

2ij 9



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES COMO  
AGENTES ETIOLÓGICOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE  
ACTUALIZACION MANCOMUNADO  
BLANCA ALICIA BARREDO PRIETO  
SUSANA CAJAL MEDRANO  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

México, D. F.

1989.

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

INTRODUCCION.....	4
OBJETIVOS.....	6
I. GENERALIDADES.....	7
i. TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS.....	7
ii. <u>ACINETOBACTER</u> .....	10
iii. <u>ALCALIGENES</u> .....	15
iv. <u>BORDETELLA</u> .....	18
v. <u>FLAVOBACTERIUM</u> .....	37
vi. <u>MORAXELLA</u> .....	41
vii. <u>PSEUDOMONAS</u> .....	46
viii. <u>XANTHOMONAS</u> .....	64
II. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.....	66
III. CONCLUSIONES.....	93
ANEJOS.....	96
IV. BIBLIOGRAFIA.....	165

## INTRODUCCION

Los avances logrados durante este siglo en lo que respecta al descubrimiento o investigación de los agentes etiológicos de un gran número de enfermedades infecciosas, han influido de manera de terminante para que las tasas mundiales de morbilidad y mortalidad sean cada vez menores.

Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, la frecuencia de muchos padecimientos que se controlan exitosamente en otras regiones, sigue siendo muy elevada. Es decir, aunque ya existen los recursos necesarios para prevenir o, en su caso, diagnosticar y tratar una gran parte de las entidades clínicas que nos afectan, éstas aún manifiestan incidencias críticas en pueblos tales como el nuestro. En este sentido, los motivos correspondientes podrían dividirse en dos grandes grupos: los de índole económico y los que derivan de la carencia de información y/o comunicación.

Por lo que respecta al primero, resulta difícil establecer medidas efectivas que sean acordes con las situaciones económicas de los numerosos países del tercer mundo; no obstante, deberían desti narse capitales mayores para los sectores encargados de preservar la salud pública.

En cuanto al segundo grupo, podrían señalarse causas muy diver sas; empero, las que dan lugar al presente trabajo son las que se asocian al químico que se desempeña dentro de los laboratorios clí

nicos. En este contexto, muchos diagnósticos de enfermedades ocasionadas por microorganismos comunes tales como Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Clostridium, Mycobacterium y bacilos Gram negativos facultativos, son generalmente confiables. Sin embargo, cuando las infecciones se deben a virus, Chlamydia, Mycoplasma, Calymatobacterium, Gardnerella, Treponema o Rickettsia, entre muchos otros, los reportes suelen ser inexactos.

Lógicamente, una de las razones de que suceda lo anterior radica en la falta de conocimientos sobre aquellos agentes etiológicos que errónea o acertadamente, se consideran o consideraban, "de menor incidencia".

Por ello, el presente trabajo intenta proporcionar la información reciente relacionada con la importancia clínica y las técnicas de identificación de un grupo de bacterias, la mayoría de las cuales ocasiona numerosos y/o graves padecimientos al ser humano: los bacilos no fermentadores.

## OBJETIVOS

Acerca de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BNF),  
géneros Acinetobacter, Alcaligenes, Bordetella, Flavobacterium,  
Moraxella, Pseudomonas y Xanthomonas:

- Describir sus principales propiedades en lo que corresponde a taxonomía, microscopía, cultivo, macroscopía y comportamiento bioquímico.
- Señalar los aspectos de mayor interés en cuanto a las enfermedades que ocasionan al ser humano.
- Describir las técnicas más confiables que se emplean para identificarlos en el laboratorio, subrayando las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

## CAPITULO I

### GENERALIDADES

#### i. TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS COMUNES.

Según el Manual de Bacteriología Sistemática (8), los bacilos no fermentadores ocupan, dentro de la clasificación general, los siguientes grupos:

#### Sección No. 4 BACILOS Y COCOS G(-)

##### Familia I. Pseudomonadaceae.

Género I Pseudomonas

Género II Xanthomonas

##### Familia VIII. Neisseriaceae

Género II Moraxella

Género III Acinetobacter

Otros géneros: Flavobacterium

Alcaligenes

Bordetella

Estas bacterias comparten ciertas características: además de manifestarse como bacilos Gram negativos no fermentadores, son asporógenos, sintetizan catalasa y son quimiorganótrofos cuyo metabolismo respiratorio generalmente emplea al oxígeno como aceptor

final de electrones; en su mayoría, son aerobios estrictos, no obstante, algunos son desnitrificantes y pueden utilizar nitratos como aceptores alternos, tal como el caso de ciertas cepas de los géneros Pseudomonas y Alcaligenes.

Comunmente, son móviles mediante flagelos polares y peritricos, si bien ello no se cumple en los géneros que presentan algunas especies inmóviles: Bordetella y Flavobacterium. De hecho, el único género cuyas especies son inmóviles en su totalidad es Acinetobacter.

En cuanto a su tamaño, éste varía entre 0.2 a 1.6  $\mu$ m por 0.5 a 4.0  $\mu$ m; no obstante, Bordetella y Flavobacterium pueden presentarse como cocos o cocobacilos.

Cómo es posible constatar, son pocas las características comunes de este tipo de bacterias; por dicha razón, es conveniente describir a cada uno de los géneros para enfatizar los caracteres que permitan establecer su diferenciación (Tabla No. 1.1).



TABLA No. 1.4 ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LOS DIFERENTES GENEROS DE BNF.

GENERO	<u>Pseudomonas</u>	<u>Xanthomonas</u>	<u>Alcaligenes</u>	<u>Bordetella</u>	<u>Flavobacterium</u>	<u>Moraxella</u>	<u>Acinetobacter</u>
Características							
Morfología	B	B <sub>a</sub>	B	CB	CB	B	B
Gram	-	-	-	-	-	-	-
Ancho ( $\mu$ m)	0.5 - 1	0.2 - 0.8	0.5 - 1.2	0.2 - 0.3	0.5	1.0 - 1.5	0.9 - 1.6
Largo ( $\mu$ m)	1.5 - 4	0.6 - 2	0.5 - 2.6	1.5 - 1.0	1.0 - 3.0	1.5 - 2.5	1.5 - 2.5
Movilidad	+	+	+	+/-	+/-	-	-
Cápsula	-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-
Espora	-	--	-	-	-	-	-
Aerobio	+/-	+	+/-	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+/-	+	+	+	+	+	-

B = Bacilo  
 CB = Cocobacilo

ii. ACINETOBACTER

Este género está integrado en su mayoría por bacilos que miden 0.9 a 1.6  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo; no obstante, se considera pleomórfico porque puede manifestar formas cocoides durante su fase estacionaria. Comúnmente, estos microorganismos se agrupan en pares o cadenas de longitud variable, son Gram negativos y, al igual que el resto de los BNF, no forma esporas (8, 109).

Estas bacterias son aerobias estrictas y poseen una fimbria polar, la cual confiere a las colonias una inexplicable motilidad espasmódica en los medios sólidos (8, 12).

Muchas cepas presentan cápsulas constituidas por heteropolisacáridos que interfieren la fagocitosis en los pacientes gravemente enfermos que presentan deficiencias en cuanto a opsoninas y fagocitos (8, 65, 68).

En su pared celular contiene un lipopolisacárido conformado por D-glucosa, glucosamina, galactosamina, lípido A, etanol-amina, ácidos grasos y trazas de proteínas, del cual no se conoce su potencia endotóxica (8, 12, 17, 66).

Todas las cepas crecen bien entre los 20 y 30°C, sin embargo, su temperatura óptima es de 33 a 35°C. Como todos los microorganismos oxidasa negativa, no contienen citocromo c, aunque sí los de las variedades  $a_1$ ,  $a_2$  y b (12, 44).

Actualmente sólo se reconocen especies: A. calcoaceticus,

en la cual se agrupa a las bacterias que antes se clasificaban dentro de las variedades Bacterium anitratum o Herellea vaginicola (productoras de ácidos a partir de azúcares) y Moraxella lwoffii o Misa polymorpha (no generadoras de ácidos)(8, 12).

Los microorganismos de éste género crecen bien en medios mixtos simples que contienen al menos una fuente de carbono y energía como etanol, acetato, lactato, piruvato, malato o  $\alpha$ -cetoglutarato; sus fuentes de nitrógeno son las sales de amonio y los nitratos. Algunas cepas en particular degradan sustancias orgánicas tales como los hidrocarburos (n-hexadecano) y los compuestos aromáticos (benzoato) y alicíclicos (ciclohexanol) (8, 12).

Su primo-aislamiento puede realizarse en agar infusión corazón, agar cerebro corazón y agar tripticase soya, generándose colonias no pigmentadas y mucoides (cuando poseen cápsula); no obstante, también pueden utilizarse medios selectivos como el agar Mac Conkey y ENB, los cuales facilitan el reconocimiento de Asimotobacter; en ellos, las cepas que no poseen cápsula producen colonias butíricas parecidas a las de las enterobacterias y más grandes que las de Moraxella. Algunas cepas pueden llegar a manifestar hemólisis en agar sangre debido a la acción de una fosfolipasa, la cual también hidroliza al tween 80; la producción de gelatinasa constituye otra propiedad variable (8, 12).

Por otro lado, los microorganismos que son aptos para utilizar la glucosa como fuente de carbono, la catabolizan a través de

la vía Entner-Doudoroff, oxidándola como primer paso a ácido glucónico, pues no contiene las enzimas necesarias para llevar a cabo la fosforilación directa de las hexosas (12).

El género Acinetobacter es parte de la flora habitual en un gran número de humanos, aunque también se le puede aislar de diversas áreas del organismo en las cuales causa lesiones actuando como oportunista. En este sentido, puede encontrarse en piel, membranas mucosas, sangre y abscesos de diferente índole; sin embargo, también se le detecta en el polvo, suelo y agua, los cuales pueden fungir como focos infecciosos (25, 44, 154, 156).

Por lo general, sus miembros son causantes de enfermedades intrahospitalarias que afectan principalmente a los pacientes inmunocomprometidos o debilitados, destacando los ancianos, los que padecen trastornos severos crónicos o agudos, los que se han sometido a cirugía y aquellos que han tenido que recurrir a instrumentos tales como vaporizadores, respiradores artificiales, canalizadores, catéteres, etc. (25, 44, 105).

Las afecciones más comunes con las que se relaciona a estas bacterias son: septicemia, endocarditis, meningitis, neumonía, abscesos cerebrales y pulmonares, traqueobronquitis, infecciones del tracto urinario, abscesos abdominales e intrapélvicos, piartrosis, osteomielitis, celulitis, abscesos en heridas, conjuntivitis y flebitis (8, 44, 151, 154).

Aunque tradicionalmente no se le concede al género una gran

importancia en salud pública, se ha demostrado que el número de casos debidos a él se ha incrementado en los últimos años y podría ser más elevado de lo que se piensa ya que aquéllos no se publican con la frecuencia con la que suceden (44).

Otra fuente de la que se le ha aislado a esta bacteria es la piel de las manos del personal que labora en los hospitales; lógicamente ello constituye un foco que incrementa el número de padecimientos con los que se relaciona a Acinetobacter (8).

La neumonía es la afección más común que provoca A. calcoaceticus y ocurre sólo en pacientes en los que se han aplicado la traqueotomía o tubos endotraqueales; muestra un elevado índice de mortalidad, ya que suele complicarse con diversos procesos que incluyen la participación de otros microorganismos. En cuanto a la traqueobronquitis, es menos severa que la neumonía, por lo cual sus índices de mortalidad son menores que los de ésta (12).

En las infecciones del tracto urinario de las que se aísla a este bacilo, los catéteres vesicales intervienen como principal fuente de infección; del mismo modo, los intravenosos se asocian frecuentemente a septicemia; en ésta última, las tasas de mortalidad son elevadas (44).

Por otro lado, el papel que juegan las fimbrias de Acinetobacter es aún desconocido, ya que no se ha logrado establecer si promueven o no la colonización. Debido a que a este género se le considera como un patógeno oportunista, se ha realizado pocos estu-

dios sobre sus propiedades patógenas; sin embargo, se piensa que es probable que tanto su cápsula como el lipopolisacárido de su pared celular estimulen la producción de anticuerpos y que los dirigidos contra la primera dan lugar a reacciones cruzadas con el material capsular de Streptococcus B y G y S. pneumoniae (8, 12).

Casi invariablemente, se ha encontrado que las cepas de Acinetobacter son resistentes a penicilina, ampicilina y cloramfenicol y que, por el contrario, la polimixina B, colistina, carbenicilina, kanamicina, tobramicina y los aminoglucósidos, entre otros, resultan adecuados para el tratamiento de los padecimientos causados por los microorganismos de este género. Su susceptibilidad a tetraciclina, sulfonamidas y estreptomycin es, por lo general, variable (8, 12, 44, 105).

iii. ALCALIGENES.

Este género se encuentra constituido por bacilos o cocos sin agrupación que miden 0.5 a 1.0  $\mu$ m de diámetro por 0.5 a 2.6  $\mu$ m de largo; sus miembros son móviles ya que poseen entre uno y doce flagelos peritricos (8, 131).

Su temperatura óptima es de 20 a 37°C y aunque la mayoría de sus miembros son aerobios estrictos, algunas cepas son capaces de desarrollar en condiciones anaerobias en presencia de nitratos o nitritos. En cuanto a la forma en que obtienen su energía, se consideran quimioorganótrofos que pueden utilizar una amplia variedad de ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de carbono. Asimismo, las sales de amonio y los nitratos constituyen su fuente habitual de nitrógeno y ciertas cepas requieren además de que se les proporcionen algunas vitaminas y/o determinados aminoácidos. En general, manifiestan crecimiento óptimo en agar sangre y otros medios preparados a base de peptonas (8, 119).

Las colonias de A. faecalis son generalmente de 1.0 a 1.5 mm. de diámetro, planas de bordes irregulares; por su parte, las de A. denitrificans miden alrededor de 0.5 mm de diámetro, son lisas y brillantes, de bordes regulares. La mayoría de las cepas manifiesta una turbidez uniforme en los medios líquidos (8, 116).

Por lo que se refiere a su patrón bioquímico, el género es oxidasa y catalasa positivas, no hidroliza la gelatina y su nombre proviene del hecho de que provocan alcalinización de los medios

que contienen azúcares, sales orgánicas o amidas (8).

Por ello, debe sospecharse de la presencia de este género cuando se trabaje con bacilos cortos Gram negativos que alcalinicen en su totalidad al TSI o Kligler en 18 h (8).

Las pruebas de reducción de nitratos y desnitrificación se consideran de gran importancia para distinguir entre A. faecalis y A. denitrificans, ya que mientras este último puede crecer anaeróbicamente reduciendo los nitratos y nitritos a nitrógeno, el primero sólo reduce nitritos y no desarrolla en condiciones anaerobias en presencia de nitratos (8).

El significado clínico de estos microorganismos no se ha logrado determinar con exactitud, ya que se les ha encontrado como oportunistas en pacientes que padezcan alguna otra enfermedad previa; es decir, en la mayoría de los casos se le encuentra actuando en combinación con otras afecciones del tracto urinario. Sin embargo, es necesario efectuar más estudios para conocer con precisión lo que corresponde a la patogenicidad de este género (8, 116).

Los especímenes clínicos en los que se le ha encontrado son: sangre, esputo, orina, heces, fluido espinal, aspirados bronquiales, secreciones de heridas y descargas purulentas de oídos, ojos y faringe. Alcaligenes se ha detectado en los ambientes intrahospitalarios, destacando su presencia en lugares húmedos, en los respiradores, sistemas de hemodiálisis, soluciones intravenosas e inclusive en los desinfectantes (8, 116).



Es conveniente hacer notar que el reconocimiento y la identificación de estos BNF resultan problemáticos, ya que no muestran características distintivas de índole bioquímico y fisiológico en relación a otros microorganismos de elevada incidencia y, además, manifiestan pocas reacciones positivas al examinarse en los medios tradicionales que se emplean para llevar a cabo el diagnóstico de las enfermedades infecciosas (116, 119).

Por lo que respecta a sus patrones de susceptibilidad, se ha comprobado que la mayoría de las cepas de este género son resistentes a ampicilina, carbenicilina, cloramfenicol, colistina y nitrofurantoina y sensibles a kanamicina, gentamicina, tetraciclina, ácido nalidixico y cefalotina (126).

iv. BORDETELLA

Este género fue descrito por primera vez por Bordet (1900), quien observó numerosos cocobacilos en secreciones respiratorias de individuos enfermos de tosferina; entonces, en memoria suya se les asignó el nombre de Bordetella a los microorganismos causantes de esta enfermedad (107).

A la fecha, se reconocen tres especies de este género: B. pertussis, B. parapertussis y B. bronchiseptica, las cuales están constituidas por cocobacilos Gram negativos que miden 0.2 a 0.3  $\mu$ m por 0.5 a 1.0  $\mu$ m y aparecen solos, en pares o cadenas cortas, si bien este último resulta muy poco común; además, son no esporulados y sólo B. bronchiseptica es móvil a través de flagelos laterales (8, 12).

Bordetella posee cápsula de composición desconocida, no obstante, la mayoría de los autores considera que ésta no es antifagocitaria en virtud de que no manifiesta ninguna reacción de quellung en presencia del anticuerpo correspondiente (8, 28, 62, 107).

En cuanto se refiere a sus requerimientos nutricionales para desarrollar in vitro, éste es uno de los géneros más exigentes y los aislamientos clínicos sólo pueden obtenerse cuando se aplican técnicas especiales; los ácidos grasos, iones metálicos, sulfuros y peróxidos le son tóxicos e impiden su desarrollo y, por otro lado, para estimular su crecimiento deben agregarse a los medios de cultivo sustancias tales como almidón, carbón activado, seroalbúmi-

na y sangre. En este contexto, el medio más eficaz para lograr su primo aislamiento es el agar Bordet-Gengou adicionado de meticilina; este antibiótico eleva la probabilidad de éxito en su cultivo debido a que inhibe a la mayoría de los microorganismos de la flora habitual que se encuentran en las muestras clínicas. Sin embargo, el medio Bordet-Gengou modificado suele ser también muy útil (36, 81).

Una vez sembrados los anteriores, las condiciones óptimas para el aislamiento de esta bacteria incluyen una incubación de siete días a 35-36°C; las colonias correspondientes podrán visualizarse desde los 2 a 4 días siguientes o inclusive hasta el sexto día cuando se utiliza el Bordet-Gengou adicionado de meticilina (81, 121).

Dado que el género es muy delicado, cuando los especímenes no puedan procesarse de inmediato, deben emplearse los siguientes medios de transporte: hidrolizado de caseína, agar carbón de Jones-Kendrick y medio de Reagan-Lowe. Por lo que toca a su morfología macroscópica, en el Bordet-Gengou modificado (agar-sangre-glicerol-papa) las colonias son lisas, convexas, brillantes, casi transparentes y de aspecto perlado, rodeadas por una zona de hemólisis sin límites definidos; en el caso de B. pertussis, su diámetro no excede de 1.0 mm, y, en contraste, las de B. bronchiseptica y B. parapertussis son más grandes (28, 121).

Entre los principales rasgos de su metabolismo, destaca el hecho de que el género es relativamente inerte en lo que corresponde

a muchas pruebas bioquímicas; lógicamente es quimioorganótrofo, llega a oxidar pero nunca a fermentar, es catalasa positiva, no licúa gelatina ni produce indol y alcaliniza la mayoría de los medios empleados para investigar la utilización de carbohidratos (12, 51, 107).

Por lo que respecta a la enfermedad con la cual se relaciona a estos microorganismos, ella se denomina tosferina o pertussis (tos intensa); las personas la adquieren al inhalar gotitas expedidas por individuos infectados, después de lo cual los microorganismos colonizan las vías aéreas manifestando un marcado viscerotropismo, es decir, sólo se multiplican en el epitelio ciliado del aparato respiratorio; esto se ha demostrado in vitro y, al parecer, resulta esencial para que se presente el padecimiento (53, 62, 107).

Cabe subrayar que Bordetella no fermenta carbohidratos y su metabolismo requiere de la utilización de aminoácidos, los cuales se encuentran en abundancia en la mucosa del tracto respiratorio, especialmente cuando ésta manifiesta inflamación y/o necrosis. El síndrome clásico aparece después de un período de incubación de 7 a 10 días (107).

Si bien la enfermedad la ocasiona más frecuentemente la especie B. pertussis, en cualquier caso son evidentes tres etapas evolutivas:

1. La catarral
2. La paroxística
3. La de convalecencia

La primera, también denominada prodrómica, tiene una duración de 1 a 2 semanas y se caracteriza por la presencia de rímorrea, la griseo, estorudos y tos leve; es decir, sólo se manifiestan sínto mas relativamente leves.

El período paroxístico dura habitualmente entre 1 y 6 semanas; en éste se presenta una clara progresión hacia tos paroxística, é to es, severos y continuos ataques túsígenos (de 5 a 20 accesos fuertes en 15 a 20 segundos) cuya mayor frecuencia tiene lugar por las noches y que conduce casi siempre a la producción de moco y vómitos. Comumente el paciente no tiene tiempo para respirar entre los accesos de tos y el paroxismo suele ser tan prolongado que genera anoxia; el estertor o silbido característico se escucha en la inspiración final al pasar el aire a través de una glotis estre cha. En esta fase de la toserina el enfermo manifiesta leucocitosis (de 12,000 a 200,000 por  $\text{mm}^3$ ) y una linfocitosis del 60%.

En el estado de convalecencia los síntomas van desapareciendo gradualmente. Es necesario hacer notar que la tos puede persistir hasta por varios meses después que el microorganismo ha desaparecido de las vías aéreas de la persona afectada (12).

En cuanto a las secuelas de este padecimiento, puede mencio-

narse que en el tracto respiratorio son casi nulas, sin embargo, desafortunadamente el sistema nervioso se ve comprometido con cierta frecuencia; así, durante el período agudo suele presentarse daño neurológico cuando existe apnea severa y ello se traduce en la aparición de convulsiones o encefalopatía; ésto no es resultado de una invasión real por B. pertussis. Como aún no se ha logrado determinar el papel de múltiples sustancias producidas por la bacteria, se desconoce el mecanismo a través del cual deriva dicha secuela, lo que sí es un hecho comprobado es que la incidencia de complicaciones en el sistema nervioso central es actualmente de 41% en pacientes hospitalizados (62, 107).

No obstante que se desconocen muchos aspectos relacionados con esta enfermedad, se ha demostrado que el daño causado por B. pertussis se debe principalmente a las propiedades biológicas de una sustancia sintetizada por el microorganismo a la cual se conoce como pertusígeno (101), pero que también recibe los nombres de factor promotor de linfocitosis (FPL), toxina pertusis (TP), factor de sensibilización a la histamina (FSH) y proteína de activación de los islotes (FAI) (38, 39, 83, 132).

El pertusígeno es probablemente el antígeno de mayor importancia en el origen de la afección y equivale a una proteína oligomérica de superficie formada por cinco subunidades: S1 (28,000 Daltons), S2 (23,000), S3 (22,000), S4 (11,700) y S5 (9300). La S1 (protómero A) es al parecer la responsable de la actividad enzimática del pertusígeno y el oligómero B es un pentámero formado por

la asociación de los dímeros S2-S4, S3-S4 y la subunidad S5; se cree que se encuentra relacionado con la unión del pertusígeno a las células "blanco". Este factor de virulencia corresponde a una toxina producida por B. pertussis en fase I que al administrarse a ratones, provoca en éstos: leucocitosis, linfocitosis, aumento en la liberación de insulina, inhibición de la hiperglicemia inducida por epinefrina e incremento de la sensibilidad de los tejidos a los efectos letales de la histamina (38, 73, 74, 75, 76, 77, 132, 149).

Una de las citadas actividades biológicas que más se le reconocen al pertusígeno consiste en la producción de linfocitosis; es probable que ésta se deba a alguna falla en la redistribución de las células del tejido linfático por la sangre, ya que se ha detectado la incapacidad de dichas células para regresar del torrente circulatorio hacia los módulos linfáticos a una velocidad normal, debido a la constricción de las vénulas endoteliales. Los estudios encaminados a esclarecer la razón de esta anomalía han evidenciado que el FPL es mitogénico para células T cuando están presentes células B, sin embargo, este fenómeno no se ha logrado observar in vivo y, por lo tanto, se ha coincidido en señalar que la linfocitosis no es consecuencia de una proliferación exagerada de los linfocitos (73, 74, 75, 76, 77, 124, 146).

Otra propiedad del pertusígeno radica en que exhibe actividad quimiotáctica; de esta manera inhibe la migración de macrófagos originando su agrupación en el sitio de infección, pero además, les induce cambios morfológicos que alteran la elongación y polariza-

ción requeridas para su locomoción (92).

La actividad enzimática del pertusigemo consiste en catalizar la transferencia del ADP-ribose del  $\text{NAD}^+$  al GTP en una proteína de la membrana; esta reacción inactiva a la subunidad inhibitoria de la adenilciclase en la célula "blanco". Probablemente, esta ribosilación también ocurra en la membrana de los macrófagos, dando lugar a cambios funcionales y morfológicos que afectan la motilidad de los mismos (39, 92).

Otro factor de virulencia corresponde a la hemaglutinina filamentosa (HAF), la cual es una proteína de superficie que aparece como agregados de filamentos cortos cuyo peso molecular aparente es de 1'000,000; en ella, destacan tres unidades con pesos moleculares de 100,000, 130,000 y 200,000, respectivamente, que parecen estar relacionadas antigénicamente debido a que reaccionan con anticuerpos monoclonales anti-HAF. La HAF regula la adhesión de los microorganismos a eritrocitos y otras células eucarióticas, actuando como puente entre ellos y las células hospedadoras (8, 62, 125).

Es importante recordar que las fimbrias bacterianas son apéndices filamentosos de superficie, no flagelares y constituidos por subunidades proteínicas idénticas cuya presencia se relaciona con la capacidad de ciertas bacterias para aglutinar eritrocitos y, principalmente, para adherirse a otras células eucarióticas antes de causar enfermedad. En cuanto a E. pertussis, su fimbria es una



estructura larga y filamentosa compuesta por subunidades con un peso molecular de 22,000 cada una, la cual se encuentra involucrada en la patogenicidad de esta especie; sin embargo, su HAF es independiente de las fimbrias en lo que corresponde a actividad química, antigénica y estructural, aunque todo indica que ambas hacen las veces de adhesinas. Estudios recientes han demostrado que mientras las fimbrias inducen la producción de aglutininas, actúan como aglutinógeno y no aglutinan eritrocitos, con el FPL y la HAF no ocurre lo anterior (125,148,160).

Otro factor que influye en la patogenicidad de este género es el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina, el cual se encuentra en la pared celular. Es termoestable, no inmunogénico y puede ser fraccionado químicamente en dos polisacáridos diferentes; posee dos fragmentos lipídicos diferentes: lípido A y lípido X, el último de los cuales parece ser el responsable de su toxicidad; además, su contribución en la patogenia radica, al parecer, en que inhibe la actividad de la adenilciclase mediante "ligandos quimiotácticos" tales como el f-Met-Leu-Phe que activan funcionalmente diferentes componentes de la proteína reguladora  $G_1$ , la cual actúa directamente sobre la enzima mencionada (58, 62).

B. pertussis también produce una toxina dermonecrótica (TDN), que corresponde a una proteína intracelular de 190,000 Daltons que contiene algunos azúcares y puede disociarse en dos polipéptidos de peso molecular 75,000 y 118,000. Esta endotoxina es termolábil, se destruye a 56°C durante 10 minutos y como su mecanismo de acción es

aún desconocido, su papel en el origen o evolución de la tosferina no es claro; de hecho, existen algunos autores que cuestionan su capacidad para causar lesiones debido a la ausencia de anticuerpos anti-TDN en sueros de pacientes convalecientes ya que el toxoide no manifiesta actividad protectora alguna (62, 78, 84, 92).

La adenilciclase producida por E. pertussis es una proteína de superficie, la cual podría equivaler a una toxina extracitoplásmica porque reduce la actividad bactericida de los fagocitos presentes en el sitio de infección; así, desempeñaría un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la enfermedad, ya que inhibe varias funciones metabólicas de los PMN, incluyendo la quimioluminiscencia, la quimiotaxis y la generación o formación de superóxidos, pero no tiene efecto sobre la fagocitosis de los mismos. Estos efectos inhibitorios pudieran deberse a la capacidad que tiene esta proteína de incrementar la concentración del cAMP intralular en los PMN (41, 42, 92, 152).

