

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Escuela de Química Biológica

.....

LA ESCHERICHIA COLI COMO MIEMBRO DEL
GRUPO DE BACTERIAS ENTEROPATOGENAS DEL HOMBRE

.....

Tesis Doctoral presentada por

EFRAIN MENA VENEGAS

En el Acto Público de su Incorporación

1957

San Salvador

El Salvador

Centro America



INVENTARIO: 10106959

063549

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector

Dr. ROMEO FORTIN MAGAÑA

Secretario

Dr. JOSE ENRIQUE CORDOVA

.....

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Decano

Dr. VICTOR ORTIZ

Secretario

Dr. JOSE M. TEJADA

.....

Director de la Escuela de Química Biológica

Dr. MANUEL SALINAS ARIZ

JURADO DE EXAMEN PUBLICO

Dr. Raúl Montoya

Dr. Mauricio Ponce

Dr. Juan Allwood Paredes

C O N T E N I D O

- I. INTRODUCCION
 - II. EL GRUPO ESCHERICHIA COLI
 - III. INVESTIGACION DE ESCHERICHIA COLI DEL GRUPO
ENTEROPATOGENO EN 131 MUESTRAS DE HECES
 - IV. RESULTADOS
 - V. DISCUSION
 - VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES
- BIBLIOGRAFIA

II. EL GRUPO ESCHERICHIA COLI

A. Clasificación y nomenclatura

La clasificación y nomenclatura de los bacilos Gram negativos fermentadores rápidos de la lactosa está sujeta a una variedad de opiniones.

La escuela americana reconoce tres géneros: Escherichia, Klebsiella y Aerobacter para los de origen animal, y Erwinia para los patógenos de las plantas. Esta división la hacen basándose en caracteres bioquímicos, patogenicidad, y localización (1). Kauffmann cree que no debe existir diferencia entre los géneros Aerobacter y Klebsiella ya que los géneros se diferencian sobre bases bioquímicas, y ésta no es suficiente para dicha separación (2).

Los científicos británicos apoyan la existencia de un solo género llamado BACTERIUM que incluye a los tres antes mencionados. Este criterio que se apoyó en el congreso de 1950 de la Asociación Internacional de Microbiólogos, fué rebatido en 1953 por el Comité Internacional de Nomenclatura quien decidió que el uso de dicho término no era permisible (1).

En el Bergey's Manual el grupo Escherichia coli forma un género y en esta forma se le considerará en el presente trabajo (3).

El Subcomité sobre Enterobacteriaceae define al grupo

Escherichia así:

" Bacilos móviles o no que conformen a la definición de Enterobacteriaceae, y con los caracteres bioquímicos siguientes:

Glucosa	Acido y usualmente gas
Manitol	Acido
Adonitol	Acido usualmente no producido
Dulcitol	Acido producido variable
Inositol	Acido usualmente no producido
Lactosa	Acido producido
Salicina	Acido producido variable
Sucrosa	Acido producido variable
Indol	Usualmente producido
Gas sulfídrico	No producido
Gelatina	No licuada
Citrato de amonio	Usualmente no utilizado
Voges Proskauer	Negativo
Rojo de Metilo	Positivo
Urea	No desdoblada
Nitratos	No reducidos

Algunas cepas producen ácido de lactosa tardíamente e irregular, o ninguna producción. " (4).

B. Generalidades

1. Datos históricos y ecología

La Escherichia coli fué descrita por Escherich en 1886 bajo el nombre de Bacterium coli commune. El cultivo original fué aislado de una deyección procedente de un niño amamantado por su madre, y cultivos de esta fuente fueron considerados por Escherich como típicos. La Escherichia coli, sin embargo, está distribuida ampliamente en la naturaleza, y es característico habitante del intestino del hombre y muchos de los animales. En el mono

se han reportado cepas de E. coli que son muy similares aunque no idénticas a las encontradas en el recién nacido. No se les adjudica ni deniega acción patógena (22).

En el intestino de un determinado individuo se pueden encontrar tres o cuatro cepas de las cuales unas permanecen por un tiempo prolongado y se llaman "Residentes", y otras sólo un tiempo corto y se llaman "Transitorias" (5). Es este bacilo tan abundante en el intestino del hombre como para que bien amerite el nombre que se le ha dado.

Es facultativo anaerobio y crece bien en los medios ordinarios de laboratorio a la temperatura de 37 grados centígrados.

La Escherichia coli es una bacteria muy susceptible a la acción inhibitoria de ciertos colorantes, mucho más que las bacterias de los géneros Salmonella y Shigella, condición que se ha aprovechado para preparar medios de cultivo selectivos.

2. Morfología

La Escherichia coli es un bacilo Gram negativo de morfología muy variable pero que generalmente se presenta como un bastón corto de 2 - 3 micras de largo por 0.6 micras de ancho. Se le encuentra en pares o en cadenas cortas. Puede ser móvil o no serlo. A veces tiene cáps

sulas. No produce esporas.

La morfología de sus colonias en gelosa sangre es idéntica a la de las otras bacterias Gram negativas del intestino, debiéndose recurrir a medios diferenciales como el SS agar, EMB, etc. para su identificación (8). Hay colonias de E. coli que son hemolíticas (Beta hemolíticas) y éstas ocurren con mayor frecuencia cuando la muestra sembrada proviene de material patológico (1)(7). Sin embargo hay que tener muy en cuenta cuando se investigan serotipos O111:B4 y O55:B5 dos cepas patógenas del intestino, que éstas no se conocen como hemolíticas, con la salvedad no obstante, de que bien podrían aparecer variantes hemolíticas en cualquier momento (4).

3. Fisiología

Su acción sobre azúcares y otros substractos fué definida al principio. De éstas la más importante es en toda probabilidad la lactosa la cual ha servido para separar el grupo coli de los grupos por largo tiempo reconocidos como patógenos del intestino. El uso del sorbitol ha sido acogido con entusiasmo por algunos investigadores, basándose en el hecho de que los serotipos O111:B4 y O55:B5 del coli, dos cepas enteropatógenas, son casi siempre sorbitol negativas. Rappaport y Henig describen un medio de MacConkey agar modificado en el cual la

lactosa ha sido reemplazada por el sorbitol. Dicen ellos que las cepas 0111 y 055 recién aisladas no fermentan el sorbitol y por lo tanto las colonias aparecen incoloras en el medio por ellos descrito. Otros serotipos de E. coli que sí producen ácido del sorbitol aparecerán de color rojo en sus colonias. Ewing y Edwards opinan que si bien es cierto que la mayoría de colonias de aquellas cepas no fermentan el sorbitol en 24 horas, hay también un buen número de excepciones. También hay cepas de E. coli que no siendo 0111 o 055 pueden ser sorbitol negativas. Sin embargo, el medio descrito por Rappaport y Henig es de gran utilidad cuando la característica bacteriológica de la cepa causante de la epidemia es conocida, es decir si fermenta o no el sorbitol.

