

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA CARACTERIZACION DE *SALMONELLA*

María Inés Caffer
Raquel Terragno

Ministerio de Salud

Subsecretaría de Investigación y Tecnología
ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Departamento Bacteriología
Servicio Enterobacterias
Buenos Aires, Argentina
2001

INDICE

1. INTRODUCCION	3
2. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS	4
3. EXAMEN MICROSCÓPICO DE MATERIA FECAL	5
4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACION BIOQUÍMICA	5
4.1. Aislamiento	5
4.2. Identificación Bioquímica	6
4.3. Procedimiento	8
4.3.1. Materiales	8
4.3.2. Metodología (Ver Fig 1. Flujograma de Aislamiento e Identificación Bioquímica)	8
4.4. Problemas de Diagnóstico Diferencial	10
5. SEROTIPIFICACION	11
5.1. Antigenos Somáticos (O)	12
5.2. Antigenos Flagelares (H)	12
5.3. Antígeno Capsular (Vi)	12
5.4. Esquema de Kauffmann - White	13
5.4. Esquema de Kauffmann - White	14
5.5. Procedimiento	15
5.5.1. Materiales	15
5.5.2. Metodología (ver fig. 2, Flujograma de serotipificación)	16
5.6. Fenómenos de Variación que afectan la Serotipificación	21
5.6.1. Variaciones somáticas	21
5.6.2. Variaciones flagelares	22
6. CONSERVACION DE AISLAMIENTOS	22
7. MEDIOS DE CULTIVO	23
7.1. Propiedades e Interpretación de los Medios Cultivo para Aislamiento	23
7.2. Propiedades e Interpretación de las Pruebas Bioquímicas para Identificación	25
7.3 Medios y Reactivos Especiales	35
BIBLIOGRAFIA	37

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA CARACTERIZACION DE SALMONELLA

1. INTRODUCCION

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), son anaerobios facultativos, no esporulados. No fermentan la lactosa (excepto *S. enterica* subesp. *arizonae* y *S. enterica* subesp. *diarizonae*), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. Typhi*); no producen indol; no degradan urea; decarboxilan lisina y ornitina.

El género *Salmonella* fue objeto de sucesivas modificaciones, a través de los años, en lo que respecta a su nomenclatura y taxonomía. Sin embargo, todavía se siguen usando muchos de los métodos descriptos y desarrollados por P.R. Edwards y H.W. Ewing, en la década del 40, cuando definieron e identificaron las primeras cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Estudios de DNA mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella enterica* subesp. *enterica*, *Salmonella enterica* subesp. *salamae*, *Salmonella enterica* subesp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subesp. *houtenae* y *Salmonella enterica* subespecie *indica*.

A su vez las subespecies de *Salmonella enterica* y la especie *Salmonella bongori* se dividen en más de 2400 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H.

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* (subespecie I) y llevan un nombre por lo general relacionado con el lugar geográfico donde se la aisló por primera vez.

Dado que las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres, escapan al dominio del “Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana” y por ello deben escribirse en letra tipo romano, no en itálica, de la siguiente manera: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium; a los fines prácticos: *Salmonella* Typhimurium.

Las serovariedades pertenecientes a las subespecies restantes y a *Salmonella bongori*, de baja incidencia en patología humana o animal, se designan con el nombre de la subespecie, seguido de la fórmula antigénica, por ej: *Salmonella* subesp. IV 50 : b : - (*Salmonella enterica* subesp. *houtenae* 50:b : -)

Los nombres de las serovariedades están condensados en el Esquema de Kauffmann-White, publicado por el “Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de Salmonella”, del Instituto Pasteur de París.

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales.

Desde el punto de vista epidemiológico *Salmonella* spp. se puede clasificar en tres grupos:

- Las que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.
- Las que infectan sólo al hombre: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A y *Salmonella* Paratyphi C y que se transmiten en forma directa ó indirecta de una persona a otra
- Las que están adaptadas a un huésped en especies animales: *S. Abortusovis*, a los ovinos; *S. Abortusequi*, a los equinos y *S. Gallinarum*, a las aves

Salmonelosis: es una zoonosis de distribución mundial. Se notifica con mayor frecuencia en los países desarrollados, ya que poseen mejores sistemas de notificación. Es una enfermedad de origen alimentario, porque los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión. La tasa de incidencia de la infección es mayor en los lactantes y en niños de corta

edad. Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60 - 80% de los casos son esporádicos; a veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos, restaurantes. La fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados en su origen, o con menor frecuencia durante su manipulación por un portador; es también importante la transmisión de persona a persona.

Las bacterias del género *Salmonella* causan en el hombre una gastroenteritis aguda, con cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos. La deshidratación puede ser grave sobre todo en menores de 1 año, ancianos e inmunocomprometidos. Aunque la morbilidad por salmonelosis es elevada, la mortalidad es baja, excepto, en niños de corta edad, ancianos e inmunocomprometidos. La infección que comienza con una diarrea aguda puede continuar hacia una infección focal o septicemia.

Tiene un período de incubación de 6 a 72 horas, generalmente entre 12 a 36 horas y la gastroenteritis persiste de 24 a 72 horas. La dosis infectiva es de 10^5 a 10^8 microorganismos.

La transmisión que oscila entre varios días a varias semanas, ocurre durante toda la evolución de la infección. El estado de portador temporal puede persistir varias semanas, especialmente en lactantes y es raro el de portador crónico (de más de un año).

Se transmite por la ingestión de alimentos provenientes de animales infectados, incluye huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos; carnes y sus derivados; leche cruda y productos lácteos; agua contaminada; aves de corral (especialmente pollo y pavo). También se informaron brotes por el consumo de frutas, jugo de frutas y hortalizas crudas contaminadas.

Otra fuente de contaminación son las mascotas (tortugas, iguanas y pájaros) y los productos farmacéuticos de origen animal no esterilizados (polvo de tiroides, hormonas pancreáticas, sustancias corticoadrenales, etc.).

La infección también se transmite a los animales de granja a través de sus alimentos y de fertilizantes elaborados con harinas de carne, de pescado y de huesos contaminados. Es importante la transmisión de persona a persona por la vía fecal-oral, en especial cuando existe diarrea.

Síndrome de fiebre entérica: está asociado con *Salmonella* Typhi (fiebre tifoidea), *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi C y *Salmonella* Paratyphi B (fiebre paratifoidea). Los tres primeros microorganismos son patógenos exclusivos del hombre y *S. Paratyphi B* se puede encontrar también en animales.

La relación entre los casos de fiebre tifoidea y paratifoidea es 10:1, según informes de la Organización Mundial de la Salud.

Estas serovariedades causan un cuadro febril prolongado con septicemia y compromiso del tejido linfático.

El período de incubación de la fiebre tifoidea es de 1 a 3 semanas, con un rango de 3 a 56 días, dependiendo de la dosis infectante.

Debido a que este síndrome puede cursar con graves complicaciones como hemorragia y perforación intestinal, estado tóxico confusional, miocarditis, complicaciones supurativas y con menor frecuencia meningitis; es importante diagnosticar los agentes causales con certeza y rapidez.

2. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Para el diagnóstico de una infección por *Salmonella* se pueden usar muestras de: materia fecal, sangre, orina, órganos, bilis y pus de abscesos.

Materia fecal: La muestra debe obtenerse en el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos. Con un hisopo estéril, se recoge una pequeña cantidad de una evacuación espontánea reciente, seleccionando las partes mucosas o sanguinolentas. En caso de no poder obtener esta muestra, se hace un hisopado rectal. Las muestras que no se pueden procesar dentro de las dos horas, se deben colocar en medio de transporte refrigerado. Como medio de transporte se usa Cary – Blair, que tiene la ventaja de ser estable hasta 18 meses después de su preparación, cuando las condiciones de almacenamiento son correctas. En este medio de transporte se puede conservar la muestra hasta 5 días.

Cuando la muestra llega al laboratorio se hace una suspensión de la materia fecal colocando el hisopo en 1 ml de solución fisiológica (0,85% ClNa) y rotándolo contra la pared del tubo; esta muestra se siembra en los medios de aislamiento. Una vez hecha la suspensión en solución fisiológica, el hisopo se coloca en un medio de enriquecimiento (caldo selenito), que facilita la recuperación de las bacterias cuando se encuentran en pequeñas cantidades. Se incuba 18-24 horas a 37°C y luego se realizan subcultivos en los medios de aislamiento (Ver Fig. 1 Flujoograma de Aislamiento e Identificación Bioquímica.).

Sangre: la muestra se toma en el momento del pico de fiebre. Se siembran 10 ml de sangre en 100 ml de caldo nutritivo; se incuba a 35 - 37°C, durante 15 días, haciendo controles periódicos de acuerdo a la turbidez observada. Luego se efectúa el aislamiento. El hemocultivo reviste un interés especial en el caso de fiebre tifoidea y paratifoidea; pero no es constantemente positivo. Los porcentajes de positividad, en ausencia de tratamiento antibiótico, son: 90% durante la primera semana, 75% en la segunda, 40% en la tercera y 10% en la cuarta.

Los hemocultivos son negativos en los síndromes de intoxicaciones alimentarias en adultos por serovariedades como *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis*, sin embargo estas serovariedades causan septicemia en los inmunocomprometidos.

Material de abscesos y orina: el pus y la orina se recogen en recipientes estériles y una alícuota se siembra directamente en los medios de cultivo.

3.EXAMEN MICROSCÓPICO DE MATERIA FECAL

Leucocitos en materia fecal

Se deposita con el hisopo una porción de la muestra de materia fecal sobre un portaobjeto, se agregan dos gotas de azul de metileno, se coloca un cubreobjeto, se espèra 2 a 3 minutos, para que los leucocitos adquieran una buena tinción nuclear y se observa al microscopio.

Se cuentan las células identificadas como mononucleares o polimorfonucleares. Los leucocitos y las células epiteliales se anotan por separado y no se tienen en cuenta las que no se pueden identificar. Los leucocitos fecales aparecen en grandes cantidades (más de 30 por campo) en los casos de shigelosis y en menor número en los de salmonelosis. En estas infecciones se observan principalmente polimorfonucleares.

4.IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACION BIOQUÍMICA

4.1. Aislamiento

Para el aislamiento se utilizan medios diferenciales y selectivos como: agar MacConkey (MC), agar Eosina Azul de Metileno (EMB), agar Salmonella Shigella (SS), agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar Hektoen (HE), agar verde brillante (BG). Las placas se incuban a 37°C durante 18 a 24 horas y se observan colonias, de 2 mm de diámetro, con las características indicadas en la Tabla 1.

TABLA 1: Características de las colonias en medios selectivos y diferenciales

Medio de cultivo	Selectividad	Aspecto de las colonias
Agar MacConkey	Baja	Incoloras
Agar EMB	Baja	Incoloras
Agar SS	Alta	Incoloras con centro negro
Agar XLD	Alta	Rojas con centro negro
Agar HE	Alta	Verdes-azuladas con centro negro
Agar BG	Alta	Rosadas pálidas

De este listado se considera que se deben utilizar un medio de baja selectividad (agar MacConkey) y uno de alta selectividad (agar SS), para el aislamiento apropiado, el reconocimiento y la diferenciación de las colonias típicas de *Salmonella*.

4.2. Identificación Bioquímica

La identificación requiere la realización de pruebas bioquímicas y de serotipificación, de distinta complejidad, dependiendo de la capacidad del laboratorio. Es conveniente que los laboratorios con menores disponibilidades envíen las cepas aisladas a laboratorios de nivel intermedio (provinciales y/o regionales), para completar las pruebas bioquímicas y realizar pruebas de serotipificación. A su vez el Laboratorio Nacional de Referencia realiza las pruebas bioquímicas de mayor complejidad y pruebas de serotipificación complementarias.

El género *Salmonella* está compuesto por dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* a su vez está subdividida en seis subespecies, a cada una de las cuales se las denomina con un nombre y un número romano. Por ej. *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (I).