E. pertussis es una especie nutricionalmente exigente, sin embargo, puede adaptarse y crecer en medios tales como el agar nutritivo evidenciando cambios genéticos que se reflejan en el tipo de colonia que desarrolla.

Cuando se le aísla en Bordet-Gengou durante el período catarral de la enfermedad, produce colonias lisas (fase 1); en contraste, las cepas sembradas en agar o caldo nutritivos pierden todas las características de la fase 1 convirtiéndose en colonias rugosas o fa

se IV. Si bien existen colonias intermedias llamadas fases II y III, éstas se obtienen en agar sangre o chocolate presentando características tanto de las colonias en fase I como de las de la IV (8, 62).

Las bacterias en las fases I y IV son indistinguibles cuando se comparan su composición de ácidos grasos y sus pruebas de catalasa y peroxidasa; no obstante, en fase IV los microorganismos han perdido propiedades tales como su capacidad tanto para inducir sensibilidad a la histamina y producir anticuerpos protectores como para promover linfocitosis en animales, es decir, carecen de casi todos los antígenos de fase I. De hecho, las bacterias en fase IV sólo conservan al lipopolisacárido de su pared celular y, por ello, la capacidad de inducir la producción de anticuerpos bactericidas como sucede con las células en fase I (12). La pérdida de las propiedades antigénicas se produce más rápidamente en medios que poseen altas concentraciones de sulfato de magnesio (generándose células de modelo C) o 500 g/ml de ácido nicotínico; esto se conoce con el nombre de modulación antigénica y se utiliza para detectar cambios en el fenotipo del microorganismo como resultado de una alteración en el medio. Las células en fase IV y las modelo C parecen ser similares, sin embargo, las de fase IV y las que desarrollan en ácido nicotínico no lo son. La modulación es inicialmente reversible, tal como lo demuestra el hecho de que un cultivo modelo C puede convertirse a fase I al sembrarse en medios complejos; no obstante, tanto la variación de fase como la modulación antigéni-

ca pueden dar como resultado una alteración en la antigenicidad y, por lo tanto, en la virulencia (consultar Tabla iv.I) (8, 12, 62, 97).

En 1682, Thomas Willis reconoció por primera vez el carácter epidémico de la tosferina. Posteriormente, la epidemiología de dicha enfermedad se ha investigado hasta el grado de que, en la actualidad, se conocen varios factores que determinan su gran distribución y frecuencia (107).

Las características epidemiológicas de este padecimiento varían de acuerdo al agente etiológico que lo produce; la mayoría de los casos se deben a B. pertussis aunque B. parapertussis origina un 22% del total; en cuanto a B. bronchiseptica es poco común encontrarla como agente causal en el humano, siendo sus huéspedes más frecuentes: roedores, cerdos y otros animales (12, 83, 101, 107, 159).

El hombre constituye el único reservorio conocido de B. pertussis y el contagio se produce generalmente cuando personas susceptibles entran en contacto con individuos que padezcan infección activa; sin embargo, la inmunización parece haber alterado un poco la epidemiología: en los últimos años se ha aislado B. pertussis tanto de pacientes con enfermedad subclínica como de portadores; es posible que estos últimos sean más resistentes debido a vacunaciones previas y que su número sea más elevado del que en realidad se piensa (12, 36, 62).

ca pueden dar como resultado una alteración en la antigenicidad y, por lo tanto, en la virulencia (consultar Tabla iv.I) (8, 12, 62, 97).

En 1682, Thomas Willis reconoció por primera vez el carácter epidémico de la tosferina. Posteriormente, la epidemiología de dicha enfermedad se ha investigado hasta el grado de que, en la actualidad, se conocen varios factores que determinan su gran distribución y frecuencia (107).

Las características epidemiológicas de este padecimiento varían de acuerdo al agente etiológico que lo produce; la mayoría de los casos se deben a E. pertussis aunque E. parapertussis origina un 22% del total; en cuanto a E. bronchiseptica es poco común encontrarla como agente causal en el humano, siendo sus huéspedes más frecuentes: roedores, cerdos y otros animales (12, 83, 101, 107, 159).

El hombre constituye el único reservorio conocido de E. pertussis y el contagio se produce generalmente cuando personas susceptibles entran en contacto con individuos que padecen infección activa; sin embargo, la inmunización parece haber alterado un poco la epidemiología: en los últimos años se ha aislado E. pertussis tanto de pacientes con enfermedad subclínica como de portadores; es posible que éstos últimos sean más resistentes debido a vacunaciones previas y que su número sea más elevado del que en realidad se piensa (12, 36, 62).

TABLA No. iv.1 Relación antigénica de E. pertussis y sus derivados

ANTIGENO	FASE I	FASE IV	EN ACIDO NICOTINICO	MODELO C
Aglutinógenos	+	-	-	-
Factor Promotor de Linfocitosis (FPL)	+	-	-	
Adhesinas	+	-	+	
Opsoninas	+	+	-	
Hemaglutinina	+	-	-	

Es importante establecer que, aunque la tosferina es una enfermedad infecciosa del aparato respiratorio, no existe una influencia climatológica en su incidencia; es decir, la pertussis y parapertussis se producen esporádicamente en todo el mundo (12, 62, 107).

Las personas que se ven afectadas son principalmente niños de hasta 10 años, en los cuales la tasa de mortalidad es bastante elevada (12, 67, 69, 82, 107).

Por lo que respecta a los recién nacidos, estos son particularmente susceptibles, sin embargo, el calostro humano contiene factores de protección tales como los anticuerpos anti-YPL y anti B. pertussis; de éstos, los dos últimos son más efectivos debido a que los primeros son de corta duración (12, 46, 106).

En los últimos años se ha logrado detectar que el riesgo de infección va en aumento aún en los adultos vacunados; esto se presenta tal vez como consecuencia de que la inmunidad disminuye con el tiempo (69, 82). Este hecho es indicativo de la necesidad de practicar un refuerzo, pues aunque la infección pueda originar sólo enfermedades leves o subclínicas, la persona se convierte en un importante foco infeccioso. Sin embargo, se requiere de estudios más a fondo para establecer las ventajas y las desventajas de la nueva aplicación (69).

Las campañas de vacunación deben ser más ágiles y eficaces, de manera que se proporcione la vacuna a todos los habitantes de

la República.

La vacuna más utilizada hoy en día es una suspensión de células inactivadas de E. pertussis en fase I, libre de endotoxina, toxina dermonecrótica y factor productor de linfocitosis; se administra junto con los toxoides de la difteria y tétanos y se le denomina DPT. Se recomienda un mínimo de 12 unidades aplicadas en tres dosis, cada una de las cuales se aplica 8 semanas después de la anterior comenzando a los 2 meses de edad; posteriormente, se administra un refuerzo a 18 meses de la última dosis y para finalizar, un segundo refuerzo a criterio del pediatra (62, 107, 122).

Es importante subrayar que se han presentado casos raros de daños cerebrales en niños vacunados, estimándose que este fenómeno ocurre en una de cada 5-10 millones de inyecciones aplicadas en E.U.A. Sin embargo, aún no se ha definido las causas de dicha encefalopatía (12, 42, 46, 61, 107).

Como consecuencia de lo anterior, desde 1981 se ha producido en Japón una vacuna acelular constituida por los toxoides provenientes del factor promotor de linfocitosis (FPL) y de la hemaglutinina filamentososa (HAF); entre las ventajas que aquélla manifiesta destaca el hecho de que ambos toxoides actúan sinérgicamente aumentando el título de anticuerpos; así, mientras los inducidos por el toxoide de HAF inhiben la adhesión del microorganismo a los cilios, los dirigidos contra el del FPL neutralizan los efectos del pertusígeno. Hasta ahora se considera que las reacciones postvacunación que



origina son muy leves o casi ausas (38, 46, 132, 147, 148, 155).

Cabe señalar que a pesar de que ambas vacunas han influido enormemente para que la morbilidad y la mortalidad de la tosferina hayan descendido (62, 69), se requiere darle verdadera importancia clínica a dicha enfermedad; ésto es, no debe descartarse la posibilidad de su existencia tanto en niños con trastornos respiratorios severos como en adultos que han estado en contacto con enfermos y presentan síntomas respiratorios (53, 64); para ello, es necesario que los laboratorios estén capacitados para confirmar el diagnóstico de este padecimiento, de manera que el médico no sólo se base en los síntomas clínicos para prescribir el tratamiento correcto. Se debe considerar que también en E.W.A. se han reportado casos frecuentes de pertussis (36, 69, 82) y parapertussis (83) en los últimos años y éstos presentan únicamente una pequeña parte del total, lo cual indica que la seriedad del problema no es sólo a nivel nacional sino también en el contexto mundial (7, 41).

Por otra parte, se ha encontrado mediante pruebas de susceptibilidad, que B. pertussis y B. parapertussis son sensibles en mayor grado a la eritromicina que al cloramfenicol, oxitetraciclina, ampicilina y kanamicina; por lo tanto, actualmente se considera que el tratamiento óptimo es a base de aquélla; dicho antibiótico elimina al microorganismo de la nasofaringe, acortando de esta manera el periodo de contagio, sin embargo, no tiene influencia sobre el curso de la enfermedad excepto cuando se administra en la etapa temprana (62, 146, 152). Para coadyuvar a una pronta recuperación

se deben aplicar medidas de apoyo tales como la succión de las secreciones, hidratación, nutrición y el establecimiento del equilibrio electrolítico; además, se recomienda la oxigenoterapia con incremento de humedad (62, 81, 83, 107). El uso de inmunoglobulina humana parece ser útil, empero, esto aún no se ha determinado claramente (62, 67, 107). Cabe mencionar que el uso de antibióticos en afecciones producidas por B. parapertussis es casi nulo debido a que se presentan en forma muy leve (83).

El diagnóstico de laboratorio de la tosferina reviste una gran importancia y, sin lugar a dudas, el factor que ejerce mayor influencia negativa es la inexperiencia de los analistas para aislar, diferenciar e identificar al agente etiológico. El éxito radica, entre otras condiciones, en efectuar correctamente la recolección y conservación de las muestras. La primera debe realizarse con el mayor cuidado posible, procurando obtener un inóculo abundante; los especímenes (exudados nasofaríngeos nasales) deben obtenerse durante el período catarral, con la ayuda de hisopos de alginato de calcio acoplados a alambres finos y flexibles. La cabeza del paciente se mantiene inmovilizada mientras se introduce suavemente un hisopo en la fosa nasal hasta tocar el fondo de la nariz; aquí se deja en esa posición durante 15-30 segundos aunque se provoque tos debido al cosquilleo que se produce. Algunas personas presentan desviación del tabique nasal encontrándose resistencia a la inserción; en estos casos, se introduce el hisopo en la otra narina. Paralelamente al exudado nasal se recomienda recolectar otro de gargan

ta, ya que con ello se obtiene un mayor porcentaje de cultivos positivos y, por lo tanto, mejores posibilidades de detección (121). Una vez recolectada la muestra se coloca en dos placas: una con agar B-G y otra con agar B-G-adicionado de meticilina (2.5 g/ml); como ya se mencionó, la utilización de este antibiótico ha redituado mucho éxito, pues reduce el desarrollo de contaminantes si bien el crecimiento de B. pertussis es un poco más lento (36). Existe otro medio confiable para incrementar las posibilidades de aislar al microorganismo; agar con carbón con cefalexina (40 g/ml) y 10% de sangre de caballo desfibrinada (89, 121).

Cuando por alguna razón no es posible obtener los exudados perinasal y/o faríngeo, las muestras alternativas son los lavados bronquiales y aspirados por succión. Sin embargo, además de la dificultad que presentan, es necesario llevarlos inmediatamente a una placa de agar B-G, ya que el microorganismo puede morir rápidamente al entrar en contacto con tubos de plástico o goma, solución salina, recipientes de metal, etc. Probablemente, los buenos resultados de los exudados se deban a su inmediata deposición en agar B-G (89, 121)..

El transporte de las muestras juega un papel muy importante debido a la sensibilidad de este microorganismo a numerosas sustancias del medio ambiente y a que muchos laboratorios no cuentan con lo requerido para aislar e identificar al agente causal; además, la mayor incidencia de este padecimiento se localiza en zonas alejadas de las grandes ciudades. En esas condiciones, pueden utilizarse me

dios de transporte tales como el medio hidrolizado de caseína, el agar carbón de Jones-Kendrick y el medio de Reagan-Lowe de carbón con cefalexina y sangre desfibrinada de caballo, que, como ya se indicó, puede utilizarse también para el aislamiento. El medio hidrolizado de caseína es adecuado para periodos de menos de 2 horas y los dos restantes para 3 a 7 días (81, 89, 121).

Una vez sembrada la muestra en el medio de aislamiento, se incubaba entre 35 y 36°C. en cámara húmeda durante 7 días; posteriormente, se examinan las placas cada día y, cuando se encuentran colonias contaminantes, éstas se cortan junto con el fragmento de agar y se descartan. En el medio B-G las colonias microscópicas de E. pertussis aparecen después de 48 horas y las visibles no lo hacen antes de 3 días; todas las que parecen sospechosas macro y microscópicamente se siembran en otras placas con agar B-G y agar sangre y de éstas se realiza la identificación bioquímica y/o serológica (con anticuerpos fluorescentes). Por otro lado, también pueden practicarse pruebas que detectan anticuerpos circulantes en los sueros de los pacientes (31, 81); en este sentido, se debe tomar en cuenta que durante la infección por E. pertussis aparecen anticuerpos IgA, IgM e IgG, empero, también los sueros de niños que se han sometido a vacunación contienen las dos últimas clases mencionadas; por lo tanto lo lógico es que la detección de IgA determinará que existe infección natural, sin embargo, ello tiene limitaciones pues esta inmunoglobulina aparece en forma tardía y persiste aún después de que ha desaparecido el microorganismo (45, 81, 98).

A continuación se enlistan algunas de las pruebas bioquímicas que pueden emplearse para diferenciar (aunque lentamente) a las diversas especies del género Bordetella:

- Movilidad
- Producción de ureasa
- Reducción de nitratos a nitritos
- Utilización de carbohidratos
- Acción sobre la leche tornasolada

v. FLAVOBACTERIUM

Este género se encuentra formado por bacilos que miden 0.5  $\mu$ m de ancho por 1.3  $\mu$ m de largo y al igual que el resto de los BNF, son Gram negativos y no esporulados; además, son inmóviles en agar blando y por ello normalmente se les considera carentes de flagelos, sin embargo, por medio de la microscopía electrónica se ha detectado que F. aquatilis y F. meningosepticum poseen estructuras polares a las cuales se les denomina pseudoflagelos porque no son funcionales (8, 12).

Estos microorganismos son aerobios estrictos y pueden desarrollarse en presencia de 7% de CO<sub>2</sub>; aunque sus hábitats naturales son el suelo y el agua, también se les ha logrado aislar de los ambientes hospitalarios, muestras de alimentos tales como carne cruda y leche, así como de materiales clínicos procedentes de humanos (sangre, orina, etc.) (50, 52, 145).

Las temperaturas requeridas para su desarrollo varían de acuerdo a la fuente de aislamiento: para las cepas obtenidas de las primeras se pueden emplear 5 a 30°C, mientras que las encontradas en los especímenes de origen humano requieren 37 o 42°C, sobre todo cuando se trata de F. meningosepticum y algunas otras especies (8, 12).

Aunque existen algunas excepciones, estas bacterias producen un pigmento amarillo a naranja cuando crecen en medios sólidos y sus colonias son circulares, de 1 a 2 mm de diámetro, convexas,

translúcidas (ocasionalmente opacas), lisas y brillantes con bordes regulares (8, 52).

El color y la intensidad de los pigmentos varía considerablemente entre una y otra especie, dependiendo también del medio en que se les cultiva y de la temperatura y el período de incubación; de hecho, la pigmentación aumenta a bajas temperaturas (15 a 20°C), no es fluorescente en presencia de luz ultravioleta y es insoluble en el medio de cultivo por ser de origen carotenóide (40, 52).

Por otro lado, estos bacilos son catalasa y fosfatasa positivas, no digieren el agar y producen ácidos, pero no gas, en medios que contienen bajas concentraciones de peptona, siempre que este (n) presente(s) alguno(s) de los siguientes carbohidratos: glucosa, fructosa y maltosa. Además, existen cepas proteolíticas que hidrolizan caseína y gelatina y algunas que sintetizan indol (8, 15).

Por lo que se refiere al aislamiento de estas bacterias, no se requieren condiciones especiales para lograrlo, sin embargo, su desarrollo es lento, ya que son necesarios de 5 a 7 días de incubación para que las colonias sean visibles macroscópicamente. Por lo general, especies tales como F. aquatile no crecen en caldo o agar nutritivos; cuando se les siembra en agar sangre, sus colonias no son hemolíticas. Además, algunas especies como F. breve, requieren de vitaminas como factores de crecimiento (16, 40, 51).

Por otro lado, estos microorganismos son heterótrofos y qui-

microorganismos, lo cual indica que son capaces de utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, degradándolos hacia otros más simples; cabe señalar que ciertos compuestos aromáticos tóxicos que se emplean como pesticidas y contaminan el ambiente, son biodegradados por estas bacterias en el agua y suelo (14, 93, 142, 144).

Por lo que corresponde a la patología, estos microorganismos se consideran patógenos humanos que, en la mayoría de los casos, actúan como oportunistas. Se ha comprobado que producen una endotoxina que les confiere virulencia y que al parecer es determinante en las enfermedades que ocasionan al hombre (8, 149).

Dentro del género, *F. meningosepticum* es el principal agente de meningitis con altas tasas tanto de morbilidad como de mortalidad en recién nacidos (64, 145).

Los padecimientos debidos a esta especie son típicamente nosocomiales, ya que se le encuentra más ampliamente distribuida en los ambientes intrahospitalarios, e inclusive se le ha detectado frecuentemente en las manos del personal que labora en las clínicas (50, 64, 137, 145).

Se cree que la colonización inicia en la faringe de los bebés sanos, afectando principalmente a los infantes prematuros; una vez que aparece la meningitis, el pronóstico es grave y los escasos sobrevivientes manifiestan por lo general secuelas de tipo neurológico incluyendo hidrocefalia. En contraste, la enfermedad en adultos



suele ser "benigna", ya que cede cuando se trata con oportunidad; de hecho, sólo aparece con cierta regularidad en personas que padecen mala nutrición, desórdenes hematológicos o deficiencia renal crónica, entre otras (50, 64, 145).

F. meningosepticus también puede llegar a establecerse en el tracto respiratorio inferior causando una neumonía epidémica que en ocasiones deriva en septicemia. Además, se le ha detectado en el tracto urinario (generalmente femenino) y en los ojos causando conjuntivitis pero nunca en el tracto gastrointestinal; cabe mencionar que estas entidades son menos comunes que la meningitis aunque llega a presentarse en forma endémica dentro de los hospitales (8, 15, 50).

Por su parte, F. multivorum también se ha aislado de la sangre de pacientes que se encuentran como internos en los nosocomios; otras especies del género no se han estudiado con profundidad pero se sabe que pueden manifestarse como oportunistas (8, 52, 137).

Estos microorganismos son resistentes a estreptomicina, penicilina G, ampicilina, carbenicilina, gentamicina, kanamicina, polimixina B y tobramicina y moderadamente susceptibles a eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina y ácido nalidixico; de hecho, se ha comprobado que sólo son sensibles a algunos agentes antimicrobianos que normalmente se emplean para erradicar bacterias Gram positivas; entre ellos, destaca la novobiocina (8, 40, 52).

vi. MORAXELLA

Este género se compone por bacilos o cocos Gram negativos; en el primer caso (subgénero Moraxella), son frecuentemente muy cortos, anchos y semejan formas cocoides de 1.0 a 1.5  $\mu$ m de ancho por 1.5 a 2.5  $\mu$ m de largo. Su agrupación más frecuente es en pares o cadenas cortas. Por otro lado, cuando cocos (subgénero Branhamella), son generalmente más pequeños, de 0.6 a 1.0  $\mu$ m de diámetro y se les encuentra en pares o aislados (8, 47).

Ambos subgéneros son inmóviles, no producen esporas y pueden sintetizar fimbrias, las cuales confiere a sus colonias una movilidad característica en los medios sólidos. Además, son aerobios (aunque algunas cepas suelen crecer bajo condiciones anaerobias), su temperatura óptima es de 33 a 35°C y, por lo general, deben incubarse en atmósferas enriquecidas con CO<sub>2</sub> para que desarrollen adecuadamente (8, 11, 48).

En cuanto a sus propiedades culturales, puede establecerse que el género Moraxella crece comúnmente en medios tales como el agar sangre, dando lugar a colonias translúcidas, convexas y pequeñas que miden de 0.1 a 0.3 mm de diámetro. En el caso particular de Moraxella (M) lacunata, ésta desarrolla mejor en gelosa chocolate presentando hemólisis y depresiones en la superficie del medio. Por su parte, Moraxella (M) nonliquefaciens no requiere de enriquecimientos extra, aunque crece mejor en agar sangre produciendo colonias mucoides y no hemolíticas que miden 2 a 3 mm de diámetro; aparente

mente ésta es la más exigente de las especies del género, ya que no desarrolla en el medio OF de Hugh & Leifson. Moraxella (M) phenylpyruvica, M. urethralis y M. (M) osloensis crecen bien tanto en agar sangre como en Mac Conkey sin suero y sus colonias miden aproximadamente entre 0.5 y 1.0 mm de diámetro; además, M. (M) phenylpyruvica es capaz de desarrollar en medios que tienen altas concentraciones de sal o bilis; de hecho, las concentraciones mínimas inhibitorias de dichas substancias son generalmente de 7.5 a 9.0% de NaCl y 5% de sales biliares para el citado microorganismo. Por el contrario, un medio de sales minerales con iones amonio y acetato es suficiente para que crezca la mayoría de las cepas de M. (M) osloensis y M. urethralis; cabe señalar que estas dos especies presentan inclusiones de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, especialmente cuando se les cultiva bajo condiciones limitantes de nitrógeno (8, 10, 47, 139).

Por su lado, el subgénero Branhamella puede diferenciarse del género Neisseria en base a que aquél reduce nitratos a nitritos, no produce ácidos a partir de carbohidratos y sus colonias no presentan pigmento. Además, estudios de transformación genética e hibridación han demostrado que estos microorganismos muestran mayor afinidad hacia las especies de Moraxella y diferencias en cuanto a las especies de Neisseria (10, 11, 47, 59).

Las colonias de M. (E) catarrhalis miden aproximadamente, 2.0 mm de diámetro, son redondas, de textura suave, opacas y no presentan hemólisis (8).

Del mismo modo, M. (B) cavie presenta colonias cónicas semio-  
pacas, de consistencia butirácea, de 2.5 mm de diámetro y rodeadas  
por una zona de hemólisis débil; esta última característica tam-  
bién se manifiesta en M. (B) ovis, cuyas colonias son gris claro  
(8, 63).

Los microorganismos de este género usualmente no se conside-  
ran de alta virulencia y frecuentemente son parásitos inofensivos  
de las membranas mucosas del hombre y otros animales; es decir, la  
mayoría de las especies son oportunistas (13, 48).

En el pasado, M. (M) lacunata se consideraba como el princi-  
pal agente causal de la conjuntivitis y queratitis humana pero, ac-  
tualmente, son raros los aislamientos de este microorganismo a par-  
tir de individuos afectados por dicha enfermedad, e inclusive, se  
le ha encontrado en conjuntivas y vías respiratorias altas de perso-  
nas sanas (8).

Otra de las especies de este género, M. (M) bovis, produce  
queratocconjuntivitis al ganado vacuno (12, 63).

Por otro lado, M. (M) phenylpyruvica se ha podido detectar en  
sangre, líquido cefalorraquídeo y el tracto genito urinario, tanto  
del hombre como del de algunos animales. Se desconoce su virulen-  
cia y se piensa que es un patógeno en potencia (12).

M. (M) osloensis es otra especie con cierta capacidad para  
provocar padecimientos al humano, ya que eventualmente se le ha en-

contrado parasitando los aparatos respiratorio y genitourinario, sangre, líquido cefalorraquídeo y articulaciones. De hecho, se sabe que esta especie puede producir una artritis séptica cuya sintomatología es variable y puede llegar a confundirse con la ocasionada por otros agentes etiológicos; por ello, se recomienda realizar cuidadosamente el diagnóstico correspondiente (19, 34, 110, 120, 127, 140).

M. (M) nonliquefaciens tiene como hábitat natural la cavidad nasal del hombre, aunque también se le ha detectado en el tracto respiratorio superior; se le considera un microorganismo oportunista, al que se le acredita patogenicidad en los pacientes inmunocomprometidos en quienes causa cuadros, tales como bronquitis crónica, neumonitis, abscesos pulmonares y septicemia (8, 13, 47, 129).

M. urethralis es una de las especies inciertas de este género, su patogenicidad aún es cuestionable, pero se le ha encontrado en el tracto genitourinario femenino y en muestras de orina (8, 80, 123).

Por lo que se refiere a M. (B) catarrhalis, la cual habita en el tracto respiratorio superior del humano, se le ha encontrado afectando oído medio, bronquios, pulmones y senos paranasales (8, 20, 21).

De lo anterior se deduce que Moraxella spp no es uno de los principales patógenos; por esta razón, se han efectuado pocos estudios acerca de su composición antigénica y sus factores de virulencia.

cia. Uno de ellos corresponde a sus fimbrias, cuya existencia constituye un requisito para que se lleve a cabo la adhesión de estas bacterias a las superficies mucosas (8, 12).

Aunque los microorganismos de este género son Gram negativos y por ello contienen lipopolisacáridos, lo cierto es que se desconoce la toxicidad de estos últimos (8).

Por otro lado, se ha demostrado que la susceptibilidad de este género a diversos antibióticos es variada; aunque la mayoría de las especies son sensibles a la penicilina, algunas cepas son resistentes a este antibiótico porque producen  $\beta$ -lactamasas. Entre dichas cepas se cuentan algunas de las especies M. (M) osloensis, M. (M) nonliquefaciens, M. (M) phenylpyruvica y M. (E) catarrhalis. Sin embargo, destaca el hecho de que M. (M) nonliquefaciens también es resistente a antibióticos tales como: ampicilina, oxaciclina, y carbenicilina, aunque no a cefalotina; por su parte, M. (M) osloensis es resistente a la estreptomycinina y otras especies de Moraxella han evidenciado serlo a kanamicina, tobramicina y eritromicina (8, 128).

No obstante puede establecerse que, en general, Moraxella spp es susceptible a penicilina, ampicilina, gentamicina, tetraciclina, aminoglicósidos y a la mayoría de los antibióticos de amplio espectro. Lógicamente, se ha observado que el número de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas está aumentando día con día (80, 110, 120, 127, 128).

### vii. PSEUDOMONAS

Los miembros de este género son bacilos Gram negativos ligeramente curvos que miden de 0.5 a 1.0  $\mu$ m de ancho por 1.5 a 5.0  $\mu$ m de largo aunque dichas dimensiones varían en ciertos casos (8, 62).

Con excepción de P. mallei que es inmóvil, el resto posee flagelos polares y/o laterales; además, tal como sucede en todos BNF, son asporogénicos. Algunas especies acumulan poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) como reserva de carbonó; ésto se hace evidente mediante tinciones especiales y puede aplicarse como un auxiliar más en la identificación (8, 12).

En general, su metabolismo es aerobio pues el oxígeno constituye su único aceptor final de electrones en cadena respiratoria; sin embargo, algunas cepas pueden utilizar el nitrato alternativa-mente para crecer en condiciones de anaerobiosis. Por otro lado, la mayoría de las bacterias de este género son quimiorganótrofas, pero algunas especies son quimiolitótrofas facultativas capaces de utilizar hidrógeno o monóxido de carbono como fuente de energía (8).

Casi todas las pseudomonas son tanto oxidasa como catalasa positivas; un gran número de ellas poseen pili que pueden ser polares (P. aeruginosa, P. acidovorans, P. testosteroni, P. maltophilia, P. alcaligenes) o peritricos (P. cepacia, P. fragi) (8).

Estas estructuras actúan como receptores de fagos y participan en la patogenicidad de algunas especies, ya que ayudan a que el mi

croorganismo se adhiera a las superficies celulares e impida el proceso de fagocitosis. Además, la mayoría de las especies que poseen pili manifiestan un tipo de movilidad diferente: la espasmódica (8).

