

AISLAMIENTO DE SHIGELLA FLEXNERI, PROTEUS MORGANII, PROVIDENCE Y OTRAS ENTEROBACTERIACEAS DE LECHE DE CONSUMO DE BOGOTA

Por

MANUEL JOSÉ TORRES, D.M.V. *
HERNANDO JARAMILLO **

Este trabajo se inició como continuación al que Torres et. al. (1) realizaron en leches pasteurizadas; ante los muy altos resultados del Recuento de Bacterias Coliformes y teniendo en cuenta que los peligros potenciales contra la salud son aproximadamente proporcionales a las densidades de coliformes que se encuentran en los productos lácteos (2, 2-A), se pensó en aislar de leches de consumo bacterias de definitivo significado patógeno.

La iniciación de este trabajo coincidió con la presentación en una población de un brote de enteritis severas. De la leche que ese grupo humano consumía, se aisló la cepa de *Shigella flexneri*. Desgraciadamente, de los casos que se presentaron no se hicieron diagnósticos etiológicos exactos ni aislamientos.

La literatura habla de aislamientos de diferentes especies de Salmonella como *S. schottmuelleri* (*S. paratyphi B*) y de *Shigella* como *S. sonnei*, de leches de consumo comerciales: estos aislamientos se hicieron durante brotes epidémicos de fiebre paratifoidea y disentería bacilar respectivamente (2). Pero en la literatura consultada no encontramos referencias de aislamientos de leche de *Shigella flexneri*, *Proteus morgani* o *Providence*. En el país no se han publicado tampoco reportes de aislamientos de estas bacterias.

MATERIALES Y METODOS

Trabajamos con 100 muestras de leche de las cuales un 66% corresponde a muestras de leche pasteurizada, y 34% a muestras de leche cruda, pero que con certeza se sabía era consumida en esa forma, sin ser hervida.

Las muestras se obtenían en el estado en que la leche es recibida por el consumidor, sin enterar a los distribuidores de

* Profesor Asistente de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

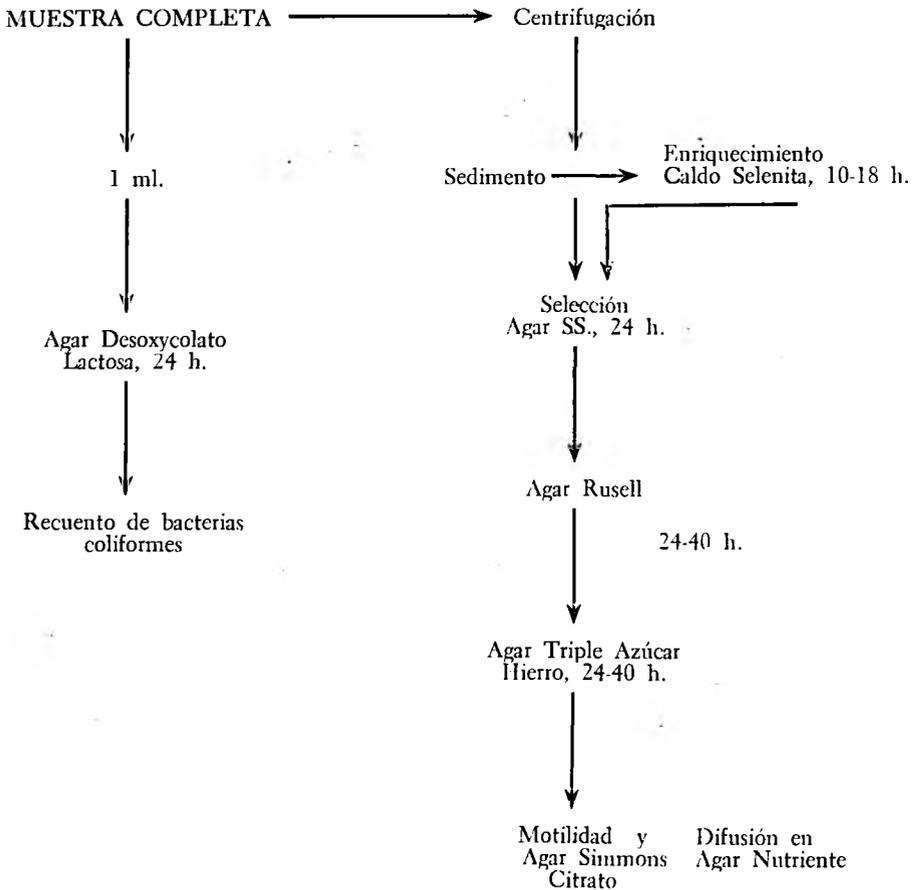
** Durante la colaboración, estudiante de último año, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

la toma de muestras que se estaba realizando.