Las subespecies tienen características bioquímicas que las diferencian entre sí (Tabla 2)

Tabla 2: Propiedades bioquímicas diferenciales de las subespecies de *Salmonella*

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>salamae</i> (II)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>houtenae</i> (IV)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>indica</i> (VI)	<i>S. bongori</i> (V)
Dulcita	+	+	-	-	-	d	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	- (75%)	+	-	d	-
Habitat de la mayoría de las cepas	Animales de sangre caliente		Animales de sangre fría y medio ambiente				

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos; d: diferentes reacciones

La mayoría de las serovariedades (99,8%) de *Salmonella* aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (I) y tienen propiedades bioquímicas características (Tabla 3), siendo excepciones las serovariedades *S. Typhi* y *S. Paratyphi A* (Tabla 4 en 3.4 Problemas de Diagnóstico Diferencial)

Tabla 3: Pruebas bioquímicas de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (I)

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella enterica</i> subep. <i>enterica</i> (I)
Lactosa ***	-
ONPG	-
Producción de SH ₂	+
Glucosa (fermentación) ***	+/con gas
Dulcita (fermentación) ***	+
Adonita (fermentación) ***	-
Lisina decarboxilasa **	+
Ornitina decarboxilasa**	+
Arginina dehidrolasa **	+
Urea (hidrólisis)**	-
Indol	-
Gelatina (hidrólisis) ****	-
Rojo de Metilo *	+
Voges Proskauer *	-
Citrato de Simmons **	+
Malonato (utilización)*	-

*Lectura a los 2 días; ** Lectura hasta los 4 días; *** Lectura hasta los 7 días; **** Lectura hasta los 30 días

Es importante tener en cuenta la posibilidad de aislar más de una serovariedad de *Salmonella* de un alimento ó de un material patológico. Si bien esto no ocurre con frecuencia, hay que tenerlo presente cuando se trabaja con muestras de materia fecal o de ganglios mesentéricos y sobre todo en el caso de ciertos alimentos para consumo humano o animal, como huevos a granel, embutidos, harinas de carnes o huesos. Es por ello que se recomienda estudiar varias colonias simultáneamente.

4.3. Procedimiento

4.3.1. Materiales

Equipamiento

- Estufa de cultivo a 37°C
- Heladera a 4°C
- Ansas
- Tubos de ensayo
- Tubos de 13x100 con tapa a rosca
- Gradillas
- Mecheros

Medios de cultivo

- Agar TSA (agar tripticasa de soya)
- Agar TSI (agar hierro – tres azúcares)
- Agar LIA (agar lisina – hierro)
- Discos de ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) para la reacción de la β-galactosidasa
- Agar SIM
- Medio base de Moeller para decarboxilasas
- L-lisina monoclorhidrato
- L-ornitina monoclorhidrato
- L-arginina monoclorhidrato
- Medio base para azúcares
- Solución de dulcita al 5%
- Malonato
- Medio RM – VP
- Reactivo de Erlich, para la prueba de indol
- Rojo de metilo
- Solución de KOH, para la prueba de Voges Proskauer
- α-naftol, para la prueba de Voges Proskauer

4.3.2. Metodología (Ver Fig 1. Flujograma de Aislamiento e Identificación Bioquímica)

De los medios de aislamiento se seleccionan 2 a 3 colonias con el aspecto descrito en Tabla 1 y se siembran con ansa punción en: estría de TSA, TSI y LIA y se incuban a 37°C, durante 18 - 24 horas.

Lectura:

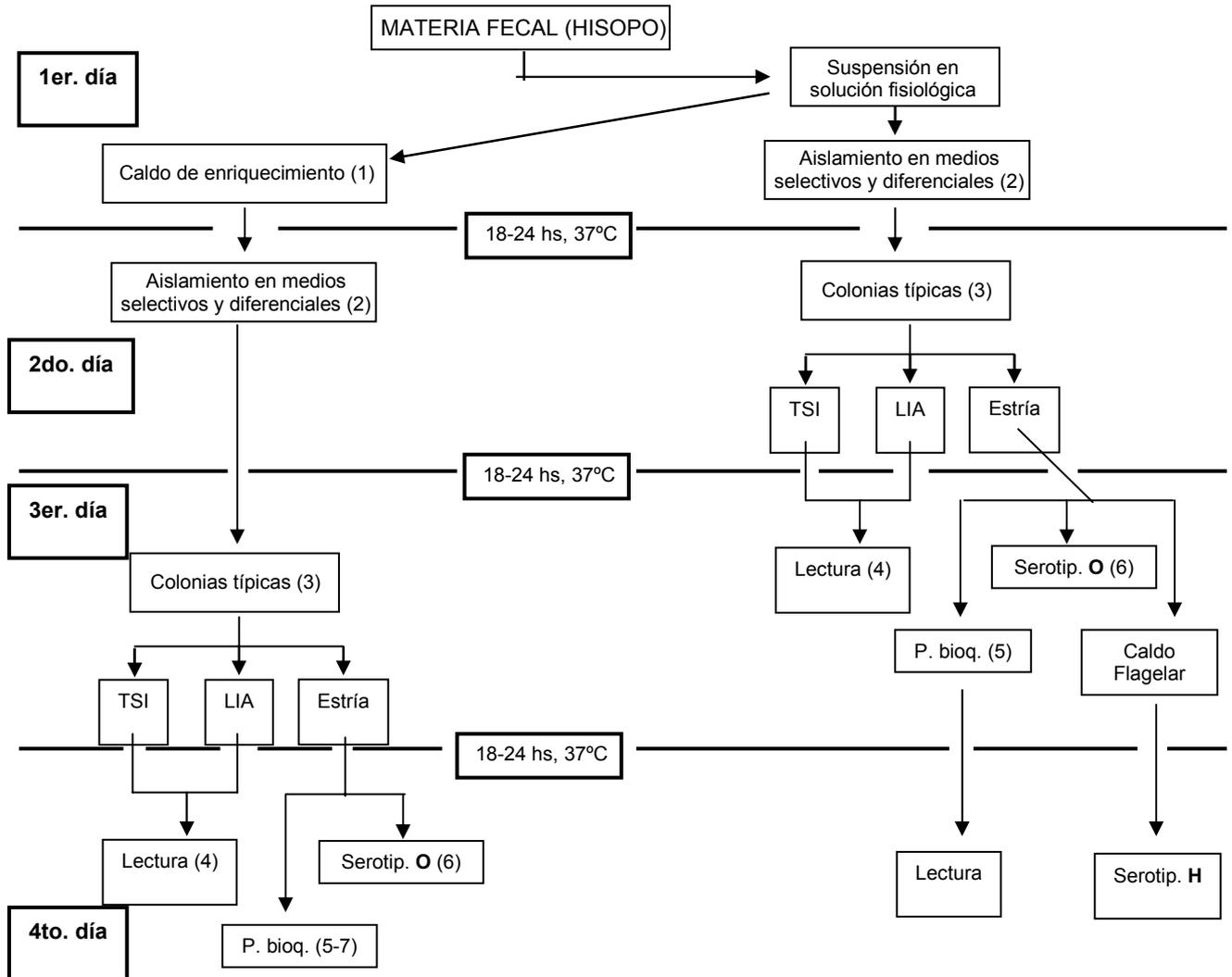
- Agar TSI: +K/A: pico alcalino (rojo)/fondo ácido (amarillo), con producción de SH₂ y con o sin gas por fermentación de glucosa únicamente
- Agar LIA: +K/K: pico alcalino (violeta)/fondo alcalino (violeta) con producción de SH₂.
- A partir del TSI se hace la prueba del:
ONPG ó β-galactosidasa: con el ansa rulo se resuspende una abundante cantidad de cultivo en 0,5 ml de solución fisiológica (Cl Na al 0,85%) estéril. Se agrega un disco de ONPG. Se incuba a 37°C, durante 18- 24 horas
Lectura: Resultado positivo: color amarillo
Resultado negativo: incoloro
Esta prueba es negativa para la mayoría de las serovariedades de importancia clínica, excepto para las pertenecientes a las subespecies IIIa, IIIb y V.

- d. Si TSI y LIA dan resultados compatibles con *Salmonella*, de la estría de TSA, se siembra una nueva estría de TSA, caldo flagelar, dulcita, malonato, decarboxilasas, caldo RM-VP, SIM.

Las pruebas se incuban a 37°C: la estría de TSA, el caldo flagelar y el SIM durante 18 - 24 horas, el RM-VP y el malonato, durante 48 horas, las decarboxilasas durante 4 días, la dulcita durante 7 días y se realizan lecturas diariamente (Ver 6.3 Propiedades e interpretación de las pruebas bioquímicas para identificación).

Lectura e interpretación de resultados: Los resultados de las pruebas bioquímicas se registran como positivos o negativos.

Fig. 1. Flujograma de Aislamiento e Identificación Biquímica



- (1) Caldo selenito
- (2) Agar MacConkey y agar SS, o agar Hektoen, o agar XLD, o agar BG.
- (3) Se pican de 2 a 3 colonias.
- (4) Si TSI y LIA dan resultados compatibles con *Salmonella*, se siembran Pruebas bioquímicas complementarias (P.bioq.) y se realiza la serotipificación O (Serotip. O)
- (5) Pruebas bioquímicas complementarias: SIM, RM-VP, decarboxilasas, dulcita, malonato.
- (6) Serotip: Serotipificación. Si la serotipificación somática O de las colonias obtenidas por ambos procedimientos de aislamiento diera igual, la serotipificación flagelar H debe hacerse en una sola de ellas.
- (7) Si la serotipificación somática O de las colonias obtenidas por ambos procedimientos diera igual, no es necesario sembrar Pruebas bioquímicas complementarias

4.4. Problemas de Diagnóstico Diferencial

a) *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi A, pueden diferenciarse de otras *Salmonella* spp, por las siguientes pruebas bioquímicas:

Tabla 4: Pruebas bioquímicas diferenciales entre *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A y *Salmonella* spp.

P. bioquímicas	S. Typhi	S. Paratyphi A	<i>Salmonella</i> spp.
SH ₂ (TSI)	Trazas	-	+
Lisina decarboxilasa	+	-	+
Ornitina decarboxilasa	-	+	+
Arginina dehidrolasa	-	-	+
Glucosa (gas)	-	+	+
Citrato Simmons	-	-	+

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos

b) Algunas cepas de *Salmonella* spp. se pueden confundir con otras enterobacterias productoras de SH₂ como *Proteus mirabilis* y *Citrobacter freundii* que son comensales del aparato digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente, pero que no son enteropatógenos.

Tabla 5: Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subesp. enterica (I) y *Proteus mirabilis*

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica (I)	<i>Proteus mirabilis</i>
SH ₂ (TSI)	+	+
Urea (hidrólisis)	-	+
Fenilalanina deaminasa	-	+
Lisina decarboxilasa	+	-
Ornitina decarboxilasa	+	+
Lactosa (fermentación)	-	-
Dulcita (fermentación)	+	-
ONPG	-	-

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos

Tabla 6: Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella enterica* subesp. enterica (I) y *Citrobacter freundii*

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella enterica</i> subesp. enterica (I)	<i>Citrobacter freundii</i>
SH ₂ (TSI)	+	+
Urea (hidrólisis)	-	d
Lisina decarboxilasa	+	-
Ornitina decarboxilasa	+	d
Lactosa (fermentación)	-	d
Sacarosa (fermentación)	-	d
Dulcita (fermentación)	+	d
Malonato (fermentación)	-	d
ONPG	-	+

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos; d: diferentes reacciones

c) Las cepas de *Citrobacter freundii* suelen ser identificadas por error como *S. enterica* subesp. *arizonae* (IIIa) (serovariedades monofásicas) y *S. enterica* subesp. *diarizonae* (IIIb) (serovariedades difásicas), (ex-género *Arizona*), en razón de compartir caracteres bioquímicos tales como: SH₂ (TSI) +, ONPG + y un perfil de fermentación de hidratos de carbono muy parecido.