Se recomienda el uso del medio de sorbitol en unión de otros medios como el SS agar, EMB, y gelosa sangre, los cuales evitan que pueda pasarse por alto ciertas cepas patógenas de E. coli. Esto es especialmente cierto del medio de gelosa sangre por no tratarse éste de un medio diferencial ni restrictivo. También lo antes aconsejado prestaría las facilidades para detectar Salmonella o Shigella que pudieran introducirse en el curso de una epidemia. Además la gelosa sangre permite seleccionar colonias no hemolíticas de E. coli entre las cuales podría encontrarse 0111 o 055 (4).

El GALACTINOL, una substancia derivada del azúcar de remolacha, ha sido usada con éxito por algunos. Esta substancia no es fermentada por la Escherichia coli pero sí por Klebsiella y Aerobacter y han sacado ellos ventaja de esta propiedad para facilitar la identificación del coli (9).

Recientemente se han publicado nuevas pruebas bioquímicas que permiten una rápida diferenciación entre el grupo Escherichia y los géneros Salmonella y Shigella. Estas pruebas son:

Prueba de la Ninhidrina

Es sabido que la E. coli produce decarboxilasas de lisi-
na moderadamente fuertes mientras que la Shigella las pro-
duce muy despacio y en pequeñas cantidades o no las pro-
duce del todo. Estas decarboxilasas se detectan por me-
dio de una substancia llamada Ninhidrina, y de allí el
nombre de la prueba.

Medio de cultivo:

Tripticasa	15 Gms.
Fosfato de potasio dibásico	2 Gms.
Glucosa	1 Gm.
Agua destilada	1000 ml.

Verter en cantidades de 5 cc. en tubos con tapadera de rosca, y esterilizar a 15 libras de presión por 15 minutos. Inocúlense de un cultivo de caldo o ge-

losa, incúbase a 37 grados centígrados toda la noche y añádase 1 cc. de Hidróxido de sodio 4N. Extraer con 2 cc. de cloroformo agitando vigorosamente. Centrifugar o dejar en reposo hasta que la emulsión se rompa. Tomar 0.5 cc. de extracto del cloroformo, colocar en tubo pequeño y añadir 0.5 cc. de reactivo de Ninhidrina (0.1 por ciento de Ninhidrina en cloroformo). Dejar reposar a la temperatura ambiente por 4 minutos y leer. Una reacción positiva se muestra por el desarrollo de un color púrpura encendido.

Prueba de la utilización del citrato

Se sabe que la Escherichia coli utiliza el citrato en presencia de fuentes de carbón y nitrógeno fácilmente asimilables, mientras que la Shigella no.

Medio de citrato y sulfuro de Christensen en agar.

Citrato de sodio	3.0	Gms.
Glucosa	0.2	Gms.
Extracto de levadura	0.5	Gms.
Monohidroclorhidrato de cisteina	0.1	Gms.
Citrato férrico amónico	0.4	Gms.
Fosfato monopotásico	1.0	Gms.
Cloruro de sodio	5.0	Gms.
Tiosulfato de sodio	0.08	Gms.
Rojo de fenol	0.012	Gms.
Agar	15.0	Gms.
Agua destilada	1000.0	ml.

El medio se esteriliza en el autoclave y con inclinación igual que un medio de TSI. Deberá inocularse

por estría y por punción. Incubar a 37 grados centígrados por 5 - 7 días o hasta que se obtenga resultado positivo. La utilización del citrato se evidencia por alcalinización del medio. El indicador de hidrógeno sulfurado (Citrato férrico amónico y tiosulfato de sodio) pueden ser omitidos si se desea.

Prueba del KCN

En un medio de cultivo que contenga KCN no crecen la mayoría de las bacterias del género Salmonella ni cultivos del grupo Arizona, mientras que una bacteria del grupo Escherichia (E. freundii) generalmente sí crece.

Medio de KCN

Peptona, Orthana especial	10.0	Gms.
Cloruro de sodio	5.0	Gms.
Fosfato de sodio monobásico	0.225	Gms.
Fosfato de sodio diabásico	5.64	Gms.
Agua destilada	1000.0	ml.

pH ajustado a 7.6

El medio básico se esteriliza en el autoclave a 15 libras, por 15 minutos, y luego se enfría en el refrigerador. A este medio básico enfriado se le añaden 15 ml. de solución 0.5% de KCN (0.5 Gms. de KCN en 100 ml. de agua destilada bien fría) por litro. El medio se distribuye inmediatamente en los tubos respectivos (13 x 100) en cantidades de 1.0 ml. y luego se tapan con tapones embebidos en parafina

caliente. Cuando se guardan a la temperatura de 4 grados centígrados los tubos se pueden usar hasta 30 días después de su preparación. El medio deberá ser inoculado con una asada de otro cultivo en caldo de 24 horas de vida, incubado por lo menos 48 horas para su observación. Tapones flojos y tubos rajados pueden dar falsos positivos, y por esa razón deben de excluirse (11).

Las pruebas arriba descritas pueden ser mejor apreciadas al recordar que algunas cepas de Shigella dispar son idénticas antígenicamente con ciertos bacilos coliformes, otras son muy similares. Y que la única diferencia en esencia entre aquella misma Shigella y los bacilos coliformes aerogénicos es la producción de gas (4) (10).

VARIANTES FERMENTATIVAS

La Escherichia coli se ha dividido en "Variantes fermentativas", basándose en su acción sobre determinados substratos. Estas variantes por supuesto pueden ser muchas debido a lo variable del poder fermentativo de estas bacterias sobre muchas azúcares. Sin embargo unas pocas de éstas son bien conocidas y a éstas nos referiremos.