Generalmente en forma inmediata y nunca después de las 12 horas de obtenida la muestra, se hacía la siembra de 1 ml. de leche, repartido en 2 cajas de Petri, vertiendo luego Agar Desoxicolato Lactosa *, siguiendo estrictamente la técnica descrita por los "Standard Methods" y su versión en español "Normas para el Exa-

men de los Productos Lácticos" (2-2-A). El recuento por medio de un contador de colonias Quebec, de campo oscuro, se hacía a las 24 horas. Se expresaron los resultados como "Recuento de Colonias de Coliformes por ml."

En forma paralela se centrifugaba otra porción de la muestra y se practicaban siembras según el diagrama siguiente y según los "Standard Methods" y "Normas":



La centrifugación de la muestra se hacía a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos.

Con el ansa de platino se tomaba el sedimento y se sembraba en *Selenita F*.

* Difco (B 420).

Enriquecimiento; este medio no debe esterilizarse al autoclave, sino calentarse hasta ebullición. Nosotros lo preparábamos cada vez y lo envasábamos en tubos estériles, dándole 6 centímetros de profundidad. Aunque este medio se ideó an-

te todo como medio de enriquecimiento para miembros del género *Salmonella*, en él se pueden aislar los bacilos disintéricos como *Sh. Sonnei* (3)*. Sin embargo, Leifson, su creador, considera que inhibe el Alcaligenes y los bacilos disintéricos, retarda los bacilos coliformes pero no inhibe el *Proteus* y la *Pseudomonas* (4).

Al cabo de unas horas (siempre menos de 18) con el ansa se tomaba material del Caldo Selenita y se sembraba por agotamiento en una caja de Agar SS. ** La siembra directa de sedimento se hacía en la misma forma. El Agar SS es altamente relativo para los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Es un medio que tampoco se debe esterilizar al autoclave. Nosotros lo preparábamos por ebullición, siempre inmediatamente antes de usarlo. Al cabo de 24 horas las colonias rojas se leían como Coliformes (generalmente *Klebsiella* - *Aerobacter*), mientras que las colonias incoloras (2 o 3) se resembledaban en medio Rusell.

El Agar Rusell Doble Azúcar***, al cabo de 24-48 horas de incubación, diferencia a las bacterias productoras de ácido de la dextrosa, ácido y gas de la dextrosa, ácido de la lactosa, ácido y gas de la lactosa; esta diferencia es la base de la división entre las bacterias Coliformes y las bacterias Enteropatógenas. Los tubos que mostraban color amarillo (ácido) y producción de gas en el fondo, y color amarillo en el bisel, se leían como Coliformes. Los tubos que mostraban color amarillo en el fondo y en el bisel, color amarillo o amarillo y gas en el fondo y rojo (alcalinidad) en el bisel, se resembledaban en el medio Triple Azúcar Hierro.

El Agar Triple Azúcar Hierro* tiene sacarosa además de lactosa y dextrosa, lo que permite la más rápida diferenciación

de las enteropatógenas y coliformes, ya que algunos coliformes que fermentan lentamente la lactosa, atacan más rápidamente la sacarosa. Además, contiene sulfato ferroso, para detectar la producción de anhídrido sulfuroso.

La motilidad se investigaba por siembra en Caldo Nutriente**, adicionado con 0.5% de Bacto-Agar***, o sea un medio semisólido. Se comprobaba por observación al campo oscuro.

Por carecer, cuando se realizaba este trabajo, de otros medios de cultivo y sueros apropiados, se enviaban las cepas aisladas a la Sección de Microbiología, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad del Valle; allí, en forma muy gentil, completaron la identificación bioquímica y serológica de estas cepas.