Tabla 7: Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella* subesp. *enterica* IIIa y IIIb y *Citrobacter freundii*

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella</i> subesp. <i>enterica</i> IIIa y IIIb	<i>Citrobacter freundii</i>
Lisina decarboxilasa	+	-
Ornitina decarboxilasa	+	- (con excepciones)
Glicerol (fermentación)	-	+
Malonato (utilización)	+	-
Gelatina (hidrólisis)	+ (lenta)	-

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos

d) Muy raramente cepas de *Salmonella* spp. pueden confundirse con otras enterobacterias productoras de SH₂, como *E. coli* SH₂ + o *Edwardsiella tarda*

Tabla 8: Caracteres bioquímicos diferenciales entre *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (I) , *Edwardsiella tarda* y *Esherichia coli* SH₂ +

P. bioquímicas	<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>E. tarda</i>	<i>E. coli</i> SH ₂ +
Indol	-	+	+
Citrato Simmons	+	-	-
Lisina decarboxilasa	+	+	+
Arginina dehidrolasa	+	-	-/+
Manita (fermentación)	+	-	+
Dulcita (fermentación)	+	-	+/-
Ramnosa (fermentación)	+	-	+
Xilosa (fermentación)	+	-	+
ONPG	-	-	+

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos

5. SEROTIPIFICACION

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, como así también es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión. Para establecer las relaciones genéticas entre cepas y por ende definir con mayor precisión sus relaciones epidemiológicas, se utilizan técnicas como la fagotipificación y la electroforesis de campo pulsado (PFGE), entre otros métodos de subtipificación.

El uso de reacciones antígeno – anticuerpo para la serotipificación de las bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, aún entre grupos de microorganismos relacionados. Los microorganismos expresan una gran variedad de antígenos (Ag): componentes estructurales de la célula (pared, cápsula, fimbrias); productos de excreción (exotoxinas, enzimas extracelulares).

Químicamente, los Ag pueden ser proteínas, hidratos de carbono y complejos de polipéptidos y carbohidratos. Como son moléculas complejas tienen más de una subestructura que puede servir como determinante antigénico. Debido a esto en los sueros inmunes se encuentran anticuerpos que reaccionan contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula.

La base de la serotipificación para todas las enterobacterias es similar: se pone en evidencia la presencia de antígenos somáticos, flagelares y capsulares.

En el caso de *Salmonella*, las serovariedades surgen como consecuencia de una asociación particular de factores antigénicos somáticos **O** y flagelares **H**.

5.1. Antígenos Somáticos (O)

Están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina.

Son cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS) que se encuentra en todos los microorganismos Gram negativos.

La cadena de polisacáridos del Ag **O** es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Como esta estructura difiere ampliamente entre las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad antigénica **O**.

Estos antígenos son termoestables y resistentes a ácidos diluidos y alcohol.

La estructura somática se denomina con la letra **O** seguida de números arábigos separados por comas, que corresponden a sus factores, por ej. *S. Typhimurium* O:1,4,5,12; *S. Enteritidis* O:1,9,12

Los Ag **O** se pueden clasificar de la siguiente manera:

- 1) Factores mayores que identifican el grupo antigénico **O**; por ej., el factor O:4, el factor O:9
- 2) Factores menores, que pueden ser
 - a) Los que tienen poco o ningún valor discriminativo porque siempre están asociados a otro factor; por ej., O:12 que siempre está asociado con O:2, O:4 y O:9, como se presenta en *S. Paratyphi A* O: 1,2,12; *S. Typhimurium* O: 1,4,5,12 y *S. Enteritidis* O: 1,9,12
 - b) Los que surgen como consecuencia de una modificación química de los Ag mayores; por ej., O:5 resulta de la acetilación de la abeciosa presente en las unidades repetidas del polisacárido responsable de la especificidad O:4,12; O:1 resulta de la inserción de un residuo de glucosa en la galactosa de la cadena de polisacárido, como es el caso de la serovariedad *S. Typhimurium* O:1,4,5,12

5.2. Antígenos Flagelares (H)

El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (“hook”) y un filamento. El cuerpo basal ancla el flagelo a la envoltura de la célula y el “hook” une el cuerpo basal con el filamento. En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento.

El filamento está constituido por flagelina, proteína de alto peso molecular. En *Salmonella* se han encontrado más de 60 especificidades antigénicas flagelares. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina.

Estos antígenos son sensibles al calor.

Unas pocas serovariedades de *Salmonella* poseen una sola fase flagelar, esas cepas se llaman monofásicas, por ej., *Salmonella* Enteritidis (9,12:g,m:-), *Salmonella* Typhi (9,12 [VI]:d:-); pero la gran mayoría de las serovariedades tienen dos especificidades en su antígeno flagelar o sea son cepas difásicas; por ej., *Salmonella* Typhimurium (1,4,5,12:i:1,2) y *Salmonella* Hadar (6,8:z₁₀:e,n,x), que expresan la fase 1 (identificada en los ejemplos por las fases: **i** ó **z₁₀**) y la fase 2 (por las fases: **1,2** y **e,n,x** respectivamente).

5.3. Antígeno Capsular (Vi)

Entre los antígenos capsulares de las Enterobacterias, el **Vi** es el más importante en el género *Salmonella*. Se encuentra en sólo tres serovariedades: *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y en algunas cepas de *S. Dublin*.

TABLA 9: Esquema de Kauffmann-White (*)

FORMULES ANTIGENIQUES/ANTIGENIC FORMULAS			
TYPE	ANTIGENE SOMATIQUE (O) SOMATIC (O) ANTIGEN	ANTIGENE FLAGELLAIRE (H) FLAGELLAR (H) ANTIGEN	
		Phase 1	Phase 2
Groupe/Group O:2 (A)			
Paratyphi A	<u>1</u> ,2,12	a	[1,5]
Nitra	2,12	g,m	–
Kiel	<u>1</u> ,2,12	g,p	–
Koessen	2,12	l,v	1,5
Groupe/Group O:4 (B)			
Kisangani	<u>1</u> ,4,[5],12	a	1,2
Hessarek ¹	4,12, <u>27</u>	a	1,5
Fulica ¹	4,[5],12	a	–
Arechavaleta	4,[5],12	a	1,7
Bispebjerg	<u>1</u> ,4,[5],12	a	e,n,x
Tinda	<u>1</u> ,4,12, <u>27</u>	a	e,n,z ₁₅
II	<u>1</u> ,4,[5],12, <u>27</u>	a	e,n,x
Huettwillen	<u>1</u> ,4,12	a	l,w
Nakuru	<u>1</u> ,4,12, <u>27</u>	a	z ₆
II	<u>1</u> ,4,12, <u>27</u>	a	z ₃₉
Paratyphi B ^{2(a,b)}	<u>1</u> ,4,[5],12	b	1,2
Limete	<u>1</u> ,4,12, <u>27</u>	b	1,5
II	4,12	b	1,5

¹ Ces deux sérovars Hessarek et Fulica, dont les formules pourraient être confondues, sont maintenus (de même que Miami/Sendai) parce qu'ils ont des caractères biochimiques très différents : rhamnose, gaz/glucose, dulcitol, tréhalose, citrate de Simmons, L(+) tartrate (= *d*-tartrate), mucate, H₂S, tétrathionate-réductase : + avec Hessarek, – avec Fulica. Ce dernier sérovar est très rare.

Serovar Hessarek and Fulica, with a same global antigenic formula, are not combined (as Miami/Sendai) because their biochemical characters are very different : rhamnose , gaz/glucose, dulcitol, trehalose, Simmons citrate agar, L(+) tartrate (= *d*-tartrate), mucate, H₂S, tetrathionate-reductase : + for Hessarek, – for Fulica. This last serovar is very rare.

^{2(a)} La variété L(+) tartrate (= *d*-tartrate) positive est souvent appelée variété Java.
Variety L(+) tartrate (= *d*-tartrate) positive is often called variety Java.

^{2(b)} Peut posséder un antigène H phase R.
May possess a R-phase H antigen. } z₃₃

(*) M. Y. Popoff et L. Le Minor. 1977. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, Francia.

5.4. Esquema de Kauffmann - White

Sobre la base de los componentes antigénicos somáticos **O** y flagelares **H** se ha establecido lo que se denomina el **Esquema de Kauffmann-White**(ver Tabla 9), que agrupa a todas las serovariedades conocidas.

El mismo comprende:

Primera columna: indica el nombre de la serovariedad, si la misma pertenece a *S. enterica* subesp. *enterica* (I) ó las siglas S. II, S. IIIa, S. IIIb, S. IV, S. V, S. VI; indicando que la serovariedad considerada pertenece a la subespecie II ó III a, etc.

Segunda columna: Antígenos somáticos (O). Los números indican el ó los factores del antígeno **O** y se escriben, separados por una coma. Las serovariedades son agrupadas en grupos somáticos, cada uno de ellos caracterizado por un factor **O** mayor. Así se determinan los grupos A, B, C, etc. Por ej. el grupo **O:2** (A) está integrado por *S. Paratyphi* A (1,2,12:a:-) entre otras, el grupo **O:4** (B) por *S. Typhimurium* (1,4,5,12:i:1,2); *S. Agona* (1,4,12:f,g,s:-); *S. Saintpaul* (1,4,5,12:e,h:1,2), entre otras, etc.

El Esquema de Kauffmann-White presenta 67 grupos O, desde el grupo A hasta el Z y luego continúa con números, desde el O:51 hasta el O:67

Tercera y cuarta columna: Antígenos flagelares (H). Se indican los factores de las fases 1 y 2, del antígeno **H**, respectivamente. Para la fase 1 los factores se denominan con letras minúsculas, seguidas algunas veces por un número que figura como subíndice y para la fase 2 se emplean en general números arábigos, aunque también se utilizan letras minúsculas. Un signo "negativo" indica que la fase considerada está ausente y por lo tanto la serovariedad es monofásica.

- ❖ Los símbolos para los factores somáticos determinados por conversión fágica están subrayados (por ej. 1,2,12)
- ❖ [] = los factores **O** o **H** entre corchetes, no subrayados, pueden estar presentes o ausentes sin relación con la conversión fágica. Por ej. factor [5] del grupo **O:4** (B). Cuando los factores **H** están entre corchetes significa que ellos se encuentran excepcionalmente en cepas salvajes.

Ejemplos:

<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,9,12:g,m:- [Ag O 1, 9,12; Ag H (fase 1) g,m; Ag H (fase 2) es -; la fase 2 está ausente, por lo tanto la serovariedad es monofásica].
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,4,5,12:i:1,2 [Ag O 1,4,5,12 ; Ag H (fase 1) i ; Ag H (fase 2) 1,2; las dos fases flagelares están presentes, por lo tanto la serovariedad es difásica].
<i>Salmonella</i> Hadar	6,8:z ₁₀ :e,n,x
<i>Salmonella</i> Typhi	1,9,12[Vi]:d:-

5.5. Procedimiento

5.5.1. Materiales

Equipamiento

- Baño de agua a 50°C
- Estufa de cultivo a 37°C
- Heladera a 4°C
- Ansas
- Tubos de ensayo
- Tubos de 13x100 con tapa a rosca
- Tubos de Craigie
- Cajas de Petri de 50 mm de diámetro
- Láminas de vidrio de 20x20 cm
- Pipetas de 5 ml
- Gradillas
- Mechero
- Lámpara para leer aglutinaciones
- Palillos de madera

Medios de cultivo:

- Estrías de agar tripticasa de soya (TSA)
- Caldo flagelar
- Agar semisólido al 0,7% para inversión de fase
- Agar semisólido al 0,5 % para exaltar movilidad

Reactivos y Soluciones:

- Antisueros diagnósticos O y H (Servicio Antígenos y Antisueros - Instituto Nacional de Producción de Biológicos – A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”)
- Solución salina al 2%
- Solución fisiológica formolada al 1%

Antisueros diagnósticos

La designación de los antisueros polivalentes (OS-A, OS-B, etc.) es la utilizada por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos, A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina.