En cuanto a su pared celular, es la típica de las bacterias Gram negativas. Presenta nueve capas de las cuales la última, en su parte interna, se encuentra formada por unidades proteicas esféricas; lógicamente, al extraerse éstas con etilendiamintetracetato (EDTA) la estabilidad osmótica de la célula se ve afectada y es necesario adicionar  $Mg^{2+}$  para recuperarla (8, 62).

La mayoría de las especies de Pseudomonas pueden desarrollar en medios minerales cuya única fuente de carbono y energía sea un compuesto orgánico; no obstante, tanto P. diminuta como P. vesicularis requieren pantotenato, biotina y cianocobalamina y, por su parte, P. maltophilia, que está más relacionada con las especies de Xanthomonas, necesita de factores de crecimiento tales como la metionina. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de 28°C y como ninguna especie puede crecer en condiciones ácidas, el pH de los medios en los que se les cultiva debe ser mayor de 4.5 (8).

Para su aislamiento se acostumbra utilizar el medio de agar sangre, empero, otros medios como el agar peptona con o sin infusión también son adecuados (8, 12, 62).

Entre los pigmentos hidrosolubles producidos por algunas pseu



domonas destacan la fluoresceína (pioverdina) y la piocianina. La primera es muy inestable y su principal componente es una quinolina cromófora unida a un péptido cíclico cuya composición difiere según la especie. Los pigmentos fluorescentes se producen abundantemente en medios con bajo contenido de hierro; entre ellos, el más utilizado es el King B adicionado de penicilina G, novobiocina y cicloheximida. En éste, dichos antimicrobianos no inhiben a las especies que producen pigmento fluorescente y las colonias se pueden identificar fácilmente por la difusión de esta sustancia en el agar. La detección del pigmento se realiza fácilmente si se cuenta con una lámpara de luz ultravioleta, ya que la fluorescencia se manifiesta de blanco a azul verdoso (8, 12, 62).

La piocianina es un compuesto de fenazina que presenta color azul; el medio empleado para detectar su producción es el King A, el cual no siempre resulta efectivo, pero se recomienda debido a que no existe alguna otra que puede utilizarse como alternativa (8, 12, 62).

Por otro lado, algunas especies sintetizan pigmentos insolubles en agua que genéricamente se denominan carotenoides y cuya estructura aún no se ha logrado establecer; en este contexto, se cuentan P. alcaligenes, P. mendocina, P. vesicularis y P. flava, entre otras (8, 12, 62).

En cuanto a la clasificación general, el género Pseudomonas se divide en cinco secciones, de las cuales las primeras cuatro se ba

san en la diferente relación que existe entre su rRNA y DNA y cada una se subdivide de acuerdo a propiedades bioquímicas, patogenicidad y condiciones de crecimiento. Por su parte, la quinta sección se establece considerando la fuente de aislamiento y sus subdivisiones se basan en las condiciones y medios de enriquecimiento en los que desarrollan (8).

#### SECCION I rRNA grupo I

A. No almacenadores de PHB como material de reserva (excepción: P. pseudoaeruginosa).

1. Productores de pigmento fluorescente.

a. Arginina dihidrolasa positiva (saprofíticos u oportunistas).

1. P. aeruginosa
2. P. fluorescens
3. P. chlororaphis
4. P. aureofaciens
5. P. putida

b. Arginina dihidrolasa negativa (fitopatógenos)

i. Oxidasa negativa.

6. P. syringae
7. P. viridiflava

ii. Oxidasa positiva.

1. P. cichorii

2. No productores de pigmento fluorescente.

a. Glucosa positiva.

9. P. stutzeri

10. P. mendocina

b. Glucosa negativa.

11. P. alcaligenes

12. P. pseudoalcaligenes

SECCION II rRNA grupo II

B. Almacenadores de PHB como material de reserva.

1. Patógenos (excepción P. picketti) y crecimiento positivo a 40°C (excepción P. solanacearum).

a. Arginina dihidrolasa positiva.

13. P. mallei

14. P. pseudomallei

15. P. caryophili

b. Arginina dihidrolasa negativa.

i. No denitrificantes.

16. P. cepacia

17. P. gladioli

ii. Denitrificantes.

18. P. picketti

19. P. solanacearum

SECCION III rRNA grupo III

2. No patógenos (sólo P. pseudoflava crece a 40°C)

a. No autótrofos.

20. P. acidovorans

21. P. testosteroni

22. P. delafieldii

b. Autótrofos.

23. P. facilis

24. P. saccharophila

25. P. flava

26. P. pseudoflava

27. P. palleronii

SECCION IV rRNA grupos IV y V

A. Almacenadores de PEB como material de reserva

a. P. diminuta (grupo IV)

b. P. vesicularis (grupo IV)

B. No almacenadores de PEB como material de reserva.

c. P. maltophilia (grupo V)

SECCION V

A. Aislados de plantas.

B. Aislados de animales.

C. Aislados de suelo.

D. Aislados de agua.

1. De agua fresca y destilada (P. huttiensis, P. lanceolata).
2. De agua de mar (P. marina, P. elongata, P. nautica).

E. Aislados de alimentos.

1. De leche y productos lácteos (P. fragi, P. nephtica).
2. De huevos (P. mucidolens, P. taetrolens).
3. De carne (P. fragi).

Por lo que se refiere a las especies que provocan afecciones al humano, éstas frecuentemente se consideran oportunistas, ya que en la mayoría de las ocasiones sólo manifiestan su patogenicidad en personas cuya resistencia a la infección ha disminuído por pade- cer de enfermedades debilitantes, desnutrición, traumatismos severos, o bien por encontrarse sometidas a tratamientos que deprimen o suprimen su respuesta inmunológica (8, 100).

Pseudomonas aeruginosa es, sin lugar a dudas, la especie más importante del género en lo que se refiere a incidencia, virulencia, resistencia a los antimicrobianos y tasas de mortalidad (8, 12, 18). Provoca padecimientos prácticamente en cualquier región anatómica del organismo humano; de hecho, es uno de los principales agentes etiológicos de dermatitis, septicemia, endocarditis, artritis, meningitis, neumonía, sinusitis, otitis, oftalmías que pueden derivar en ulceración de la córnea, enfermedades intrahospit- alarias y, aunque con menor frecuencia, también ocasiona vaginitis, infecciones en el tracto urinario, faringitis, laringitis, epigloti- titis, etc. (8, 55, 62, 81).

La descripción de las entidades clínicas mencionadas no se relaciona con los objetivos del presente trabajo, sin embargo, a continuación se citan datos sobre algunas enfermedades debidas a microorganismos de este género, de los cuales la literatura convencional no aporta la información que aquí se incluye.

En los últimos años, se ha tenido que reconocer y difundir la importancia de la fibrosis quística (FQ); ésta es una afección hereditaria de etiología aún no definida en lo que alguna disfunción de las glándulas mucossecretoras provoca congestionamientos en los bronquios y neumopatía crónica; bajo dichas condiciones, el 70 al 90% de los pacientes sufren una invasión pulmonar crónica posterior por P. aeruginosa productoras de colonia mucóide (30, 35, 133) y en algunas ocasiones por P. cepacia (143).

Cabe señalar que la sustancia mucóide producida por esta especie está constituida principalmente por un polímero de alginato (aunque pueden presentarse variaciones dependiendo de la cepa) (30).

La fase inicial de la infección pulmonar en pacientes con FQ está determinada por la adhesión del microorganismo a la mucosa bucal; una vez que éste se ha reproducido en dicho tejido desciende hasta el pulmón. Al parecer, el alginato desempeña una función importante en la adhesión de los bacilos a las células epiteliales de la boca y, por ende, en la persistencia de las complicaciones neumónicas, ya que aún cuando la bacteria se erradique del pulmón, el problema infeccioso en esta región podrá reaparecer indefinidamente (30, 35, 131).

En la mayoría de los pacientes con FQ, la invasión pulmonar por P. aeruginosa ocurre en dos etapas: en la primera, después de la colonización, la bacteria libera proteasas y exotoxina A; éstas contribuyen a que el microorganismo persista en esa región del huésped, ya que al parecer desdoblán a las inmunoglobulinas y a los componentes del complemento e interfieren la fagocitosis al inhibir la quimiotaxis. En condiciones normales, el tejido pulmonar produce inhibidores de las proteasas ( $\alpha$ -2-macroglobulina y  $\alpha$ -1-antiproteasa), sin embargo, P. aeruginosa sintetiza una elastasa que inhibe la actividad de tales antiproteasas; lógicamente, el resultado final dependerá de la concentración de antiproteasas y proteasas liberadas (33).

Por lo que hace a la segunda etapa, en ella se eleva la cuenta polimorfonucleares y el título de anticuerpos; éstos neutralizan a las proteasas bacterianas y a la exotoxina A y circulan con ellas como complejos que estimulan la producción de proteasas por los polimorfonucleares las cuales, en altas concentraciones, podrían ser las responsables del daño tisular más importante en estos pacientes (33, 96, 100).

La respuesta inmune humoral de los pacientes con dicha enfermedad puede ser óptima y, no obstante, fracasar en lo que concierne a la eliminación del microorganismo. Lo anterior puede deberse a que los anticuerpos IgG, los macrófagos y, en general, las propiedades bactericidas del suero, son interferidos por las inmunoglobulinas IgA que se absorben a la bacteria; es decir, aparentemente, esta clase de anticuerpos resulta nociva para los pacientes con FQ, pues

to que al reaccionar con el inmunógeno no fijan complemento, ni promueven la fagocitosis y sí impiden que exista un efecto antiparasitario mediado por anticuerpos de tipo IgG e IgM (22, 35, 100, 133).

Otra razón por la cual a P. aeruginosa no pueden erradicarlo las personas que padecen FQ, es que éstas poseen concentraciones elevadas de ácido siálico en la saliva y otras secreciones de las mucosas. Se ha demostrado que esta sustancia actúa como receptor y aglutinante del microorganismo y, bajo esas condiciones, favorece su permanencia en las vías respiratorias (71, 100).

El hecho es que un 90% de las personas que padecen FQ con infección pulmonar por P. aeruginosa muere a causa de insuficiencia respiratoria (133).

Otro padecimiento en el que participa frecuentemente el género Pseudomonas es la endocarditis; los pacientes más afectados son los que se han sometido a cirugía de válvula(s) cardíaca(s) y los drogadictos. Las especies más importantes en este sentido son P. aeruginosa, P. cepacia y P. luteola, las cuales figuran entre las de mayor resistencia a los antibióticos, y, por ende, se encuentran entre las que mantienen una elevada tasa de mortalidad por esta afección (9, 24, 60, 62).

Por su parte, P. maltophilia destaca como patógeno importante en el síndrome respiratorio agudo; en éste, el daño del pulmón generalmente se agudiza como consecuencia de la invasión bacteriana



del tejido; este tipo de neumonía se adquiere muchas veces en los nosocomios y también se refleja en altos índices de mortandad. Según se ha establecido, la participación de una citotoxina es definitiva: ésta corresponde a una proteína de 25,100 Daltons que no posee capacidad enzimática, pero que actúa a nivel de membrana de las células huésped permitiendo el paso de moléculas pequeñas; otros efectos que se le han detectado son el aumento moderado y parcialmente reversible de la resistencia vascular y, por lo tanto, de la presión sanguínea y el incremento lento pero irreversible de la filtración capilar (134).

La osteomielitis se presenta frecuentemente como consecuencia de las heridas por punción o fracturas y P. aeruginosa es uno de los principales agentes causales. El mecanismo mediante el cual se origina es aún desconocido, sin embargo, es probable que se deba a la inoculación de material contaminado dentro del músculo, hueso o cartilago al momento del traumatismo. La osteomielitis por Pseudomonas se asocia a pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos, diabéticos, a los que padecen enfermedades infecciosas en el tracto genitourinario y a los heroinómanos; por ello, para prevenirla debe hacerse énfasis en cuanto a la limpieza de tejidos lesionados, al uso adecuado de los antibióticos y al empleo de jeringas estériles (97, 112).

Por otro lado, P. aeruginosa es el principal patógeno en lo que se refiere a contaminación de quemaduras y heridas postquirúrgicas; en este contexto, la producción de elastasa (enzima proteolítica que

causa necrosis aguda) parece fungir como factor determinante en la gravedad del trastorno. Otras especies involucradas en este tipo de afecciones son: P. cepacia, P. maltophilia, P. stutzeri, P. putida, P. alcaligenes, P. acidovorans (8, 12, 62).

El cuadro conocido como melioidosis endémico en el sudeste de Asia, lo produce P. pseudomallei. Se piensa que tanto los roedores como el humano adquieren al microorganismo al contaminárseles heridas o quemaduras, aunque otras vías probables son la inhalación y la ingestión. Este padecimiento presenta los síntomas más severos cuando el microorganismo alcanza la sangre y se disemina a varios tejidos; generalmente cursa en forma aguda resultando mortal en tres a seis semanas, pero también puede ser leve, crónico e incluso subclínico. Dichas variaciones quizá dependan de la vía de entrada, la dosis infectante, la virulencia de la cepa y la resistencia del huésped (85).

En los casos graves se presentan fiebre, neumonía, disnea y pérdida de peso y aunque los pulmones suelen ser las regiones más afectadas, la enfermedad se puede manifestar como supuración local en cualquier órgano o tejido (piel, bazo, hígado, riñones, huesos, articulaciones e incluso meninges) (62, 85).

El muermo es una entidad clínica que afecta particularmente a los equinos y cuyo agente etiológico es P. mallei. Las infecciones humanas, con frecuencia mortales, se contraen al inhalar las secreciones nasales de los animales enfermos (comúnmente caballos y bu-

ros). En el hombre, corresponde generalmente a una enfermedad respiratoria aguda o crónica. En la forma aguda, el paciente presenta fiebre, descarga mucopurulenta y muere a las dos semanas. En contraste, la crónica persiste durante meses o años evidenciando linfadenopatías (12).

Los miembros de este género producen varias sustancias que pueden considerarse factores de patogenicidad, ya sea porque causan trastornos directamente o bien porque son determinantes en el establecimiento de la infección. Entre ellas, destacan una enterotoxina, la exotoxina A, dos hemolisinas, el factor denominado inmunosupresor, los lipopolisacáridos (LPS) las adhesinas, la capa lizosa, las proteasas (colagenasa y elastasa), una citoxina, etc. (26, 54, 62, 94, 117, 134, 157). En la tabla NO 7.1 se resumen los efectos que ocasionan algunas de ellas.

La exotoxina A es un polipéptido termolábil de cadena sencilla cuyo peso molecular es de 71,000 Daltons. Está integrada por dos fragmentos: el B (45,000 Da), es la porción que se une a la célula huésped y el A (26,000 Da) es el tóxico porque transfiere ADP-ribosa del  $NAD^+$  al factor de elongación inhibiendo de esta manera la síntesis de proteínas. Probablemente, dicha toxina se une a un receptor específico que se encuentra en la membrana de los fibroblastos antes de introducirse por medio de endosomas hasta el aparato de Golgi y, una vez en este sitio, se active antes de pasar al citoplasma. Se ha demostrado que su presencia provoca hipotensión como consecuencia de que disminuye la frecuencia cardíaca, aunque el hí

TABLA No. 7.1. Productos celulares y extracelulares de Pseudomonas Sp.

<u>PRODUCTO</u>	<u>EFEECTO</u>
Enterotoxina	Provoca la acumulación de líquido en el fleón.
Exotoxina A	Inhibe la síntesis de proteínas (letal)
Hemolisinas: Fosfolipasa (lecitinasa)	Necrótico y causa atelectasia en las neumonías.
Lipopolisacárido (LPS)	Antifagocítico.
Proteasas: Colagenasa	Destrucción de tejido y ulceración en la córnea.
Elastasa	Hidrólisis de proteínas y ulceración en la córnea.

gado parece constituir uno de sus órganos "blanco", ya que en éste ocasiona necrosis con notable regularidad (8, 23, 26, 54, 62, 95, 117, 157).

La elastasa y la colagenasa (proteasa alcalina) producidas por este microorganismo causan necrosis aguda al degradar colágenas y fibronectinas y originar la formación de edemas como resultado del incremento de la permeabilidad vascular. Lo anterior disminuye las defensas del paciente y éste queda expuesto a infecciones secundarias ocasionadas por otro tipo de microorganismos (C. albicans, S. aureus, etc.) (62, 94, 99, 157).

Pseudomonas figura entre los géneros más ubicuotas, ya que se le puede encontrar en cualquier parte de la biósfera; ello repercute notablemente en lo que se refiere a la incidencia de las enfermedades infecciosas. Dentro de los hospitales, este microorganismo se ha aislado tanto del aire como de las superficies de mobiliario y equipo, fomites, catéteres, desinfectantes, jabones, soluciones oftálmicas, material quirúrgico, la piel y vías respiratorias del personal (2, 9, 12, 62). De hecho, en E.U.A. se le considera responsable del 4% de las epidemias intrahospitalarias, del 10% de las enfermedades nosocomiales de origen infeccioso, del 11% de las septicemias, del 30% de afecciones en pacientes con quemaduras o cáncer y del 95% de las osteomielitis. Además, se calcula que se encuentra presente en el 73% de muestras clínicas (12, 62, 112).

Aún cuando Pseudomonas se considera oportunista, varios auto-

res recomiendan el uso de vacunas para prevenir los padecimientos que provoca; de hecho, se ha desarrollado una vacuna de extracto polivalente (VEP) que ha manifestado efectividad óptima y con la cual podría reducirse la mortalidad asociada a este género (62, 87, 88). Al parecer, el lipopolisacárido es en gran medida el responsable de la protección que induce en personas a las que se les aplica la VEP, ya que inclusive existe correlación entre dicha protección y el título de IgG anti-LPS contenida en el suero de los individuos inmunizados con la vacuna (87, 88).

Sin embargo, otros componentes de la superficie bacteriana también inducen la formación de anticuerpos protectores; entre éstos se cuentan la proteína F, los flagelos, una glucoproteína tóxica y un polisacárido de elevado peso molecular (87).

La proteína F (35,000 a 37,000 Da) se encuentra en la membrana celular de P. aeruginosa. Al parecer, dichos anticuerpos no estimulan la fagocitosis mediada por complemento sino que actúan como opsoninas promoviendo que los macrófagos fagociten a la bacteria (6, 90).

En cuanto a los flagelos de estos bacilos, se sabe que están constituidos por dos tipos de sustancia: una flagelina heteróloga "a" (45,52 KDa) con subtipos  $a_0$ ,  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  y  $a_4$  y otra homóloga "b" (53 KDa). Ambas inducen la producción de anticuerpos IgG que promueven la opsonización; de hecho, se ha demostrado que la inmunización pasiva con suero anti-flagelos confiere protección contra

P. aeruginosa (3).

Por otro lado, también se ha producido un suero antitoxina A/antilipopolisacárido capaz de neutralizar el efecto citotóxico que el microorganismo manifiesta en las quemaduras. Esto sugiere la posibilidad de producir un toxoide y aplicarlo en lugar de la vacuna mencionada (27, 157).

Aún cuando no se contempla la necesidad de realizar campañas de vacunación contra Pseudomonas sp., los autores recomiendan el uso de sueros y vacunas para disminuir o eliminar la predisposición de los individuos comprometidos para adquirir la infección y los consecuentes padecimientos por este microorganismo; no debe pasarse por alto que la prevención de la colonización y el control de la enfermedad primaria constituyen las fórmulas necesarias para que el paciente sobreviva (3, 27, 62, 90, 100).

Por lo que se refiere a los antibióticos más efectivos contra este género, éstos son la gentamicina, tobramicina y amikacina, los cuales inhiben la síntesis de proteínas. No obstante, se presenta resistencia a gentamicina en tratamientos prolongados debido a una modificación enzimática del antibiótico por el microorganismo y que consiste en una N-acetilación y O-acetilación o bien, una fosforilación que impide su paso a través de la pared celular de la bacteria (8, 62, 158).

Pocas penicilinas son activas contra estos bacilos (29); la carbenicilina se usa comúnmente sola o en combinación con aminoglu

cósidos. Sin embargo, aunque dicho antibiótico provoca el alargamiento de la célula bacteriana, ello no sucede en presencia de  $\beta$ -lactamasas (8, 130).

En otros casos se ha reportado resistencia a piperacilina y tobramicina en mutantes cuyas  $\beta$ -lactamasas son constitutivas; este tipo de cepas se han aislado en procesos infecciosos postoperatorios (60).

Al parecer, el tratamiento indicado para disminuir el riesgo de que se presenten contaminaciones de heridas postquirúrgicas, contempla la administración de antibióticos tales como la cefalosporina; no obstante, también existen cepas resistentes a este fármaco (91, 102).

Recientemente se ha descubierto un antibiótico derivado del carbapen que no resulta susceptible a la acción de las  $\beta$ -lactamasas y muestra actividad contra el género; empero algunos estudios han demostrado que ciertas cepas impiden que penetre al alterar su membrana celular (18, 118).

En concreto, la resistencia del género a los antimicrobianos es extensa y variada, por lo cual ninguna terapia exitosa en un caso determinado, puede sugerirse para resolver otros; en este contexto, lo adecuado es efectuar análisis de susceptibilidad para cada cepa.



viii. XANTHOMONAS

Este género se encuentra constituido por bacilos que miden 0.4 a 0.7  $\mu$ m de diámetro por 0.7 a 1.8  $\mu$ m de largo, si bien existen variaciones en cuanto a forma y tamaño; por lo regular no presentan agrupación, aunque en ocasiones es difícil decidir si se trata de células largas únicas o de dos juntas (8).

Dichos bacilos son Gram negativos, aerobios estrictos y móviles, ya que poseen uno o máximo dos flagelos polares que miden alrededor de 1.75  $\mu$ m de longitud. Es importante hacer mención de que aún no se ha reportado la presencia de fimbrias o pili (8).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C y los medios en los que se les cultiva deben contener factores tales como metionina, ácido glutámico, ácido nicotínico o una combinación de éstos; estas bacterias no desarrollan en presencia de 0.02 a 0.1% de cloruro de trifeniltetrazolio (8).

Las colonias de todas las especies de Xanthomonas son normalmente lisas, redondas, de bordes enteros y manifiestan viscosidad cuando sus elementos son jóvenes; en caso contrario pueden mostrar superficies con estrías y formar lóbulos. También presentan un pigmento amarillo de tipo aril-polieno cuya tonalidad varía dependiendo de la especie o el medio de cultivo (8).

Los microorganismos de este género son catalasa positiva, oxidasa negativa y no reducen nitratos ni desnitrifican. Por lo que se refiere a su obtención de energía, son quimioorganótrofos capaces

de utilizar una gran variedad de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono; aunque producen pequeñas cantidades de ácido, ésto no sucede cuando desarrollan en leche tor masol (8).

Se ha comprobado que el género es patógeno de plantas y hasta ahora no se ha detectado que ocasione padecimientos al humano. Por ello y debido también a sus propiedades físicas, su importancia reside en su aplicación en la industria alimentaria y otras, en las cuales estos bacilos se emplean como p $\grave{a}$ sticidas, agentes quelantes, emulsificantes y estabilizadores (8).

## CAPITULO II

### DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Tal como se ha mencionado en los capítulos anteriores, cuando se hace referencia a la patología de los BNF deben contemplarse prácticamente todas las enfermedades de origen infeccioso que afectan al humano; ello implica que los métodos directos para diagnóstico deben partir de muestras tales como sangre, líquido de talorra quideo, orina, expectoraciones o aspirados trastraqueales, líquido sinovial, médula ósea, biopsias y secreciones o exudados purulentos provenientes de las regiones afectadas.

Posteriormente, dichas muestras se analizan microscópicamente mediante la realización de frotis al Gram, antes de sembrarse en los medios de cultivo seleccionados de acuerdo a los tipos de bacterias que pueden fungir como agentes etiológicos de los padecimientos que se investigan.

Las condiciones bajo las cuales deben incubarse los medios utilizados se establecen considerando los requerimientos de los microorganismos sospechosos, en cuanto a temperatura, tiempo en el que desarrollan colonias visibles y si son aerobios, anaerobios o les es indispensable una atmósfera de 10% de  $CO_2$ .

Finalmente, se efectúan las pruebas relacionadas con la identificación, una vez que las colonias obtenidas se hayan analizado mediante frotis al Gram, tanto para determinar la morfología micros-

cópica de las bacterias que las integran, como para verificar su pureza. Los estudios complementarios como son las pruebas de sensibilidad y la tipificación, sólo se llevan a cabo cuando así se solicita.

Debido a la incapacidad de los BNF para fermentar carbohidratos, las pruebas mediante las cuales se identifican representan actividades poco realizadas en los laboratorios clínicos; por ello, a continuación se describen las metodologías más aceptadas en este sentido.

Existen diferentes recursos para llevar a cabo la caracterización e identificación de los bacilos Gram negativos no fermentadores (BNF); entre ellos, destacan por su confiabilidad y aceptación los denominados "esquemas" diseñados por King-Weaver (72), Gilardi (72) y Pickett (72, 111, 113, 114, 115) además del elaborado por Otto y Pickett (108, 109) que contempla pruebas propuestas por los primeros y el tercero. Además, recientemente se están promoviendo con el mismo fin, sistemas comerciales tales como el Oxi/Fer (Roche Diagnostic Division) (4, 32, 57, 70, 103, 108, 135), el API 20E (Analytab Products) (32, 108, 136, 150), el sistema N/F (Flow Laboratories) (5, 70, 150), el Miniéek (BBL Microbiology Systems) (4, 37, 153) y el Automicrobic (Vitek Systems) (1, 49, 56, 138, 141), que si bien pueden considerarse de fácil manejo y óptima sensibilidad, resultan de elevado costo porque no se producen en nuestro país.

a. Esquema de King Weaver.

Para efectuar una investigación precisa, este esquema sugiere un proceso de dos pasos:

10. La detección del BNF.
20. La identificación de la especie.

En el primero, los parámetros involucrados son:

- Utilización de glucosa. Esta característica se investiga en el medio O-F de Hugh & Leifson.
- Capacidad para desarrollar en agar Mac Conkey.
- Oxidación de la N, N dimetil p-fenilendiamina.
- Movilidad. Para analizar esta característica se investiga ya sea directamente al microscopio o en un medio para detectarla. No se recomienda el agar semisólido, pues los BNF son aerobios y sólo desarrollan en la superficie haciendo difícil la visualización del resultado de la prueba. Consultar fundamentos y técnicas en los anexos.

Una vez investigadas las cuatro características anteriores y efectuados los frotis al Gram de los microorganismos prueba, éstos pueden agruparse en alguno de los siguientes trece grupos:

1. Gram negativo, fermentador, Mac Conkey (MAC) positivo y oxidasa negativa.

2. Gram negativo, fermentador, MAC positivo, oxidasa positiva y móvil.
3. Gram negativo, fermentador, MAC positivo, oxidasa positiva e inmóvil.
4. Gram negativo, fermentador, MAC negativo y oxidasa negativa.
5. Gram negativo, fermentador, MAC negativo y oxidasa positiva.
6. Gram negativo, oxidante de glucosa, MAC positivo y oxidasa negativa.
7. Gram negativo, oxidante de glucosa, MAC positivo y oxidasa positiva.
8. Gram negativo, oxidante de glucosa, MAC negativo y oxidasa negativa.
9. Gram negativo, oxidante de glucosa, MAC negativo y oxidasa positiva.
10. Gram negativo, no oxidante ni fermentador, MAC positivo y oxidasa negativa.
11. Gram negativo, no oxidante ni fermentador, MAC positivo y oxidasa positiva.

12. Gram negativo, no oxidante ni fermentador, MAC negativo y oxidasa negativa.
13. Gram negativo, no oxidante ni fermentador, MAC negativo y oxidasa positiva.

Con el objeto de identificar la especie, los autores proponen las siguientes pruebas (no se mencionan del grupo 1 al grupo 5 debido a que son microorganismos fermentadores):

Para los del grupo 6:

- Reducción de nitratos
- Lisina descarboxilasa
- Arginina dihidrolasa
- Ornitina descarboxilasa
- O/F de lactosa

Para los del grupo 7:

- Indol
- Gas  $N_2$  a partir de nitrato
- Formación de nitrito
- Desarrollo de SS
- Lisina descarboxilasa
- Arginina dihidrolasa
- Producción de fluoresceína
- O/F de glucosa, xilosa, manitol, lactosa, sacarosa y maltosa

Para los del grupo 8:

- O/F de glucosa, xilosa y maltosa

Para los del grupo 9:

- Indol.
- Producción de pigmento insoluble
- O/F de glucosa, xilosa, manitol, lactosa, sacarosa y maltosa.