RESULTADOS

De todas las muestras se hizo Recuento de Bacterias Coliformes y aislamiento de este mismo grupo de enterobacteriáceas. Mostramos en el Cuadro 1 los resultados de tales recuentos y los aislamientos en aquellos casos en que se continuó la clasificación de las cepas. Esto se hizo únicamente con aquellas cepas que mostraban reacciones diferentes a las de las bacterias coliformes.

Cabe anotar que, a pesar del uso de medios selectivos y diferenciales, algunas cepas de bacterias del grupo Coliforme reaccionan a veces en forma atípica, lo que explica su aparición en dicho cuadro de aislamientos.

También anotamos que como de cada grupo de colonias diferentes se tomaba una para clasificar, aparecen en algunos

* BBL.

** Difco (B 74).

*** Difco (B 84).

* Difco (B 265).

** Difco (b 3).

*** Difco (B 140).

casos varias cepas procedentes de la misma muestra.

Además, de las muestras y cepas que aparecen en el Cuadro 1, se aislaron las siguientes cepas que posteriormente no crecieron, y por tanto no pudieron ser clasificadas:

| | | | |
|---------|-------|---------|----|
| Cepa 24 | de la | Muestra | 88 |
| Cepa 33 | de la | Muestra | 96 |
| Cepa 35 | de la | Muestra | 95 |
| Cepa 25 | de la | Muestra | 91 |
| Cepa 26 | de la | Muestra | 92 |
| Cepa 14 | de la | Muestra | 77 |
| Cepa 65 | de la | Muestra | 58 |

RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES Y AISLAMENTOS DE ENTEROBACTERIACEAS EN LECHE DE CONSUMO DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ, D. E.

| Mues. Tipo de muestra N° | Marca | Recuento de bacterias coliformes por ml. (en placa) | Cepa N° | Crecimiento en Agar SS. | Agar Rus-sell | Agar Doble Azúcar Tri-ple | Motilidad | Agar Simmons Citrato | Clasificación de la cepa aislada |
|--------------------------|-------|---|---------|-------------------------|---------------|---------------------------|-----------|----------------------|----------------------------------|
| 1 | LC | 155 | 1 | C.I | F | B | F | B | Shigella flexneri 6 |
| 47 | LC | 2040 | 1 | A | A | A | A | A | Providence |
| 50 | LC | 990 | 2 | A | NC | A | A | NC | Escherichia coli |
| 51 | LC | 1190 | 3 | A | A | A | A | A | Proteus morganii |
| 51 | LC | 1190 | 4 | A | NC | A | A | NC | Providence |
| 50 | LP | 11 | 66 | A | AG | NC | AG | NC | Proteus morganii |
| 63 | LC | 1810 | 70 | C.I | AG | A | A | A | Escherichia coli |
| 63 | LC | 1810 | 5 | C.I | A | NC | AG | NC | Providence |
| 69 | LP | 420 | 6 | C.I | AG | A | A | A | Escherichia coli |
| 70 | LC | 1580 | 8 | C.I | A | A | A | A | Providence |
| 73 | LP | 38 | 10 | C.I | AG | A | A | A | Klebsiella - Aerobacter |
| 73 | LP | 38 | 11 | C.I | A | NC | A | NC | Escherichia coli |
| 74 | LC | 2510 | 12 | C.I | A | A | A | A | Escherichia coli |
| 76 | LP | 1 | 13 | C.I | A | A | A | A | Providence |
| 79 | LP | 279 | 15 | C.I | AG | A | A | A | Citrobacter |
| 80 | LP | 295 | 16 | C.I | AG | A | A | A | Citrobacter |
| 81 | LC | 1780 | 17 | C.I | A | NC | A | A | Klebsiella - Aerobacter |
| 79 | LP | 279 | 20 | C.I | A | A | A | A | Escherichia coli |
| 81 | LC | 1780 | 21 | C.I | AG | A | A | A | Escherichia coli |
| 83 | LP | 57 | 22 | C.I | A | A | A | A | Escherichia coli |
| 85 | LC | 3870 | 23 | C.I | AG | A | A | A | Escherichia coli |
| 88 | LP | 170 | 30 | C.I | A | A | A | A | Providence |
| 94 | LP | 550 | 32 | C.I | A | A | A | NC | Providence |