Más o menos la mitad de las cepas de E. coli fermentan la sucrosa mientras que la otra mitad no, a las primeras se les ha llamado coli communior y a las segun-

das coli communis. Con menos frecuencia se han encontrado cepas de E. coli que no fermentan la lactosa de inmediato, pero en el curso de la incubación éstas colonias no fermentadoras de la lactosa al principio desarrollan papilas que al ser transplantadas se desarrollan en verdaderas fermentadoras de lactosa. A estas cepas de coli se les ha llamado coli mutabile. Otra variante fermentativa es aquella que fermenta la dextrosa pero sin producción de gas, a ésta se le ha llamado coli anaerógenes.

El grupo de los bacilos paracolón se puede considerar una variante fermentativa del coli difiriendo del típico en que fermenta la lactosa tardíamente. La relación entre estos dos grupos de bacterias no está muy clara todavía (7).

C. Composición antigénica

Los trabajos iniciales verificados por algunos investigadores revelaron que el grupo coli tenía una gran heterogeneidad de factores antigénicos (1).

1. Antígenos de importancia serológica.

Hay tres clases de antígenos que son de importancia en la serología de la Escherichia coli. Estos son O K y H.

ANTIGENOS O

Los antígenos O son somáticos. No son inactivados por el calor a 100 grados centígrados o 121 grados centí-

grados. No son destruidos por el alcohol. Consisten básicamente en carbohidratos.

ANTIGENOS K

Los antígenos K son somáticos llamados de envoltura o también de cápsula, y son bloqueadores de la aglutinación del antígeno O. Hay tres variedades del antígeno K: L A y B.

Variedad L

La aglutinabilidad de este antígeno en su antisuero es inactivada por el calor a 100 grados centígrados en una hora.

Las suspensiones bacterianas se vuelven aglutinables en antisuero O mediante la aplicación de calor a 100 grados centígrados por una hora.

El poder combinante de su anticuerpo se inactiva por el calor a 100 grados centígrados en una hora. (Diferencia la más importante entre variedad L y variedad B).

El poder antigénico es inactivado por el calor a 100 grados centígrados en una hora.

Se le encuentra como envoltura o vaina, ocasionalmente como cápsula.

Variedad A

La aglutinabilidad del antígeno A en antisueros A

E. coli, especialmente aquellos relacionados con casos de diarrea infantil, de manera que el esquema de E. coli se ha extendido aún más (2) (4).

D. Patogenicidad

1. Infecciones diversas

Es bien sabido que bajo ciertas condiciones el bacilo coli puede invadir ciertos órganos anatómicamente relacionados al intestino, tales como la vesícula biliar, riñones, vejiga, y también el peritoneo. El apéndice es con alguna frecuencia sitio de infección producida por la E. coli. Las infecciones agudas del tracto urinario son causadas con gran frecuencia por Escherichia coli. También, acompañado de otras bacterias de la piel se le puede encontrar en focos infecciosos de la misma.

La Escherichia coli puede ganar acceso al torrente sanguíneo, aunque raras veces (6). El autor de este trabajo aisló en una ocasión una Escherichia coli en hemocultivo de un paciente con cistitis sobrevenida a raíz de severo trauma en la uretra. El hemocultivo fué pedido por el médico que atendía el caso, mientras el paciente era presa de violentos escalofríos que fueron seguidos de elevada fiebre. En dos ocasiones anteriores se aisló en la orina de este mismo paciente una cepa de Escherichia coli, en cultivo puro, que resultó ser sensible únicamente

a Cloromicetina.

La cepa aislada de la sangre fué también sensible unicamente a Cloromicetina y resistente a los otros antibióticos y sulfamidados probados. Cabe pensar que lo ocurrido a este paciente fué una bacteremia transitoria.

En algunos casos la entrada del coli a la sangre representa más bien un fenómeno secundario durante estados agonales de otras condiciones. En los recién nacidos se presenta a veces una infección generalizada a bacilo coliforme que puede conducir a una fatal "Septicemia Hemorrágica" o "Enfermedad de Winckel" (12).

Flax y Shaw reportaron un caso raro de Septicemia debida a bacilo coli anaerógenes (13).

2. Enteropatógenos del grupo Escherichia coli

Resumen histórico

Por muchos años los investigadores habían ya estudiado cultivos de Escherichia coli aislados de casos de gastroenteritis infantiles en los cuales no se encontraba una bacteria patógena tal como Salmonella o Shigella. Los resultados obtenidos de aquellos cultivos estudiados no fueron concluyentes ya que sólo métodos bioquímicos se emplearon para diferenciar las distintas cepas aisladas de los niños afectados de diarrea, y también de per-

sonas normales. Actualmente se sabe que diferentes serotipos de Escherichia coli dan a menudo idénticas reacciones bioquímicas. El problema empezó a solucionarse con el establecimiento del esquema serológico del grupo Escherichia por Kauffmann, el cual fué a su vez grandemente facilitado por el descubrimiento que el mismo Kauffmann hizo del antígeno L, con lo cual se clarificó en gran parte el porqué de resultados discordantes.

Bray en 1945, y Bray y Beaven en 1948 despertaron el interés en el papel que la E. coli podría estar jugando en los brotes epidémicos y casos esporádicos de diarrea infantil. Fueron estos autores los primeros en emplear métodos serológicos para diferenciar los serotipos coli aislados de niños normales, de aquellos que provenían de niños afectados de diarrea. Aislaron el tipo que ahora se conoce como O111:B4 en 42 pacientes de 44 estudiados, todos ellos sufrían de la llamada "Diarrea Infantil de Verano".

Independientemente Varela, Aguirre, y Carrillo en la Ciudad de México aislaron en 1946 el mismo serotipo de E. coli al cual ellos llamaron coli-gómez. El segundo tipo, de importancia por su asociación a diarreas infantiles fué investigado por Giles, Sangster y Smith en 1949. Este fué el O55:B5. Desde 1945, cultivos de

E. coli 0111:B4, y 055:B5 han sido aislados durante epidemias y en casos esporádicos de diarrea infantil en casi todos los países del mundo.

Otros serotipos han sido reportados, de manera que en la actualidad hay por lo menos doce que deben ser investigados en casos de brotes epidémicos de diarrea infantil:

026:B6	086a:B7	0111:B4	0112a
055:B5		0119:B14	0112c:B11
		0124:B17	
		0125:B15	
		0126:B16	
		0127:B8	
		0128:B12	

Fournelle aisló recientemente en Alaska, de un niño esquimal, la cepa 0117:H27 (2) (4) (14) (18).