Para los del grupo 10:

- Ureasa
- Producción de pigmento soluble
- O/F de maltosa
- Hidrólisis de la gelatina
- Hemólisis

Para los del grupo 11:

- Reducción de nitratos
- Gas  $N_2$  a partir de nitrato
- Gas  $N_2$  a partir de nitrito
- Producción de  $H_2S$
- O/F de xilosa
- Desarrollo en SS
- Ureasa

Para los del grupo 12:

- Ureasa
- Producción de pigmento soluble



- O/F de maltosa
- Hidrólisis de la gelatina
- Hemólisis

Para los del grupo 13:

- Indol
- Ureasa
- O/F de xilosa
- Gas  $N_2$  a partir de nitrato

Los resultados de las pruebas mencionadas según la especie se encuentran en las tablas No. 2.1 a la 2.8; por su parte, las técnicas y fundamentos pueden consultarse en los anexos.

b. Esquema de Gilardi.

Este autor sugiere los mismos dos pasos contemplados por King y Weaver para efectuar la caracterización de BNF; es decir:

- 1º. La detección del BNF.
- 2º. La identificación de la especie.

Para cumplir el primer objetivo (la detección del BNF), propone investigar las siguientes características:

- Prueba de las oxidasas
- Movilidad
- Producción de pigmento

Realizando las pruebas mencionadas y los frotis al Gram, se logra clasificar a los microorganismos prueba dentro de los siguientes grupos:

1. Grupo de bacilos móviles, oxidasa positiva (Pseudomonas spp. y Alcaligenes spp.).
2. Grupo de diplococos inmóviles, oxidasa positiva (Acinetobacter spp.) y diplobacilos oxidasa positiva (Moraxella spp.).
3. Grupo de bacilos inmóviles, oxidasa positiva, con pigmento amarillo (Flavobacterium spp.).

Una vez que se ha clasificado el microorganismo en alguno de estos tres grupos, se procede a realizar las pruebas siguientes:

Para los del grupo 1:

- O/F de glucosa y maltosa
- ONPG
- Producción de fluoresceína
- Producción de  $H_2S$
- Ureasa
- Gas  $N_2$  a partir de nitrato
- Gas  $N_2$  a partir de nitrito
- Arginina dihidrolasa
- Lisina descarboxilasa
- Ornitina descarboxilasa
- Hidrólisis de la gelatina
- Desarrollo a  $42^\circ C$
- Sensibilidad a penicilina

- Sensibilidad a polimixina
- Fenilalanina desaminasa

Para los de los grupos 2 y 3:

- O/Y de glucosa
- Gas N<sub>2</sub> a partir de nitrato
- Hidrólisis de esculina
- Actividad de lipasa
- Hidrólisis del almidón
- Hidrólisis de la gelatina
- Hemólisis
- Desarrollo en SS
- Desarrollo en Mac Conkey
- Asimilación de acetato
- Sensibilidad a penicilina
- Sensibilidad a polimixina

Para detalles sobre los resultados consultar las tablas No. 2.9 y 2.10; para los fundamentos y las técnicas, los anexos.

c. Esquema de Fickett.

El criterio utilizado por Fickett (111, 113, 114, 115) propone la realización de los siguientes puntos:

- c.1. Obtención de un subcultivo preliminar de la colonia bacteriana desconocida: del medio de aislamiento primario se trans-

fiere el microorganismo a un medio en el que se obtenga un desarrollo abundante. En este paso, se utiliza normalmente el agar Kligler debido a que promueve el desarrollo de la mayoría de los BHP por contener una gran cantidad de carbohidratos; aunque algunos proponen utilizar agar sangre o chocolate, éstos son deficientes en carbohidratos y los microorganismos pueden no producir reacciones positivas posteriormente en los medios diferenciales, por no desarrollar completamente sus sistemas enzimáticos (72).

- c.2. Resiembra en medios en los que pueda efectuarse la investigación de características bioquímicas y nutricionales a partir del desarrollo abundante obtenido en el agar Kligler a un medio de movilidad-nitrato. Otras pruebas a realizar para detectar las características primarias son las de citocromo oxidasa y frotis al Gram.

Si el microorganismo es móvil y oxidasa positiva, se sospecha de Pseudomonas spp. y se inocula en un tubo con caldo infusión, Cerebro Corazón, incubándose a 42°C con el objeto de determinar si desarrolla a esta temperatura. En el caso de que sea inmóvil y oxidasa positiva se puede tratar de Moraxella spp.; por esta razón se realiza una prueba de sensibilidad a la penicilina.

En ambos casos se siembra un tubo con medio de fluorescencia-nitrato para investigar si produce la primera y reduce al segundo.

c.3. Selección de un mínimo de características primarias (oxidasa, movilidad, desnitrificación, fluorescencia, desarrollo a 42°C y sensibilidad a penicilina) provenientes de los resultados de las pruebas anteriores para identificar rápidamente a las dos especies de BNF de mayor incidencia: Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter calcoaceticus. Una vez que se identifica a cualquiera de ellos no se requieren estudios adicionales.

En el caso de no obtenerse características propias de los dos microorganismos antes mencionados, el paso a seguir es:

c.4. Determinación de características secundarias en el medio Amortiguador Sustrato Simple (ASS) adicionado de sustratos tales como glucosa, arabinosa, acetamida, urea, fructosa, lactosa, lisina, gluconato y triptófano. Esto se lleva a cabo con el objeto de identificar a alguna de las restantes especies.

De los puntos anteriores, se desprenden los diez grupos que el autor considera:

1. Grupo oxidasa negativa: Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas maltophilia.
2. Grupo fluorescente: Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas putida.
3. Grupo desnitrificante, oxidasa positiva y no fluorescente:

Alcaligenes denitrificans subsp. xyloxydans; Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas picketti, Pseudomonas pseudomallei, Pseudomonas stutzeri, Alcaligenes denitrificans subsp. denitrificans.

4. Grupo lactasa fuertemente positiva, oxidasa positiva, no fluorescente y no desnitrificante: Pseudomonas cepacia, Pseudomonas pseudomallei.
5. Grupo pigmentado, oxidasa positiva, no fluorescente y no desnitrificante: Flavobacterium multivorum, Pseudomonas maltophilia, Pseudomonas stutzeri.
6. Grupo sensible a penicilina, oxidasa positiva, no fluorescente y no desnitrificante: Moraxella (M) nonliquefaciens, Moraxella (M) osloensis y Moraxella (M) phenylpyruvica.
7. Grupo indol positivo: Flavobacterium meningosepticum.
8. Grupo urea positivo, oxidasa positiva, no fluorescente, no desnitrificante e indol negativo: Bordetella bronchiseptica.
9. Grupo no sacarolítico, oxidasa positiva, no desnitrificante, no pigmentado y urea negativo: Alcaligenes faecalis, Pseudomonas acidovorans, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas dimiuta, Pseudomonas pseudoalcaligenes y Pseudomonas testosteroni.

10. Grupo sacarolítico, oxidasa positiva, no desnitrificante, no pigmentado, urea negativa: Alcaligenes desnitrificans subsp. xyloxydans, Pseudomonas acidovorans, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas maltophilia, Pseudomonas pickettii, Pseudomonas pseudoalcaligenes, Pseudomonas vesicularis.

Los resultados de las pruebas mencionadas según el grupo se encuentran en las tablas No. 2.11 hasta 2.22; por otra parte, las técnicas y fundamentos pueden consultarse en los anexos.

d. Esquema de Otto & Fickett.

El método propuesto por estos dos autores consta de dos pasos:

- 1o. Identificación rápida del género de ENF.
- 2o. Identificación de la especie.

En el primer paso se realizan las siguientes pruebas convencionales:

- Pigmentación
- Oxidación
- Movilidad
- Gas  $N_2$  a partir de nitrato
- Gas  $N_2$  a partir de nitrito
- Fluorescencia
- Desarrollo a 42°C
- Indol

- Gluconato
- Lisina descarboxilata
- Hidrólisis de la gelatina
- Ureasa

En el segundo paso, se efectúa la identificación de la especie con una serie de pruebas que se basan en la acción del microorganismo sobre sustratos tales como las sales de ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados y carbohidratos (112, 113).

Considerando los resultados obtenidos en los dos pasos anteriores los autores clasifican a los BNF en alguno de los siguientes tres grupos:

1. Pseudomonas sacarolíticas.
2. BNF sacarolíticos y débilmente sacarolíticos.
3. BNF no sacarolíticos y Moraxella spp.

Consultar las tablas No. 2.23 2.24.y 2.25 para mayores detalles.

e. Sistemas Comerciales.

e.1. Sistema Oxi/Fern:

El equipo consta de un tubo de plástico con ocho compartimentos, cada uno de los cuales contiene un sustrato diferente; de esta manera permite realizar nueve pruebas bioquímicas, puesto que en el pozo que se investiga la producción de  $H_2S$  puede leerse también

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



la síntesis de indol. A lo largo del tubo, atravesando las diferentes cámaras, se encuentra un canal por donde se introduce una aguja de inoculación que, como su nombre lo indica, se emplea para transferir una cantidad adecuada de bacterias procedentes de una colonia de la caja de aislamiento hasta el compartimento correspondiente.

La siembra se realiza introduciendo la aguja poco a poco y girándola en cada una de las cámaras para obtener una buena distribución del inóculo; posteriormente, se retira y se vuelve a insertar hasta la tercera división, donde se rompe con el objeto de asegurar que no entre oxígeno y permanezcan las condiciones atmosféricas apropiadas para la fermentación de glucosa, descarboxilación de arginina y detección de gas  $N_2$ ; una vez efectuado lo anterior, se colocan las tapas de rosca en cada uno de los extremos del tubo y se incuba a la temperatura adecuada.

Una vez transcurrido el período de incubación, se comparan los resultados obtenidos con los datos contenidos en la guía del equipo, se suman los números de los resultados positivos y, el número final, se confronta con las cifras de un manual identificándose de ese modo al microorganismo.

Las pruebas que incluye el sistema, son:

- Producción de  $H_2S$  e indol
- Producción de ácido a partir de glucosa
- Producción de ácido a partir de xilosa

- Wreasa
- Utilización de citrato
- Producción de ácido a partir de glucosa  
(en anaerobiosis)
- Arginina dihidrolasa
- Desnitrificación (producción de gas  $N_2$   
a partir de nitratos)

Los compartimentos empleados para la investigación de fermentación de glucosa, arginina dihidrolasa y desnitrificación, tienen un sello de parafina cuyo fin es el de crear un ambiente anaerobio, mientras que los demás están perforados para asegurar el suministro de oxígeno.

Aunque el sistema mencionado se diseñó originalmente para efectuar nueve pruebas bioquímicas, Oberhofer y cols (103) sugieren que puede emplearse para realizar diez diferentes, ya que en el mismo compartimento en el que se investiga la síntesis de gas  $N_2$  a partir de nitratos, se puede leer la producción de nitritos.

Por otra parte, el esquema contempla que se inoculen, además, una caja petri con agar tripticosa de soya (ATS), con el objeto de observar la producción de pigmento a temperatura ambiente y un tubo con medio semisólido SIM para investigar movilidad; la prueba de las oxidases puede verificarse posteriormente.

e.2. Sistema API 20-E:

Este sistema está integrado por una tira plástica con veinte microtubos que contienen sustratos deshidratados y una cámara de incubación con tapa no hermética. En la parte superior de cada microtubo existe un orificio por donde se adiciona, con pipeta, una suspensión de la bacteria analizada; la inoculación se lleva a cabo de la siguiente manera: se retira la tapa de la bandeja de incubación y se añaden 5 ml de agua corriente para proporcionar al medio la humedad necesaria; a continuación, se coloca la tira de API 20-E en la cámara de incubación y, posteriormente, la suspensión bacteriana obtenida en 5 ml de solución salina isotónica estéril, se vierte sobre cada uno de los microtubos con una pipeta Pasteur; al cabo de 48 hs de incubación a la temperatura adecuada, se procede a realizar las lecturas añadiendo, en los casos necesarios, los reactivos requeridos.

Las pruebas incluidas en este sistema son:

- ONPG
- Arginina dihidrolasa
- Lisina descarboxilasa
- Ornitina descarboxilasa
- Utilización de citrato
- Producción de  $H_2S$
- Ureasa
- Voges-Proskauer
- Hidrólisis de la gelatina
- Fermentación de glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, arabinosa y amigdalina

- Producción de gas  $N_2$  a partir de nitrato en el compartimento de glucosa
- Catalasa en el compartimento de cualquier carbohidrato

Para efectuar la identificación de varias especies no fermentadores, el esquema de debe ampliar considerando características tales como:

- Movilidad
- Oxidación
- Prueba de las oxidasas
- Capacidad para desarrollar en MAC

Los reactivos necesarios para realizar las cuatro pruebas anteriores los proporciona también el fabricante.

Se codifican las diecisiete reacciones mencionadas y los resultados obtenidos se pueden transformar en número de 9 dígitos, a partir de los cuales se puede efectuar la identificación de los cultivos bacterianos con la ayuda de un índice de perfiles analíticos o de una computadora.

### e.3. Sistema N/F:

El sistema N/F consta de dos tubos de selección: el primero, denominado GNF, detecta fermentación de glucosa (para corroborar la negatividad de la prueba), producción de gas  $N_2$  a partir de ni-

tratos en el fondo del tubo y síntesis de fluoresceína en la porción del pico de flauta; el segundo, designado 42P, pone de manifiesto la capacidad del microorganismo para desarrollar a temperaturas de 42°C y, además, se emplea para detectar la producción de pirocianina en el caso de que la haya.

Un tercer dispositivo corresponde a una placa circular que contiene once pozos periféricos sellados independientemente y uno central sin sellar; todos contienen medios sólidos: en cinco de ellos, se investiga la oxidación de glucosa, xilosa, manitol, lactosa y maltosa, respectivamente y otros cinco poseen las sustancias requeridas para determinar asimilación de acetamida, hidrólisis de esculina, producción de ureasa, DNAsa y  $\beta$ -galactosidasa; el onceavo funciona como control para la utilización de los carbohidratos y en el pozo central se analizan las síntesis de indol y  $H_2S$ .

La prueba considerada primaria es la de las oxidasas; en este sentido, las colonias que la den positiva se inoculan en los tubos GNF y 42P y sólo cuando las bacterias en estudio no se identifican como Pseudomonas aeruginosa o Pseudomonas putida, o bien sean negativas, se procederá a inocular la placa circular. Para efectuar esto último se prepara una suspensión bacteriana en 0.5 ml agua estéril y con una pipeta Pasteur se adiciona una gota en cada pozo; en el de localización central, se añade la gota y con la pipeta se punciona hasta el fondo para poner de manifiesto más fácilmente la producción  $H_2S$ .

Una vez transcurrido el período de incubación, para la identificación del microorganismo, se hace la lectura de las reacciones según la guía del sistema y, de los resultados, se deriva un número de seis dígitos que se confronta con el libro de selección de Corning. Dicho número se obtiene a partir de: seis pruebas primarias, las cuales se dividen en dos grupos de 3; el primer grupo, de las que se efectúan en el tubo QNF y el segundo del tubo 42P y de la prueba de oxidasas. En cada grupo la primera, segunda y tercera reacciones, tienen un valor de 4, 2 y 1 respectivamente; se suman los valores de las pruebas positivas para generar un dígito de cada grupo. Los cuatro dígitos restantes se obtienen a partir de las 12 reacciones que se realizan en la placa; éstas también se dividen en 4 grupos de 3, asignándoles el valor de 4, 2 y 1 a cada prueba obteniendo así, un dígito de cada grupo.

#### e.4. Sistema Minitek (MT):

Está constituido por placas de plástico que contienen doce horas daciones, en cada una de las cuales el analista puede depositar alguno de los treinta y cinco discos que tienen un determinado sustrato, dependiendo de las pruebas que requiera efectuar; este sistema, además de contener los reactivos para investigar BNF, incluye los necesarios para efectuar la identificación de las enterobacterias. En el caso de que se investiguen BNF, las pruebas seleccionadas serán:

- Utilización de glucosa (tanto en anaerobiosis como en aerobiosis), sacarosa, xi losa, maltosa, lactosa y manitosa, lacto sa y manitol.

- Lisina descarboxilasa
- Ornitina descarboxilasa
- Arginina dihidrolasa
- Nitrato reductasa
- ONPG
- Hidrólisis de almidón
- Fenilalanina desaminasa
- Utilización de citrato

Para llevar a cabo la inoculación, se distribuye con pipetas estériles una suspensión de la bacteria en cada uno de los pozos; posteriormente, aquellas horadaciones en las que se estudian las descarboxilasas para lisina, ornitina y arginina, la actividad de ureasa y la fermentación de la glucosa, se sellan con aceite mineral; una vez efectuado lo anterior, se incuban y se leen los resultados de acuerdo al catálogo que ofrece el fabricante (4, 37), o bien, puede recurrirse al uso de computadores.

Este sistema lo complementaron Appelbaum y Cola (4); quienes le añadieron pruebas no proporcionadas en el equipo, tales como hidrólisis de esculina, malonato e hidrólisis de gelatina; posteriormente, Wellstood-Nuesse (153) incluyeron en él la de producción de indol.

#### e.5. Sistema Automicrobic (AMS):

Si bien se diseñó para efectuar la detección, enumeración e identificación de bacterias y levaduras presentes en muestras clínicas, los datos que proporciona cuando se aplica a la investigación de BNF

son altamente confiables; está integrado por placas de plástico cuyas horadaciones contienen medios de cultivo altamente selectivos en forma liofilizada, mismos que quedan rehidratados al inocularse con una suspensión del cultivo del microorganismo. Durante la correspondiente incubación, un sistema óptico de monitores detecta los cambios sucedidos en el medio y los transfiere a una computadora.

Este equipo analiza hasta 240 muestras clínicas en 13 hs; su instrumentación consta de un dilutor, un módulo de llenado, una incubadora en la que se realizan las lecturas, una computadora y un procesador de datos. Su utilización es por demás sencilla; con el inyector de muestras se coloca una cantidad determinada del cultivo en la cámara del dilutor; en ésta, la suspensión bacteriana se mezcla y diluye convenientemente y la continuación, automáticamente, la placa se inocula en el módulo llenador e inmediatamente después se incuba.



f. Comentarios.

La funcionalidad de cada uno de los sistemas descritos varía en cuanto a confiabilidad y el tiempo en el que se obtienen los resultados; sin embargo, otro parámetro que no puede pasarse por alto cuando haya que decidirse por alguno es el económico. A continuación, se subrayan las ventajas y desventajas que se mencionan en la literatura especializada sobre estos aspectos.

Por haber sido el primero en diseñarse, el esquema de King-Weaver puede considerarse como la base del resto de los sistemas existentes; sin embargo, aunque incluye un gran número de pruebas, algunas de ellas no muestran mayor exactitud y otras ni siquiera son útiles para efectuar la identificación de BNF. Por tales motivos, no sólo resulta incostruable desde el punto de vista económico, sino que deja mucho que desear en lo que se refiere a confiabilidad y al aspecto práctico (72). Durante los años posteriores a su manufactura, Gilardi, Pickett y Otto han ido modificándolo, dando lugar a que las metodologías resultantes sean más confiables y sensibles debido, fundamentalmente, a que la cantidad, especificidad y sencillez de las pruebas involucradas se han optimizado. Gilardi (72), por ejemplo, redujo su número considerando solamente a aquellas que son realmente indispensables y omitiendo a las que necesitan requerimientos nutricionales especiales o períodos de incubación prolongados; de esta manera, se logró mejorar el esquema en cuantto a los factores tiempo y sencillez pero, en ocasiones, los resultados obtenidos son insuficientes para identificar BNF de ba-

ja frecuencia o mutantes atípicas.

Por su parte, el esquema elaborado por Pickett (72) se basa en la realización de un análisis más eficaz y detallado, ya que incluye pruebas que determinan caracteres primarios y secundarios que permitan identificar a la mayoría de los géneros de ENF con un amplio margen de confiabilidad. Sin embargo, en ocasiones esto puede representar una gran pérdida de tiempo, por lo que se considera recomendable sólo para laboratorios de referencia, en los cuales este factor no es tan importante.

El esquema original también se ha modificado, con el fin de elevar su sensibilidad y confiabilidad sin alterar en parte medular. Por ejemplo, Otto y Pickett (109) variaron la fórmula del medio convencional de Hugh & Leifson, al disminuir la concentración de triptona, para reducir la posibilidad de que se produjeran enmas cariasentos de reacciones positivas débiles por las aminas provenientes de aquélla. Además, el número de pruebas que contempla en la actualidad no es muy grande y los resultados se leen en 24 a 48 h; no obstante, la considerable variedad de sustratos empleados (sa les orgánicas, amidas y carbohidratos), puede afectar la economía del laboratorio.

En cuanto a los microistemas distribuidos comercialmente, se ha evaluado su exactitud y precisión al efectuarse comparaciones en tre los resultados que proporciona cada uno de ellos.

Según lo expuesto por Appelbaum (4), Dowda (32), Koestenblatt (70) y Oberhofer (103), el sistema Oxi/Ferm reditúa información con

fiable y sólo en la prueba de utilización del citrato se presentan resultados dudosos por la coloración que toma el medio al término de la incubación. Koestenblatt y cols (70) sugieren modificar la composición de dicho medio para resolver ese problema. Además, requiere de la realización de pruebas adicionales para que los BNF, se identifiquen correctamente. La ventaja de este micro sistema radica en la facilidad con la que se inocula, ya que ésto se traduce en ahorro de tiempo y resultados confiables; sin embargo, deben transcurrir tiempos de 24 y hasta de 48 h para que los microorganismos puedan identificarse.

El sistema API 20-E (4, 32, 43, 150) es de fácil manejo, sus resultados se interpretan regularmente sin dificultad y se obtienen 24 a 48 h después de la inoculación. Su desventaja más relevante consiste en que su catálogo de identificación no contempla una gran cantidad de números o posibles perfiles y frecuentemente se tiene que hacer uso de una computadora; esto origina una gran pérdida de tiempo y, por ello, algunos investigadores (4, 150) han recomendado la ampliación de dicho catálogo.

Por su parte, el equipo N/F es, según lo reportado por Koestenblatt y cols (70), exacto y reproducible, la identificación de Pseudomonas aeruginosa se realiza en 24 h y la del resto de las especies antes de 48 h; por otro lado, requiere la realización de un número mínimo de pruebas suplementarias (4, 5, 70) y la necesidad de recurrir a la computadora es esporádica; debido a que el catálogo proporcionado es sumamente completo; con ésto, la obtención de

los resultados se efectúa fácil y rápidamente. El problema más serio radica en que ocasionalmente se presentan dificultades para visualizar los resultados de la prueba de producción de gas  $N_2$ , por esta razón se ha recomendado su sustitución por pruebas tales como movilidad, reducción de nitratos y fenilalanina desaminasa (4,70).

En cuanto a la libertad para elegir las pruebas, puede establecerse que, en general, ésta no se tiene en los microsistemas antes mencionados pero sí en el Minitek; éste es ampliamente recomendado (37,153) precisamente porque el laboratorista puede escoger, según su criterio, las reacciones que considere más adecuadas. Además, tanto en ejecución como en obtención de resultados, éste es el equipo más aceptado (4, 153), debido a que es de fácil manejo y en pocas ocasiones requiere del uso de la computadora (4). Entre sus inconvenientes, puede mencionarse el hecho de que el número de pozos en cada placa es insuficiente y frecuentemente se tienen que utilizar otras para analizar a una misma bacteria; éste representa un gasto extra para el laboratorio (153). Algunos autores (4) han recomendado la incorporación de las pruebas de nitrato reductasa, manitol y esculina, ya que ello mejoraría la detección de Acinetobacter calcoaceticus y Flavobacterium meningosepticum.

El más sofisticado de todos los microsistemas existentes es el AMS, ya que como es automatizado, proporciona identificaciones rápidas de los BNF, disminuye las posibilidades de error y muestra sensibilidad, precisión y exactitud (56, 138, 141). Por supuesto, el factor economía es un mayor y probablemente única desventaja; no

obstante, podría ser que en el futuro la identificación bacteriana se realizara con equipos de esta naturaleza.

Con base en comentarios anteriores (72, 81, 104, 108, 136, 150), puede establecerse que algunos de los sistemas convencionales sólo son útiles en laboratorios de referencia, debido a que no todas las especies que se pueden identificar con ellos se presentan con regularidad en las muestras clínicas. Otros esquemas son más adecuados para los laboratorios de diagnóstico, debido a la sencillez de sus pruebas, a la rapidez con que proporcionan los resultados y, principalmente, a que son relativamente económicos. Por lógica, en los casos en los que se cuenta con presupuestos amplios, deben utilizarse los microsistemas comerciales que ofrecen sencillez y rapidez y aportan resultados confiables. Finalmente, cualquiera de los esquemas o equipos mencionados puede aportar resultados valiosos si se aplica y maneja correctamente.

## CAPITULO III

### CONCLUSIONES

#### 1. Por lo que respecta a los BNF en general:

- No deben considerarse bacterias inofensivas y/o de baja virulencia, ya que la mayoría de los miembros de este grupo ocasiona enfermedades graves al ser humano.
- Aunque en nuestro país no se cuenta con datos exactos sobre la frecuencia de los padecimientos que provocan, pero puede señalarse que podrían ser de relevancia; por ello, es indispensable que los equipos de salud de nuestro país (médicos, químicos, epidemiólogos, etc.) los consideren entre los microorganismos a los que combaten consistentemente.
- En los laboratorios clínicos, debe investigarse su posible presencia en muestras tales como secreciones y/o exudados, líquido cefalorraquídeo, sangre, orina, aspirados transtraqueales, etc.
- Considerando parámetros tales como confiabilidad y economía, las pruebas más adecuadas para llevar a cabo su identificación en el laboratorio clínico, son las que se incluyen en los esquemas de Otto/Pickett y Gilardi. Sin embargo, los sistemas comerciales también resultan recomendables, porque aunque son costosos proporcionan la información más rápidamente.

2. En cuanto al género Bordetella, es necesario subrayar el hecho de que la tosferina aún constituye un serio problema de salud en las comunidades rurales, debido a que la vacuna correspondiente no se aplica al total de la población; en este sentido, cabe sugerir la realización de campañas de vacunación más efectivas. Por otro lado, es indispensable investigar si la utilización de la vacuna acelular resulta adecuada en nuestro país, ya que podrían evitarse las eventuales secuelas generadas por la vacuna tradicional.
3. Por lo que se refiere a F. meningosepticum, es importante señalar su gran relevancia en la meningitis infantil, ya que se ha comprobado que presenta tasas elevadas de morbimortalidad dentro de los hospitales.
4. La incidencia de A. calcoaceticus en padecimientos nosocomiales se ha incrementado notablemente en los últimos años.
5. Los géneros Alcaligenes y Moraxella se consideran oportunistas de baja virulencia que participan con cierta frecuencia como patógenos secundarios. Moraxella (Branhamella) catarrhalis según los últimos artículos se considera patógeno de vías respiratorias.
6. Sin lugar a dudas, el género Pseudomonas es el de mayor frecuencia y virulencia entre los BNF. De hecho, figura entre las bacterias más investigadas por los infectólogos, quienes en su gran mayoría sugieren y analizan la posibilidad de aplicar vacu

nas para disminuir la notable predisposición de los individuos inmunocomprometidos y/o lesionados, para adquirir infecciones por estos microorganismos.

7. Xanthomonas constituye, el único género de BNF al que los investigadores no le han detectado relación con enfermedades infecciosas en el humano. Su importancia radica en la utilidad de su aplicación a nivel industrial para la producción de alimentos.



## ANEXOS

### 1. Prueba de la oxidasa (86).

La enzima citocromo oxidasa es una hemoproteína presente en los microorganismos aerobios o facultativos y que permite a éstos utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. El objetivo de esta prueba consiste en determinar si dicha enzima es capaz de habilitar a las aminas aromáticas primarias, tales como el diclorohidrato de p-fenilendiamina, para que actúen como aceptores de electrones. Es decir, en presencia de oxígeno, la citocromo oxidasa de ciertas bacterias oxida al reactivo utilizado transformándolo en indofenol o azul de indofenol, los cuales son compuestos coloridos.

