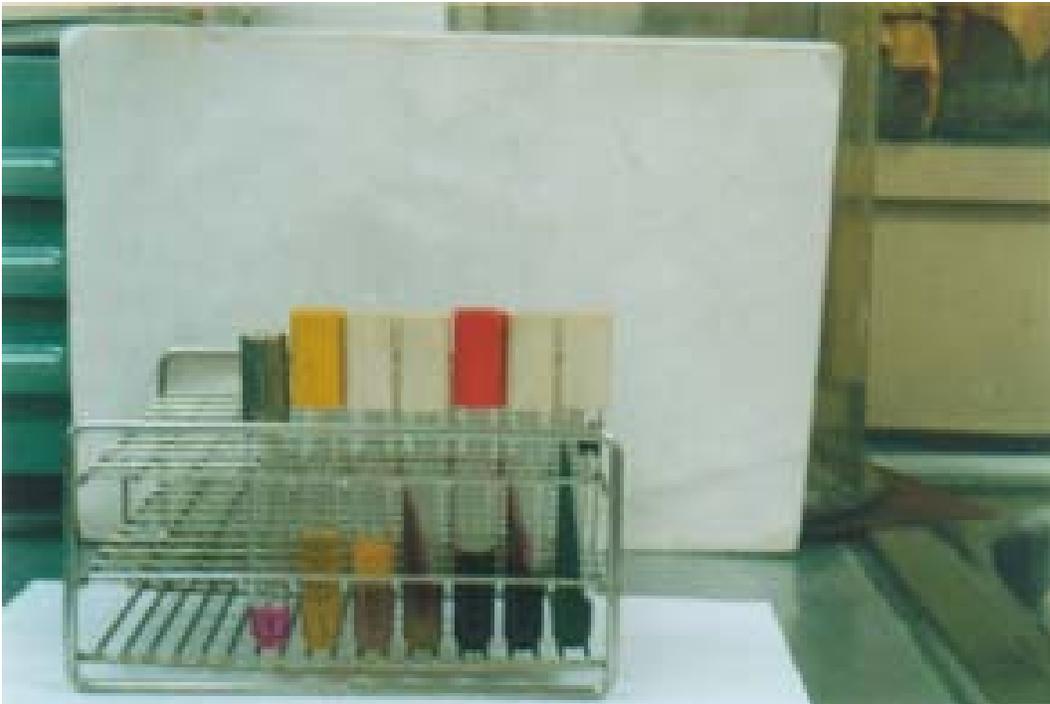
Aspecto del medio preparado: ámbar claro.

ANEXO N° 2. Fotos de la toma de muestra y de pruebas bioquímicas realizadas en el trabajo de investigación.





Características bioquímicas de *Citrobacter*.



Características bioquímicas de *Proteus*.

ANEXO N° 3. Tabla para interpretar los resultados de Serología para *E. coli*
(Juego de Antisuero de Seiken-Japon)

Clasificación	Polivalente	Monovalente
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	I	O1, O26, O86a, O111, O119, O127a, O128
	II	O44, O55, O125, O126, O146
	III	O18, O114, O142, O151, O157*, O158
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	IV	O6, O27, O78, O148, O159, O168
	V	O20, O25, O63, O153, O167
	VI	O8, O15 , O115, O169
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	VII	O28ac, O112ac, O124, O136, O144
	VIII	O29, O143, O152, O164

ANEXO N° 4. Tabla de la NCCLS para la interpretación de resultados

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina (Amp)	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Sulfamethoxazole Trimethoprim (SXT)	≤ 10	11 - 15	≥ 16
Imipenem (IPM)	≤ 13	14 - 15	≥ 16
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Cefotaxime (CTX)	≤ 13	15 - 17	≥ 18
Gentamicina (GN)	≤ 12	13 - 20	≥ 21