Estudios sobre el rol patógeno de estas bacterias

La evidencia epidemiológica ha aportado su contribución en los estudios verificados. Se ha encontrado por ejemplo, que una de las cepas en sospecha durante una epidemia, predomine en las heces de los niños afectados pero no en la de los sanos. También ha sido de utilidad la observación de que un brote epidémico coincida con la introducción en la nursería de organismos tales como 0111:B4, 055:B5 etc., y que desaparezcan juntamente con el brote. (15) (16) (17)

Las pruebas en voluntarios han sido otra fase importantísima del mismo estudio. A un grupo de voluntarios se les pidió que ingirieran cultivos de cepas 0111:B4 o 055:B5. Estos voluntarios desarrollaron diarreas desde leves hasta severas, no habiendo ocurrido en las personas que actuaron como controles. Para un estudio inmunológico se desarrolló un test de hemaglutinación y se encontró un aumento en título de hemaglutininas homólogas de Escherichia coli en los voluntarios que ingirieron cultivos de cepa 055:B5, mientras que en los controles que ingirieron cultivos de cepas inocuas, no se encontró aumento alguno de dicha hemaglutinina. Por otra parte, los voluntarios que tomaron cepas patógenas 055:B5 no mostraron aumento alguno en título de hemaglutinina heteróloga de E. coli.

Ferguson y June usaron voluntarios de un penal para experiencias de esta misma índole. Se tomó precauciones para seleccionar voluntarios que estuviesen libres de enfermedades orgánicas o infecciosas. Se mantuvo a estos individuos seleccionados en cuarentena antes del experimento. Se les dió a tomar en leche cepas patógenas de Escherichia coli. Se usó un grupo de control, al que no se le dió dichas cepas, sino leche conteniendo cepas inocuas de E. coli. Ninguno de los individuos que parti-

ciparon en el experimento sabía si su leche contenía o no cepas patógenas de coli. Durante el período de cuarentena previo al experimento se les hicieron observaciones clínicas y varios exámenes de laboratorio. Después de la ingestión de la leche nuevamente se les hicieron las mismas observaciones, incluyendo exámenes de heces, garganta, orina, y sangre.

Los resultados se pueden resumir en la forma siguiente:

- a. Los voluntarios que ingirieron Escherichia coli patógena sufrieron síntomas similares a los producidos por la intoxicación alimenticia aguda, cuando la dosis de organismos ingerida fué grande.
530.500.000 organismos ingeridos o menos produjeron efectos leves o ninguna molestia. No hubo evidencia alguna de bacteremia, o de aparición de organismos en la orina.
- b. Un buen porcentaje de voluntarios que ingirieron E. coli O111:B4 desarrollaron aglutininas para dicho organismo. Algunos voluntarios que no desarrollaron síntomas de ninguna clase también desarrollaron aglutininas, aunque en menor grado.
- c. Los voluntarios que ingirieron una cepa clasificada como patógena, no sufrieron de síntomas que pudieran ser atribuidos a la bacteria, no obstante que el nú-

dos cepas de Escherichia coli O111:B4. Una produjo en 4 voluntarios síntomas similares a los del envenamamiento alimenticio. La otra cepa no produjo síntomas en 3 adultos voluntarios.

Modica, Ferguson, y Ducey están en favor de la relación existente entre Escherichia coli O111:B4 y las diarreas. Para reforzar sus pruebas en favor de tal relación, reportan haber encontrado aglutinitas anti E. coli O111:B4 en el suero de niños convalecientes de un episodio de diarrea epidémica (15).

Como conclusión a esta parte podría decirse que hay todavía mucho lugar para experimentación en esta línea, pero que poca duda puede haber ya del rol patógeno de estas bacterias en el intestino de los niños.

INVESTIGACION DE ESCHERICHIA COLI DEL GRUPO ENTEROPATOGENO EN
131 MUESTRAS DE HECES

A. Finalidad de la investigación

1. Tratar de aislar bacterias del grupo Escherichia coli enteropatógeno (0111:B4, 055:B5, 026:B6, 0127:B3), por medios bioquímicos y serológicos.
2. Observar si el número de esas bacterias aisladas representa una cifra de consideración como para incluir los métodos empleados en este trabajo en la rutina bacteriológica de diagnóstico del grupo entérico.
3. Buscar entre la información obtenida de este trabajo, algún dato o datos que pudieran servir para la evaluación indirecta del rol patógeno de las bacterias investigadas.

B. Material y métodos

Todos los medios de cultivo empleados son de la casa Difco y de la B.B.L. (Baltimore Biological Laboratory, Inc.). Se obtienen en forma deshidratada y se rehidratan en el laboratorio acorde a las recomendaciones de las casas (23)(24).

Las muestras de heces fueron enviadas en receptáculos de vidrio especiales para este fin, con excepción de ocho las cuales fueron tomadas en el laboratorio con hisopo rectal.

A cada una de las muestras se le procuró hacer lo más

posible de la sistemática que a continuación se describe:

Examen microscópico

Estudio de la muestra en solución salina, directamente al microscopio, sola y con lugol añadido. Se buscó formas tróficas y enquistadas de Protozoarios, huevos de Metazoarios, y manifestaciones de inflamación en el intestino (Leucocitos, hematíes, mucus).

Se hizo además estudio microscópico de concentrado de la muestra investigando quistes de Protozoarios, y huevos de Metazoarios. Se usó el método de Faust de concentración (19).

Examen bacteriológico

La muestra se sembró en SS agar, EMB, Medio de Tetratona-to, Gelosa sangre, y Sorbitol agar.

Para investigar Salmonella y Shigella, y además otras lactosa negativa se resembró colonias incoloras de los medios de SS agar y EMB a un medio de TSI agar por caja. A las 24 horas se observó el TSI y si había indicación de que la bacteria fuera Salmonella o Shigella se procedió a hacer una reacción de aglutinación con suero polivalente, Vi, y de grupos para Salmonella. Asimismo con sueros de grupo para Shigella. Luego se sembraron los siguientes medios para estudiar la acción bioquímica de la bacteria:

Caldo base con lactosa
Caldo base con sucrosa
Caldo base con dextrosa
Agua triptona
Medio semisólido de movilidad
Medio líquido de urea
Citrato agar de Simmons

El agua de triptona llevaba suspendida sobre el nivel del líquido una cinta de papel impregnada de acetato de plomo para detectar la presencia de gas sulfídrico. Para detectar la producción de indol en el mismo medio se usó la modificación de Bohme con el reactivo de Ehrlich. (23).