1. Antisueros somáticos - **O**

1.a - Antisueros polivalentes **O**: Estos antisueros sirven para orientar la serotipificación, permitiendo ubicar la cepa en estudio dentro de grandes grupos, que comprenden a varios grupos **O** del Esquema de Kauffmann – White.

OS-A :contienen anticuerpos **O** de los grupos A, B, D, E, L (del Esquema de Kauffmann - White)

(O :1,2,12 + 1,4,5,12 +1,9,12 + (9),46 + 3,10 + 1,3,19 + 21)

OS-B : contienen anticuerpos **O** de los grupos C1, C2, F, G, H (del Esquema de Kauffmann - White)

(O :6,7 + 6,8 + 11 +1,13,22 + 1,13,23 + 6,14,24 + 8,20)

OS-C: contienen anticuerpos **O** de los grupos I, J, K, M, N, O, P (del esquema de Kauffmann - White)

(O:16+18+6,14,18+28+30+35+38)

OS-D: contienen anticuerpos **O** de los grupos Q, R, S, T, U, V, W (del esquema de Kauffmann - White)
(O: 39 + 40 + 41 + 42 + 43 + 44 + 45)

OS-E: contienen anticuerpos **O** de los grupos O X, Y, Z, 51, 52 y 53 (del esquema de Kauffmann - White)
(O: 47 + 48 + 50 + 51 + 52 + 53)

OS-F: contienen anticuerpos **O** de los grupos O 54, 55, 56, 57, 58, 59 (del esquema de Kauffmann - White)
(O: 54 + 55 + 56 + 57 + 58 + 59)

OS-G: contienen anticuerpos **O** de los grupos O 60, 61, 62, 63, 64, 65 (del esquema de Kauffmann - White)
(O: 60 + 61 + 62 + 63 + 64 + 65 + 66 + 67)

1.b - Antisueros de grupo **O**. Por ej.: O:4,5; O:6,7; O:6,8; O:3,10; O:3,15

1.c - Antisueros de factores **O**. Por ej.: O:4; O:5; O:7; O:8; O:10; O:15; O:9

2. Antisueros flagelares - **H**

2.a. Antisueros polivalentes **H**

HS-1: 1,2 + 1,5 + 1,6 + 1,7 + z₆

HSA: a + b + c + d + i + z₁₀ + z₂₉

HS-B: e, h + e, nx + e, nz₁₅ + f, g + g, m, s + g, p + m, t

HS-C: k + l, v + l, w + r + y + z + z₄, z₂₃

2.b. Antisueros de fases **H**. Por ej. H:a; H:b; H:i; H:e, h; H:e, n, x; H:e, n, z₁₅; H:f, g; H:g, m; H:m, t; H:k; H:l, v; H:l, w; H:r; H:y; H:1, 2; H:1, 5; H:1, 6; etc.

2.c. Antisueros de factores **H**. Por ej.: H:h; H:x; H:z₁₅; H:f; H:m; H:p; H:s; H:t; H:v; H:w; H:2; H:5; H:6; H:7; etc.

5.5.2. Metodología (ver fig. 2, Flujoograma de serotipificación)

Serotipificación somática

La reacción antígeno-anticuerpo para la caracterización del serogrupo **O** de *Salmonella* spp. se hace en lámina, a partir de cultivos de 24 horas en agar tripticasa de soya, incubado a 37°C. Siempre se debe verificar que el cultivo se encuentre en forma lisa, por ausencia de aglutinación con solución salina al 2%. Una porción del cultivo se mezcla con la solución salina, rotando suavemente la lámina durante 30 segundos. Luego se observa cuidadosamente si hay o no grumos.

- Si hay grumos la cepa está rugosa y no se puede realizar la serotipificación somática **O**, pero si se debe confirmar la identificación por pruebas bioquímicas y realizar la serotipificación flagelar **H**. Para revertir una cepa de la forma rugosa a lisa se realizan subcultivos en agar sangre o Mueller Hinton.
- Si no presenta grumos se realiza la serotipificación somática **O** como se indica a continuación.

Sobre una lámina de vidrio se enfrenta una pequeña cantidad del cultivo con una gota de los antisueros polivalentes OS-A y OS-B (dentro de ellos están alrededor del 98% de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales) y se mezcla cuidadosamente con un ansa o un palillo. Estos antisueros polivalentes cumplen la función de una primera selección en grandes grupos.

Se mueve suavemente la lámina, durante 2 minutos como máximo, para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo y se observa presencia o ausencia de aglutinación, con luz indirecta.

Si hay aglutinación con alguno de los dos antisueros polivalentes, se prueban los antisueros de grupo **O** correspondientes.

Si hay aglutinación con un antisuero de grupo **O** se prueban los antisueros de factores **O**.

Consideraciones a tener en cuenta

Si el cultivo en estudio no reacciona con ninguno de los dos antisueros polivalentes (OS-A y OS-B) y bioquímicamente pertenece al género *Salmonella* puede ser:

- a) Una serovariedad no comprendida en dichos antisueros, en tal caso remitir la cepa al Laboratorio de Referencia.
- b) Una serovariedad que presente antígeno de envoltura Vi (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y algunas cepas de *S. Dublin*). En este caso se enfrenta el cultivo con el antisuero Vi. Si la aglutinación con el antisuero Vi da positiva, se hace una suspensión de la bacteria en 1 ml de solución fisiológica, se calienta 30 minutos a 100°C y se repite la aglutinación con el antígeno somático.

Lectura e interpretación de resultados

El grado de aglutinación se registra de la siguiente manera:

4+: 75 a 100% de microorganismos aglutinados

3+: 75% aproximadamente de microorganismos aglutinados

2+: 50% aproximadamente de microorganismos aglutinados

1+: menos de 25% de microorganismos aglutinados

Negativo: ausencia de aglutinación (suspensión homogénea)

Serotipificación flagelar

La caracterización antigénica flagelar se hace a partir de un cultivo en 5 ml de caldo flagelar incubado a 37°C durante 18 - 24 horas.

Del caldo flagelar se separa una alícuota de 0,5 ml en un tubo estéril de 13x100 con tapa a rosca.

Al caldo flagelar restante se le agregan 5 ml de solución fisiológica formolada al 1% y se deja una hora a temperatura ambiente.

En 4 tubos de ensayo se coloca una gota de cada uno de los antisueros flagelares polivalentes (HS-1, HS-A, HS-B y HS-C) y se agregan 0,5 ml del caldo formolado.

Se incuba 1 hora a 50°C en baño de agua y se lee presencia o ausencia de flóculos con luz indirecta. No se deben agitar los tubos luego de la incubación a fin de no disgregar los flóculos.

Si el cultivo da aglutinación positiva con dos antisueros polivalentes, (por ej. *S. Typhimurium* da aglutinación positiva con HS-1 y HS-A) se trata de una serovariedad difásica (que son la gran mayoría) y se debe enfrentar con los antisueros de fase **H** correspondientes (en el caso del ej. H:i y H:1,2) siempre por aglutinación en tubo.

Si el antisuero de fase flagelar está compuesto por más de un factor, por ej. *S. Saintpaul* (1,4,5,12 : e,h : 1,2) AgH (fase 1): e,h y Ag H (Fase 2):1,2 se deben determinar los factores **H** correspondientes, utilizando los antisueros de factores **H**, H:h y H:2 en este caso.

Si el cultivo aglutina con un solo antisuero polivalente flagelar, puede ser:

- a) Que sea una serovariedad monofásica, por ej. *S. Enteritidis* (1,9,12 . g,m : -) ó *S. Typhi* (1,9,12 [Vi] :d : -)

- b) Que sea una serovariedad difásica, de acuerdo al esquema de Kauffmann-White por los resultados de la aglutinación **O** y se expresa únicamente una sola fase **H**, por lo tanto hay que poner en evidencia la fase no detectable, usando el “Método de inversión de fase”. El método consiste en inmovilizar la fase flagelar que se expresó, mediante el agregado del antisuero de fase correspondiente, de esta manera se permite la expresión de la otra fase flagelar. Por ejemplo si en *S. Typhimurium*, la gran mayoría de la población expresa los flagelos de la fase H: 1,2, el cultivo no va aglutinar con el antisuero de la fase H: i, entonces se inmovilizan los flagelos de la fase H:1,2, con el antisuero de fase correspondiente.

Método de inversión de fase

Se funden 10 ml de agar movilidad al 0,7%, se deja enfriar a 50°C. En una caja de Petri (de 50mm de diámetro) se mezclan dos gotas del antisuero de la fase flagelar pre-determinada, H:1,2, en el caso del ejemplo, y el agar semisólido.

Se homogeniza con movimientos de rotación y se deja solidificar.

Se siembra una ansada del cultivo sin formolar en el centro de la superficie del agar.

Se incuba a 37°C durante 18-24 horas.

Las bacterias que poseen la fase ya identificada son inmovilizadas por el antisuero H:1,2. Las células que tienen la fase no detectada, H:i, conservan su movilidad y se extienden sobre la superficie del agar.

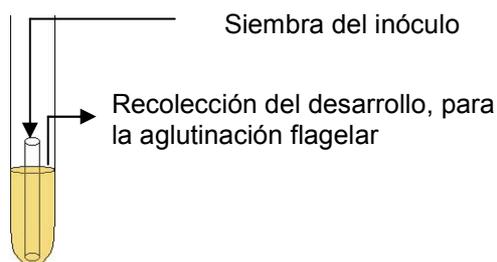
Luego de la incubación a 37°C, durante 18-24 horas, se toma desarrollo bacteriano de la periferia de la placa y se enfrenta con el antisuero de la fase sospechada, en este caso H:i

Consideraciones a tener en cuenta:

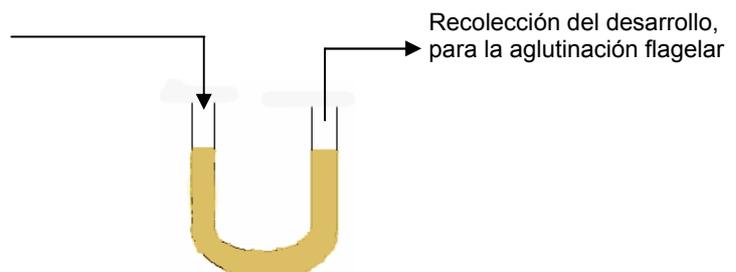
Si una cepa de *Salmonella*, confirmada con aglutinación somática no reacciona con ninguno de los antisueros específicos flagelares polivalentes, hay que tener en cuenta que:

- la cepa puede presentar un antígeno flagelar no incluido en el antisuero polivalente, en este caso debe ser remitida al Laboratorio de Referencia, para completar su estudio.
- se puede tratar de una cepa inmóvil, por la ausencia de flagelos.
- se puede tratar de una cepa con movilidad reducida. En este caso se debe exaltar la movilidad por pasajes sucesivos en tubos de Craigie o en tubos en U conteniendo agar movilidad al 0.5 %. La cepa se siembra en el tubo interno, el inóculo migra a lo largo del mismo llegando a la superficie del medio contenido en el tubo externo. Este recorrido se puede completar al cabo de 18 horas de incubación a 37°C, o requerir un tiempo de incubación mayor. Se toma una porción del crecimiento del tubo externo y se siembra en un nuevo caldo flagelar; a partir del cual se repite la serotipificación flagelar. Si se trata de una cepa con movilidad reducida, se deben realizar pasajes de la misma en tubos de Craigie o en tubos en U, hasta lograr el recorrido completo en 18 horas.

Tubo de Craigie



Tubo en “U”



Lectura e interpretación de resultados

El grado de aglutinación se registra de la siguiente manera:

4+: 100% de los microorganismos aglutinados y el sobrenadante es un líquido claro.