#### Reactivos:

- 1) Reactivo de Kovacs para oxidasa: Diclorohidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% en agua.
- 2) Reactivo de Gordon y McLeod: Diclorohidrato de dimetil-p-fenilendiamina al 1-1.5% en agua.
- 3) Reactivo de Nadi: Una mezcla en partes iguales de  $\alpha$ -naftol al 1% en alcohol etílico de 95° y aminodimetilanilina al 1%.

#### Técnica:

- 1) Directamente en la placa, se agregan 2 o 3 gotas de reactivo so

bre la colonia sospechosa. El color correspondiente aparecerá durante los 10 a 15 segundos posteriores.

- 2) En un trozo de papel filtro Whatman (6 cm<sup>2</sup>) se agregan unas gotas de reactivo de Kovacs; posteriormente, con un asa se extiende de la colonia sobre él. La coloración esperada se observará 10 a 30 minutos después.

#### Interpretación:

Las colonias que manifiesten resultado positivo desarrollarán un color rosado, después marrón y finalmente negro. Si se emplea la mezcla dimetil-p-fenilendiamina/ $\alpha$ -naftol, se presenta reacción positiva por la aparición de un color azul. Las colonias de microorganismos oxidasa negativa no evidenciarán cambio de color.

#### 2. Prueba de movilidad (86).

Esta prueba puede efectuarse de diversas maneras: ya sea directamente al microscopio mediante tinciones flagelares o en medios para detección de movilidad. La primera se recomienda cuando las reacciones sean débiles o dudosas, en cuyo caso se sugiere la técnica de Leifson (72) por su fácil realización.

Los flagelos bacterianos se tifen con soluciones alcohólicas de colorantes como la pararrosanilina que precipitan al evaporarse el solvente. Puede utilizarse fucsina básica (acetato de pararrosanilina) y además ácido tánico como mordiente. Para la visualización de la bacteria, también puede aplicarse un colorante de contraste (azul de metileno).

Reactivos:

- 1) Fucsina básica al 1.2% en alcohol de 96° .
- 2) Acido tánico al 3% en agua. Añadir fenol 1:2,000 para conservar lo durante el almacenamiento.
- 3) Cloruro de sodio al 1.5% en agua.

Se mezclan las tres soluciones en volúmenes iguales y su pH se ajusta a 5. Puede usarse inmediatamente y si se desea conservar durante 1 semana, se almacena a temperatura ambiente en un frasco con cierre hermético.

Técnica:

Se prepara una suspensión bacteriana en agua con un cultivo joven (24-48 h) obtenido en un medio libre de hidratos de carbono, pues los pH's ácidos inhiben la formación de flagelos.

Se colocan dos gotas de suspensión en el extremo de un portaobjetos lavado con ácido (HCl al 3% en alcohol etílico de 96°) y se dejan secar al aire. Con un lápiz de cera se marca sobre la superficie del vidrio una línea perpendicular que vaya desde la suspensión deseada hasta el extremo opuesto. Posteriormente, el portaobjetos se coloca en un plano inclinado se cubre con una película fina de colorante y se deja durante 5 a 15 minutos para que se evapore el alcohol. Cuando se forma un precipitado, se enjuaga el portaobjetos con agua destilada y se deja secar al aire.

**Interpretación:**

Se observa al microscopio con el objetivo de inmersión: los flagelos manifiestan un color rojo a negro-azulado.

Tratándose de microorganismos aerobios estrictos, se recomienda el agar semisólido utilizado para bacterias fermentadoras, debido a que los BNF aerobios solamente desarrollan en la superficie. Sin embargo, si se emplea este medio, la punción debe efectuarse abarcando los 4 mm superiores del medio y la lectura se realiza durante las 4 a 6 h siguientes, ya que muchas cepas móviles de BNF sólo exhiben tempranamente una tenue turbidez que tiende a desaparecer con incubaciones prolongadas (72).

El método recomendado por Gilardi contempla menores concentraciones de agar para que exista una mejor difusión e incubaciones de 18 a 20°C; esto último se debe a que las proteínas flagelares de algunos microorganismos no se sintetizan óptimamente a 37°C (10).

**Reactivos:**

Digerido pancreático de caseína	10 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	3 g
Aguá destilada	1,000 ml
pH 7.2	

**Técnica:**

Mezclar los reactivos y disolverlos. Colocar 3.5 ml de la mezcla en tubos de 13 X 100 mm y esterilizarlos a 121°C, 15 lb durante 15 minutos. Inocularlos con la colonia sospechosa puncionando el agar con el asa e incubar a 18-20°C durante 24 a 48 h.

**Interpretación:**

Las bacterias móviles producen una turbidez alrededor de la línea de inoculación que se difunde en el medio; también podrían observarse estructuras parecidas a estrias. En los resultados negativos sólo se manifiesta el crecimiento a lo largo de la línea de inoculación sin difundirse en el medio.

**3. Prueba de producción de indol (86).**

Algunas bacterias poseen las enzimas necesarias para oxidar al triptofano; en conjunto, se le conoce como triptofanasa y catalizan la reacción de desaminación de dicho aminoácido dejando intacto el anillo aromático en forma de indol y liberando amoníaco y ácido pirúvico.

El indol puede detectarse por la formación de un complejo de color rojo cuando reacciona con el grupo aldehído del reactivo de Ehrlich o Kovacs (p-dimetilaminobenzaldehído).

Medios y reactivos:

1) Caldo Triptofano

Peptona	2 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Agua destilada	100. ml

Mezclar y disolver los reactivos, distribuir en tubos de 13 X 100 mm con 3.5 ml cada uno y esterilizar a 121°C, 15 lb, durante 15 minutos.

2) Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico	150 ml
p-dimetilaminobenzaldehído	10 g
HCl concentrado	50 ml

3) Reactivo de Ehrlich

Alcohol etílico absoluto	190 ml
p-dimetilaminobenzaldehído	2 g
HCl concentrado	40 ml

Técnica:

Se inocula el medio con el microorganismo a investigar y se incuba a 35°C durante 18-24 h. Al finalizar este periodo, se agregan 3-5 gotas del reactivo elegido por la pared del tubo. Cuando se utiliza el reactivo de Ehrlich, debe añadirse 1 ml de cloroformo antes de este paso.

### Interpretación:

Si la reacción es positiva, se desarrolla un color rojo en la capa del cloroformo o entre el caldo y el reactivo.

#### 4. Prueba de ureasa (86).

La urea es una diamida que se hidroliza rápidamente en presencia de una enzima constitutiva: la ureasa. En solución, la urea se hidroliza reedituando dióxido de carbono, amoníaco y agua, los cuales finalmente se convierten en carbonato de amonio. La reacción se detecta con un indicador que vira a un color característico al aumentar el pH del medio por efecto de este último compuesto.

#### Medios y Reactivos:

##### 4.1. Caldo Urea de Stuart

Fosfato monopotásico	9.1 g
Extracto de levadura	0.1 g
Fosfato disódico	9.5 g
Urea	20.0 g
Agua destilada	1,000 ml
pH 6.8	

Se mezclan y disuelven los reactivos sin calentar y posteriormente se esterilizan por filtración con membrana Millipore. En condiciones de esterilidad, se reparte en tubos de 12 X 75 mm con 2.5 ml cada uno.

4.2. Agar Urea de Chistensen

Peptona	1 g
Glucosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato monopotásico	2 g
Urea	20 g
Rojo de fenol	.012 g
Agar	15 g
pH 6.8	

Mezclar y disolver todos los reactivos, con excepción de la urea; esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos y enfriar a 50°C. Por otro lado, se disuelve la urea en 100 ml de agua y se esteriliza por filtración. Una vez que ha enfriado el agar se le añade en condiciones asépticas la urea ya estéril. Se reparte en tubos de 16 X 150 mm con 6 ml cada uno y se enfrían en posición inclinada.

**Técnica:**

Se inocular según el medio elegido; se añade una colonia sospechosa al caldo o se estria sobre el agar. Se incuban ambos a 35°C durante 18-24 h y se observan los resultados.

**Interpretación:**

Para el caldo de Stuart, el indicador del medio virará a rojo si el medio se alcaliniza por la producción de carbonato de amonio a partir de la urea.



El agar de Christensen indicará que el microorganismo es un degradador rápido de urea cuando todo el medio vira a rojo y degradador lento si el color rojo sólo se presenta en el pico de flauta y poco a poco se difunde en todo el tubo.

5. Prueba del ortofenil galactósido (ONPG) (86).

Las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa permeasa, son las responsables de la fermentación de la lactosa. La segunda interviene en el transporte del carbohidrato a través de la pared celular de la bacteria y la primera lo hidroliza, lo mismo que a otros  $\beta$ -galactósidos. Los BNF carecen de ambas enzimas, sin embargo, pueden presentar dos fenotipos diferentes: G-P+, los que no sintetizan  $\beta$ -galactosidasa pero sí la permeasa y, por lo tanto, pueden acumular galactósidos sin metabolizarlos; G-P-, los que poseen  $\beta$ -galactosidasa, pero pierden la permeasa. Los fermentadores lentos de lactosa carecen de la  $\beta$ -galactosidasa permeasa pero pueden fermentarla porque producen las enzimas necesarias para metabolizarla; de hecho, si se elevan las concentraciones de glucosa disminuye el tiempo de fermentación.

La capacidad para fermentar o no la lactosa puede predecirse empleando como sustrato el o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG); la hidrólisis de este compuesto produce galactosa y o-nitrofenil; este último es cromógeno en solución alcalina, por lo cual la aparición de un color amarillo indicará actividad de la  $\beta$ -galactosidasa.

**Medios y Reactivos:**

Amortiguador de fosfato de Na	0.01 M pH 7
ONPG	0.75 M
Solución fisiológica NaCl	0.85
Tolueno	

**Técnica:**

El microorganismo se cultiva en algún medio que contenga lactosa tal como el Kligler; una vez obtenido el desarrollo, se toma una asada abundante y se prepara una suspensión con 0.5 ml de solución fisiológica. A ésta se le añaden unas gotas de tolueno, mezclando enérgicamente con el fin de liberar la enzima de las células. Inmediatamente después, se añade una cantidad igual de ONPG y se incuba la suspensión en baño de agua a 37°C de 5 a 10 minutos.

**Interpretación:**

La aparición de un color amarillo indicará reacción positiva; si dicho resultado se obtiene en 5-10 minutos después de la incubación se considerará que el microorganismo es fermentador. La mayoría de las pruebas positivas tardan una hora pero no por ello deben interpretarse como negativas antes de 24 h de incubación.

**6. Prueba de hidrólisis de la gelatina (72).**

Las proteínas son moléculas demasiado grandes para penetrar en la célula bacteriana, por tanto, para que ésta las utilice, antes debe

hidrolizarlas. Algunas bacterias producen enzimas proteolíticas que hidrolizan a la gelatina, proteína compleja, derivada del colágeno natural. Si se incorpora la gelatina a un medio de cultivo puede detectarse la producción de estas enzimas, que se conocen como gelatinasa.

**Medios y Reactivos:**

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1 000 ml

La gelatina se deja reposar en el agua 15-30 minutos; después se calienta hasta hervir (50°C) para que se disuelva; se agregan el extracto de carne y la peptona, se vuelve a calentar la ebullición y se reparte en tubos de 12 X 75 mm antes esterilizarse a 15 lb durante 15 minutos.

**Técnica:**

Se siembra el tubo por punción de un inóculo abundante, hasta 2 a 2.5 cm de profundidad. Incubar a 35°C durante 24 hs a 14 días.

**Interpretación:**

Colocar los tubos en el refrigerador o en baño de hielo durante un período aproximado de 2 hs para determinar si se ha producido o no la hidrólisis.

## 7. Prueba de la fenilalanina-desaminasa (86).

El aminoácido fenilalanina es susceptible de ser desaminado por una enzima aminoácido oxidasa, que es una flavoproteína y que se conoce como fenilalanina-desaminasa. La desaminación oxidativa extrae al grupo amino de la fenilalanina para formar un  $\alpha$ -cetoácido, el ácido fenilpirúvico y liberar amoníaco. El ácido se detecta por la formación de una hidrazona, con la ayuda del cloruro férrico que actúa como agente quelante, produciéndose un color verde en el medio.

### Medios y Reactivos:

#### 1) Medio de fenilalanina

D-L fenilalanina	2 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	1 g
Agar	12 g
Agua destilada	1 000 ml
pH 7.3	

Se disuelve primero el agar y después se agregan el resto de las sustancias. Repartir en tubos de 13 X 100 mm, 3.5 ml en cada uno y esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos; se deja solidificar el medio inclinando los tubos.

#### 2) Cloruro férrico

Cloruro férrico	10 g
-----------------	------

HCl conc.	2.5 g
Agua destilada	100 ml

**Técnica:**

Inocular el agar e incubar a 35°C durante 18-24 h, añadir 4 o 5 gotas de cloruro férrico, directamente sobre la superficie del agar y rotar el tubo para desprender las colonias de la superficie.

**Interpretación:**

La formación inmediata de un color verde intenso indica la presencia de ácido fenilpirúvico y, por lo tanto, de la enzima.

**8. Prueba del ácido sulfhídrico (86).**

La metionina, la cistina y la cisteína contienen azufre y algunas bacterias que sintetizan la enzima cisteinasa son capaces de liberarlo produciendo ácido sulfhídrico. La peptona contiene cisteína por lo que un microorganismo que sintetice dicha enzima produce gas  $H_2S$ ; del mismo modo, el tiosulfato de sodio puede ser reducido para producir dicho gas, si el microorganismo sintetiza la tiosulfato reductasa. En ambos casos, el gas producido se detecta con la presencia de un indicador que tenga Fe, Pb o Bi, como es el caso del citrato férrico de amonio, del acetato de plomo o del sulfito de bismuto, que al entrar en contacto con el ácido sulfhídrico producido, forman un precipitado negro del sulfuro correspondiente.

**Medios y reactivos:**

1) Agar de Hierro Kligler (Véase pruebas con agar de HK).

2) Agar con Sulfito de Bismuto

Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Glucosa	5 g
Fosfato disódico	4 g
Sulfato ferroso	0.3 g
Sulfito de bismuto	8 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 000 ml

Para cualquiera de los dos medios antes mencionados: mezclar y disolver los componentes; distribuir en tubos (con excepción del agar con sulfito de bismuto) y esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos. Dejar enfriar en posición inclinada los tubos con agar Kligler, y repartir asépticamente el agar sulfito de bismuto en cajas de Petri.

**Técnica:**

1) El agar de hierro Kligler se inocula estriando y puncionando el medio hasta 0.6 cm aproximadamente del fondo.

2) El agar con sulfito de bismuto se estria para aislamiento.

Ambos medios se incuban a 35°C durante 18 a 24 h.

### Interpretación:

Se verifica una reacción positiva en el medio Kligler cuando se observa ennegrecimiento del medio producido por el precipitado de sulfuro ferroso.

En agar sulfito de bismuto las colonias son negras y presentan una zona alrededor del mismo color que puede mostrar un reflejo metálico.

### 9. Prueba de reducción de nitrato (86).

La reducción de nitrato ya sea a nitrito o a gas nitrógeno, tiene lugar en condiciones anaeróbicas; en las que el microorganismo obtiene su  $O_2$  del nitrato. La mayoría de las bacterias aeróbicas son anaerobios facultativos y sólo reducen al nitrato en ausencia de  $O_2$ . La reducción del nitrato tiene diferentes productos finales dependiendo de la especie bacteriana y los cuales son: nitrito ( $NO_2$ ), amoníaco ( $NH_3$ ), nitrógeno molecular ( $N_2$ ), óxido nítrico ( $NO$ ), óxido nítrico ( $N_2O$ ) o hidroxilamina ( $RNEOH$ ). Estos productos ya no son asimilados por la célula que los excreta al medio circundante. Dichos compuestos sirven para detectar si hubo reducción o no, por medio de dos reactivos: ácido sulfanílico y  $\alpha$ -naftilamina. Se forma un compuesto diazoico p-sulfobenceno-azo- $\alpha$ -naftilamina que es colorido, indicando la presencia de productos de reducción.

### Medios y Reactivos:

1) Caldo con nitrato

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Nitrato de potasio	1 g
Agua destilada	1 000 ml

2) Agar con nitrato

Caldo con nitrato	1 000 ml
Agar	12 g

3) Reactivo A

$\alpha$ -náftilamina	5 g
Acido acético 30%	1 000 ml

4) Reactivo B

Acido sulfanílico	8 g
Acido acético 30%	1 000 ml

Mezclar y disolver los componentes. Repartir el caldo y el agar en tubos y esterilizar a 121°C, 15 lb durante 1 minuto. El agar se deja solidificar en pico de flauta.

Técnica:

Inocular el caldo con una asada de cultivo puro del microorganismo a investigar, el agar se estría y se punciona, se incuba a 35°C de 12 a 24 h. Después de la incubación se añaden los reactivos A y B. Si la reacción es negativa, añadir un poco de Zn (20 mg) exento de nitratos o nitritos y observar si se produce o no color en 30 seg.



**Interpretación:**

Si aparece un color rojo dentro de los 30 seg de agregar los reactivos A y B, hay presencia de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) y la reacción será positiva.

Si no se desarrolla color hay que agregar el Zn mencionado y si aún después no aparece color, entonces el microorganismo redujo el nitrato a nitrito y después redujo al nitrito; si aparece color rojo intenso, hay presencia de nitrato no reducido por lo tanto la reacción es negativa, ya que fue el zinc el que redujo ese nitrato.

10 (9A). Producción de gas a partir de nitrato y nitrito (86).

El nitrato o el nitrito puede ser reducidos hasta nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ). Esto puede observarse con la aparición de burbujas en medio.

**Medios y Reactivos:**

1) Caldo de reducción de nitratos

Caseína	10 g
Extracto de levadura	3 g
Nitrato de potasio	2 g
Agua destilada	1 000 ml
pH 7.1	

2) Caldo de reducción de nitrito para BNF

Caldo infusión corazón 1 000 ml

Nitrito de potasio Q.P. 1 g

pH 7

Repartir en tubos de 16 X 150 mm con campanas de Durham. Esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos.

Técnica:

Inocular con un asa el cultivo puro de la bacteria sospechosa. Incubar a 35°C durante 12 a 24 h.

Interpretación: .

La aparición de burbujas dentro de la campana de Durham indica presencia de gas nitrógeno ( $N_2$ ).

11. Prueba de oxidación-fermentación (86).

Una bacteria utiliza los carbohidratos por oxidación o por fermentación; esto, depende en gran parte de que el metabolismo del microorganismo sea aerobio o anaerobio. Hay microorganismos que pueden desarrollar en ambas condiciones y estos son los anaerobios facultativos.

La fermentación es un proceso anaerobio y los fermentadores de carbohidratos son generalmente anaerobios facultativos. El ciclo fermentativo principal de la glucosa es el ciclo de Embden-Meyerhof, aún

cuando puede producirse la degradación por el ciclo de las pentosas o por el de Entner-Loudoroff. Sin embargo, los tres ciclos requieren de fosforilación a nivel de sustrato como paso inicial, antes de la degradación. Por este proceso la glucosa es degradada en dos moléculas de triosa, siendo el intermediario clave el ácido pirúvico.

La oxidación de glucosa es un proceso aerobio que lo realiza por lo general, las bacterias aerobias estrictas. La glucosa no es degradada o desdoblada en dos moléculas de triosa; por el contrario, el grupo aldehído es oxidado directamente en grupo carboxilo formando ácido glicónico que es, a su vez, oxidado a ácido 2-cetoglicónico que puede ser degradado en dos moléculas de ácido pirúvico. La fosforilación en este proceso no es inicial debido a la incapacidad del ATP de penetrar en la célula bacteriana.

La degradación de carbohidratos por cualquiera de las vías mencionadas anteriormente da como producto final ácidos que son excretados al medio y que pueden ser detectados con un indicador de pH que virará de color según éste.

#### Medios y Reactivos:

##### 1) Medio básico O/F de Hugh & Leifson

Peptona	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	0.3 g
Agar	2-3 g
Azul de bromotimol	0.03-0.08 g

Agua destilada                    1 000 ml  
pH 7.1

2) Soluciones acuosas al 1% de cada carbohidrato.

Mezclar y disolver los reactivos y esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos, enfriar a 40-45°C y agregar en condiciones asépticas los carbohidratos ya esterilizados por medio de filtración. Repartir en tubos estériles de 16 X 150 mm con tapa de rosca. Enfriar en posición vertical.

Técnica:

Se inocula con una asada de cultivo de la bacteria a estudiar hasta cuatro veces puncionando 1.3 cm por debajo de la superficie. Se incuban a 35°C durante 48 h o más.

Interpretación:

Al presentarse producción de gas, se observa un cambio de color en el medio. Ver tabla 11.1

TABLA No. 11.1. Interpretación de resultados Oxidación-Fermentación

O/F	Tubo con reacción	Tubo abierto	Tubo sellado
OXIDACION	Abierto	Amarillo (A)	Verde (-)
FERMENTACION (anaeróbica)	Sellado	Amarillo (A)	Amarillo (A)
FERMENTACION (aeróbica)	Sellado	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)
NI FERMENTACION NI OXIDACION (-)	Ninguno	Azul o Verde (-)	Verde (-)
FERMENTACION Y OXIDACION	Ambos	Amarillo (A o AG)	Amarillo (A o AG)

A = Acido

AG = Acido y gas

## 12. Prueba del gluconato (86).

Cuando la glucosa se metaboliza por oxidación en ácido glucónico, no se produce fosforilación inicial y sólo aquellos microorganismos capaces de metabolizar oxidativamente pueden utilizar el gluconato de potasio, como única fuente de carbono. El ácido glucónico, en este proceso, se oxida directamente en ácido 2-cetogluconico, el intermediario clave en esta prueba, ya que es un compuesto reductor. Al agregar el reactivo de Benedict, el ácido 2-cetogluconico reduce el hidróxido cúprico (cuando se calienta) a óxido cuproso insoluble, que es un precipitado de color amarillo a anaranjado.

### Medios y Reactivos:

#### 1) Caldo de gluconato y peptona

Peptona	1.5 g
Extracto de levadura	1.0 g
Gluconato de potasio	37.2 g
Fosfato de potasio	40.0 g
Agua destilada	1 000 ml

#### 2) Solución de Benedict

Sulfato de cobre pentahidratado	1.73 g
Carbonato de sodio	10.00 g
Citrato de sodio	17.3 g
Agua destilada	1 000 ml

Mezclar y disolver los reactivos. Distribuir el medio en tubos de 13 X 100 con 3.5 ml cada uno. Esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos.

**Técnica:**

Inocular con una asada de cultivo puro del microorganismo en estudio e incubar a 35°C durante 48 h, agregar el reactivo de Benedict, mezclar y calentar en baño de agua durante 10 minutos.

**Interpretación:**

Un precipitado de color amarillo a anaranjado indica presencia de una sustancia reductora y la prueba se considera positiva. Si no hay cambio en el medio la prueba es negativa.

**13. Prueba de la hidrólisis de esculina (86).**

La esculina es un glucósido; un acetal derivado de monosacáridos simples, que como tal, rápidamente lo hidrolizan los ácidos. La base de la prueba es la hidrólisis de esculina a esculetina liberando glucosa. La esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un complejo negro.

**Medios y Reactivos:**

**1) Medio de esculina con bilis**

Peptona	5 g
Extracto de carne	40 g
Bilis de buey	1 g

Esculina	1 g
Citrato de hierro	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Mezclar y disolver los reactivos repartiendo en tubos de 10 X 150 mm con 5 ml cada uno y esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos. Enfriar inclinando los tubos.

**Técnica:**

Inocular el tubo de un caldo con un cultivo puro dejando escurrir 2 gotas a la superficie del pico de flauta con una Pipeta Pasteur, después incubar a 35°C durante 48 h.

**Interpretación:**

Si han presencia de un color negro o castaño oscuro en el pico de flauta, la prueba es positiva. Si después de 72 h de incubación no se ha producido ennegrecimiento del medio la prueba es negativa.

**14. Prueba de fluorescencia-desnitrificación (72).**

La capacidad para producir el pigmento fluoresceína y de reducir nitratos y/o nitritos completamente a gas  $N_2$  son dos características importantes para la identificación de BNF.

La fluoresceína es un colorante luminiscente que al excitarse con luz UV emite una fluorescencia color verde-amarillento. La fluorescencia de las colonias, puede no detectarse en un medio de aisla-



miento común; más bien se deben utilizar con frecuencia, medios con sales catiónicas como sulfato de magnesio, que actúan como activadores o coactivadores para intensificar la luminiscencia.

En la reducción total de nitratos, o sea la desnitrificación, el radical nitrato actúa como aceptor de electrones, formando gas nitrógeno y agua. (Véase pruebas No. 9 y 10).

#### Medios y Reactivos:

##### 1) Medio de fluorescencia-desnitrificación (Sellers)

Proteosa peptona No. 3	1 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.15 g
Fosfato dipotásico	0.15 g
Nitrato de potasio	0.20 g
Nitrito de sodio	0.05 g
Agar	1.50 g
Agua destilada	100 l

Mezclar y disolver los reactivos y distribuir volúmenes de 4 ml en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca. Después esterilizarlos a 121°C, 15 lb durante 15 minutos y dejar solidificar en pico de flauta de modo que el fondo y el pico tengan la misma longitud.

#### Técnica:

Inocular por punción con una suspensión abundante del cultivo estriando luego la superficie. Incubar a 35°C durante 24-48 h.

**Interpretación:**

Examinar el tubo con una fuente de luz UV para detectar fluorescencia. Una luminiscencia de color amarillo-verdoso brillante indica una prueba positiva. La presencia de burbujas en el fondo del medio indica la producción de gas nitrógeno por desnitrificación.

**15. Pruebas con agar de hierro Kligler (86).**

El agar de hierro Kligler es un medio diferencial que determina la fermentación de carbohidratos y la producción de ácido sulfhídrico. La fermentación se produce aeróbicamente en el pico de flauta, donde la glucosa es catabolizada por medio del ciclo Embden-Meyerhof para dar ácido pirúvico, el cual, pasa a ciclo de Krebs obteniéndose  $\text{CO}_2$ , agua y energía.

En la capa profunda del cultivo, la fermentación se produce anaeróbicamente y la glucosa se metaboliza, a través del mismo ciclo, en ATP y ácido pirúvico que después se convierte a diversos productos orgánicos como ácidos que provocan el vire del indicador a color amarillo. Las bacterias son capaces de utilizar el tiosulfato de sodio para producir  $\text{H}_2\text{S}$  que se detecta con alguna sal de hierro que forma con el gas producido, un precipitado negro de sulfato ferroso.

**Medios y Reactivos:**

**1) Agar de hierro Kligler**

Polipeptona	20 g
Lactosa 1%	10 g

Glucosa 0.1%	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato férrico de amonio	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.5 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml
pH 7.4	

Mesclar y disolver los componentes, distribuir en tubos de 13 X 100 mm con 3.5 ml cada uno, esterilizar a 15 lb, 121°C durante 15 mi nutos y solidificar en posición inclinada.

**Técnica:**

Inoculan una colonia pura estriando la superficie y puncionando el fondo, incubar a 35°C de 18 a 24 h.

**Interpretación:**

Existen cuatro posibilidades: 1) fermentación de la glucosa (reacción alcalina/ácida) es decir, un pico de flauta rojo que indica que se produjo la degradación aeróbica de la glucosa cuya baja concentración provoca que el microorganismo utilice las peptonas del medio para obtener los nutrientes necesarios. El catabolismo de la peptona produce amoníaco dando el pH alcalino observado al virar el indicador a rojo. En la capa profunda el color amarillo observado se debe a la degradación anaeróbica de la glucosa.

2) Fermentación de la lactosa y la glucosa (reacción ácida/ácida) se puede apreciar por el color amarillo en todo el medio.

3) No fermentación de lactosa ni de glucosa (reacción alcalina/alcalina). Cuando el microorganismo es incapaz de degradar lactosa ni glucosa, utiliza la peptona del medio produciendo un cambio en el mismo a rojo, tanto en el pico de flauta como en la parte profunda indicando que se degrada aeróbica y anaeróbicamente.

4) No fermentación de glucosa ni de lactosa (reacción alcalina/sin cambio). Puede ocurrir también, que el microorganismo degrade la peptona sólo en condiciones de aerobiosis, presentando el medio un color rojo en el pico de flauta y en la capa profunda sin cambio, con el color original del tubo y presentando crecimiento solamente.

La producción de  $H_2S$  se detecta por un precipitado negro de sulfuro ferroso ya sea distribuido por toda la capa profunda o por un anillo negro cerca de la parte superior de la capa profunda.