F = Fondo, por picadura
 B = Bisel, por rayado
 LC = Leche Cruda
 LP = Leche Pasteurizada
 CI = Colonia Incolora
 A = Amarillo Acido
 AG = Amarillo Acido Gas
 NC = No Cambio Alcalino

DISCUSION

Analicemos brevemente la importancia y significado de las cepas aisladas.

En el Cuadro 2 vemos la ubicación de las Enterobacteriáceas aisladas.

Shigella Flexneri 6:

El género *Shigella* está compuesto por bacilos, inmóviles, Gram negativos, que no licuan la gelatina. En general, no producen H₂S, pero según veremos, la cepa aislada está dentro de la excepción. Fue aislada por el investigador Flexner en el año 1900 de un brote de disentería en las Filipinas (5).

La *Shigella Flexneri* pertenece al grupo II, o sea que no fermenta el manitol. Subgrupo A, o sea que no produce ácido de la lactosa. Producción de ácido de la ramnosa, variable. No produce trimetilamina del óxido de trimetilamina. Aglutina con Suero polivalente específico (grupos 1 a 6).

Produce ácido pero no gas de la glucosa, fructuosa. Produce ácido pero no gas de la glucosa y arabinosa, irregularmente de la ramnosa, sucrosa y maltosa. Fermenta el Manitol (excepto algunas cepas de los serotipos).

No produce, en general, hidrógeno sulfurado (H₂S), pero la cepa aislada "resulta corresponder a un tipo de *Shigella Flexneri* 6 que excepcionalmente dentro del género *Shigella* producen gas".

El serotipo 6 contiene cepas que poseen propiedades bioquímicas.

El tipo 6 (que corresponde al tipo VI de Wheeler, al tipo 88 de Boyd, al tipo L de los alemanes) es una variación del bacilo de Newcastle-Manchester [o *Shigella paradysenteriae* (Newcastle)] aislado en 1929.

La distribución de la *Sh. Flexneri* y bacilos relacionados es universal. Un gran porcentaje de los casos de disentería en climas templados y aun tropicales se debe a *Sh. Flexneri*. Es tal vez la especie más frecuente causal de disentería bacilar (6).

En cuanto a patogenicidad, es de advertir que la disentería bacilar es una infección localizada en el tracto intestinal, nunca septicémica, cuya principal manifestación es una colitis ulcerativa. No puede aislarse de la muestra de sangre de los pacientes como en el caso de la *Salmonella typhi*. Aunque en el conejo y en el hombre la toxina disentérica es excretada en el intestino grueso, cuando se introduce por vía intestinal no produce cambios, parece, por tanto, afectar las células profundas, más que las superficiales, de la membrana mucosa. La acción selectiva de las toxinas, más que la acción local de las bacterias, parece ser la responsable de la enfermedad. En una gran serie de casos causados por *Sh. Flexneri* y *Sh. Sonnei* en Dinamarca, la mortalidad alcanzó un 2% (6).

Produce también algunos casos de gastroenteritis infantil, pero los casos en que el bacilo disentérico está presente no difieren de los casos en que no se puede aislar éste. De modo que no se sabe qué proporción de las diarreas infantiles es producido por el bacilo disentérico (6).

Epidemiológicamente hablando, las personas que padecen la enfermedad (que parece ser muchas, aunque muchos casos se quedan sin reconocer, por la suavidad de los síntomas), son portadores convalescientes y crónicos que eliminan el bacilo por 3-5 semanas (hasta 4 años y medio) (6). El paso del bacilo de un intestino afectado al tracto alimenticio de un individuo sano, se realiza principalmente:

1º) Por el agua, que en este caso no es tan importante vector inanimado como en la fiebre tifoidea. 2º) Mal manejo de excretas, ya que las moscas en la disentería bacilar juegan un papel de transmisión más importante que en la fiebre tifoidea (7) (3). Se han reportado brotes muy severos de disentería bacilar por alimentos contaminados con *Sh. Sonnei*, pero no hemos encontrado referencias a brotes de *Sh. Flexneri* transmitida por alimentos.