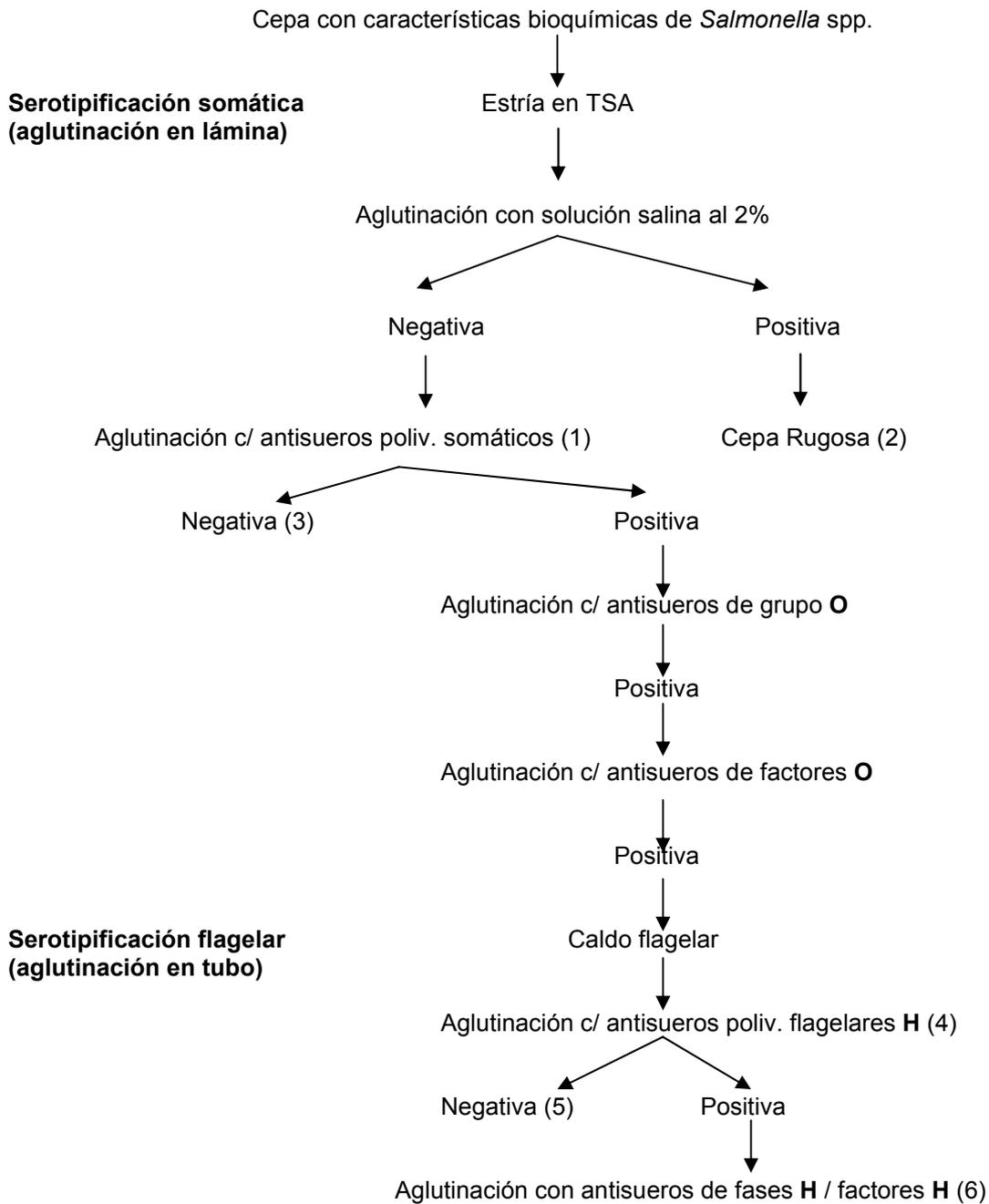
3+: 75% aproximadamente de los microorganismos son aglutinados y el sobrenadante líquido es ligeramente turbio.

2+: 50% aproximadamente de los microorganismos son aglutinados y el sobrenadante es un líquido moderadamente turbio.

1+: 25% aproximadamente de los microorganismos son aglutinados y el sobrenadante líquido es turbio.

Negativo: ausencia de aglutinación caracterizada por una suspensión homogénea del antígeno.

Fig. 2 Flujograma de Serotipificación



Fórmula antigénica (O + H) = Serovariedad (Esquema de Kauffmann- White)

- (1) OS-A y OS-B
- (2) Para revertir una cepa de la forma rugosa a lisa, se realizan subcultivos en agar sangre o Mueller Hinton. Si no es posible revertir la rugosidad, se debe confirmar la identificación por pruebas bioquímicas y realizar la serotipificación flagelar H.
- (3) Ver Consideraciones a tener en cuenta en "Serotipificación somática"
- (4) HS-1; HS-A; HS-B; HS-C
- (5) Ver Consideraciones a tener en cuenta en "Serotipificación flagelar"
- (6) Si la serovariedad de *Salmonella* es difásica y sólo expresa una fase, ver "Método de inversión de fases"

5.6. Fenómenos de Variación que afectan la Serotipificación

Para una correcta serotipificación de *Salmonella* spp. es necesario entender y conocer los fenómenos de variaciones somáticas y flagelares que pueden ocurrir.

5.6.1. Variaciones somáticas

Variación S - R (Lisa - Rugosa)

Es debido a una mutación que elimina las cadenas laterales del “core” del polisacárido. No es una variación abrupta, por el contrario ocurre gradualmente y existen grados intermedios de rugosidad en la transición de la forma lisa (S) a la rugosa (R). Los cultivos R dan colonias rugosas de borde irregular, con tendencia a producir desarrollo granular en caldo y autoaglutinan cuando se las enfrenta con solución salina al 2%, es decir no son serotipificables.

En el laboratorio para revertir una cepa de la forma R a la forma S, se realizan subcultivos sucesivos de la mismas en medios de enriquecimiento (agar sangre o agar Mueller Hinton). Una cepa que se encuentre en la fase rugosa, debe ser reaislada a fin de tratar de identificar colonias lisas. Si no es posible revertir la rugosidad, se debe confirmar la identificación por pruebas bioquímicas y realizar la serotipificación flagelar **H**.

Cuando la cepa es rugosa se informa como **O:Rugosa**, acompañada de la fórmula del antígeno flagelar que corresponda.

Variación M - N (Mucoide - No mucoide)

Es una variación entre formas mucoides (M) y no mucoides (N) de *Salmonella*.

M es un antígeno de envoltura que se encuentra por ej. en *S. Paratyphi B*. Las formas mucoides no son aglutinadas por antisueros O. El antígeno M se destruye a 100°C y por acción del alcohol, pero es resistente al formol y al calentamiento a 60°C.

Cuando la cepa es mucosa, no se puede determinar el antígeno **O**, pero se debe confirmar la identificación por pruebas bioquímicas y realizar la serotipificación **H**.

Variación S - T - R

Durante la evolución de formas lisas a rugosas, aparecen antígenos somáticos transientes, llamados T. El poder antigénico está conservado; el aspecto de los cultivos en caldo y en agar es liso pero ha desaparecido totalmente la especificidad O, siendo reemplazada por un nuevo antígeno somático T.

Variación de forma

Es una variación cuantitativa en la cantidad de antígeno O presente en la progenie de una cepa. Esta variación ocurre sólo en los miembros del género *Salmonella* y afecta únicamente a los antígenos menores, pudiéndose encontrar en la naturaleza cepas desprovistas de los mismos.

Variación V - W (Capsular - no capsular)

El antígeno Vi es un antígeno capsular o de envoltura que se halla presente en *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C y en algunas cepas de *Salmonella* Dublin.

Interesa destacar que la variación V - W ocurre en *Salmonella* Typhi y en aquellas cepas que poseen antígeno Vi. El antígeno Vi en *Salmonella* Typhi es un polisacárido altamente polimerizado, compuesto por unidades de ácido N-acetil-aminohexurónico. Las formas V (Viel) muy ricas en antígeno Vi, son O no aglutinables, mientras que las W (Wenig), desprovistas de antígeno Vi son O aglutinables. Existen también formas intermedias V - W que conservan la propiedad de aglutinar con antisueros Vi y O específicos.

Una suspensión de *Salmonella* Typhi rica en antígeno Vi calentada a 60°C durante 1 hora, o a 100°C por 30 minutos, se transforma en O aglutinable, pues se destruye el antígeno Vi.

SUSPENSION BACTERIANA	ANTISUERO “Vi”	ANTISUERO “O”
Capsulada V	+	-
Calentada 1 h a 60 ° C ó 30 min. A 100° C	-	+
Variación V - W	+	+

Variación no fimbriada - fimbriada

Además de los flagelos, las bacterias pueden producir otras estructuras filamentosas, llamadas fimbrias, más finas y cortas, localizadas en la superficie de la bacteria en número de 100 a 250 por célula. Se encontró que en los cultivos fimbriados se pueden producir variaciones entre formas fimbriadas y no fimbriadas. Algunos cultivos de *Salmonella* que poseen fimbrias pueden inhibir la aglutinación somática.

5.6.2. Variaciones flagelares

Variación OH - O

Se debe a la pérdida de los flagelos, o sea que una cepa móvil se transforma en inmóvil. Esto ocurre por una mutación o por una pérdida de los genes responsables de la síntesis de la flagelina. Este fenómeno se observa con relativa frecuencia en el género *Salmonella*.

Variación de fase

Es de fundamental importancia en el estudio antigénico del género *Salmonella*. Sólo un reducido número de serovariedades son monofásicas, siendo las difásicas la inmensa mayoría. Por. ej. *S. Typhimurium* puede producir flagelos ya sea de especificidad H:i ó H:1,2. Una célula bacteriana puede tener flagelos de una sola especificidad, por ej. H:i. Después de varias generaciones, aparece en la población otra célula bacteriana con flagelos con especificidad H:1,2, con una frecuencia de 10^{-4} . Un cultivo (billones de bacterias) de *S. Typhimurium*, es una mezcla de células bacterianas, con flagelos de especificidad H:i y con flagelos de especificidad H:1,2. Si la población está balanceada, un cultivo puede aglutinar con antisueros contra ambas fases H:i y H:1,2.

Si la gran mayoría de la población bacteriana tiene flagelos con especificidad H:1,2, el cultivo no va a aglutinar con el antisuero H:i. Debido a que para la identificación de las serovariedades es esencial la determinación de las dos fases del antígeno H, es necesario seleccionar, la minoría de la población bacteriana que posee flagelos de la fase H:i, en el caso de este ej. Esto se realiza usando la propiedad de inmovilizar que tienen los anticuerpos H. En agar semisólido adicionado del antisuero H:1,2, las células bacterias que poseen flagelos de esa especificidad serán inmovilizadas y las que poseen los flagelos de la otra especificidad podrán extenderse sobre el medio y el cultivo resultante aglutinará con el antisuero H:i (ver detalles “Método de inversión de fases”).

6. CONSERVACION DE AISLAMIENTOS

Los aislamientos de *Salmonella* se conservan:

- En agar semisólido:** (caldo nutritivo adicionado de agar al 0,8%) en viales de vidrio o de plástico, con cierre hermético. La cepa se siembra por punción, se incuba a 37°C durante 18-24 horas. Los viales se almacenan a temperatura ambiente.
- A - 70°C en caldo-glicerol:** La cepa se siembra en caldo tripticasa de soya y se incuba a 37°C durante 3 a 4 horas, a fin de que alcance la fase logarítmica de crecimiento. En criotubos se coloca 400 µl de glicerol estéril y se agrega 1000 µl del cultivo bacteriano. Se conserva en congeladora a – 70°C. Para ser utilizada para distintos propósitos se toma una porción de la suspensión congelada con un palillo de madera y se subcultiva en un medio sólido o líquido, se deben realizar dos subcultivos. El vial se debe retornar inmediatamente al freezer.