Para detectar la producción de gas se observa si hay burbujas o si el medio se ha desplazado completamente del fondo del tubo. Si es así, se dice que el microorganismo es aerogénico o, en su defecto, anaerogénico.

16. Prueba de descarboxilasas (arginina, lisina y ornitina) (86).

Las descarboxilasas son enzimas capaces de actuar sobre la porción carboxilo de los aminoácidos, con formación de aminas y  $CO_2$ ; son numerosas y cada una es específica para un sustrato determinado.

Las descarboxilasas que son útiles en el diagnóstico de laboratorio son tres: arginina descarboxilasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa.

La lisina sufre la descarboxilación para producir cadaverina y  $\text{CO}_2$ . La ornitina al ser descarboxilada da putresceína y  $\text{CO}_2$ . La arginina es catabolizada a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultánea o separadamente (arginina dihidrolasa y arginina descarboxilasa). En el sistema descarboxilasa se produce putrescina,  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  a través de agmatina y por el contrario, en el de dihidrolasa se obtienen las mismas sustancias a través de ornitina.

Estos productos de la descarboxilación son estables en condiciones anaeróbicas por lo que se cultiva la bacteria estudiada recubriendo la superficie del medio con una capa de parafina. Todo el oxígeno lo consume el microorganismo durante la fase inicial de crecimiento y durante la descarboxilación el pH aumenta a medida que se produce  $\text{CO}_2$ , el cual se detecta por el viraje del indicador, púrpura de bromocresol y/o rojo de cresol.

#### Medios y Reactivos:

##### 1) Caldo descarboxilasa de Moeller

Peptona	5 g
Extracto de carne	5 g
Púrpura de bromocresol	0.03 g
Rojo de cresol	0.005 g
Piridoxal	0.005 g

Glucosa	0.5 g
Agua destilada	1 000 ml
pH 6	

Mezclar y disolver los reactivos; después, dividir en 4 partes y colocar en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca una de éstas. A las tres restantes se les añade el aminoácido correspondiente en una concentración del 1%. Se reajusta el pH en la de ornitina y se reparte en tubos; 3-4 ml en tubos de 13 X 100 mm y esterilizar a 121°C, 15 lb durante 10 minutos.

**Técnica:**

Se inoculan los tubos con un cultivo joven, tomando con una asa la colonia sospechosa; una vez hecho esto, se cubre con una capa de 4 a 5 mm de parafina estéril, cada uno de los tubos y se incuba a 37°C. Diariamente se examinan durante cuatro días.

**Interpretación:**

Una reacción alcalina, será positiva y se detectará por un color púrpura en el medio. Los medios se ponen amarillos en un principio por la producción de ácido a partir de la glucosa.

**17. Medio amortiguador sustrato simple (72).**

Muchos de los medios diferenciales utilizados comúnmente en la identificación de microorganismos fermentadores no son adecuados para los no fermentadores, pues algunos de éstos desarrollan lentamente y producen en el medio reacciones débiles. Los medios permiten

obtener rápidos resultados de las pruebas bioquímicas (dentro de 24 h) mediante el uso de suspensiones bacterianas densas.

Los medios de amortiguador sustrato simple incluyen un solo sustrato (carbohidrato, alcohol, amina u otra sustancia), un indicador de pH y amortiguador de fosfato.

Medios y Reactivos:

1) Medio para carbohidratos y alcoholes.

$K_2HPO_4$ 0.5 M	5 ml
Rojo de fenol-cristal violeta	1 ml
Agar	0.5 g
Agua destilada	400 ml

2) Solución de carbohidratos o alcoholes al 10%

3) Medio para amidas y sales orgánicas

$KH_2PO_4$ 0.5 M	14 ml
$K_2HPO_4$ 0.5 M	6 ml
Rojo de fenol-cristal violeta	1 ml
Agar	0.5 g
Agua destilada	400 ml

4) Soluciones de sustratos

Acetamida	1 g%
Nicotinamida	2.5 g%
Tartrato	1 g%

Se mezclan los reactivos del medio basal al cual se le adiciona 0.2 ml del sustrato seleccionado; este tipo de medio no requiere de esterilización. Se inocula 0.1 ml de una suspensión bacteriana turbia y se incuba durante 4 a 6 días con lectura diaria.

**Interpretación:**

La lectura positiva de los tubos con carbohidratos se verifica por una coloración amarilla del medio; en el caso de las amidas como sustrato, si el indicador vira a azul la prueba es positiva.

**18. Prueba de hidrólisis del almidón (amilasa) (72).**

En esta prueba se utiliza el agar Brucella adicionado con 0.2 g de almidón de papa (72). Si el microorganismo sintetiza la enzima amilasa, hidrolizará el almidón presente en el medio y al agregar el reactivo de yodo de Gram aparecerá una zona clara; por el contrario, si no se hidroliza el almidón aparecerá un color azul oscuro que indica que éste reacciona con el yodo.

**Medios y Reactivos:**

**1) Agar Brucella**

Digerido pancreático de caseína	10.0 g
Digerido péptico de tejidos animales	10.0 g
Autolizado de levadura	2.0 g
Dextrosa	1.0 g
Cloruro de sodio	0.1 g



Bisulfito de sodio	0.1 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 000 ml
pH 7.2	

Se mezclan los reactivos y se coloca 1 ml de la solución de almidón de papa al 0.2% por tubo de 13 X 100 mm con tapón de rosca. Se esteriliza a 121°C, 15 lb durante 15 minutos y se dejan enfriar inclinados. Se inocular con una asada de suspensión bacteriana abundante, formando una sola estría a lo largo del centro del pico, se incuba durante 72 h. Después de la incubación se agrega unas gotas de solución de yodo de Gram y se observa.

**Interpretación:**

Una zona clara y adyacente a la estría indica un resultado positivo, ya que el almidón no hidrolizado toma color azul oscuro al reaccionar con el yodo.

**19. Prueba de lipasa (72).**

Alguno de los BNF producen la enzima lipasa que desdobla lípidos como el Tween 80, el tributirín, etc si éstos se encuentran en el medio se puede detectar un cambio en éste si la sustancia se hidroliza.

**Medios y Reactivos:**

- 1) Agar Brucella (Véase prueba No. 18).

Una vez preparado el medio se agrega la solución de tributirina al 1%, se esteriliza y se reparten asépticamente en cajas Petri. Una vez solidificado se inoculara estriando y se incuba durante 48 h.

**Interpretación:**

Si se observan zonas claras alrededor en las colonias la prueba es positiva.

20. Prueba de susceptibilidad por el método de difusión. Revestimiento de agar de Barry, García y Thrupp (81).

La susceptibilidad bacteriana frente a los antimicrobianos se mi de utilizando principios de difusión en agar. Dichas técnicas pueden utilizarse como procedimiento cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo; sin embargo, los microorganismos se clasifican como resistentes, intermedios o susceptibles.

Los antibióticos se aplican generalmente a las placas de prueba en discos secos de papel filtro. Los discos secos absorben agua del medio de agar, de esta forma el fármaco se disuelve y se difunde a través del agar. A medida que la sustancia se difunde también hay multiplicación bacteriana. No aparece crecimiento en el área donde el antibiótico está presente en concentraciones inhibitorias; mientras más susceptible sea el microorganismo, la zona de inhibición es mayor, dependiendo del antibiótico de que se trate. El tamaño de la zona de inhibición depende también, de la velocidad de difusión de la sustancia en el agar: diferentes drogas se difunden a diferentes velocidades.

Medios y Reactivos:

1) Medio Mueller-Hinton sin suplemento.

Infusión de carne vacuna	300 g
Hidrolizado de caseína	12.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17 g
Agua destilada	1 000 ml
pH 7.2-7.4	

Mezclar y disolver los reactivos, esterilizar a 121°C; 15 lb durante 15 minutos y repartir asépticamente en cajas Petri de 150 mm con 60 ml cada una o de 100 mm con 25 ml cada una. Después, dejarlas enfriar a temperatura ambiente y guardarlas envueltas en bolsas de plástico en el refrigerador (2-8°C). Antes de usarlas, colocar las placas en una incubadora (35°C) durante 10-20 minutos.

Técnica:

Se seleccionan 4 o 5 colonias aisladas del microorganismo en estudio y se prepara una suspensión visiblemente turbia en tubos de 13 X 100 mm con 0.5 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón. Después, con un asa calibrada, se transfiere 0.001 ml del cultivo en caldo, a 9 ml de solución acuosa de agar 1.5% fundido y enfriado a 45-50°C. El agar sembrado se mezcla rápidamente por inversión suave y se extiende con uniformidad sobre la superficie de una caja Petri de 150 mm que contiene agar Mueller-Hinton. Este procedimiento se facilita llevando las placas a temperatura ambiente antes de extender la caja

de agar sembrado. Las placas inoculadas se dejan reposar 15 minutos antes de aplicar los discos con antibiótico. Una vez transcurrido es te tiempo se aplican los discos impregnados de antimicrobiano a la superficie de las placas con pinzas esterilizadas. Todos los discos deben presionarse suavemente sobre el agar para asegurar contacto to tal con la superficie del medio.

La disposición de los discos debe ser tal que no estén a menos de 15 mm de los bordes de la placa y lo bastante separados entre sí para impedir la superposición de las zonas de inhibición. Aproximadamente son 12 a 13 discos en las cajas de 150 mm y de 4 a 5 en las de 100 mm.

A los 15 minutos de aplicar los discos las placas se invierten y se colocan en la incubadora a 35°C.

#### Interpretación:

Después de 16 a 18 h de incubación se examinan las placas y se miden los diámetros de inhibición con regla o una matriz preparada especialmente. Los diámetros se traducen en categorías de susceptibles, intermedios o resistentes.

#### 21. Prueba de la leche tornasolada (86).

La leche tornasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias funciones metabólicas de un organismo. El tornasol incorporado a la leche es un indicador del pH y de oxidación-reducción. La leche contiene el carbohidrato lactosa junto con tres protef

nas; caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina. Por lo tanto, un microorganismo puede mostrar una o varias propiedades metabólicas en la leche tornasolada: 1) fermentación de lactosa, 2) reducción de tornasol, 3) formación de coágulo, 4) peptonización (digestión), 5) formación de gas.

Si la bacteria es capaz de fermentar la lactosa se produce principalmente ácido láctico y por lo tanto, el virre del indicador. Ciertas bacterias no fermentan lactosa, pero actúan sobre las sustancias nitrogenadas que se encuentran en la leche liberando amoníaco y en consecuencia producen un pH alcalino.

El tornasol puede ser reducido por algunas bacterias y cambia el color del medio a blanco.

Las enzimas proteolíticas provocan la hidrólisis de las proteínas de la leche lo que da por resultado la coagulación de la misma. El coágulo está formado por la precipitación de la caseína; ya sea por la formación de ácidos o por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina. En condiciones ácidas se produce un coágulo firme, gelatinoso que no se separa de las paredes del tubo y es fácilmente soluble en condiciones alcalinas. Por el contrario, la paracaseína precipitada es un coágulo blando, insoluble y se separa de los costados del tubo después de algunas horas, produciendo un líquido residual que se denomina "suero".

Los gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ ) pueden formarse como resultado de la fermentación de la lactosa. Cuando hay una fermentación turbulenta, es

decir, una producción abundante de gases se desintegra el coágulo ácido.

**Medios y Reactivos:**

1) Medio de leche tornasolada

Leche descremada deshidratada	100 g
Polvo de tornasol	0.75 g
Agua destilada	1.000 ml
pH 6.8	

Mezclar y disolver los componentes y ajustar el pH adicionando una pequeña cantidad de tornasol. Después se distribuye en tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca y dejar las tapas sin ajustar. Esterilizar a 115°C durante 10 minutos, se deja enfriar y luego se ajustan las tapas. Se inocula con una asada abundante y se incuba a 35°C de 18 a 24 h.

**Interpretación:**

- 1) Rojo a rosado: reacción ácida y fermentación de lactosa.
- 2) Azul purpúreo: sin cambio, no hay fermentación.
- 3) Azul: reacción alcalina, no hay fermentación pero el microorganismo ataca las sustancias nitrogenadas.
- 4) Blanco: reducción del tornasol.
- 5) Formación de cuajo: coagulación de las proteínas de la leche.
- 6) Digestión: peptonización, si se ha digerido la proteína de la leche y hay alcaración del medio.

- 7) Gas: burbujas en el medio.
- 8) Fermentación turbulenta: el coágulo ácido es fragmentado por la abundante producción de gas.
22. Medio de movilidad-nitrato (113, 115).

Triptosa	1 %
Agar infusión	0.8 %
Nitrato de potasio	0.1 %

Mezclar y disolver los reactivos, repartir en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca y 4 ml en cada uno. Después esterilizar a 121 C° durante 15 minutos y enfriar verticalmente. Muchas de las cepas móviles de BNF imparten una ligera opacidad al medio por lo que se recomienda revisarlo después de 6 h de incubación, así como a las 24 h y 48 h.

23. Medio agar Mac Conkey (81)

Bactopeptona	17 g
Peptona: proteosa o polipeptona	3 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agua destilada	1 000 ml
pH 7.1	

Puede agregarse sacarosa para dar una concentración final de 1%. Esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos y repartir en cajas Petri.

24. Medio agar Salmonella-Shigella (81).

Extracto de carne	5 g
Proteosa o polipeptona	5 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	8.5 g
Citrato de sodio	8.5 g
Tiosulfato de sodio	8.5 g
Citrato férrico	1 g
Agar	13 g
Rojo neutro	0.025 g
Verde brillante	0.330 mg
Agua destilada	1 000 ml
pH 7	

Se mezclan los reactivos y se disuelven en caliente hasta hervir, no se esteriliza; se enfría a 42-45°C y se reparte en cajas Petri.

25. Medio agar infusión cerebro corazón (81).

Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón de vacuno	250 g
Proteosa	10 g
Lextrosa	2 g



Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	2.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml
pH	7.4

Mezclar y disolver los reactivos, esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos.

26. Medio agar de Bordet-Gengou sin peptona (81).

Papas peladas y cortadas en daditos	187.5 g
Agua destilada	1 500 ml
Glicerol	15 ml
Cloruro de sodio grado reactivo	10 g
Agar	30 g
Sangre desfibrinada estéril de oveja	300 ml

Hervir las papas en agua unos 30 minutos hasta que estén blandas, filtrando a través de varias capas de gasa.

Añadir glicerol, cloruro de sodio y agar hasta tener 1 000 ml del filtrado, ajustar el pH a 7 y llevar a ebullición. Distribuir cantidades de 100 ml en frascos de tapa de rosca, o cantidades de 20 ml en tubos con tapa de rosca.

Esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos, enfriar y sellar.

Inmediatamente antes de usarlo, derretir la parafina y mantener a 50-60°C. Añadir 30 ml de sangre de oveja por cada 100 ml, mezclar y preparar 5 o 6 placas.

Para preparar el agar con meticilina agregar 3.25 ml del anti-biótico a una concentración de 100 g/ml por frasco antes de agregar sangre. Mezclar bien.

Las placas deberán tener color rojo cereza, estar húmedas y libres de burbujas.

27. Medio agar sangre (81).

Infusión de músculo cardíaco bovino	375	g
Triptosa	10	g
Cloruro de sodio	5	g
Agar	15	g
Agua destilada	1 000	ml
pH	7.4	

Esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 5 % de sangre de conejo desfibrinada estéril.

28. Medio hidrolizado de caseína (CAS) (81).

Para transporte breve y procedimientos de anticuerpos fluorescente para Bordetella pertussis.

Hidrolizado de caseína	1	g
Agua destilada	100	ml

Disolver el hidrolizado en el agua y ajustar el pH a 7.2.

Repartir 0.5 ml en tubos de 16 X 125 mm con tapa de rosca.

Esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos, enfriar.

Para usar, sumergir hisopos nasofaríngeos de alginato de calcio en líquido, cortar el extremo del alambre, sellar el tubo y conservarlo en un lugar que sea fresco. Luego se procede a estriar las placas o preparar el frotis en 2 h.

29. Medio de Jones-Kendrick (81).

Para transporte de Bordetella pertussis.

Almidón soluble	10 g
Extracto de levadura	3.5 g
Caldo infusión corazón	25 g
Agar	20 g
Agua destilada	1'000 ml
Carbón activado en polvo	4 g
Penicilina	300 U

Añadir el almidón, el extracto de levadura, la infusión y el agar al agua, hirviendo para disolver.

Añadir el carbón, mezclar bien y esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos. Enfriar hasta 50°C, agregar la penicilina y repartir en frascos pequeños como pico de flauta.

Usar como medio de transporte para pertussis inoculando la su-

perficie de un plano inclinado, sellando y enviando al laboratorio de referencia.

30. Medio de transporte de B. pertussis de Regan-Lowe (81).

Para transporte y/o placas de B. pertussis y B. parapertussis.

Agar carbón Oxoid	25.5 g
Agua destilada	1 000 ml
Cefalexina estéril	0.004 g
Sangre equina defibrinada estéril	100 ml

Mezclar el agar con agua y dejar reposar 15 minutos.

Esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos y enfriar a 50°C.

Agregar la cefalexina y la sangre equina a la base, mezclar bien y repartir en frascos pequeños con tapa de rosca estériles, lle<sup>ndolos</sup> hasta el borde.

Usar como medio de transporte para hisopos nasofaríngeos sumergiendo estos últimos en agar blando, cortando el tallo del hisopo y transportando el frasco a un laboratorio de referencia. Las placas pueden hacerse aumentando el agar a 49 g/l y manteniendo las mismas concentraciones de cefalexina y sangre.

31. Medio A de King (8).

Recomendado para la producción de pigmentos de fenazina por Pseudomonas sp.

Peptona	20 g
Glicerol	10 g
Sulfato de potasio	10 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml
pH	7.2

Mezclar y disolver los reactivos, después esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos y repartir asépticamente en cajas Petri.

32. Medio B de King (8).

Para el aislamiento directo de Pseudomonas sp. que producen pio verdina.

Peptona	20 g
Glicerol	10 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml
pH	7.2

Mezclar y disolver los reactivos, después esterilizar a 121°C, 15 lb durante 15 minutos y repartir asépticamente en cajas Petri.

TABLE No. 2.1 GRUPO 6: GRAN NEGATIVO, OXIDADOR DE GLUCOSA, MAC CONKEY POSITIVO, OXIDASA NEGATIVO\*  
 CARACTERISTICAS DIFERENCIALES (ESQUEMA DE KING WEAVER)

ESPECIE	NOVILIDAD	REDUCCION DE NITRATOS	LISINA DESCARBOXILASA	ARGININA DIEHIDROLASA	ORNITINA DESCARBOXILASA	OF LACTOSA
<u>Pseudomonas cepacia.</u>	+	Variable	+ -	-	- +	Acida
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	-	-	-	-	-	Acida
<u>Pseudomonas mallei</u>	-	+	-	+	-	- Acida > 7 días

+ 90% o más de Cepas Positivas; -, 10% o menos de Cepas Positivas.

\* Organismos a Considerar: Pseudomonas cepacia, Acinetobacter calcoaceticus y Pseudomonas mallei.

TABLA No. 2.2 GRUPO 7: GRAM NEGATIVO, OXIDADOR DE GLUCOSA, MAC CONKEY POSITIVO;  
REACCIONES CON NITRATOS DE CARBONO (ESQUEMA KING-WEAVER)

ESPECIE	GLUCOSA	XILOSA	MANITOL	LACTOSA	SACAROSA	MALTOSA
<u>Flavobacterium nesingosepticum</u>	A	ALC	A	VAR	ALC	A
<u>Flavobacterium balustium</u>	A	ALC	ALC	ALC	ALC	A
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	A	A	VAR	ALC	ALC	ALC
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	A	A	VAR	VAR	VAR	VAR
<u>Pseudomonas pseudomallei</u>	A	A	A	A	VAR	A
<u>Pseudomonas stutzeri</u>	A	A	A	ALC	ALC	VAR
<u>Pseudomonas cepacia</u>	A	A(ALC)	ALC	ALC	ALC	A

A, ACIDA: ALC, ALCALINA: VAR, VARIABLE

TABLA No. 2-2 GRUPO 7: GRAN NEGATIVO OXIDADOR DE GLUCOSA, MAC CONKEY POSITIVO, OXIDASA POSITIVO  
 \*CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES (MQUINA DE KING-WEAVER).

ESPECIE	INDOL	GAS & PARTIR DE NITRATO	FORMACION DE NITRATO	GAS N <sub>2</sub> A PARTIR DE NITRATO Y NITRITO	DESARROLLO EN CC	LIBINA DESCARBOXILADA	ARGININA DIFOSFORILADA	MOVILIDAD	FLAGELIOS	FLUORESCENCIA
<i>Flavobacterium serinocapsulatum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium helveticum</i>	+	-	~(+)	-o+	-	-	-	-	-	-
<i>F. auruginosa</i>	-	+	-o+	+o-	+(-)	-	+	+	< 3 Polares	+
<i>F. fluorescens</i>	-	~(+)	-o+	-(+)	+	-	+	+	> 2 Polares	+
<i>F. pseudomallei</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	> 2 Polares	-
<i>F. stutzeri</i>	-	+	-o+	+o-	+(-)	-	o o -	+	< 3 Polares	-
<i>F. vesiculare</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	1 Polar	-
<i>F. caryophila</i>	-	-	Variable	-	- (casos)	+(-)	-	+	> 2 Polares	-

+, 90% o más de cepas positivas; (+), 51-89% de cepas positivas; (-), 10-50% de cepas positivas; -, menos de 10% de cepas positivas; PHN, Prueba no realizada.



TABLA No. 2.3 GRUPO 8: GRAM NEGATIVO OXIDADOR DE GLUCOSA, MAC CONKEY NEGATIVO, OXIDASA NEGATIVO\* CARACTERISTICAS DIFERENCIALES (ESQUEMA KING WEAVER)

ESPECIE	GLUCOSA	BASE OF XILOSA	MALTOZA
<u>Pseudomonas mallei</u>	A	ALC	ALC

A, ACIDA: ALC, ALCALINA

Organismos por considerar: Pseudomonas mallei

TABLA No. 2.4 GRUPO 9: GRAM NEGATIVO, OXIDADOR DE GLUCOSA NEGATIVO, OXIDASA POSITIVO  
 \*CARACTERISTICAS DIFERENCIALES (ESQUEMA DE KING-WEAVER)

ESPECIE	Indol	Pigmento insoluble	Glucosa	Xilosa	Manitol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Urea
<u>Flavobacterium meningosepticum</u>	+	Amarillo	A	A/c	BASE OF A (-)	A/c (A)	A/c	A	-(+ Tardía)
<u>Flavobacterium halustinum</u>	+	Amarillo	A	A/c(A)	BASE OF A/c(A)	A/c	A/c(A)	A	-(+ Tardía)

A, Ácida; Alc, Alcalina; N, Neutra; +, 90% o más de cepas positivas; (+), 51-89% de cepas positivas; (-), 10-50% de cepas positivas.

- Organismos por considerar: Flavobacterium meningosepticum, Flavobacterium halustinum.

TABLA No. 2.5 GRUPO 10: GRAM NEGATIVO, OXIDADOR DE GLUCOSA (NO FERMENTADOR), MAC CONKEY POSITIVO, OXIDASA NEGATIVO: \*CARACTERISTICAS DIFERENCIALES (ESQUEMA KING-WEAVER)

ESPECIE	UREA	PIGMENTO SOLUBLE	OF MALTOSA	GELATINA	MOVILIDAD	HEMOLISIS BETA
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	- (+)	-	-	- (+)	-	- (+)
<u>Pseudomonas maltophilia</u>	-(+ débil, tardía)	(Marrón) Canela	Acida	+	+	-
<u>Bordetella parapertussis</u>	+	Marrón	-	-	-	+

+, 90% o más de Cepas Positivas; (+), 51-89% de Cepas Positivas; -, menos de 10% de Cepas Positivas.

\* Organismos por considerar: Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas maltophilia, Bordetella parapertussis.

TABLA No. 2.6 GRUPO 11: GRAM NEGATIVO, NO OXIDADOR DE GLUCOSA (NO FERMENTADOR), HAC COMEY POSITIVO, OXIDASA POSITIVO;  
\*CARACTERISTICAS DIFERENCIALES (ESQUEMA DE KING-KEVEN).

ESPECIE	FLAGELOS	REDUCCION DE NITRATOS	GAS A PARTIR DE NITRATO	GAS A PARTIR DE NITRITO (NITRATO NO REDUCIDO)	H <sub>2</sub> S	OF XILOSA	DESARROLLO EN SS	UREA
<u>Pseudomonas acidovorans</u>	Polares > 2	+ (- rara)	-	-	-	--	Variable	- o +
<u>Pseudomonas taeniotaraxi</u>	>1	+ (- rara)	-	-	-	-	Variable	- o +
<u>Pseudomonas alcaligenes</u>	Polares 1-2	+ (-)	-	-	-	-	Variable	-
<u>Pseudomonas pseudoalcaligenes</u>	Polares 1-2	+ (-)	-	-	-	-	Variable	-
<u>Pseudomonas denitrificans</u>	Polares < 3?	+	+	-	-	-	- (+)	-
<u>Pseudomonas diminuta</u>	Polares 1-2;	- (+)	-	-	-	-	- (+)	- (+)
<u>Pseudomonas putrefaciens</u>	Polares 1-2	+	-	-	+	Neutra o Alcalina	Variable	- o +
<u>Mordetella bronchiseptica</u>	Peritricos	+	-	-	-	-	+	+ Fuerte
<u>Alcaligenes faecalis</u>	Peritricos	- o +	-	-	-	-	+	-
<u>Alcaligenes denitrificans</u> <u>subsp. denitrificans</u>	Peritricos	+	+	-	-	-	Variable	-

+, 90% o más de cepas positivas; (+), 51-89% positivas; (-), 10-50% positivas, - menos de 10% positivas.

TABLA No. 2.7 GRUPO 12: GRAM NEGATIVO, NO OXIDADOR DE GLUCOSA (NO FERMENTADOR),  
MAC CONKEY NEGATIVO, OXIDASA NEGATIVO\* CARACTERISTICAS  
DIFERENCIALES (ESQUEMA KING-WEAVER)

ESPECIE	UREA	PIGMENTO SOLUBLE	OF MALTOSA	GELATINA	MOVILIDAD	HEMOLISIS BETA
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	(+)	-	-	- (+)	-	- (+)
<u>Pseudomonas maltophilia</u>	-(+) débil, tardía)	Canela	Acida	+	+	-
<u>Bordetella parapertussis</u>	+	Marrón	-	-	-	+

+, 90% o más de cepas positivas, (+), 51-89% de cepas positivas; -10% o menos de cepas positivas.

\* Organismos por considerar: Acinetobacter calcoaceticus, Pseudomonas maltophilia, Bordetella parapertussis.

TABLA No. 2.8 GRUPO 13: GRAM NEGATIVO, NO OXIDADOR DE GLUCOSA (NO FERMENTADOR),  
 MAC CONKEY NEGATIVO, OXIDASA NEGATIVO: CARACTERISTICAS  
 DIFERENCIALES (ESQUEMA DE KING-WEAVER)

ESPECIE	INDOL	UREA	OF XILOSA	REDUCCION DE NITRATOS	OTRAS
<u>Moraxella spp</u>	-	- (+ Rara)	-	+ o -	Frecuentemente tipicos diplobacilos

TABLA No. 2-9 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE IDENTIFICACION DEL GRUPO PSEUDOMONAS-ALCALIGENES\* (ESQUEMA DE GILARDI)

CARACTERÍSTICAS	<i>P. aeruginosa</i> (51) <sup>†</sup>	<i>P. fluorescens</i> (26) <sup>†</sup>	<i>P. putida</i> (46) <sup>†</sup>	<i>P. mendocinensis</i> (9) <sup>†</sup>	<i>P. spazua</i> (22) <sup>†</sup>	<i>P. solanaceae</i> (11) <sup>†</sup>	<i>P. alcaligenes</i> (7) <sup>†</sup>	<i>P. pseudoalcaligenes</i> (10) <sup>†</sup>	<i>P. stutzeri</i> (31) <sup>†</sup>	<i>P. mendocina</i> (5) <sup>†</sup>	<i>P. putrefaciens</i> (12) <sup>†</sup>	<i>P. maltophilia</i> (117) <sup>†</sup>	<i>P. distans</i> (4) <sup>†</sup>	<i>P. faecalis</i> (9) <sup>†</sup>	<i>P. bronchiseptica</i> (3) <sup>†</sup>
Acido Glucosa OF	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	0	0
Acido Maltosa OF	0	84	26	100	100	0	0	10	100	100	25	100	0	0	0
OMPG	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	98	0	0	0
Fluorescencia	90	88	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acido sulfhídrico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Urea	86	54	63	60	27	0	14	0	19	60	25	0	0	0	100
Reducción de nitrato	26	0	0	80	27	100	57	100	26	100	100	38	0	22	33
Desnitrificación (N <sub>2</sub> )	61	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0
Oxidasa	100	100	100	100	91	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100
Decarboxilasas:															
Arginina	98	100	98	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
Lisina	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Ornitina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Licuección de Gelatina	59	100	0	100	45	0	14	0	20	92	100	100	0	0	0
Desarrollo en Agar BA	94	96	100	0	0	82	0	80	94	100	58	0	0	44	33
Desarrollo a 42°C	100	0	0	100	77	0	100	100	100	40	58	63	100	56	66
Susceptible a Penicilina	0	0	0	0	0	0	43	0	16	0	9	4	0	33	33
Susceptible a Polixixina	100	100	100	0	0	73	86	90	100	100	100	98	0	100	100
Fenilalanina desaminasa	2	0	0	0	0	0	72	50	60	0	0	0	0	0	0

\* Modificado de Gilardi

† La cifra entre paréntesis indica el número de cepas ensayadas. Los números de las columnas indican el porcentaje de cepas positivas para las características ensayadas.