Del medio de Tetracionato se resembró a un nuevo EMB y se siguió la misma sistemática que se describió arriba.

La identificación final de Salmonellae y Shigellae se hizo basándose en los datos obtenidos de las pruebas serológicas y las pruebas bioquímicas. En algunos casos se hizo uso de la reacción con el antisuero H para detectar el antígeno flagelar de Salmonellae.

Para investigar Escherichia coli del grupo patógeno se resembraron tres colonias a 3 tubos de gelosa simple. Una colonia del medio de gelosa sangre (No hemolítica de preferencia), una colonia característica lactosa positiva del medio de SS agar o EMB, y una colonia del medio de sorbitol agar (De preferencia sorbitol negativa). Los tres tubos de gelosa nutritiva (Gelosa simple) se incubaron 24 horas y se usaron para las pruebas serológicas y bioquímicas.

Pruebas serológicas para E. coli enteropatógeno

Los sueros usados son todos de la casa Difco. Se trabajó con dos clases de sueros: Suero OB polivalente (0111:B4, 055:B5, 026:B6, y 0127:B8), y suero OB individual para cada uno de los componentes del suero polivalente. Los sueros polivalentes por sí solos pueden dar una identificación presuntiva del coli patógeno, y son probablemente los que mayor uso tienen en los laboratorios bacteriológicos donde una respuesta rápida y orientadora es de lo más indispensable (20). Los sueros OB individuales del grupo que comprende el suero polivalente, son necesarios para una identificación más segura del coli en estudio.

Primera prueba serológica: Se tomó una porción del crecimiento en el tubo de gelosa nutritiva y se hizo una suspensión moderadamente gruesa en una gota de suero polivalente, y en una gota de solución salina colocada a la par y usada como control.

Las suspensiones se hicieron en una lámina portaobjetos, por ser fácilmente manejadas y depositadas en los recipientes con líquido desinfectante (En la primera y segunda prueba serológica se trabaja con cepas vivas), y evitando así una posible contaminación del operador o cualquiera otra persona.

La lámina se movió en tal forma que las suspensiones se

podieran mezclar satisfactoriamente por espacio de 2 minutos. Se consideró positiva la muestra si se observó aglutinación franca a los 2 minutos o antes. De otro modo se le consideró negativa. El control debió permanecer perfectamente homogéneo, de lo contrario se consideró como aglutinación espontánea y la muestra por lo tanto negativa.

Segunda prueba serológica: Al resultar positiva la aglutinación con el suero polivalente se procedió a usar igual técnica con los sueros OB individuales. Los resultados positivos en esta prueba son debidos casi en su totalidad a la acción del antígeno B, ya que éste, como antes se explicó, es bloqueador de la acción del antígeno O. Por lo tanto la tercera prueba serológica es necesaria para determinar la presencia del antígeno O.

Tercera prueba serológica: Se hizo una suspensión gruesa del crecimiento en el tubo de gelosa nutritiva, usando solución salina como diluyente. Se calentó la suspensión a 100 grados centígrados (Baño de agua) por media hora, para destruir el antígeno B. Luego se repitió la prueba serológica como se hizo en la segunda.

Existe todavía una cuarta prueba serológica para confirmar las diferentes especies de E. coli. Para esta prueba se prepara una serie de diluciones del suero anti O, se añade a cada una de las diluciones una porción de suspensión

bacteriana calentada (100 grados centígrados por media hora), se incuban en baño de agua a 50 grados centígrados por 18-20 horas y se lee la aglutinación. Los cultivos que muestran aglutinación a una dilución de 320 o más se les considera poseedores del antígeno O correspondiente al antisuero usado (21).

Pruebas bioquímicas para Escherichia coli

Para estas pruebas se usó también los tubos de gelosa nutritiva con crecimiento de 24 horas. Estas pruebas bioquímicas se verificaron unicamente cuando la reacción con el suero polivalente fué positiva. Los medios que se usaron para detectar la acción bioquímica de estas bacterias son los mismos que se usaron para los géneros Salmonella y Shigella, habiéndose añadido un medio más para la detección del acetilmetilcarbinol, y para la prueba del rojo de metilo. (✱) Las reacciones que se consideraron como características del grupo Escherichia coli son:

Dextrosa	Acido y gas
Lactosa	Acido
Sucrosa	Acido producido variable
Indol	Usualmente producido
Gas sulfídrico	No producido
Urea	No desdoblada
Movilidad	Variable
Citrato	Usualmente no utilizado
Rojo de Metilo	Positivo
Voges Proskauer	Negativo

(✱) Se hace notar que se omitieron otras pruebas, no por carecer éstas de importancia, sino por razones de otra índole.

Para la identificación de una bacteria Gram negativa como Escherichia coli del grupo enteropatógeno se consideró necesario la reacción bioquímica más la identificación serológica.

EJEMPLO DE ESTUDIO COMPLETO EN UNA MUESTRA

Nombre del paciente.....XXX
 Edad.....2 meses

Protozoarios.....No hay
 Metazoarios.....Huevos de Ascaris lumbricoides

Signos inflamatorios.....Presentes

Otras bacterias
 lactosa negativa.....Proteus

Escherichia coli

-Serología

Polivalente.....Positivo
 OB individual.....O111:B4
 Después de calentamiento.....O111:B4 (O111)

-Bioquímica

Dextrosa.....Acido y gas
 Lactosa.....Acido
 Sucrosa.....Acido
 Indol.....Positivo
 Gas sulfídrico.....Negativo
 Urea.....Negativo
 Movilidad.....Negativo
 Citrato.....Negativo
 Rojo de Metilo.....Positivo
 Vogues Proskauer.....Negativo

RESULTADO Escherichia coli del grupo enteropatógeno.