7.MEDIOS DE CULTIVO

7.1. Propiedades e Interpretación de los Medios Cultivo para Aislamiento

Caldo Selenito

Para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* en materia fecal, orina y tejidos infectados, incluida *Salmonella* Typhi, pero no sirve para *Shigella*.

El selenito inhibe el crecimiento de coliformes intestinales y enterococos, principalmente en las primeras 6 a 12 horas de incubación.

No son inhibidas *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*.

El medio contiene: peptona o triptona, lactosa, sales.

Si se observa color rojo ladrillo de selenito precipitado, el medio no debe utilizarse.

El material sólido se inocular directamente en el caldo; el material líquido se debe mezclar en una relación 1:1 con caldo a doble concentración. Se incuba 24 horas a 37° C o a 34° C.

El pasaje a medios selectivos puede hacerse al cabo de 6 a 12 horas.

Agar EMB

Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias patógenas intestinales Gram (-). El contenido de lactosa y sacarosa hace posible la diferenciación de *Salmonella* y *Shigella* lac/sac (-), de la flora acompañante lac (-)/lac (+) (*Proteus vulgaris*, *Citrobacter*, *Aeromonas hydrophila*). La combinación de colorantes es la que permite diferenciar entre los fermentadores y no fermentadores de lactosa. La sacarosa se incluye porque algunos coliformes la fermentan más rápido que a la lactosa.

El desarrollo de las bacterias Gram (+) está inhibido por los colorantes del medio (eosina amarilla y azul de metileno).

Agar EMB Levine contiene solamente lactosa.

El medio contiene: peptona, sales biliares, tiosulfato, carbonato de calcio.

Aspecto de las colonias

<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	transparentes, ámbar rosado
<i>Escherichia</i>	violáceas con brillo metálico y centro negro azulado
<i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i>	más grandes que las anteriores, mucosas sin brillo metálico y centro oscuro.
Bacterias lac (+)	negras o centro oscuro, halo transparente
Bacterias lac (+) o sac (-)	incoloras

Agar Hektoen

Es un medio selectivo para bacterias intestinales, incluídas algunas shigellas. No tiene efecto inhibitor sobre *Salmonella* y *Shigella* pero si sobre flora acompañante. Debido a los dos indicadores (azul de bromotimol y fucsina), las colonias lac+ tienen una diferencia cromática con las colonias lac-; lo mismo ocurre con bacterias fermentadoras de sacarosa y salicina. El tiosulfato con el hierro dan coloración negra a las colonias sulfídrico+. Las sales biliares inhiben a la flora acompañante. Puede agregarse novobiocina para inhuibir *Citrobacter* y *Proteus*.

El medio contiene: peptona, extracto de levadura, sacarosa, lactosa, salicina, tiosulfato, citrato de hierro amoniacal, sales biliares, azul de bromotimol, fucsina.

Aspecto de las colonias

<i>Shigella</i> , <i>Providencia</i>	verdes, planas, transparentes
<i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i>	verde-azuladas, c/s centro negro
<i>Pseudomonas</i>	verde-azuladas, planas, borde irregular
Coliformes	salmón, halo de precipitación

Agar MacConkey

Es un medio selectivo y diferencial para aislar microorganismos fermentadores y no fermentadores de lactosa.

Sirve para aislar *Salmonella*, *Shigella*, y coliformes de materia fecal, orina, alimentos y aguas residuales.

Es un medio de baja selectividad para usar con inóculos pequeños.

Las sales biliares y el cristal violeta inhiben microorganismos Gram (+). La presencia de lactosa permite el desarrollo de las cepas lactosa (+) que se manifiesta por el viraje del indicador debido a la producción de ácido; luego se absorbe el rojo neutro dando color rojo a la colonia y un halo turbio por la precipitación de las sales biliares por la acidez del medio. Las bacterias no fermentadoras de lactosa (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *Shigella dysenteriae*) no alteran el medio, dando colonias incoloras y transparentes. Para detectar *S. Typhi* hay que usar medio MacConkey junto con agar SS y agar bismuto sulfito.

El medio contiene: peptona, sales biliares, rojo neutro, cristal violeta, sales.

Aspecto de las colonias

<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	incoloras, medio amarillo
<i>Escherichia</i>	rojas, halo turbio
<i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i>	grandes, rosadas a rojo, mucosas
<i>Proteus</i>	incoloras

Agar SS

Es un medio selectivo para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de materia fecal, alimentos y animales; pero no es el ideal para *Sh. dysenteriae* y *Sh. boydii*. Sirve también para *Y. enterocolitica* y para diferenciar fermentadores de lactosa de los no fermentadores. La presencia de verde brillante, bilis de buey, alta concentración de tiosulfato y el citrato inhiben la flora acompañante. El tiosulfato y la sal de hierro ponen en evidencia la formación de sulfuro de hierro. La degradación de la lactosa a ácido provoca el viraje del indicador rojo neutro a rojo.

El medio contiene: extracto de carne, peptona, lactosa, citrato de hierro amoniacal, tiosulfato, verde brillante, rojo neutro.

Aspecto de las colonias

<i>Salmonella</i>	incoloras, transparentes, centro negro
<i>Shigella</i>	incoloras, transparentes, medio amarillo
<i>Proteus</i>	transparentes, centro rojo, medio amarillo
<i>Escherichia coli</i>	rosadas a rojo, medio rojo
<i>Enterobacter aerogenes</i>	rosadas a crema, opacas, mucosas
Bacterias lactosa+	rojizas, mucoides, centro negro

Agar verde brillante

Excelente medio de gran selectividad para el aislamiento de *Salmonella* a partir de materia fecal; pero no puede usarse para aislar *S. Typhi*.

Los fermentadores de lactosa o sacarosa que pueden crecer en este medio se diferencian rápidamente debido a la formación de colonias verde-amarillentas, rodeadas de una zona de igual color. Esto se debe a la fermentación de los azúcares que produce acidez, haciendo virar el indicador (rojo fenol) a amarillo. En medio alcalino se observa un color rojo intenso.

El verde brillante inhibe microorganismos Gram (+), *S. Typhi* y *Shigella*. Para inhibir *Proteus* se recomienda agregar 0,2% de desoxicolato de sodio. La selectividad del medio permite usar inóculos densos. Si se exceden los 15 minutos de esterilización a 121°C, disminuye la selectividad del medio.

El medio contiene: peptona, lactosa, rojo fenol, verde brillante.

Aspecto de las colonias

<i>Salmonella</i> a veces <i>Proteus</i> y <i>Citrobacter</i>	rosa pálido, transparentes
<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i>	verde-amarillo
<i>Klebsiella</i> , Bacterias lactosa +	opacas, halo verde-amarillo

Agar XLD

Es un medio de selectividad moderada a alta que permite ser usado con *Salmonella* y *Shigella*. La degradación de xilosa, lactosa y sacarosa produce acidez que hace virar el indicador al amarillo. El tiosulfato y la sal de hierro ponen en evidencia la producción de sulfídrico. La decarboxilación de la lisina a cadaverina se visualiza por la presencia de un color rojo púrpura por aumento del pH. El desoxicolato inhibe Gram (+). La diferenciación de *Salmonella/Shigella* de otras enterobacterias se basa en tres reacciones: fermentación de xilosa, decarboxilación de lisina y producción de sulfídrico. La xilosa diferencia *Shigella* de *Providencia* que no fermenta xilosa o lo hace muy lentamente; la lisina diferencia *Salmonella* de los fermentadores de xilosa no patógenos. La lactosa y la sacarosa en exceso evitan que los coliformes lisina positiva reviertan la condición alcalina de los microorganismos consumidores rápidos de xilosa/lisina. La producción de sulfídrico ocurre en condiciones alcalinas dando colonias con centro negro; en condiciones ácidas la precipitación negra se inhibe.

El medio contiene: extracto de levadura, xilosa, lactosa, sacarosa, lisina, desoxicolato, tiosulfato, citrato de hierro amoniacal, rojo fenol, sales.

El precipitado que ocasionalmente presenta el medio no perjudica su rendimiento, puede eliminarse por filtración.

Aspecto de las colonias

<i>E. coli, Enterobacter</i>	amarilla, opacas, con precipitado
<i>Aeromonas</i>	amarilla, opacas, con precipitado
<i>Klebsiella</i>	amarilla, opacas, mucosas, c/precipitado
<i>Citrobacter</i>	amarilla, opacas, centro negro
<i>Serratia, Hafnia</i>	amarilla, opacas
<i>P. vulgaris, P. mirabilis</i>	amarilla, translúcidas, centro negro
<i>Salmonella</i>	igual color del medio, centro negro
<i>Shigella, Providencia</i>	igual color del medio, translúcidas
<i>S. Typhi</i>	amarilla, ligeramente opacas

7.2. Propiedades e Interpretación de las Pruebas Bioquímicas para Identificación

Agar hierro tres azúcares (TSI) y Agar Kligler (KIA)

I. Principio

El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (SH₂). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de SH₂. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de SH₂ se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.

El agar de Kligler contiene dos azúcares: lactosa (1%) y glucosa (0.1%). Este medio puede reemplazar al TSI, la diferencia entre ambos es la ausencia de sacarosa. Los fundamentos bioquímicos y la interpretación de los resultados son los mismos para ambos medios.

II. Materiales

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada y dispensar volúmenes de 5.0 ml en tubos con tapa a rosca; autoclavar a 121°C por 15 minutos y enfriar inclinado dejando un fondo de 5 a 10 mm. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.

Guardar en heladera; si hay cambio de color no usar.

III. Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar material.
- B. Punzar el fondo en el centro.
- C. Retirar el ansa y estriar sobre la superficie del agar.
- D. Dejar la tapa floja para permitir intercambio de aire.
- E. Incubar a 37°C por 18 a 24 horas.

IV. Resultados

- A. Estría ácida/fondo ácido (amarillo/amarillo): fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa (*E. coli*).
- B. Estría alcalina/fondo ácido (rojo/amarillo): fermentación de glucosa solamente (*Shigella* spp.).
- C. Estría alcalina/fondo alcalino (rojo/rojo): no fermentador (*Pseudomonas aeruginosa*).
- D. Precipitado negro en el fondo: producción de SH₂ (*Salmonella* spp.).
- E. Burbujas o roturas: producción de gas (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.).

V. Control de Calidad

BACTERIA	ESTRIA	PUNCION	SH2
<i>Salmonella</i> Typhi	K	A	+ (*)
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	K	Ac/g	-
<i>Salmonella</i> spp.	K	A	+
<i>Shigella</i> spp.	K	A	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A	Ac/g	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	A	Ac/g	-
<i>Escherichia coli</i>	A	Ac/g	-
<i>Citrobacter</i> spp.	A	Ac/g	+
<i>Klebsiella</i> spp.	A	Ac/g	-
<i>Proteus vulgaris</i>	A	A o Ac/g	+(sucio)
<i>Proteus mirabilis</i>	K	Ac/g o A	+ (sucio)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A	Ac/g o A	-

(*) sólo en la parte superior de la punción o formación de un anillo.

A: ácido; K: alcalino; c/g: con gas

VI. Consideraciones

- A. Cuando se agrupan los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, las reacciones del TSI y LIA pueden variar ligeramente. Algunos no fermentadores de lactosa pueden fermentar sacarosa.
- B. El test se debe leer entre las 18 y 24 horas. Lecturas tempranas pueden dar falsos resultados ácido/ácido, mientras que lecturas tardías pueden dar falsos resultados alcalino/alcalino.
- C. Una gran producción de SH₂ enmascara la reacción de la glucosa. Sin embargo la glucosa fue fermentada aunque no se vea el cambio de color. Observar si hay producción de gas.
- D. En el TSI, la utilización de sacarosa puede suprimir el mecanismo enzimático que resulta en la producción de SH₂. Por esta razón, algunos organismos pueden demostrar producción de SH₂ en KIA pero no en TSI.