Proteus Morganii:

También se le conoce como Bacilo de Morgan Nº 1, ya que este investigador lo aisló en 1906 de las heces de niños que padecían la llamada "diarrea de verano" (8).

Por sus características plenamente se justifica su inclusión en el Género *Proteus*. En el Caldo Urea * da la típica reacción alcalina por hidrólisis de la urea. Este medio altamente amortiguado es específico para la identificación de miembros del Género *Proteus* (4). Su crecimiento difuso en todo el medio agar (20°-28°C. en medio con agar al 1%), es también típico del *Proteus*.

Es una bacteria bacilar, móvil por flagelos peritricos, Gram negativa; produce ácido y pequeñas cantidades de gas de la glucosa, fructuosa, galactosa y manosa; rara vez de la xylosa. No ataca la lactosa ni la sacarosa. No utiliza el citrato de amonio como única fuente de carbono.

Aparte de su definitivamente reconocido poder patógeno en las "diarreas de verano" infantiles, se le ha aislado de fiebres paratifoideas (9).

Hay otras bacterias semejantes a ésta que se llaman a veces *Proteus Morganii* aunque tienen características diferentes en cuanto a motilidad y su acción sobre la

leche. Pero el término *Proteus Morganii* o bacilo de Morgan debe usarse para denominar a la bacteria patógena que hemos descrito.

Proteus Inconstans: (*Providencia*).

Aunque este es el nombre que le da el Manual Bergey (10) los autores prefieren el de Grupo *Providencia* que le dio tentativamente Kauffmann en 1951 (11); este nombre se originó porque Stuart et. al., en la Universidad de Brown en Providence, Rhode Island, lo describieron por primera vez (12).

Aunque en cierta forma relacionados con el Género *Proteus*, no hidrolizan la urea sino excepcionalmente, pueden fermentar o no la lactosa y son fermentadores lentos de la sacarosa.

Son en realidad miembros del Grupo *Paracolón*. Son bacilos móviles por flagelos peritricos, Gram negativos, utilizan el citrato de amonio como única fuente de carbono.

Están asociados con brotes institucionales de diarreas infantiles y pueden considerarse como patógenos. Su estudio serológico está incompleto, lo que hace difícil su identificación en asociación con enfermedades entéricas. Se ha aislado de casos de gastroenteritis y de infecciones del tracto urinario.

Bacterias coliformes:

Son todos los bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, que no forman esporos, que son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a 32°-35°C. en 48 horas, en medios de cultivos sólidos y líquidos (13).

Por la fórmula IMVIC (I = Indol, M = Rojo de Metilo, V = V.P., o sea producción de Acetil - Metil - Carbinol, C = Capacidad de utilización del Citrato de Amonio) se reconocen tres grupos principales:

* Difco (B 272).

| | |
|------------------------------------|---------|
| <i>Escherichia Coli</i> (clásico): | + + - - |
| Grupo <i>Klebsiella-Aerobacter</i> | - - + + |
| Grupo Intermedio | - + - + |

Este último grupo incluye el *Escherichia freundii* o *Citrobacter* y el *E. intermedium*; no tiene importancia en patología, pues son bacterias típicamente saprofitas, muy extendidas en la naturaleza (suelo y agua) y en el intestino del hombre y otros animales.

Las bacterias coliformes fermentan la lactosa con producción de ácido y gas.

Escherichia Coli:

Aunque es habitante normal del tracto intestinal del hombre y otros vertebrados, causa frecuentemente infecciones del tracto urogenital y bajo ciertas circunstancias infecciones del mismo tracto digestivo (enteritis infantiles) y órganos anexo (vesícula biliar) (14).

Grupo *Klebsiella - Aerobacter*:

Comprende: el Género *Klebsiella*, cuyo principal representante es la *K. pneumoniae* o bacilo de Friedländer, asociada con infecciones agudas del tracto respiratorio; y el Género *Aerobacter*, que se conoce como *Aerobacter aerogenes* y que corresponde al *Bact. lactis aerogenes* de Escherich.