V. RESULTADOS

Cuadro No.1

POSITIVIDAD A ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENA EN EL TOTAL DE LAS MUESTRAS

Muestras estudiadas	131
Muestras positivas	28
Porcentaje de positividad	21.4

Cuadro No.2

HALLAZGO DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENA CON RELACION A EDAD

	<u>Pacientes menores de cinco años</u>	<u>Pacientes mayores de cinco años</u>
Muestras estudiadas	76	55
Muestras positivas	21	7
Porcentaje de positividad	27.6	12.7

Cuadro No.3

MUESTRAS CON SIGNOS INFLAMATORIOS DEL INTESTINO, AUSENCIA DE PROTOZOARIOS, METAZOARIOS, Y DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS ENTERICAS DE RECONOCIDA PATOGENICIDAD

Muestras estudiadas	27
Muestras positivas a <u>E. coli</u> enteropatógena	10
Porcentaje de positividad	37

En las páginas siguientes se da una tabulación de los datos obtenidos del examen de las 131 muestras de heces.

Por razones de espacio los encabezamientos de las columnas aparecen en abreviaturas, en algunas de ellas. Los encabezamientos son:

Edad

Protozoarios

Metazoarios

Escherichia coli del grupo patógeno

Otras bacterias Gram negativas, lactosa negativas

Signos inflamatorios

Otros datos

Aunque en el trabajo experimental se describen formas tróficas y quísticas de Protozoarios, en la tabulación sólo se mostrará el nombre del Protozoario. Igualmente con los Metazoarios, sólo se dará el nombre.

El término " hisopo" se usa para mostrar que la muestra fué tomada en el laboratorio usando un hisopo rectal.

Para los signos inflamatorios y otros se usan tres marcas: (+) indicando que estaban presentes, (-) indicando que estaban ausentes, y (?) indicando que no fué posible buscarlos en la muestra.

<u>Edad</u>	<u>Protozoarios</u>	<u>Metazoarios</u>	<u>E. coli pat.</u>	<u>Otras bact.</u>	<u>S.I.</u>	<u>Otros datos</u>
26 años	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
6 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
16 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
6 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
1 año	No hay	No hay	055:B5	No hay	+	
44 años	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	+	
21 años	?	?	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	
6 meses	No hay	No hay	0111:B4	No hay	+	
8 meses	No hay	No hay	055:B5	No hay	+	
14 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
14 años	No hay	<u>Trichu-</u> <u>ris</u>	055:B5	No hay	+	
9 meses	No hay	No hay	0111:B4	<u>Paracolo-</u> <u>bactrum</u>	+	
21 meses	No hay	<u>Ancylos-</u> <u>toma</u>	No hay	No hay	+	
21 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
51 años	No hay	<u>Ascaris,</u> <u>Trichu-</u> <u>ris</u>	No hay	No hay	+	
4 años	No hay	No hay	0111:B4	No hay	+	
2 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
66 años	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
14 meses	No hay	<u>Ascaris,</u> <u>Strongi-</u> <u>loides</u>	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	

<u>Edad</u>	<u>Protozoarios</u>	<u>Metazoarios</u>	<u>E. coli pat.</u>	<u>Otras bact.</u>	<u>S.I.</u>	<u>Otros datos</u>
18 años	No hay	<u>Ascaris</u>	No hay	No hay	+	
32 años	No hay	<u>Ascaris</u>	No hay	No hay	+	
4 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	
11 meses	?	?	026:B6	No hay	+	
6 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
18 meses	No hay	<u>Ascaris</u>	026:B6	No hay	+	
11 días	No hay	No hay	026:B6	No hay	+	
20 meses	No hay	No hay	0111:B4	No hay	+	
15 años	No hay	<u>Ascaris</u>	No hay	No hay	+	
9 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	
44 años	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
49 años	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
6 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
15 meses	?	?	No hay	<u>Proteus</u>	?	Hisopo
11 meses	?	?	No hay	No hay	?	Hisopo
9 meses	No hay	No hay	0127:B8	No hay	+	
26 años	<u>Trico-</u> <u>monas</u>	<u>Ascaris</u>	No hay	No hay	+	
17 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
8 meses	No hay	<u>Trichu-</u> <u>ris</u>	026:B6	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	
9 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	

<u>Edad</u>	<u>Protozoarios</u>	<u>Metazoarios</u>	<u>E. coli pat.</u>	<u>Otras bact.</u>	<u>S.I.</u>	<u>Otros datos</u>
8 meses	?	?	No hay	No hay	?	Hisopo
6 meses	?	?	No hay	No hay	?	Hisopo
1 mes	No hay	No hay	O111:B4	No hay	+	
9 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	
3 meses	No hay	<u>Trichu-</u> <u>ris</u>	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	
8 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudo-</u> <u>monas</u>	+	
23 años	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	+	
2 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	+	
14 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
15 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
5 meses	?	?	O111:B4	No hay	?	Hisopo
5 meses	?	?	No hay	No hay	?	Hisopo
48 años	No hay	No hay	O111:B4	No hay	+	
2 meses	?	?	No hay	<u>Proteus</u>	?	Hisopo
23 años	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
22 años	<u>Tricho-</u> <u>monas</u>	No hay	No hay	No hay	+	
8 meses	No hay	No hay	O55:B5	No hay	+	
15 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
30 años	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
6 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	+	

<u>Edad</u>	<u>Protozoarios</u>	<u>Metazoarios</u>	<u>E. coli pat.</u>	<u>Otras bact.</u>	<u>S.I.</u>	<u>Otros datos</u>
12 años	<u>Ent.coli</u>	<u>Ascaris, Ancylostoma</u>	No hay	No hay	-	
70 años	?	?	No hay	No hay	?	
11 años	?	?	No hay	No hay	?	
18 años	?	?	No hay	No hay	?	
14 meses	?	?	No hay	<u>Proteus</u>	?	
20 años	?	?	No hay	<u>Pseudomonas</u>	?	
19 meses	<u>Giardia, Entero-monas</u>	<u>Ascaris</u>	No hay	<u>Proteus</u>	-	
25 años	?	?	No hay	No hay	?	
1 año	<u>Ent.coli</u>	<u>Ascaris</u>	No hay	No hay	-	
10 meses	?	?	No hay	<u>Proteus</u>	?	
54 años	?	?	0127:B8	No hay	?	
28 años	No hay	<u>Strongyloides</u>	0127:B8	No hay	-	
20 meses	<u>Giardia</u>	No hay	No hay	No hay	-	
24 años	No hay	<u>Ancylostoma, Trichuris</u>	No hay	<u>Proteus</u>	-	
57 años	?	?	No hay	No hay	?	
28 años	?	?	No hay	<u>Proteus</u>	?	
5 meses	<u>Ent.coli</u>	No hay	No hay	No hay	-	
22 meses	?	?	No hay	No hay	-	