Prueba de la β -galactosidasa

Principio

La fermentación de la lactosa requiere dos enzimas; mientras la permeasa facilita la penetración de la molécula de lactosa dentro de la célula bacteriana, la β -galactosidasa hidroliza la lactosa para formar galactosa y glucosa. Las bacterias no fermentadoras de lactosa carecen de ambas enzimas, sin embargo hay bacterias que tienen β -galactosidasa pero no permeasa. El o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) es un compuesto incoloro estructuralmente similar a la lactosa. En presencia de β -galactosidasa, ONPG se rompe en galactosa y o-nitrofenil, un compuesto color amarillo. Como la familia *Enterobacteriaceae* se agrupan de acuerdo a su habilidad de fermentar lactosa, este test es útil en la identificación de fermentadores de lactosa.

II. Materiales

A. Solución de ONPG

Disolver 80.0 mg de ONPG en 15.0 ml de agua destilada a 37°C, agregar 5.0 ml del buffer fosfato, ajustar a pH 7.0 y esterilizar por filtración. La solución es estable por 6 meses. Rotular la solución y guardar refrigerada (4 a 8°C), en recipientes de color caramelo o envueltos en papel de aluminio.

B. Buffer fosfato de sodio 1M (pH 7.0)

Disolver 6,9 gr de NaHPO₄.H₂O en 45.0 ml de agua destilada. Agregar 3.0 ml de una solución de NaOH al 30% (w/v) y ajustar el pH a 7.0. Llevar el volumen a 50.0 ml con agua destilada y guardar a 4°C.

III. Procedimiento

- A. A partir de un cultivo en TSI, hacer una suspensión espesa del organismo a ensayar en 0.5 ml de solución salina. El volumen no tiene mayor importancia porque es una prueba basada en la observación de un cambio de color.
- B. Agregar un disco o dos gotas de solución de ONPG.
- C. Incubar la mezcla a 37°C y examinar cambio de color hasta 24 horas.

IV. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de color amarillo.

Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

V. Control de calidad

Escherichia coli +

Salmonella spp. - (excepto *Salmonella* subesp. IIIa, IIIb y V)

VI. Consideraciones

- A. Se puede partir de estrías de agar nutritivo con 1% de lactosa, cuando no se dispone de TSI.
- B. La solución de ONPG preparada debe ser incolora antes de su empleo.
- C. A veces se puede favorecer la liberación de la enzima agregando una gota de tolueno, se deja reposar unos minutos a 37°C y se agrega luego el ONPG.

Agar lisina hierro (LIA)

I. Principio

La descarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesario la fermentación previa de la glucosa.

Los microorganismos que no descarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio.

La formación de SH₂ produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido.

Las bacterias del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de *Morganella morganii*, desaminan la lisina a ácido α -cetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis.

II. Materiales

El medio está disponible comercialmente. Disolver el polvo en agua destilada y dispensar en volúmenes de 4 ml en tubos con tapa a rosca. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar de manera de tener estría y fondo. Guardar en heladera.

III. Procedimiento

- A. Inocular punzando el fondo y luego estriar la superficie del agar.
- B. Incubar a 37°C por 18 a 24 horas (a veces pueden ser necesarias 48 horas).

IV. Resultados

Los microorganismos que descarboxilan la lisina producen un viraje al violeta.

Los microorganismos que no descarboxilan la lisina y fermentan glucosa producen un viraje al amarillo.

La formación de SH₂ se indica por la aparición de una coloración negra.

V. Control de Calidad

BACTERIA	ESTRIA	PUNCION	SH2
<i>Salmonella</i> spp.	K	K	+
<i>Proteus mirabilis</i>	R	A	+
<i>Proteus vulgaris</i>	R	A	+
<i>Morganella morganii</i>	K	A	-
<i>Providencia rettgeri</i>	R	A	-
<i>Providencia</i> spp.	R	A	-
<i>Citrobacter</i> spp.	K	A	+
<i>Escherichia coli</i>	K	A	-
<i>Shigella</i> spp.	K	A	-
<i>Klebsiella</i> spp.	K	K	-

A: ácido; ; alcalino; R: desaminación de la lisina

Este medio no es un sustituto del método standard de Moeller.

VI. Consideraciones

Dado que la descarboxilación de la lisina ocurre únicamente a pH ácido, este medio sólo puede utilizarse para diferenciar cultivos que fermenten glucosa.

Agar SIM

I. Principio

Es un medio que se usa para determinar la formación de sulfuro de hidrógeno, la producción de indol y la movilidad en el diagnóstico de Enterobacterias.

II. Materiales

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada, calentar suavemente hasta su disolución y dispensar en volúmenes de 5 ml en tubos con tapa a rosca. Autoclavar a 121°C, 15 minutos; enfriar en posición vertical y guardar en heladera.

III. Procedimiento

- A. Con un ansa tomar material de una colonia y sembrar por punción.
- B. Incubar a 37°C por 18 a 24 horas.

IV. Resultados

- A. Para la producción de SH₂
Ensayo positivo: ennegrecimiento del medio.
Ensayo negativo: no hay ennegrecimiento.
- B. Para la movilidad
Ensayo positivo: hay una turbidez difusa del medio.
Ensayo negativo: sólo hay crecimiento a lo largo de la punción.
- C. Para la producción de indol
Ensayo positivo: aparición de color rojo cuando se agrega el reactivo de Erlich.
Ensayo negativo: no hay aparición de color.

V. Control de Calidad

Escherichia coli: SH₂ -, indol +, movilidad +
Klebsiella pneumoniae: SH₂ -, indol -, movilidad -
Proteus vulgaris: SH₂ +, indol +, movilidad +

VI. Consideraciones

Un organismo que produce sulfuro de hidrógeno puede mostrar ennegrecimiento en SIM pero no en TSI por la presencia de sacarosa en este último medio. La utilización de la sacarosa puede suprimir los mecanismos enzimáticos responsables de la producción del sulfuro de hidrógeno.

Prueba del malonato

I. Principio

El ensayo pone en evidencia la capacidad de las bacterias de utilizar malonato como fuente de carbono. Las cantidades mínimas de glucosa del medio, permiten el desarrollo de organismos

que no pueden usar malonato o sales de amonio, sin embargo esos organismos no pueden mantener un pH alcalino. La producción de ácido por la fermentación de la glucosa impide una posible alcalinización. Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción buffer produciendo hidróxido de sodio. El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. La mayoría de las especies de *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. utilizan malonato de sodio. El ensayo también sirve para separar *Salmonella enterica* subesp. *arizonae* (+) de otras subespecies de *Salmonella* (-).

II. Materiales

A. Medio

Extracto de levadura	1.0 gr
Sulfato de amonio	2.0 gr
Fosfato dipotásico	0.6 gr
Fosfato monopotásico	0.4 gr
Cloruro de sodio	2.0 gr
Malonato de sodio	3.0 gr
Glucosa	0.25 gr
Azul de bromotimol (1/500)	12.5 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Disolver en agua destilada, dispensar 3 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121°C por 10 minutos. Enfriar antes de usar; el sustrato es estable por 2 a 3 meses. Rotular los tubos y guardar en heladera. Si hay cambio de color en el medio no usar.

III. Procedimiento

- Con ansa estéril tomar material e inocular el medio.
- Incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
- Reincubar los tubos negativos hasta 4 días, registrando los resultados día por día.

IV. Resultados

Ensayo positivo: reacción alcalina (azul).

Ensayo negativo: no hay cambio de color (verde).

Ensayo negativo: reacción ácida, sólo fermentación de glucosa (amarillo).

V. Control de Calidad

Enterobacter aerogenes +

Escherichia coli -

VI. Consideraciones

- Algunos organismos malonato (+) producen una ligera alcalinidad, que hace la interpretación difícil. Cuando hay duda comparar con un tubo sin inocular. Cualquier vestigio de color azul denota una prueba positiva luego de una incubación de 48 horas. No se debe hacer una interpretación final negativa hasta no haber incubado los tubos durante 48 horas.
- A veces es necesario agregar extracto de levadura y glucosa para estimular el crecimiento de algunos organismos.
- Algunas cepas malonato (-) dan color amarillo por la fermentación de la glucosa solamente. Esto produce una disminución del pH y el viraje del indicador al amarillo.

Test de decarboxilasa-dihidrolasa

I. Principio

La descarboxilación es un proceso en el cual las decarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de Enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La descarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que arginina da citrulina por acción de una dihidrolasa. El test se debe acompañar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la descarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso ocurre en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6.0), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la descarboxilación. Este último proceso de lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador al color violeta.

La prueba de la lisina ayuda en la diferenciación de *Edwardsiella* (+), y *Salmonella* (+) de *Citrobacter* (-); de *Enterobacter aerogenes* (+) de *Enterobacter cloacae* (-) y *Enterobacter agglomerans* (-)

La prueba de ornitina ayuda a diferenciar *Klebsiella* (-), *Proteus mirabilis* (+) de *Proteus vulgaris* (-); *Morganella morganii* (+) de *Providencia rettgeri* (-); *Yersinia enterocolitica* (+) de *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis* (-).

II. Materiales

El medio basal más comúnmente utilizado es el medio de decarboxilasa de Moeller. El medio está disponible comercialmente. Las concentraciones de aminoácidos a usar son: 1% para la forma L y 2% para la forma DL. Fraccionar el medio base en 4 porciones de 250 ml cada una. Agregar los aminoácidos a 3 porciones del medio. El pH de la fracción que lleva ornitina se debe reajustar después de agregar el aminoácido y antes de esterilizar. Fraccionar en volúmenes de 3 a 4 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121°C por 10 minutos. El sustrato es estable por 3 meses. Rotular los tubos y guardar en heladera.

Al aceite mineral se le agrega 1 ml de agua por cada 100 ml de vaselina, y se autoclava a 121°C por 45 minutos.

III. Procedimiento

- A. Tomar material con un ansa e inocular el tubo control y los tubos con los aminoácidos.
- B. Cubrir todos los tubos con una capa de vaselina estéril.
- C. Incubar a 37°C
- D. Efectuar las lecturas día por día hasta 4 días, registrando los resultados día por día.

IV. Resultados

Ensayo positivo: medio turbio y púrpura a púrpura amarillento.

Ensayo negativo: color amarillo

Tubo control: permanece con su color original o se vuelve amarillo si el organismo es un fermentador de glucosa (se debe ver turbidez en el tubo).

V. Control de calidad

BACTERIA	ARGININA	LISINA	ORNITINA
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	+
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	+
<i>Klebsiella spp.</i>	-	+	-

Ensayo del rojo de metilo

I. Principio

El test se usa para determinar la presencia de iones hidrógeno cuando un microorganismo fermenta glucosa. Todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* convierten glucosa en ácido pirúvico por el camino de Embden-Meyerhof. Los organismos que metabolizan ácido pirúvico producen ácido y bajan el pH a menos de 4.4. Los organismos que utilizan, en cambio, el camino del butilenglicol producen acetoina y butanodiol (diacetilo). El indicador del medio, rojo de metilo, es rojo a pH < 5.0 y amarillo a pH > 5.8. El test es útil para la diferenciación de *Escherichia coli* (rojo metilo positivo) de *Klebsiella* spp. (rojo metilo negativo). La mayoría de las *Enterobacteriaceae* tienen uno u otro camino metabólico, pero raramente ambos.

II. Materiales

A. Preparación del medio

El medio está disponible comercialmente. Disolver en agua destilada, dispensar 5 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121°C por 15 minutos. El sustrato es estable por 2 a 3 meses. Rotular los tubos, indicando fecha de preparación y de expiración. Guardar en heladera.

B. Preparación del reactivo

Disolver 0.1 gr de rojo de metilo en 300 ml de etanol y diluir con 200 ml de agua destilada, para alcanzar un volumen total de 500 ml. El reactivo es estable por 1 año. Rotular y guardar en heladera.

III. Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar material e inocular un tubo con caldo RM/VP.
- B. Incubar a 35°C por un mínimo de 48 horas.
- C. Transferir 2.5 ml de la suspensión a un tubo.
- D. Agregar 5 gotas del indicador y observar si hay cambio de color.