El *A. aerogenes*, por definición, es inmóvil y no licua la gelatina, mientras que la *Klebsiella* es inmóvil y la gelatina es licuada lentamente. Las propiedades descritas no se encuentran frecuentemente separadas. La mayoría de las cepas móviles también licuan la gelatina y son por definición *aerobacter cloaceae*, término que debe preferirse. El término *A. aerogenes* tiende a desaparecer.

Ni el Género *Aerobacter* ni el Género *Klebsiella* tienen importancia como enteropatógenos.

Pero en todo caso, cabe aclarar que la investigación de las bacterias coliformes

no tiene por objeto ni descubrir la contaminación fecal (aunque esta sí es una interpretación de importancia en muy altos Recuentos de Coliformes) ni identificar el *E. Coli* en los productos lácteos, sino averiguar en qué grado se adoptan medidas para disminuir la contaminación bacteriana en los productos lácteos (2).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se aísla de leche de consumo, cruda y que en ese estado es consumida, cepas de *Shigella Flexneri 6*, *Proteus morgani* y *Providencia (Proteus inconstans)*. El aislamiento de *Shigella-Flexneri 6* se hizo durante un brote de gastroenteritis, en leche que se consumía cruda en la población afectada.

Se aísla de leche pasteurizada de consumo, cepas de *Proteus morgani* y *Providencia (Proteus inconstans)*.

En ambos casos coincide el aislamiento de cepas patógenas con muy altos recuentos de bacterias coliformes, lo que está de acuerdo con lo expresado en los "Standard Methods" y "Normas":

"Los peligros potenciales contra la salud son aproximadamente proporcionales a las densidades de coliformes que se encuentran en los productos lácteos y alimentos afines para la venta, sobre todo si están pasteurizados".

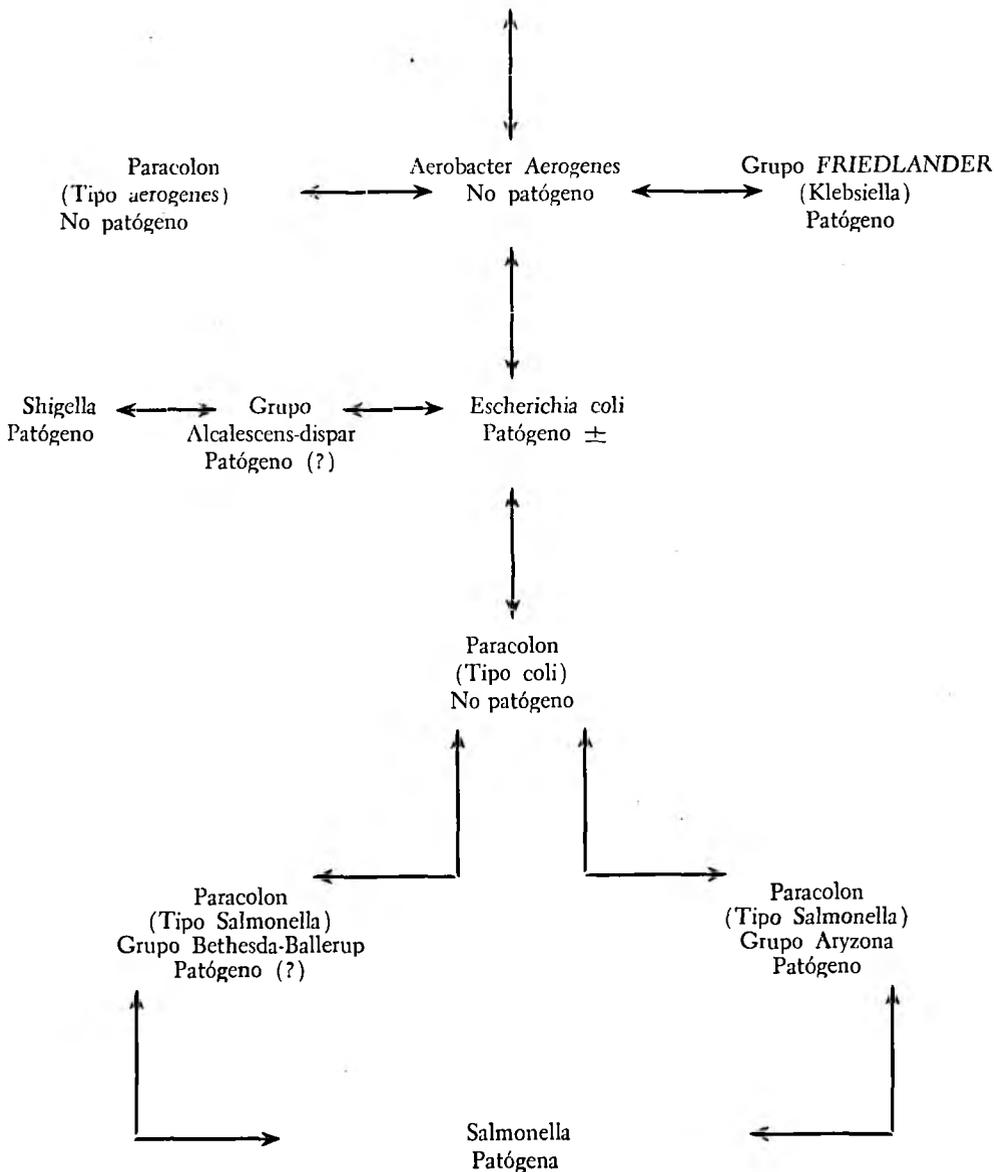
Se demuestra una vez más el riesgo que implica el consumo de leche cruda y leche no adecuadamente pasteurizada.