TABLA No. 2.10 CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE IDENTIFICACION DEL GRUPO ACINETOBACTER-MORAXELLA Y DE FLAVOBACTERIUM\* (ESQUEMA DEL GILARDI).

PRUEBA O SUSTRATO	<u>A. calcoaceticus</u> (377)+	<u>M. (M.) osloensis</u> (7)+	<u>M. (M.) lacunata</u> (2)+	<u>M. (M.) nonliquifaciens</u> (27)+	<u>Flavobacterium</u> (17)+
Acido Glucosa OF	100	0	0	0	100
Reducción de Nitrato	0	29	100	100	0
Citrocromo Oxidasa	0	100	100	100	100
Hidrólisis de Esculina	0	0	0	0	100
Actividad de Lipasa	100	43	0	7	100
Hidrólisis de Almidón	0	0	0	0	100
Licuefacción de Gelatina	0	0	100	0	100
Hemólisis (Sangre Ovina al 5%)	0	0	0	0	41
Desarrollo en Agar SS	0	14	0	22	0
Desarrollo en Agar de Mac Conkey	100	43	50	41	0
Asimilación de Acetato (Medio Basal Mineral)	99	100	0	0	0
Susceptible a Penicilina	0	100	100	100	0
Susceptible a Polivixina	100	100	100	100	0

\* Modificación de Gilardi.

+ La cifra entre paréntesis indica el número de cepas ensayadas. Los números de las columnas indican el porcentaje de cepas positivas para las características ensayadas.



TABLA 2.11 IDENTIFICACION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y ACINETOBACTER CALCOACETICUS (USANDO LAS PRUEBAS PRELIMINARES DE PICKETT)

CARACTERISTICAS	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>	<u>Acinetobacter</u> <u>calcoaceticus</u>
Desarrollo Pigmentado	90% +	90% -
Oxidasa	+	-
Medio Movilidad Nitrate:		
Movilidad	+	-
Gas	+	-
Medio Fluorescencia-Nitrato:		
Fluorescencia	+	-
Acidificación del Pico	-	+
Formación de Gas (desnitrificación)	+	-
Desarrollo a 42°C	+	-
Sensible a Pemicilina	-	-

TAULA No. 2.12 ALGORITMO PARA LA DIFERENCIACION INICIAL DEL GRUPO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES (MC DIFICADO DE PICKETT).

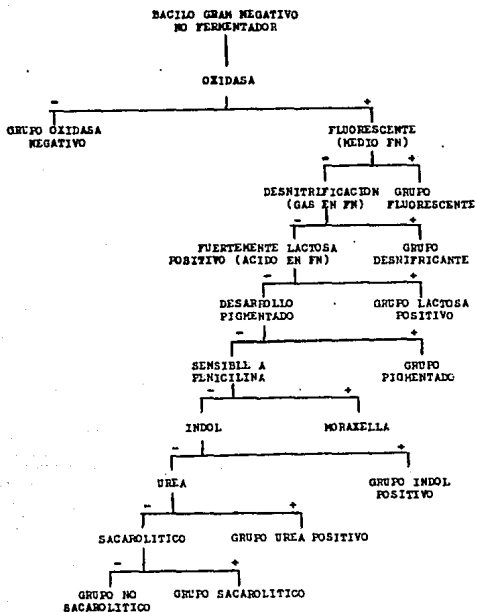


TABLA No. 2.13 GRUPO OXIDASA NEGATIVO (ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES	<u>Acinetobacter</u> <u>calcoaceticus</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>cepacia</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>melitropilla</u>
<b>Caracteres primarios:</b>			
Diámetro de colonias (mm)	1.0 - 2.0	0.1 - 0.5	0.2 - 1
Desarrollo en Mac Conkey	+	(-)	+
Fluorescencia (FN)	-	(-)	(-)
Desnitricación (FN)	-	-	+
Movilidad (NM)	-	+	+
Reducción nitrito (NM)	-	(+)	(+)
<b>Caracteres secundarios:</b>			
Arabinosa	+	+	-
Glucosa	+	+	+
Lactosa	+	+	+
Áctamida	-	(+)	-
Gluconato	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	+	+
Urea	(-)	-	-
<b>Caracteres adicionales:</b>			
Fructosa	(+)	+	+
Manitol	-	-	-
Ramnosa	+	-	-
Sacarosa	-	(+)	+

TABLA No. 2.14 GRUPO FLUORESCENTE (ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>putida</u>
Caracteres primarios:			
Díámetro de colonias (mm)	0.5 - 2	0.1 - 1	0.4 - 2
Desarrollo pigmentado	(+)	-	-
Desarrollo a 42°C	+	-	-
Reducción de nitrato (FN)	+	(-)	-
Producción de gas N <sub>2</sub> (MN)	+	(-)	-
Caracteres secundarios:			
Lactosa	-	(+)	-
Acetamida	+	-	-
Gluconato	(+)	(+)	+
Caracteres adicionales:			
Maltosa	-	+	-
Ramnosa	(-)	+	-
Tartrato	-	-	+

+, 90% o más positivas; (+), 51-89% positivas; (-), 10-50% positivas; -, menos 10% positivas. FN; medio fluorescencia-Desnitrificación. MN; medio Movilidad-Nitrato.

TABLA No. 2.15 GRUPO DESNITRIFICANTE (ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERÍSTICAS	<u>A. denitrificans</u> subsp. <u>Pyrobacillus</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>sparganensis</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>picketti</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>parvum</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>glutera</u>	<u>Alopiogenes deni-</u> <u>trificans</u> , subsp. <u>denitrificans</u>	<u>Pseudomonas denitri-</u> <u>ficans</u>
Caracteres primarios:							
Díametro de colonias (mm)	1	0.5 - 2.0	0.1 - 0.5	0.8 - 1.5	0.2 - 1.5	0.2 - 2.0	0.7 - 1.0
Desarrollo pigmentado	-	(+)	-	(-)	(-)	-	-
Desarrollo a 42°C	(-)	+	(+)	+	+	+	(-)
Fluorescencia (FM)	-	+	-	(-)	-	-	-
(FM)	ND	+	(-)	(+)	(+)	+	+
Caracteres secundarios:							
Arabinosa	(+)	+	+	+	+	-	-
Lactosa	-	-	-	+	-	-	-
Acetamida	(+)	+	-	(+)	(-)	+	-
Gluconato	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	ND	-	-	-	-	-	-
Urea	(+)	-	-	-	-	-	-
Caracteres adicionales:							
Fructosa	ND	+	+	+	+	-	-
Sacarosa	(-)	-	-	(+)	-	-	-
Gelatina	-	+	(-)	+	-	-	-
Amilasa	-	-	-	+	(+)	-	-
Esculina	(-)	-	-	(+)	-	-	-

+, 90% cepas positivas; (+), 51-59% positivas; (-), 10-50% positivas; -, menos 10% positivas. ND, no hay datos.  
FM, medio de Fluorescencia-Desnitrificación.

TABLA NO. 2.16 GRUPO FUERTEMENTE LACTOSA POSITIVO  
(ESQUEMA DE PICKETT).

CARACTERISTICAS	<u>Pseudomonas</u> <u>cepacia</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>pseudomallei</u>
Caracteres primarios:		
Diámetro de colonias (mm)	0.1 - 0.5	0.8 - 1.5
Desarrollo de Mac Conkey	(-)	+
Desarrollo pigmentado	(-)	(-)
Desarrollo a 42°C	(+)	+
Movilidad (MN)	+	+
Gas (MN)	-	(+)
Reducción de nitrato (MN)	(+)	+
Caracteres secundarios:		
Acetamida	(+)	(+)
Lisina descarboxilasa	+	-
Urea	-	-
Caracteres adicionales:		
Manitol	+	+
Sacarosa	(+)	(+)
Amilasa	-	+
Esculina	(+)	(+)

+, 90% cepas positivas; (+), 51-89%, positivas; (-), 10-50% pp  
sitivas; -, menos de 10% positivas.  
MN; medio de Movilidad-Nitrato.

TABLA No. 2.17 GRUPO PIGMENTADO (ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERÍSTICAS	<u>Flavobacterium</u> <u>multivorum</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>maltophila</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>stutzeri</u>
Caracteres primarios:			
Diámetro de colonia (mm)	0.5 - 1.5	0.2 - 1.0	0.2 - 1.5
Desarrollo a 42°C	(-)	(-)	-
Desarrollo pigmentado:	(+)	(-)	(+)
Susceptibilidad a penicilina	-	-	(+)
Movilidad (MN)	-	+	(-)
Producción de Gas N <sub>2</sub> (MN)	-	-	-
Producción de Nitrato (MN)	(-)	(+)	(-)
Caracteres secundarios:			
Arabinosa	(-)	-	+
Glucosa	+	+	+
Lactosa	-	+	+
Acetamida	-	-	-
Indol	+	+	-
Lisina descarboxilasa	-	+	-
Urea	-	-	(-)
Caracteres adicionales:			
Fructosa	+	+	+
Sacarosa	-	+	+
Fenilalanina-desaminasa	-	-	-
Amilasa	+	-	(-)
Esculina	+	(+)	(+)

+, 90% o más de cepas positivas; (+), 51-89% cepas positivas; (-), 10-50% ce-  
pas positivas; - menos de 10% cepas positivas.  
MN, medio Movilidad-Nitrato.

TABLA No. 2.18 GRUPO SUSCEPTIBLE A PENICILINA-MORAXELA (ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERÍSTICAS	<u>Moraxella</u> <u>(M.) mobilisfaciens</u>	<u>Moraxella</u> <u>(M.) calcoensis</u>	<u>Moraxella</u> <u>(M.) phenylpyruvica</u>
Caracteres primarios:			
Díametro de colonias (mm)	0.1 - 0.5	0.1 - 0.8	0.1 - 0.8
Desarrollo en Mac Conkey	(-)	(+)	+
Desarrollo pigmentado	-	-	-
Desarrollo a 42°C	-	-	+
Susceptibilidad a penicilina	+	+	+
Movilidad (MN)	-	-	-
Reducción de nitrato (MN)	-	-	-
Caracteres secundarios:			
Arabinosa	-	(+)	-
Glucosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Indol	-	-	-
Urea	-	-	-
Caracteres adicionales:			
Fructosa	-	-	-
Ribosa	-	+	-
Asparagina	-	-	+
Glutamina	-	-	+
Formiato	-	-	+
Fenilalanina desaminasa	-	-	+

+, 90% o más cepas positivas; (+) 51-89% cepas positivas; (-) 10-50% cepas positivas; - menos del 10% cepas positivas.  
MN, medio de Movilidad-Nitrato.



TABLA No. 2.19 GRUPO INDOL POSITIVO  
(ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERISTICAS	<u>Flavobacterium</u> <u>meningosepticum</u>
Caracteres primarios:	
Diámetro de colonias (mm)	0.5 - 1.5
Desarrollo en Mac Conkey	(-)
Desarrollo pigmentado	-
Desarrollo a 42°C	(-)
Susceptibilidad a penicilina	-
Reducción de nitrato (MN)	-
Caracteres secundarios:	
Arabinosa	-
Glucosa	+
Lactosa	+
Características adicionales:	
Fructosa	+
Manitol	+
Amilasa	-
Esculina	+
Fenilalanina desaminasa	-

+, 90% o más cepas positivas; (+), 51-89% cepas positivas; (-), 10-50% cepas positivas; - menos de 10% cepas positivas.

MN; medio de Movilidad-Nitrato.

TABLA No. 2.20 GRUPO UREA POSITIVO (ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERISTICAS	<u>Bordetella</u> <u>bronchiseptica</u>
Caracteres primarios:	
Diámetro de colonias (mm)	0.2 - 1.5
Desarrollo en Mac Conkey	+
Desarrollo pigmentado	-
Desarrollo a 42°C	+
Susceptibilidad a penicilina	-
Movilidad (MN)	+
Producción de gas N <sub>2</sub> (MN)	-
Reducción de nitrato	(-)
Caracteres secundarios:	
Arabinosa	-
Glucosa	-
Lactosa	-
Urea	+
Caracteres adicionales:	
Fructosa	-
Sacarosa	-
Anilasa	-
Esculina	-

+, 90% o más cepas positivas; (+), 51-89% cepas positivas;  
 (-) 10-50% cepas positivas; 10% o menos cepas positivas.  
 MN, medio de Movilidad-Nitrato.

TABLA No. 2-21. GRUPO NO SACAROLITICO (ESQUEMA DE PICKETT)

CARACTERÍSTICAS	<u>Alcaligenes</u>	<u>Pseudomonas acidovorans</u>	<u>Pseudomonas alcaligenes</u>	<u>Pseudomonas diminuta</u>	<u>Pseudomonas pseudocaligenes</u>	<u>Pseudomonas testosteroni</u>
<b>Caracteres primarios:</b>						
Dímetro de colonias (mm)	ND	0.4 - 1.0	0.5 - 1.8	0.1 - 0.4	0.8 - 3.0	ND
Desarrollo a 42°C	+	-	+	(-)	+	-
Reducción de nitrato (NM)	(-)	+	+	-	+	+
<b>Caracteres secundarios:</b>						
Arabinosa	-	-	-	(-)	(-)	-
Glucosa	-	(-)	-	-	(-)	-
Acetamida	+	+	-	-	-	-
<b>Caracteres adicionales:</b>						
Fructosa	-	+	-	-	+	-
Manitol	-	(+)	-	-	-	-
Alantoina	-	(+)	-	-	-	+
Citrato	+	+	+	-	+	+
Gelatina	-	+	(-)	+	(-)	-
Tartrato	+	+	-	-	-	-

+, 90% o más cepas positivas; (+) 51-89% cepas positivas; (-) 10-50% cepas positivas; - menos de 10% cepas positivas.  
 ND, no hay datos. NM, medio Novilidad-Nitrato.

TABLE No. 2.22 GRUPO SACARILITICO (ESQUEMA DE PIGMENT)

CARACTERISTICAS	<i>A. denitrificans</i> <i>Subsp. xyloxydans</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>acidovorans</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>nitrophila</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>picketti</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>pseudocelligosa</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>resicularis</i>
<b>Caracteres primarios:</b>							
Diámetro colonias (mm)	1	0.4 - 1.0	0.1 - 0.5	0.2 - 1	0.1 - 0.5	0.8 - 1.0	0.2
Desarrollo pigmentado	-	-	(-)	(-)	-	-	(-)
Desarrollo en Mac Conkey	+	+	(-)	+	+	+	(+)
Producción Gas N <sub>2</sub> (MH)	ND	-	-	-	(-)	-	-
Reducción Nitrato (MH)	+	+	(+)	(+)	+	+	-
<b>Caracteres secundarios:</b>							
Arabinosa	(+)	-	+	-	+	< (-)	+
Glucosa	+	(-)	+	+	+	(-)	+
Lactosa	-	-	+	+	-	-	-
Acetamida	(+)	+	(+)	-	-	-	-
Gluconato	(+)	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	ND	-	+	+	-	-	-
Urea	(+)	-	-	-	-	-	-
<b>Caracteres adicionales:</b>							
Fructosa	ND	+	+	+	+	+	(-)
Manitol	(-)	(+)	+	-	-	-	-
Sacarosa	(-)	-	(+)	+	-	-	-
Esculina	(-)	-	(+)	(+)	-	-	(-)

+, 90% o más cepas positivas; (+), 51-89% cepas positivas; (-) 10-50% cepas positivas; - menos de 10% cepas positivas.  
 ND, no hay datos.

TABLA No. 2.23 GRUPO PSEUDOMONAS SACAROLITICAS (ESQUEMA DE OTTO Y PICKETT)

CARACTERISTICAS	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. ricketti</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. maltophilia</i>
Desarrollo pigmentado	+	-	-	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrito	+	+	-	-	-	+	-
Fluorescencia	+	+	+	-	-	-	-
Desarrollo a 42 C	+	-	-	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	+	+	+	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	+
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	-	+
Maltosa	-	-	-	+	+	+	+
Manitol	+	+	-	+	-	+	-
Acetamida	+	-	-	+	-	+	-
Alantoina	+	+	+	+	+	+	-
Malonato	+	+	+	+	+	+	+
Propionato	+	+	+	+	+	+	+
Tartrato	-	+	+	+	+	+	-
$\beta$ -alanina	+	+	+	+	+	+	+

TABLE No. 2.26 GRUPO SACAROLITICO Y DERIVANTE SACAROLITICO (ESQUEMA OTT Y PICKETT)

CARACTERISTICAS	<i>Xanthomonas</i>	<i>A. calcoacetivus</i>	<i>E. meningospticus</i>	<i>E. scidovorans</i>	<i>E. pseudocaliginosa</i>	<i>E. vesicularis</i>
Desarrollo pipentado	+	-	+	-	-	-
Oxidasa	+	-	+	+	+	+
Movilidad	+	-	-	+	+	+
Reducción de nitrato	-	-	-	+	+	-
Reducción de nitrito	-	-	-	-	-	-
Fluorescencia	-	-	-	-	-	-
Desarrollo a 42°C	-	+	-	-	+	-
Indol	-	-	+	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	+	-	-	-	+
Celobiosa	+	+	+	-	-	+
Fructosa	+	+	+	+	+	-
Lactosa	+	+	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	-	-	+
Manitol	-	-	+	+	-	-
Acetamida	-	-	-	+	-	-
Alantoína	-	+	-	+	+	-
Melionato	-	-	-	+	-	-
Propionato	-	+	+	+	-	-
Tartrato	-	-	-	+	-	-
$\beta$ -Alanina	-	+	-	+	+	-

TABLA No. 2.25 GRUPO NO SACAROLITICO Y MORAXELLA SPP.

CARACTERISTICAS	<i>Pseudomonas</i> <i>glumosa</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>alkaligenes</i>	<i>A. denitrificans</i> Subsp. <i>denitrifi-</i> <i>cans</i>	<i>Alcaligenes</i> <i>faecalis</i>	<i>Bordetella</i> <i>bronchiseptica</i>	<i>Flavobacterium</i> <i>salustianum</i>	<i>Moraxella</i> (M) <i>nonliquefaciens</i>	<i>Moraxella</i> (M) <i>colombica</i>	<i>Moraxella</i> (M) <i>phenylpyruvica</i>
Desarrollo pigmentado	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Reducción de nitrato	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Reducción nitrito	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluorescencia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desarrollo a 42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Suscept. a penicilina	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipasa decarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetasa	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Alantoina	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Malonato	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Propionato	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Tartrato	-	-	+	-	+	-	-	-	-
$\beta$ -alanina	+	-	+	+	+	-	-	-	-

#### IV BIBLIOGRAFIA

1. Aldridge, C., Jones, P. W., Gibson, S., Lanham, J., Meyer, M., Vannest, R. & Charles, R. "Automated Microbiological Detection/identification System". *Journal of Clinical Microbiology*. 6(4): 406-413 (1977).
2. R.L. Anderson, R.L. Berkelman, D.C. Mackel, B. J. Davis, B.W. Holland J. W.J. Martone. "Investigations into the survival of P. aeruginosa in polaxamer-iodine". *Applied & Environmental Microbiology*. 47 (4): 757-762. Abril, 1984.
3. T.R. Anderson & T.C. Montie. "Opsonophagocytosis of P. aeruginosa Treated With Antiflagellar Serum". *Infection & Immunity*. 55(12): 3204-3206. Dec, 1987.
4. Appelbaum, P.C., Stavitz, J., Bentz, M.S. of von Juster, L. "Four Methods for Identification of Gram-Negative Nonfermenting Rods: Organisms More Commonly Encountered in Clinical Specimens". *Journal of Clinical Microbiology*. 12:271-278 (1980).
5. Barnishan, J. and Ayers, L. W. "Rapid Identification of Nonfermentative Gram-Negative Rods By The Corning N/F System". *Journal of Clinical Microbiology*. 9(2): 239-243 (1979).
6. J.L. Battershill, D.P. Speert & R.E.W. Hancock. "Use of Monoclonal Antibodies to Protein F of P. aeruginosa as Opsonins



- for Phagocytosis by Macrophages". *Infection & Immunity*. 55(10): 2531-2533. Oct, 1987.
- 7 Bemis D.A. and Wilson S. A. "Influence of Potential Virulence Determinants on *Bordetella Bronchiseptica*- Induced Ciliostasis". *Infection and Immunity*. 50(1): 35-42 (1985).
8. "BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY".  
Ed. Williams & Wikins.  
1984, U.S.A.  
pp. 140-210 V-1.
9. R.L. Berkelman, S. Lewin, J.R. Allen, R.L. Anderson, L.D. Budnick, S. Shapiro, S.M. Friedman, P. Nicholas, R.S. Holzman & R.W. Haley. "Pseudobacteremia Attributed to Contamination of Providone-iodine with *P. cepacia*". *Annals of Internal Medicine*. 95(1): 32-36. July, 1981.
10. Bovre, K. & Henriksen, S. D. "Minimal Standards for Description of New Taxa Within the Genera *Moraxella* and *Acinetobacteri* Proposal by the Subcommittee on *Moraxella* and Allied Bacteria". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26(1): 92-96 (1976).
11. Bovre K., Fluglesang, J. E., Hagen, H., Jantzen, E. & Froholm L.O. "*Moraxella atlantae* sp. nov. and its Distinction from *Moraxella phenylpyruvica*". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26(4): 511-521 (1976).

12. Braude, A.I.  
"ENFERMEDADES INFECCIOSAS".  
Ed. Panamericana.  
Buenos Aires, 1984.
13. Brorson, J.E., Falsen, E., Nilsson-Ehle, H., Rødger, S. & Westin, J. "Septicemia due to Moraxella Nonliquefaciens in a Patient With Multiple Myeloma". Scandinavian Journal of Infections Diseases. 15: 221-223 (1983).
14. Brown, E.J., Pignatello, J. J., Martinson, M.N. & Crawford, R.L. "Pentachlorophenol Degradation: a pure Bacterial Culture and an Epilithic Microbial Consortium". Applied and Environmental Microbiology. 52(1): 92-97 (1986).
15. Bruun, B. "Studies on a Collection of Strains of the Genus Flavobacterium". I.- Biochemical Studies. Acta path. microbiol. Immunol. Scand. Sect. B. 90: 415-421 (1982).
16. Bruun, B. "Studies on a Collection of Strains of the Genus Flavobacterium". II.- Nutritional Studies. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B. 91: 35-41 (1983).
17. Bryan, B. A., Linhardt, R. J. & Daniels, L. "Variation in Composition and Yield of Exopolysaccharides Produced by Klebsiella sp. Strain K 32 and Acinetobacter calcoaceticus BD 4". Applied and Environmental Microbiology. 51(6): 1304-1308 (1986).

18. K.H. Büscher, W. Cullmann, W. Dick, S. Wendt, W. Opferkuch. "Imipenem Resistance in P. aeruginosa is due to Diminished Expression of Outer Membrane Proteins". Journal of Infections Diseases. 156(4): 681-684. Oct, 1987.
19. Butzler, J.P., Hansen, W., Cadranel, S. & Henriksen, S.D. "Stomatitis With Septicemia due to Moraxella osloensis". The Journal of Pediatrics. 84(5): 721-722 (1974).
20. Calvert J.E. and Calogeras A. "Characteristics of Human B. Cells Responsive to the T-Independent Mitogen. Branhamella catarrhalis". Immunology. 58:37-41 (1986).
21. Calvert J.E., Proctor S.J. and Jefferis R. "Activation of B Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells by Branhamella catarrhalis". Immunology. 60: 45-50 (1987).
22. M.C., Cerqueti, D.O. Sordelli, J. J. Bellanti & A.M. Hooke. "Lung Defenses Against P. aeruginosa in C 5-Deficient mice With Different Genetic Backgrounds". Infection & Immunity. 52(3): 853-857. June, 1986.
23. J.K.S., Chia, M. Pollack, D. Avigan & S. Steinbah. "Functionally Distinct Monoclonal Antibodies Reactive with Enzymatically Active and Binding Domains of P. aeruginosa Toxin A". Infection & Immunity. 52(3): 756-762. June, 1986.

24. B. J. Connor, R. T. Kopecky, P. A. Frymoyer & B. A. Forbes.  
"Recurrent P. luteola (CDC Gp. Ve-1) Peritonitis in a Patient Undergoing Continuous Ambulatory peritoneal Dialysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 25(6): 1113-1114. June, 1987.
25. Cordes, L. G., Briak, E. W., Checko, P. J., Lentnek, A., Lyons, R. W., Hayes, P. S., Wu, T. C., Tharr, D. G. & Fraser, D. W.  
"A Cluster of Acinetobacter Pneumonia in Foundry Workers". *Annals of Internal Medicine*. 95: 688-693 (1981).
26. A. S. Cross, J. C. Sodoff, B. H. Iglewski & P. A. Sokol. "Evidence for the Role of Toxin A in the Pathogenesis of Infection with Pseudomonas aeruginosa in Human". *Journal of Infectious Diseases*. 142(4): 538: 546. October, 1980.
27. S. J. Cryz JR., A. E. Lang, J. C. Sadoff, R. Germanier & E. Fu  
rer. "Vaccine Potential of P. aeruginosa O-Polysaccharide Toxin A Conjugates". *Infection & Immunity*. 55(7): 1547-1551. July, 1987.
28. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen H. N., Ginzberg, H. S.  
"MICROBIOLOGY".  
Harper International Edition.  
3rd. Ed.  
1980, W. S. A.  
pp. 693-703.
29. H. F. Dean, A. F. Morgan, L. V. Asche & B. W. Holloway. "Isolates of Pseudomonas aeruginosa from Australian Hospitals Having

- R-Plasmid Determinated Antibiotic Resistance". Medical Journal of Australia. 2: 116-119 (1977).
30. P. Doig, N. R. Smith, T. Todd, R. T. Irving. "Characterization of the Binding of P. aeruginosa Alginate to Human Epithelial Cells". Infection & Immunity. 55(6): 1517-1522. June, 1987.
  31. Donaldson, P. & Whitaker, J. A. "Diagnosis of pertussis by Fluorescent Antibody Staining of Nasopharyngeal Smears". A. M. A. Journal of Diseases of Children. Vol. 99: 53-57 (1960).
  32. Dowda, H. "Evaluation of two Rapid Methods for Identification of Commonly Encountered Nonfermenting or Oxidase Positive, Gram-Negative Rods". Journal of Clinical Microbiology. 6(6): 605-609 (1977).
  33. G. Döring, W. Goldstein, A. Röll, P. O. Shietz, H. Heiby & K. Botzenhart. "Role of P. aeruginosa Exoenzymes in Lung Infections of Patients with Cystic Fibrosis". Infection & Immunity. 49(3): 551-552. September, 1985.
  34. Feigin, R. D., San Joaquin, V. & Middelkamp, J. N. "Septic Arthritis Due to Moraxella osloensis". Journal of Pediatrics. 75: 116-117 (1969).
  35. R. B. Fick, G. P. Naegel, R. J. Matthey & H. Y. Reynolds "Cystic Fibrosis Pseudomonas Oponins". Journal of Clinical Investigation. 68: 899-914. October, 1981.