<u>Edad</u>	<u>Protozoarios</u>	<u>Metazoarios</u>	<u>E. coli pat.</u>	<u>Otras bact.</u>	<u>S.I.</u>	<u>Otros datos</u>
38 años	?	?	No hay	Proteus	+	
2 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	-	
8 meses	?	?	No hay	No hay	?	
54 años	<u>Ent.coli</u>	No hay	No hay	No hay	?	
20 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	-	
42 años	<u>Giardia</u> , <u>Trichomonas</u>	No hay	No hay	No hay	-	
50 años	?	?	No hay	<u>Proteus</u>	?	
1 año	<u>Trichomonas</u>	No hay	No hay	No hay	-	
11 meses	<u>Ent.coli</u>	No hay	No hay	<u>Salmonella</u>	+	
35 años	<u>Giardia</u>	<u>Ascaris</u>	0127:B8	No hay	-	
9 meses	?	?	No hay	<u>Paracolo-bactrum</u>	?	
14 meses	<u>Giardia</u>	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	-	
82 años	No hay	<u>Ascaris</u>	No hay	<u>Proteus</u>	+	
18 años	No hay	<u>Ascaris</u> , <u>Trichuris</u>	No hay	No hay	-	
36 años	<u>Ent.coli</u>	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	-	
18 años	?	?	No hay	<u>Proteus</u>	?	
23 años	?	?	No hay	No hay	?	
7 meses	?	?	0127:B8	<u>Proteus</u>	?	
20 años	<u>Ent.coli</u>	No hay	055:B5	No hay	-	
35 años	No hay	<u>Ancylostoma</u>	No hay	<u>Proteus</u>	-	

<u>Edad</u>	<u>Protozoarios</u>	<u>Metazoarios</u>	<u>E. coli pat.</u>	<u>Otras bact.</u>	<u>S.I.</u>	<u>Otros datos</u>
48 años	?	?	No hay	No hay	?	
25 años	No hay	No hay	No hay	No hay	?	
19 meses	<u>Trichomonas</u>	No hay	O111:B4	<u>Proteus</u>	+	
8 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Paracolo-bactrum</u>	-	
11 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	-	
51 años	<u>Ent.coli</u>	No hay	No hay	<u>Salmonella</u>	-	
36 años	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	-	
16 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	+	
10 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Shigella Flexneri</u>	+	
60 años	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	?	
9 meses	No hay	No hay	O127:B8	<u>Proteus</u>	-	
14 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	-	
60 años	No hay	No hay	No hay	<u>Salmonella paratífica</u>	-	
20 años	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	?	
10 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus Pseudomonas</u>	-	
10 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudomonas</u>	+	
9 meses	No hay	No hay	No hay	No hay	-	
41 años	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudomonas Paracolo-bactrum</u>	-	
18 meses	No hay	No hay	O127:B8	<u>Paracolo-bactrum</u>	?	Hisopo

<u>Edad</u>	<u>Proto- zoarios</u>	<u>Meta- zoarios</u>	<u>E. coli pat.</u>	<u>Otras bact.</u>	<u>S.I.</u>	<u>Otros datos</u>
28 años	No hay	No hay	No hay	<u>Proteus</u>	?	
6 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Pseudomonas</u>	-	
3 meses	<u>Giardia Ent.coli</u>	No hay	No hay	No hay	-	
55 años	No hay	No hay	No hay	<u>Salm.tífica Paracolo- bactrum</u>	+	
10 meses	?	?	0111:B4	No hay	?	
2 años	?	?	026:B6	No hay	?	
20 años	<u>Trichomo- nas, ente- romonas</u>	<u>Ancylos- toma</u>	0127:B8	<u>Salmonella paratífica</u>	-	
3 años	?	?	No hay	No hay	?	
18 meses	No hay	No hay	No hay	<u>Shigella flexnery</u>	+	
6 años	?	?	No hay	No hay	?	
9 años	?	?	No hay	No hay	?	
25 años	?	?	No hay	No hay	?	
15 años	No hay	No hay	No hay	No hay	-	
4 años	No hay	No hay	No hay	<u>Shigella sonnei</u>	+	
11 meses	<u>Ent.coli</u>	No hay	026:B6	<u>Proteus</u>	-	

V. DISCUSION

Los resultados obtenidos del estudio de las 131 muestras de heces señalan un número de casos positivos a Escherichia coli del grupo enteropatógeno que despierta la curiosidad de quienquiera se dedique a este tipo de trabajo.

De 131 casos estudiados 28 fueron positivos haciendo esto una positividad de 21.4%. Este porcentaje es alto y cabría preguntarse si estas bacterias coliformes están jugando un papel patógeno o no. La respuesta a esta pregunta constituye material suficiente para un trabajo aparte. Habría que estar seguro de eliminar la acción de otros agentes patógenos del intestino tales como Protozoarios, Metazoarios, otras bacterias, virus, y aún agentes tóxicos (1). El estudio de virus en muestras patológicas está todavía al alcance de pocos laboratorios. Sin embargo, y aunque el objeto de la presente tesis es la investigación de las cepas patógenas y no decidir su papel patógeno, se puede con los datos aquí recopilados, hacer conclusiones parciales y provisionales respecto a su patogenicidad. (Habrá que tener siempre en mente que en el estudio de las muestras no se incluyó investigación alguna de agentes virales, ni tóxicos, Las razones se explican por si solas.)

Se pudo estudiar de las 131 muestras, 27 en las cuales se encontró signos inflamatorios del intestino con ausencia de Protozoarios, Metazoarios y alguna otra bacteria entérica lac-

tosa negativa. De estas 27 muestras 10 fueron positivas a Escherichia coli patógena. El dato parece significativo, pues cabría pensar que los signos de inflamación intestinal presentes bien podrían ser causados por la Escherichia coli. Es también de interés hacer notar que de los 10 casos positivos, 9 correspondieron a niños de edad comprendida entre los 11 días y 4 años. Un solo caso correspondió a un adulto de 48 años de edad. Se recordará que las enteritis debidas a coli enteropatógeno son mucho más frecuentes entre los niños de corta edad, y que los adultos parecen tener resistencia a las cepas.