Se requiere la ejecución de investigaciones semejantes, para mostrar con el aislamiento de bacterias comprobadamente patógenas a las autoridades sanitarias la necesidad de establecer control muy estricto sobre la leche y demás alimentos, sobre todos aquellos dirigidos a la población infantil; y a la población la necesidad de consumir leche y productos lácteos procesados debidamente.

CUADRO N° 2
 INTERRELACION APROXIMADA
 DE LOS BACILOS ENTERICOS

Según Borrows (6), con ligeras modificaciones
 en nomenclatura.

PARACOLON
 (Tipo Anaerogénico - aerogenes)
 (GRUPO PROVIDENCE. Patógeno)



REFERENCIAS

1. TORRES M. J. et. al. — *Estudio Inicial de la Higiene de las Leches Pasterizadas en la Ciudad de Bogotá*. 1965. Datos no publicados
2. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 11th ed. New-York, American Publish Health Association, 1960.
- 2A. *Normas para el Examen de los Productos Lácteos*. 11ª ed. Organización Panamericana de la Salud. Publicaciones científicas N° 84, 1963.
3. *Productos para Laboratorios de Microbiología*, 1ª ed. en español, Baltimore Biological Laboratory Inc., México, 1959.
4. *Difco Manual*, 9th ed., Difco Laboratories, Dctroit, 1963.
5. FLEXNER S. — *Zbl. Bact.* 28: 265, 1900.
6. BORROWS W. — *Textbook of Microbiology*, 17th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, P. 491-501, 1961.
7. HIGGINS and FLOYD. — *Amer. Jour. Trop. Med. and Hig.* 4: 263, 1955.
8. MORGAN, H. DE R. — *Brit. Med. Jour.*, 908, 1906.
9. HAVENS, L. C., and MAYFIELD, C. R. — *Jour. Prev. Md.*, 4: 179, 1930.
10. BREED, R. MURRAY, E. G. D. and SMITH N. R. — *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology* 7th ed. the Williams & Wilkns Company, Baltimore, 1957.
11. KAUFFMAN F. — *Acta path. microbiol. Scand.* 26: 381, 1951.
12. STUART, C. A., WHEELER, K. M., Mc GANN V. — *J. Bact.*, 52: 531, 1946.
13. *International Standards for Drinking Water*, World Health Organization, Geneva; WHO 1958. P. 20.
14. WILSON, G. S. and MILES, A. A., TOPLEY and WILSON'S. — *Principles of Bacteriology and Immunity* 4th ed. The Williams and Wilkins Company, 1961.