36. Field L. and Parker Ch. "Pertussis outbreak in Austin and Travis Country, Texas, 1975". Journal of Clinical Microbiology. 6(2): 154-160 (1977).
37. Finklea, P. S., Cole, M. S., Sodeman, T. M. "Clinical Evaluation of the Minitek Differential System for Identification of Enterobacteriaceae". Journal of Clinical Microbiology. 4(5): 400-404 (1976).
38. Fish F., Cowell J. L. and Manclark CH. R. "Proliferative Response of Immune Mouse T-Lymphocytes to the Lymphocytosis Promoting factor of Bordetella pertussis". Infection and Immunity. 44(1): 1-6 (1984).
39. Frank D. W. and Parker CH. D. "Interaction of Monoclonal Antibodies with pertussis Toxin and its Subunits". Infection and Immunity. 46(1): 195-201 (1984).
40. Frency, J., Hansens, W., Ploton, C., Meugnier, H., Madier, S., Bornstein, N. & Gleurette, J. "Septicemia Cused by Sphingobacterium multivorum". Journal of Clinical Microbiology. 25(6): 1126-1128 (1987).
41. Friedman, RLL. "Bordetella pertussis adenylate Cyclase: Isolation and Purification by Calmodulin-Speharose 4B Chromatography". Infection and Immunity. 55(1): 129-134 (1987).
42. Friedman, R. L., Fiederlein, R. L., Glasser, L. & Galgiani, J. N. "Bordetella pertussis Adenylate Cyclase: Effects of Affini-

- ty Purified Adenylate Cyclase on Human Polymorphonuclear Leukocyte Functions". *Infection & Immunity*. 55(1): 135-140 (1987).
43. Gardner, P., Griffin, W. P., Swartz, H. N. "Nonfermentative Gram-Negative Bacilli of Nosocomial Interest". *American Journal of Medicine*. 48: 735-749 (1970).
44. Gley, R. H., Moellering, R. C. & Kunz, L. J. "Acinetobacter calcoaceticus (Herellea Vaginicola): Clinical and Laboratory Studies". *Medicine*. 56(2): 79-97 (1977).
45. Grace, S. DeVilliers, D. M., Almond, N. M. & Elson, C. J. "Relationship Between non-antigen-specific Immunodepression and Persisting Immune Complexes Induced by pertussis in Mice". *Immunology*. 57: 621-625. (1986).
46. Hedenskog, S., Granström, M., Olin, P., Tiru, M. & Soto, Y. "A Clinical Trial of a Monocomponent Pertussis Toxoid Vaccine". *A. J. D. C.* 141: 844-847 (1987).
47. Henriksen S. D. "Moraxella, Neisseria, Branhamella and Acinetobacter". *Annual Review Microbiology*. 30: 63-83 (1976).
48. Henriksen S. D. & Boure K. "Transfer of Moraxella kingae Henriksen and Bovre to the Genus Kingella Gen. Nov. in the Family Neisseriaceae". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26(4): 447-450 (1976).
49. Hindler, J. A. and Bruckner, D. A. "Evaluation of the Automicrobic System for Susceptibility Testing of Aminoglycosides and

Gram-Negative Bacilli". Journal of Clinical Microbiology. 25(3): 546-550 (1987).

50. Holmes B. "Identification and Distribution of Flavobacterium meningosepticum in Clinical Material". Journal of Applied Bacteriology. 62: 29-41 (1987).
51. Holmes B. and Owen, R. J. "Flavobacterium breve Sp. Nov., Nom. Rev.". International J. of Systematic Bacteriology. 32(2): 233-234 (1982).
52. Holmes B., Owen R. J. and Hollis D. G. "Flavobacterium spiritivorum, a New Species Isolated From Human Clinical Specimens". International J. of Systematic Bacteriology. 32(2): 157-165 (1982).
53. Holt, L. B. "The Pathology and Immunology of Bordetella pertussis infection". Journal Medical Microbiology. 5: 407-424 (1972).
54. P. S. Holt, & M. L. Mieleldt. "Variable WicH Affect Suppression of the Immune Response Induced by P. aeruginosa Exotoxin A". Infection & Immunity. 52(1): 96-100. April, 1986.
55. P. J. Hudson, R. L. Vogt, D. A. Jillson, S. J. Kappel & A. K. Highsmith. "Duration of Whirlpool-Spa Use as a Risk Factor for Pseudomonas dermatitis".
56. Isenberg, H. D., Gavan T. L., Smith P. B. Sonnenwirth, A., Taylor, W., Martin, W. J., Rhoden, D. & Balows, A. "Collaborative



- Investigation of the Automicrobic System Enterobacteriaceae Biochemical Card". Journal of Clinical Microbiology. 11(4): 694-702 (1980).
57. Isenberg, H. D. and Sampson-Scherer, J. "Clinical Laboratory Evaluation of a System Approach to the Recognition of Nonfermentative or Oxidase-Producing Gram-Negative, Rod-Shaped Bacteria". Journal of Clinical Microbiology. 5(3): 336-340 (1977).
58. Jakway J. P. and DeFranco A. L. "Pertussis Toxin Inhibition of B-cell and Macrophage Responses to Bacterial Lipopolysaccharide". Science. 234: 743-745 (1986).
59. Janda W. M., Malloy, P. J. & Schreckenberger, P. C. "Clinical Evaluation of the Vittek Neisseria-Haemophilus Identification Card". Journal of Clinical Microbiology 25(1): 37-41 (1987).
60. V. E. Jiménez L., L. D. Saravolats, A. A. Medeiros, L. D. Pohlod. "Failure of Therapy in Pseudomonas endocarditis: Selection of Persistent Mutants". The Journal of Infectious Diseases. 154(1): 64-68. July, 1986.
61. Johnston I. D. A., Bland, J. M., Ingram, D., Anderson, H. R. & Warner, J. O. "Effect of Whooping Cough in Infancy on Subsequent Lung Function and Bronchial Reactivity". Am. Rev. Respir. Dis. 134: 270-275 (1986).
62. Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B. "ZINSSER/MICROBIOLOGIA".

Ed. Médica Panamericana.

17a. Ed.

1983, Argentina.

pp. 581-590; 714-719.

63. Juni, E., and Heym, G. A. "Defined Medium for Moraxella Bovis". Applied and Environmental Microbiology. 52(4): 996-968 (1986).
64. Kaplan, H., Goldberg, M. D., Tanber, Z., Solomon, F. & Sompoling Ky, D. "Successful Treatment of Neonatal Flavobacterium meningosepticum Infection". Eur. J. Pediatr. 140: 337-338 (1983).
65. Kaplan N., Rosenberg, E., Janh, B. & Jann, K. "Structural Studies of the Capsular Polysaccharide of Acinetobacter calcoaceticus BD4". Eur. J. Biochem. 152: 453-458 (1985).
66. Kaplan N., Zosim Z. and Rosenberg E. "Reconstitution of Emulsifying Activity of Acinetobacter calcoaceticus BD4 Emulsion by Using Pure Polysaccharide and Protein". Applied and Environmental Microbiology. 53(2): 440-446 (1987).
67. Kaufman S. and Bruyin H. B. "Pertussis". A. M. A. Journal of Diseases of Children. 99: 47-52 (1960).
68. Kawahara K., Brade, H., Rietschel, E. T. & Zähringer, V. "Studies on the Chemical Structure of the Core-Lipid a Region of the Lipopolysaccharide of Acinetobacter calcoaceticus NCTC 10305". European Journal of Biochemistry. 163: 489-495 (1987).

69. Kendrick, P. L. "Can Whooping Cough Be Eradicated?". The Journal of Infectious Diseases. 132(6): 707-712 (1975).
70. Koestenblatt, E. K., Larove, D. H., Pavletichk, J. "Comparison of the Oxi/Ferm and N/F Systems for Identification of Infrequently Encountered Nonfermentative and Oxidase-Positive Fermentative Bacilli". Journal of Clinical Microbiology. 5: 384-390 (1982).
71. K. Komiyama, B. F. Habbick & S. K. Tumber. "Role of Sialic Acid In Saliva-Mediated Aggregation of P. aeruginosa Isolated From Cystic Fibrosis Patients". Infection & Immunity. 55(10): 2364-2369. October, 1987.
72. Koneman, E. W., Allen, S. D. & Dowell, V. R.  
"DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO".  
Editorial Médica Panamericana.  
1a. Edición.  
Argentina, 1983.
73. Kong, A. S., Morse, S. I. "The in Vitro Effects of Bordetella pertussis Lymphocytosis-Promoting Factor on Murine Lymphocytes". I. Proliferative response. The Journal of Experimental Medicine. 145: 151-162 (1977).
74. Kong, A. S., Morse S. I. "The in Vitro Effects of Bordetella pertussis Lymphocytes". II. Nature of the Responding Cells. The Journal of Experimental Medicine. 145; 163-173 (1977).

75. Kong, A. S., Morse S. I. "The in Vitro Effects of Bordetella pertussis Lymphocytosis-Promoting Factor on Murine Lymphocytes". III. B-Cell Dependence for T-Cell Proliferation. The Journal of Experimental Medicine. 149: 1001-1017 (1979).
76. Kong, A. S., Morse S. I. "The in Vitro Effects of Bordetella pertussis Lymphocytosis-Promoting Factor on Murine Lymphocytes". IV. Generation, Characterization, and Specificity of Cytotoxic Lymphocytes. The Journal of Experimental Medicine. 149: 1393-1406 (1979).
77. Kong, A. S., Morse S. I. "The in Vitro Effects of Bordetella pertussis Lymphocytosis-Promoting factor on Murine Lymphocytes". V. Modulation of T-Cell Proliferation by Helper and Suppressor Lymphocytes. The Journal of Immunology. 124(4): 363-369 (1980).
78. Kuwe K., Nakay, T., Samejima, Y. & Sugimoto, C. "Properties of Dermonecrotic Toxin Prepared From Sonic Extracto of Bordetella bronchiseptica". Infection and Immunity. 52(4): 370-377 (1986).
79. J. S. Lam, L. A. MacDonald, M. Y. C. Lam, L. G. M. Duchasne & G. G. Southam. "Production & Characterization of Monoclonal Antibodies Against Serotype Strains of P. aeruginosa". Infection & Immunity. 55(5): 1051-1057. May, 1987.
80. Lautrop, H., Bovre, K., Frederiksen W. "A Moraxella-Like Microorganism Isolated from the Genito-Urinary Tract of Man".

Acta Path. Microbiol. Scand. Section B. 78: 225-256 (1970).

81. Lennette, E. H., Balows, A., Blausler W. J., Truant, J. P.  
"MICROBIOLOGIA CLINICA".  
Ed. Médica Panamericana.  
3a. Ed. 19.  
1982, Argentina.  
pp. 412-419.
82. Linneman, C. C., Perlstein, P. H., Ramundo, H. & Minton, S. D.  
"Use of Pertussis Vaccine in an Epidemic Involving Hospital  
Staff". The Lancet. 540-544 (1975).
83. Linnemann, C. and Perry, E. "Bordetella Parrapertussis". Am. J.  
Dis. Chil, 131: 560-563. (1977).
84. Livey, I. and Wardlaw, A. C. "Production and Properties of  
Bordetella pertussis Heat-Labile Toxin". Journal of Medical Mi  
crobiology. 17: 91-103 (1984).
85. Lynch, Raphael, Mellor, Spare Inwood.  
"METODOS DE LABORATORIO".  
Ed. Interamericana.  
2a. Ed.  
1982, México.  
pp. 957-958.

86. Mac Faddin, Jean F.  
"PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IM  
PORTANCIA CLINICA".  
1a. Edición Panamericana.  
Buenos Aires, Argentina, 1980.
87. MacIntyre, S., Lucken, R., Owen, P. "Smooth Lipopolysaccharide  
is the Major Protective antigen for mice in the surface Extract  
from IATS Serotype 6 Contributing to the Polyvalent P. aerugi-  
nosa Vaccine PEV". & Infection & Immunity 52(1) 76-84 (1986).
88. MacIntyre, S., M Veigt, T., Owen, P. "Immunochemical and Bio-  
chemical analysis of the Polyvalent P. aeruginosa vaccine PEV".  
Infection & Immunity. 51(2): 675-686. February, 1986.
89. Marcon, M. J., Hamoudi, A., Cannon, H. & Hribar, M. "Comparison  
of Throat and Nasopharyngeal Swabs Specimens for Culture Diag-  
nosis of E. pertussis infection". Journal of Clinical Microbi-  
ology. 25(6): 1109-1110 (1987).
90. Matthews, J. M., Greer, and Gilleland Jr. "Outer Membrane Pro-  
tein F (porin) Preparation of P. aeruginosa as a Protective Va  
ccine Against Heterologous Immunotype Strains in a Burned Mou-  
se Model". The Journal of Infections Diseases. 155(6):  
1282-1291. June, 1987.
91. McRay, E., Martone, W. J., Robert P. Wise & D. H. Culver. "Risk  
Factors for wound Infections After Genitourinary Reconstructi-  
ve Surgery". American Journal of Epidemiology 123(6):  
1026-1032 (1986).

92. Meade B. D., Kind, P., Well, I., McGrath, P., & Manclark, C. "In vitro Inhibition of Murine Macrophage Migration by Bordetella pertussis Lymphocytosis-Promoting factor". Infection and Immunity. 45(3): 718-725 (1984).
93. Michelacci, Y. M., Horton, D. & Población, C. "Isolation and Characterization of an Induced Chondroitinase ABC from Flavobacterium heparinum". Biochimica & Biophysica. Acta 923: 291-301 (1987).
94. Molla, A., V. Matsumura, T. Yamamoto, R. Okamura & H. Maeda. "Pathogenic Capacity of Proteases from S. marcescens & P. aeruginosa & their Suppression by Chicken egg white Ovomacroglobulin". Infection and Immunity. 55(10): 2509-2517. October, 1987.
95. Morris, R. E. and Saelinger, C. B. "Reduced Temperature Alters Pseudomonas Exotoxin A Entry Into the Mouse LM Cell". Infection and Immunity. 52(2): 445-452. May, 1986.
96. Moss & N. J. Lewiston. "Immune Complexes and Humoral response to Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis". American Review of Respiratory Disease. 121:23-29 (1980).
97. Muñoz, Aras, Bergman & Sadowski. "Biological activities of Crytalline pertussigen from B. pertussis". Infection and Immunity. 33:820-826 (1981).
98. Nagel, J. and Poot-Scholtens, E. J. "Serum IgA Antibody to Bordetella pertussis as an Indicator of Infection". Journal Med.

Microbiology. 16: 417-426 (1983).

99. A. N. Neely, E. J. Law. & I. A. Holder. "Increased Susceptibility to Lethal Candida Infections in Burned mice Preinfected with P. aeruginosa or Pretreated with Proteolytic Enzymes". Infection and Immunity. 52(1): 200-204. April, 1986.
100. W. E. Nelson, V. C. Vaughan, R. J. McKay.  
"TRATADO DE PEDIATRIA".  
Salvat Mexicana S. A. de C. V.  
7a. Ed., 2a. reimpresión.  
México, 1981.  
Tomo I: pp. 630-632, 888-889, 944-959.
101. Novotny P., Kobisch, M., Cownley, K., Chubb, A. & Montaraz, J.  
"Evaluation of Bordetella bronchiseptica vaccines in Specific-pathogen-free Piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked Immunosorbent Assay". Infection and Immunity. 50(1): 190-198 (1985).
102. K. M. Nugent, W. C. Kopp. "Effectos of Cyclosporine on Pulmonary Clearance of S. aureus & P. aeruginosa". The Journal of Infections Diseases. 154(2): 352-355. August, 1986.
103. Oberhofer, T. R., Rowen, J. W., Cunningham G. F. & Higbee, J. W. "Evaluation of the oxi/ferm Tube System with Selected Gram-Negative Bacteria". Journal of Clinical Microbiology. 6(6): 559-566 (1977).



104. Oberhofer, T. R., Rowen, J. W., Cunningham, G. F. "Characterization and Identification of Gram-Negative, Nonfermentative Bacteria". *Journal of Clinical Microbiology*. 5(2): 208-220 (1977).
105. O'Connell, C. J. and Hamilton R. "Gram-Negative Rod Infections". II. *Acinetobacter* infections in General Hospital. *New York State Journal of Medicine*. 750-753. (1981).
106. Oda, M., Cowell, J. L., Burstyn, D., Thaib, S. & Manclark, C. "Antibodies to Bordetella pertussis in Human Colostrum and their Protective Activity Against Aerosol Infection of Mice". *Infection and Immunity*. 47(2): 441-445 (1985).
107. Olson, L. C. "Pertussis". *Medicine*. 54(6): 427-469 (1975).
108. Otto, L. A. and Blachman, U. "Nonfermentative Bacilli: Evaluation of Three Systems for Identification". *Journal of Clinical Microbiology*. 10(2): 147-154 (1979).
109. Otto, L. A. and Pickett, M. J. "Rapid Method for Identification of Gram-Negative, Nonfermentative Bacilli". *Journal of Clinical Microbiology*. 3(6): 566-575 (1976).
110. Patel, N. J., Moore, T., Weiss, T. & Zuckner, J. "Kingella kingae Infections Arthritis: Case Report and Review of Literature of Kingella and Moraxella infections". *Arthritis and Rheumatism* 26(4): 557-559 (1983).

111. Pedersen, M. M., Marso, E. and Pickett, M. J. "Nonfermentative Bacilli Associated With man". III. Pathogenicity and Antibiotic Susceptibility. A. J. C. P. 54: 178-191 (1970).
112. L. F. Pérez M., R. C. Martínez, L. Molina M., D. Félix A., J. I. Santos P. "Osteomielitis del Calcáneo por P. aeruginosa. Presentación de un caso y revisión de la Literatura". Bol. Med. Hospital Infantil México 43(6): 385-390. Junio, 1986.
113. Pickett, M. J. and Pedersen, M. M. "Characterization of Saccharolytic Nonfermentative Bacteria Associated With Man". Canadian Journal of Microbiology 16:351-362 (1970).
114. Pickett, M. J. and Pedersen, M. M. "Salient Features of Nonsaccharolytic and Weakly Saccharolytic Nonfermentative Rods". Canadian Journal of Microbiology. 16(6): 401-409 (1970).
115. Pickett, M. J. and Pedersen, M. M. "Nonfermentative Bacilli Associated With Man:". II. Detection and Identification. A. J. C. P. 54: 164-177 (1970).
116. Pien, F. D. and Higa, H. Y. "Achromobacter xylosoxidans Isolates in Hawaii". Journal of Clinical Microbiology 7(2): 239-241 (1978).
117. Pollack, M. "Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A". The New England Journal of Medicine. 502(24): 1360-1362. June 12, 1980.

118. J. P. Quinn, E. J. Dudek, C. A. DiVincenzo, D. A. Lucks & S. A. Lerner. "Emergence of Resistance to Imipenem During Therapy for Pseudomonas aeruginosa Infections". The Journal of Infections Diseases. 154(2): 289-294. August, 1986.
119. Barick, H. R., Riley, P. & Martin, R. "Carbon Substrate Utilization Studies of Some Cultures of Alcaligenes denitrificans, Alcaligenes faecalis, and Alcaligenes odorans Isolated from Clinical Specimens". Journal of Clinical Microbiology. 8(3): 313-319 (1978).
120. Redfield, D. C., Overturf, G., Ewing, M. O. & Fowers, D. "Bacteria, Arthritis & Skin Lesions Due to Kingella kingae". Archives of Disease in Childhood. 55:411 (1980).
121. Regan J. and Lowe F. "Enrichment Medium for the Isolation of Bordetella". Journal of Clinical Microbiology. 6(3): 303-309 (1977).
122. Redhead, K. "Serum Antibody Responses to the outer Membrane Proteins of Bordetella pertussis". Infection and Immunity. 44(3): 724-729 (1984).
123. Riley, P. S., Hollis, D. G., Weaver, R. E. "Characterization and Differentiation of 59 Strains of Moraxella urethralis from Clinical Specimens". Applied Microbiology. 28: 355-358 (1974).
124. Robinson A. and Hawkins D. "Structure and Biological Properties of Solubilized Envelope Proteins of Bordetella pertussis".

- Infection and Immunity. 39(2); 590-598 (1983).
125. Robinson, A. and Irons, L. I. "Synergistic Effect of B. pertussis Lymphocytosis-Promoting Factor on Protective Activities of Isolated Bordetella Antigen's in Mice". Infection and Immunity. 40(2): 523-528 (1983).
126. Rockhill, R. G. and Lutwick, L. I. "Group IV e-like Gram-Negative Bacillemia in a Patient With Obstructive Uropathy". Journal of Clinical Microbiology. 8(1): 108-109 (1978).
127. Rosenbaum J., Lieberman D., and Kats, W.A. "Moraxella Infections Arthritis: First Report in an Adult". Annals of the Rheumatic Diseases. 39: 184-185 (1980).
128. Rosenthal, S. L. Fremdlich, L. Gilardi, G. & Clodomor, F. "In Vitro Antibiotic Sensitivity of Moraxella species". Chemotherapy. 24: 360-363 (1978).
129. Rosett W., Heck, D. M. and Hodges, G. R. "Pneumonitis and Pulmonary Abscess Associated With Moraxella nonliquefaciens". Chest. 70(5): 664-665 (1976).
130. C. C. Sanders & W. E. Sanders. "Type I  $\beta$ -lactamases of Gram Negative Bacteria: Interactions With  $\beta$ -lactam Antibiotics". The Journal of Infections Diseases. 154(5): 792-800. November, 1986.

131. Sato, H. and Okinaga, K. "Role of Pili in the Adherence of P. aeruginosa to the mouse Epidermal Cells" Infection & Immunity. 55(8): 1774-1778. August, 1987.
132. Sato, H. and Sato Y. "Bordetella pertussis Infection in Mice: Correlation of Specific Antibodies Against two Antigens, Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin with Mouse Protectivity in an Intracerebral or Aerosol Challenge System". Infection and Immunity. 46(2): 415-421 (1984).
133. N. L. Schiller & R. L. Millard. "Pseudomonas. Infected Cystic Fibrosis Patient Sputum Inhibits the Bactericidal Activity of Normal Human Serum. Pediatric Research. 17(9): 747-752. (1983).
134. W. Seeger, D. Walmrath, H. Neuho & J. F. Lutz. "Pulmonary Microvascular Injury Induced by P. aeruginosa Cytotoxin in Isolated Rabbit Lungs". Infection & Immunity. 52(3): 846-852. June, 1986.
135. Shayegani, M., Lee, A. M. and McGlynn, M. "Evaluation of the Oxi/Ferm. Tube System for Identification of Nonfermentative Gram-Negative Bacilli". Journal of Clinical Microbiology. 7(6): 533-538 (1979).
136. Shayegani, M., Manpin, P. S., McGlynn, D. M. "Evaluation of the API 20E System for Identification of Nonfermentative Gram-Negative Bacteria". Journal of Clinical Microbiology. 7(6): 539-545 (1978).

137. Smalley, D. L. "Endotoxin-like Activity in Pseudomonas paucemobilis (group IIK biotype 1) and Flavobacterium multivorum (group II K Biotype)2)". *Experientia*. 38: 1483-1484 (1982).
138. Smith, S. M., Cundy, K. R., Gilardi, G. L., & Wong, W. "Evaluation of the Automicrobic System for Identification of Glucosa Nonfermenting Gram-Negative Rods". *Journal of Clinical Microbiology*. 15(2): 302-307 (1982).
139. Snell, J. J. and Lapage, S. P. "Transfer of Some Saccharolytic Moraxella Species to Kingella Henriksen and Bovre 1976, with Descriptions of Kingella indologenes sp. nov. and Kingella denitrificans sp. nov.". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26(4): 451-458 (1976).
140. Spahr, R. C. "Septic Arthritis due to Moraxella Species". *The Journal of Pediatrics*. 86: 310 (1975).
141. Sonnenwirth, A. C. "Preprototype of an Automated Microbial Detection and Identification System: a Developmental Investigation". 6(4): 400-405 (1977).
142. Stucki, G. and Alexander M. "Role of Dissolution Rate and Solubility in Biodegradation of Aromatic Compounds". *Applied and Environmental Microbiology*. 53(2): 292-297 (1987).
143. Tablan, O. C., Carson L. A., B. Cusick, Bland L. A., Martone W. J. & Jarvis W. R. "Laboratory Proficiency Test Results on Use of Selective Media for Isolating P. cepacia". *Journal of Clinical Microbiology*. 25(3): 485-487. May, 1987

144. Takeuchi, M., Ninomiya, K., Kawabata, K., Asano, N. Kameda, Y. & Matsui, K. "Purification and Properties of Glucoside 3-Dehydrogenase from Flavobacterium saccharophilum". Journal of Biochemistry. 100: 1049-1055 (1986).
145. Thong M. L., Puthucheray, S. D. & Lee, E. "Flavobacterium meningosepticum infection: and Epidemiological Study in a Newborn Nursery". Journal of Clinical Pathology. 34: 429-433 (1981).
146. Torre, D., Quadrelli, C., Pugliese, A. & Maggiolo, F. "Effect of Betamethasone in Lungs of Mice Treated With Lymphocytosis-Promoting factor of Bordetella pertussis". The Journal of Infectious Diseases. 154(2): 238-244 (1986).
147. Tuomanen, E. and Weiss, A. "Characterization of two Adhesins of Bordetella pertussis for Human Ciliated Respiratory-Epithelial Cells". The Journal of Infectious Diseases. 152(1): 118-125. (1985).
148. Urisu, A., Cowell, J. & Manclark, C. "Filamentous Hemagglutinin Has a Major Role in Mediating Adherence of Bordetella pertussis to Human WDR Cells". Infection and Immunity. 52(3): 695-701 (1986).
149. Vogel, F. R., Klein, T., Stewart, W., Igarashi, T. & Friedman, H. "Immune Suppression and Induction of Gamma Interferon by Pertussis Toxin". Infection and Immunity 49(1): 90-97 (1985).

150. Warwood, N. M., Blazevic, D. J. and Hofherr. "Comparison of the API 20E and Corning nif Systems for Identification of Nonfermentative Gram-Negative Rods". Journal of Clinical Microbiology. 10(2): 175-179 (1979).
151. Weinberger, I., Davidson, E., Rosenberg, Z., Fuchs, I. & Agmon J. "Prosthetic Valve Endocarditis Caused by Acinetobacter calcoaceticus Subsp. Iwoffii". Journal of Clinical Microbiology. 25(5): 955-957 (1987).
152. Weiss, A., Hewlett, E., Myers, W. & Falkow, S. "Pertussis Toxin and Extracytoplasmic Adenylate Cyclase as Virulence Factors of Bordetella pertussis". The Journal of Infectious Diseases. 150(2): 219-222 (1984).
153. Wellstood-Nuense, S. "Comparison of the Minitek System with Conventional Methods for Identification of Nonfermentative and Oxidase-Positive Fermentative Gram-Negative Bacilli". Journal of Clinical Microbiology. 9(4): 511-516 (1979).
154. Williams H. N., Falkler, W. & Hasler, J. "Acinetobacter Contamination of Laboratory Dental Pumice". Journal of Dental Research. 62(10): 1073-1075 (1983).
155. Winters A. L., Baggett, D., Benjamin, W., Brown, K. & Klein, T. "Resistance to Adenovirus Infection After Administration of Bordetella pertussis Vaccine in Mice". Infection and Immunity. 47(3): 587-591 (1985).



156. Ygout, J. F., Housset, B., Derenne, J. & Daguët, G. "Hospital-Acquired Acinetobacter baumanii pneumonitis". (letter). The Lancet. 802 (1987).
157. Young, L. S. "The Role of Exotoxins in the Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa Infections". The Journal of Infections Diseases. 142(4): 626-630. October, 1980.
158. V. L. Yu, T.P. Felegie, R. B. Yee, A. W. Pasalle & F. H. Taylor. "Synergistic Interaction in Vitro with Use of Three Antibiotics Simultaneously Against Pseudomonas maltophilia". The Journal of Infections Diseases. 142(4): 602-607. October, 1980.
159. Zeligs B. J., Zeligs, J. D. & Bellanti, J. A. "Functional and Ultrastructural Changes in Alveolar Macrophages from Rabbits Colonized With Bordetella bronchiseptica". Infection and Immunity. 53(3): 702-706 (1986).
160. Zhang, I., Cowell, J., Steven, A., Carter, P., McGrath, P. & Manclark, C. "Purification and Characterization of Fimbriae Isolated from B. pertussis". Infection and Immunity. 48(2): 422-427 (1985).