IV. Resultados

Ensayo positivo: el reactivo permanece rojo.

Ensayo negativo: el reactivo se torna amarillo-naranja.

Si el resultado es negativo continuar la incubación de la bacteria por 24 horas más.

V. Control de Calidad

Escherichia coli +

Enterobacter aerogenes -

VI. Consideraciones

- A. Variaciones en la cantidad de peptona del medio puede afectar el resultado.
- B. Aumentando la concentración de glucosa en el medio no se acelera la reacción del rojo de metilo.
- C. No sobreinocular, el crecimiento bacteriano se inhibe cuando el inóculo es grande.
- D. Una incubación de 48 horas es suficiente para la mayoría de los cultivos; pero el ensayo no se debe realizar con cultivos que tengan menos de 48 horas de incubación.

Ensayo de Voges-Proskauer

I.Principio

El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoina (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges-Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno e KOH, la acetoina se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo. La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de α -naftol antes del agregado de KOH.

II.Materiales

A.Preparación del medio

El medio está disponible comercialmente. Para la preparación del caldo RMVP, ver el procedimiento indicado para el test de rojo de metilo.

B. Preparación de solución de α -naftol

Disolver 5.0 gr de α - naftol en una pequeña cantidad de alcohol absoluto y luego llevar el volumen a 100 ml. La solución debe ser incolora. El reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración. Guardar en heladera en frascos color caramelo.

C. Preparación de la solución de KOH

Disolver los pellets de KOH en agua destilada y luego llevar el volumen final a 100 ml (trabajar sobre baño de agua fría para evitar recalentamiento). El reactivo es estable por 1 año. Rotular indicando fecha de preparación y de expiración.

III. Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar material e inocular un tubo de caldo RM/VP.
- B. Incubar a 37°C por un mínimo de 48 horas.
- C. Transferir 2.5 ml de la suspensión a otro tubo.
- D. Agregar 0.6 ml del reactivo de α -naftol.
- E. Agregar 0.2 ml del reactivo de KOH.
- F. Agitar el tubo y dejar descansar 10 a 15 minutos.
- G. Observar la formación de un color rosado a rojo.

IV. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de color rojo dentro de los 15 minutos.

Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

V. Control de Calidad

Klebsiella pneumoniae +
Escherichia coli -

VI. Consideraciones

- A. Cuando hay una incubación prolongada (más de 3 días) algunos organismos VP + pueden producir un aumento de la acidez del medio, dando reacciones positivas débiles o falsas reacciones negativas.
- B. La mayoría de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* dan reacciones opuestas entre el rojo de metilo y VP, sin embargo algunos organismos como *Hafnia alvei* pueden dar ambas reacciones positivas.
- C. Los reactivos se deben agregar en el orden indicado. Una inversión del orden puede dar un resultado positivo débil o un falso negativo.
- D. No se debe agregar KOH en exceso, porque se puede enmascarar una reacción positiva débil por la formación de un color cobrizo por la reacción del KOH con el α -naftol. No leer el ensayo después de 1 hora; puede aparecer una coloración cobriza dando un resultado falso positivo.

Test de utilización de azúcares

I. Principio

Es un ensayo para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar un hidrato de carbono con producción de ácido o ácido y gas. El patrón de utilización de azúcares ayuda en la diferenciación e identificación de muchas bacterias. En este ensayo, determinados azúcares se agregan a un medio basal estéril. La producción de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador. La elección del medio y del indicador dependen del camino metabólico del organismo y de la claridad visual del cambio de pH.

II. Materiales

I. Medio base

- Peptona 10.0 g
- Extracto de carne 1.0 g
- Cloruro de sodio 5.0 g
- Azul de bromotimol 10.0 ml
- Indicador de Andrade 5.0 ml
- Agua destilada 1000 ml

Rehidratar los ingredientes con agua destilada, calentando suavemente si es necesario; ajustar el pH a 7.1-7.2 (7.4). Autoclavar a 121°C por 15 minutos y enfriar en baño de agua a 50°C. Fraccionar el medio base en alícuotas y agregar los azúcares esterilizados por filtración en concentraciones de : 0.5% para dulcita y salicina y 1.0% para los otros azúcares. Dispensar en volúmenes de 4-5 ml en tubos con tapa a rosca, estériles. El medio se guarda en heladera y es estable por 3 meses.

Para la glucosa y glicerol, el medio base se dispensa en tubos con campanita de Durham antes de autoclavar. La campanita se llenará con el medio y luego se agrega el azúcar esterilmente después de enfriar a 50°C.

B. Indicador de Andrade

Disolver 0.5 gr de fucsina ácida en 100 ml de agua destilada, agregar 15.0 ml de NaOH 1N (4%); mezclar bien y dejar descansar a temperatura ambiente durante 24 horas, agitando frecuentemente. El color rojo se debe transformar en un color castaño. Si no se produce una decoloración suficiente agregar 1.0 ml de NaOH 1N (4%).

C. Solución de azul de bromotimol

Mezclar 47.5 ml de agua destilada con 2.5 ml de NaOH 0,1N y luego agregar 0.1 gr de indicador.

D. Preparación de la solución madre de azúcares

Se prepara una solución del azúcar al 10% ó 5%, en agua destilada estéril. Se tinaliza a 70°C, durante 20 minutos. Se guardan a temperatura ambiente, en un frasco estéril, adicionado de cloroformo, se agita y se deja reposar.

III. Procedimiento

- A. Con un ansa estéril tomar material de un cultivo en medio sólido.
- B. Sumergir el ansa en cada tubo de hidrato de carbono.
- C. Para una batería de 8 a 10 azúcares, es suficiente un único inóculo, no hay necesidad de flamear el ansa entre tubo y tubo. La posibilidad de transportar el hidrato de carbono de tubo a tubo es infinitesimal y no afectará los resultados. Para una batería grande (15 a 20) de azúcares, puede ser necesario emplear 2 a 3 inóculos, flamando el ansa antes de tomar nueva muestra.
- D. Incubar a 37°C y examinar día por día por 4 a 5 días. Para algunos microorganismos puede ser necesario una incubación más prolongada (7 días), registrando los resultados día por día.
- E. En laboratorios de referencia las lecturas se deben prolongar hasta 30 días.

IV. Resultados

Ensayo positivo: viraje del indicador al rojo-rosado por acidificación del medio.
Ensayo negativo: no hay cambio de color.

V. Control de calidad

Con distintos microorganismos que fermenten los azúcares, como por ejemplo:
Escherichia coli: glucosa +
Klebsiella spp.: lactosa +
Yersinia enterocolitica: sacarosa +

VI. Consideraciones

- A. Inocular un medio basal sin azúcar para cada microorganismo.
- B. La campanita de Durham se usa en el tubo con glucosa.
- C. Como cualquier indicio de gas, aún una burbuja pequeña, es evidencia de producción de gas, observar cuidadosamente la campanita antes de inocular.
- D. La campanita de Durham se agrega únicamente al medio con glucosa porque si el microorganismo produce gas con glucosa producirá gas con los otros azúcares. No obstante, si se sabe que el microorganismo en estudio no fermenta glucosa, es aconsejable agregar campanita a otros azúcares, pero hay que tener en cuenta que todas las Enterobacterias son fermentadoras de glucosa por definición, entonces sólo se pone campanita al medio con glucosa.

7.3 Medios y Reactivos Especiales

Caldo flagelar

Para la serotipificación flagelar de serovariedades de *Salmonella*.

Caldo tripticasa de soja	15.0 gr
Triptona	13.0 gr
Agua destilada	1000 ml

Se disuelven los componentes en agua destilada, se ajusta el pH a 7.4, se fracciona en volúmenes de 5 ml en tubos con tapón de algodón y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se guarda a temperatura ambiente.

Agar Movilidad

Peptona	10,0 gr
Extracto de carne	3 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Agar	5 o 7 gr
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7,4.

Preparación de Tubos de Craigie: en tubos de 10x160mm con tapa a rosca adicionados de una varilla hueca de 8cm aproximadamente, se colocan 5ml de agar movilidad al 0.5%. Se esteriliza 15 minutos a 121°C.

Solución salina al 2%

Cloruro de sodio	2 gr
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Se ajusta el pH a 7,2 y se autoclava a 121°C durante 20 minutos

Solución fisiológica formolada

Cloruro de sodio	8,5 gr
Formlina (37-40%)	10,0 ml
Agua destilada c.p.s.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7,2 y se autoclava a 121°C durante 20 minutos

Agar blando

Se utiliza para la conservación de cepas por punción a temperatura ambiente.

Agar agar	0.8%
Caldo nutritivo	0.8% (en polvo)
Agua destilada	cantidad suficiente

Disolver el agar calentando suavemente, fraccionar en volúmenes de 1.5 ml, esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Guardar en heladera (4°C).

BIBLIOGRAFIA

1. Bopp, Ch.A., Brenner, F.W., Wells, J.G., Strockbine, N.A. (1999). *Eschericia, Shigella* and *Salmonella*. En Manual of Clinical Microbiology. Murray, P., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (ed.) 7th Edition. Chapter 28, 459 - 474. American Society for Microbiology. Washington D.C.
2. Eiguer, T., Caffer, M. I., (1988). Taxonomía de *Salmonella*. Rev. Arg. Microbiol. 20: 151-154.
3. Ewing, W.H. (1986). Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th. Edition. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
4. Farmer, J. J., Wells, J. G., Griffin, P. M., Wachsmuth, I. K. (1987). *Enterobacteriaceae* Infections, from Diagnostic Procedures for Bacterial Infections, 7th Ed., cap. 14, 233-296, Am. Public Health Assoc., Inc. Washington, D.C.
5. Farmer III, J.J. (1999) *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. En Manual of Clinical Microbiology. Murray, P., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (ed.) 7th Edition. Chapter 27, 442 - 458. American Society for Microbiology. Washington D.C.
6. Lapage, S. P., Sneath, P., H., A., Lessel, E., F., Skerman, V., Seeliger, H., Clark, W., (ed.). International Code of Nomenclature of Enterobacteria. Am. Soc. Microb., Washington, D.C., revisión 1976.
7. Le Minor, L., Veron, M., Popoff, M. (1982). Proposition pour une nomenclature des *Salmonella*. Ann. Microbiol (Inst. Pasteur) 133B: 245-254.
8. Le Minor L., M. Popoff, B. Laurent, D. Hermant. (1986). Individualisation d'une septieme sous-espece de *Salmonella*: *Salmonella cholerasuis* subsp. *indica* subsp., nov. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 137B: 211-217.
9. Le Minor, L., Richard, C. (1993) Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobacteries. Institut Pasteur, Paris, France.
10. Mac Fadin, J.F. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana.
11. Manual de Laboratorio de Infecciones Entéricas Agudas. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la OMS. Ed. Española, 1983.
12. Miller, S.I., Hohmann, E.L., Pegues, D.A. (1995). *Salmonella* (Including *Salmonella* Typhi) En Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell, G.L., Douglas and Bennett's (ed.) 4th Edition. Chapter 200. De. By Mandell, G.L. M.D.; Bennet, J.E. MD.; Dollin, R. M.D.
13. Peluffo, C. (1973). *Salmonella*: Método simplificado de diagnóstico serológico. Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la OMS.
14. Popoff, M., Bockemuhl, J., McWorther-Murlin, A. (1991). Supplement 1990 (n° 34) to the Kauffmann-White scheme. Res. Microbiol. (Inst. Pasteur) 142:1029-1033.
15. Salmonellosis. Grupo de Trabajo, V Congreso Argentino de Microbiología, Noviembre 1988. Asociación Argentina de Microbiología.
16. Wray, C., Wray, A. (2000). *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing
17. World Health Organization, Centre for Reference and Research on *Salmonella*. (1997). Formules antigeniques des serovars de *Salmonella*. WHO International *Salmonella* Center, Institut Pasteur, Paris.