En casi todos los casos las muestras de heces fueron enviadas al laboratorio. La excepción fué 8 casos en los cuales los niños fueron llevados por sus madres al laboratorio, donde se les tomó una muestra de heces directamente del intestino usando un hisopo rectal. Las madres de los 8 niños dieron el dato de diarrea profusa sufrida por sus niños. De estos 8 casos de franca diarrea se aisló 2 cepas de Escherichia coli enteropatógena.

Para ser más estricto en la evaluación de los datos obtenidos no se tomaron en cuenta los casos de positividad a coli cuando en compañía de éste se encontró algún otro agente que pudiera considerarse como patógeno.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Se hace un estudio del grupo Escherichia coli. Con particular interés se describe las cepas capaces de producir enteritis infecciosas, incluyendo algunas experiencias de investigadores que han tratado de probar su poder patógeno.
2. Se examinaron 131 muestras de heces, investigando en ellas Escherichia coli 0111:B4, 055:B5, 026:B6, 0127:B8, todas pertenecientes al grupo de las enteropatógenas. Se anotó además otros datos de importancia que se observaron en las muestras.
3. Se aislaron cepas patógenas de Escherichia coli en un 21.4% del total de las muestras examinadas. De 27 muestras que mostraban signos inflamatorios del intestino, con ausencia de otro posible agente patógeno, se aisló 10 cepas patógenas, correspondiendo 9 de estas a niños de menos de 5 años de edad.
De las heces de 8 niños con procesos diarreicos profusos, se aisló 2 cepas de coli patógeno.
4. Con base en los hallazgos del presente trabajo cabe recomendar que se dedique tiempo y esfuerzo a la investigación de la Escherichia coli enteropatógena como parte del examen que se haga en las materias fecales de pacientes

con trastornos gastrointestinales, muy especialmente cuando estos pacientes sean niños.

Con especial interés se recomienda el uso de sueros polivalentes que comprenden los antígenos O y B de las cepas más comunmente aisladas (0111:B4, 055:B5, 026:B6, 0127:B8), conteniendo los anticuerpos correspondientes a dichos antígenos. Con estos sueros es posible lograr identificaciones presuntivas más rápidas de los coli patógenos, y obtener en un mínimo de tiempo pruebas de sensibilidad a los antibióticos y sulfamidados.

BIBLIOGRAFIA

1. TOPLEY W.W.C. and WILSON G.S., Principles of Bacteriology and Immunity Vol I y II. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, 1955.
2. KAUFFMANN F., The Differentiation of Escherichia and Klebsiella Types. Charles C. Thomas. Springfield, 1951.
3. BREED R.S., MURRAY E.G.D., FITCHENS A.P., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Company. Baltimore, 1948.
4. EDWARDS P.R., and EWING W.H., Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company. Minneapolis, 1955.
5. SEARS H.J., BROWNLEE I., and UCHIYAMA J.K., Persistence of individual strains of Escherichia coli in the intestinal tract of man. J. of Bact., 59:293-301, 1950.
6. DUBOS R.J., Bacterial and Mycotic Infections of Man. J.B. Lippincott Company. Philadelphia, London, Montreal 1948.
7. BURROWS W., Jordan-Burrows Textbook of Bacteriology. W.B. Saunders Company. Philadelphia and London, 1949.
8. SCHAUB I., and FOLEY K., Methods for Diagnostic Bacteriology. The C.V. Mosby Company. Saint Louis, 1943.
9. GRABER C.D., and DUNLOP S.G., Incidence of serologic types of Escherichia coli associated with infantile diarrhea among pediatric patients in the Denver area. The J. of Lab. and Clin. Med., 44:416-420, 1954.
10. EWING W.H., The relationship of Shigella dispar to certain coliform bacteria. J. of Bact., 58:497-500, 1949.
11. EDWARDS P.R., FIFE M.A., and EWING W.H., Newer biochemical methods in the recognition of Shigella and Salmonella. The Am. J. of Med. Tech., 22:28-35, 1956.
12. ZINSSER H., JONES S.B., A textbook of Bacteriology. D. Appleton-Century Company Inc. New York-London, 1939.
13. FLAX H.J., and SHAW F.W., Bacterium coli anaerogenes septicemia. The J. of Lab. and Clin. Med., 27:1048-1050, 1942.

14. EWING W.H., and EDWARDS P.R., Isolation and preliminary identification of Escherichia coli serotypes associated with cases of diarrhea of the newborn. The Public Health Laboratory, 12:75-81, 1954.
15. MODICA R.I., FERGUSON W.W., and DUCEY E.F., Epidemic in infantile diarrhea associated with E. coli O111:B4. The J. of Lab. and Clin. Med., 39:122-127, 1952.
16. EDITORIAL., Pathogenicity of Escherichia. J. of the A.M.A., 154:837, 1954.
17. WRIGHT J., and RODEN A.T., Escherichia coli O55:B5 infection in a gastroenteritis ward. The Am. J. of Hyg., 58:133-147, 1953.
18. FOURNELLE H.S., Experience with the laboratory diagnosis of enteric diseases in Alaska. The Am. J. of Med. Tech, 22:36-43, 1956.
19. CRAIG CH.F., and FAUST E.C., Clinical Parasitology. Lea and Febiger. Philadelphia, 1945.
20. BYNOE E.T., Symposium discussion. Practical laboratory approaches to enteric disease with emphasis on cold climate aspects. The Am. J. of Med. Tech., 22:52-54, 1956.
21. DIFCO LABORATORIES., Directions for the use of Bacto E. coli OB AND O antisera. (Circular con direcciones para uso)
22. EWING W.H., GALTON M.H., and TANNER K.E., Escherichia coli O111a, O111c:B4 a new serotype isolated from monkeys. J. of Bact., 69:546-551, 1955.
23. SCHAUB I., and FOLEY K., Diagnostic Bacteriology. The C.V. Mosby Company. Saint Louis, 1947.
24. FERGUSON W.W., and JUNE R.C., Experiments on feeding adult volunteers with Escherichia coli O111:B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. The Am. J. of Hyg., 55:155-169, 1952.
25. DIFCO MANUAL., Difco Laboratories Inc., Detroit, 1953.
26. B.B.L. PRODUCTS FOR THE BACTERIOLOGICAL LABORATORY. Biological Laboratory, Inc., Baltimore, 1951.