



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO ① lej.

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA

De los ciclos Profesional y
de Posgrado

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

Desarrollo de un Sistema
Miniaturizado para la
Identificación de
Bacterias
Gram negativas

Tesis

Para obtener el grado de

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

Presenta el alumno

M. C. Ma. del Carmen Giraud Rodríguez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

INTRODUCCION GENERAL

Identificación bacteriana 1

Sistemas miniaturizados comerciales. 6

RESUMEN DESARROLLO DE UN MICROMETODO PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS. 8

INTRODUCCION. 10

ANTECEDENTES.

Ventajas y desventajas de los micrométodos. 11

Evaluación de los diferentes sistemas comerciales. 12

OBJETIVOS. 17

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos empleados. 18

Sustratos 19

Metodos de secado y evaluación. 32

Reproducibilidad de las pruebas y correlación de
los sistemas. 32

Análisis estadístico. 34

Sistema de almacen. 34

RESULTADOS

Métodos de secado y evaluación.	36
Obtención de la concentración óptima de sustrato.	36
Determinación del volumen óptimo.	36
Reproducibilidad de las pruebas.	36
Análisis de concordancia.	36
Modificación de sustratos.	37
Sistema de almacén.	39

APENDICE

40

DISCUSION

54

CONCLUSIONES

59

BIBLIOGRAFIA.

60

RESUMEN (BIOTIPIFICACION POR MICROMETODO PARA IDENTIFICACION DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENA (EPEC) ASO CIADAS A DIARREA Y CORRELACION CON EL ENSAYO DE ADHEREN CIA A CELULAS HEP - 2.	73
---	----

INTRODUCCION

75

OBJETIVOS

76

MATERIALES Y METODOS.

Cepas del estudio.	77
Sustratos y estandarización del micrométodo.	77

Biotipificación.	78
Análisis estadístico y programa de computadora.	78
RESULTADOS	80
DISCUSION	87
CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFIA.	89

DESARROLLO DE UN SISTEMA MINIATURIZADO PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

INTRODUCCION GENERAL

La identificación bacteriana está basada principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas guían el metabolismo de las bacterias a lo largo de una de las diversas vías, que pueden detectarse a través de medios especiales - utilizados en las técnicas de cultivo. En ellos los sustratos sobre los cuales estas enzimas pueden actuar se incorporan al medio de cultivo, junto con un sistema indicador que pueda detectar ya sea la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Es posible determinar un patrón bioquímico para lograr la identificación, al seleccionar una serie de medios que detecten diferentes características metabólicas del microorganismo en estudio.

En la actualidad, se dispone de una variedad de pruebas diferenciales y de numerosos esquemas para la identificación final. Estos esquemas son sistemas que proveen los medios para identificar a todos los miembros de un determinado grupo de microorganismos, ubicándolos en un formulario en donde se enumeran todas sus características positivas y negativas. Existe un gran número de estos sistemas en uso, la mayoría se basa en uno de los cuatro criterios siguientes:

- 1) La matriz en casillero o damero.
- 2) El sistema de grupos de Edwards y Edwing.
- 3) Diagramas de ramificación
- 4) Sistemas de codificación numérica.

Sin embargo, la mayoría de las pruebas utilizadas en el mé-

todo convencional se realizan en tubo y requieren un período de incubación de dos o más días. Este sistema convencional es considerado como el método estándar, entendiendo este concepto como la reproducibilidad del método, efectuado por varios individuos sin encontrar diferencias que sean estadísticamente significativas. (60) A finales de la década de 1960 se inició la introducción de sistemas miniaturizados de identificación microbiana, con los cuales las pruebas bioquímicas de caracterización se puede llevar a cabo fácilmente, representando un importante avance tecnológico en la bacteriología clínica. En base a los trabajos de Buissiere y Nardon (9) se establecieron muchos de los requerimientos físicos y químicos de los micrométodos, los cuales son tiras de plástico conteniendo microtubos, o pozos, cada uno con sustratos deshidratados para las diferentes pruebas, los cuales serán reconstituidos agregando una suspensión bacteriana. El concepto de comercializar baterías de medios diferenciales seleccionados para la identificación de un grupo de bacterias han sido, desde luego, una evolución lógica en la microbiología. Estos equipos fueron desarrollados inicialmente para la identificación de enterobacterias debido a la frecuencia de sus aislamientos de muestras clínicas, a su crecimiento relativamente rápido y a sus reacciones bioquímicas en general bien definidas.

Los sistemas comerciales se utilizan sobre todo para diferenciar e identificar miembros de la familia Enterobacteriaceae, una familia de bacterias que exige el máximo de conocimiento y experiencia para su precisa identificación, dado que incluye un número tan grande de organismos como para dar un amplia escala de variaciones con respecto a lo normal en su actividad bioquímica.

Los bacilos gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae ocupan altos porcentajes de aislamientos en los diversos especímenes clínicos. El papel que juegan en la producción de enfermedades graves y en la resistencia a antibióticos ha llegado a incrementarse, (36) por lo que exige rapidez y precisión en el diagnóstico microbiológico.

Debido a que la identificación de las Enterobacterias requiere

re una serie compleja de pruebas bioquímicas, es posible ahorrar tiempo y evitar una identificación errónea efectuando algunas observaciones preliminares para tener seguridad de que el organismo en estudio pertenece a este grupo. Si dicho organismo es un bacilo gram negativo de otro grupo, puede ser necesario medir una serie totalmente diferente de características y las comúnmente empleadas para la identificación de las enterobacterias puede ser inadecuada o desorientadora. Con pocas excepciones, todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae presentan las siguientes características: Metabolizan la glucosa mediante fermentación, carecen de actividad de citocromo oxidasa y reducen los nitratos a nitritos.

Es posible hacer una identificación preliminar de las enterobacterias sobre la base de las características de las colonias y de las reacciones bioquímicas en medios de aislamiento primario. La identificación posterior de las especies requiere la determinación de características metabólicas adicionales que reflejan el código genético y la identidad única del organismo en estudio.

En la actualidad, hay 17 sistemas (86) que han estado en el mercado durante un tiempo suficiente; que han sido considerados como buenos, con una correlación en exactitud que va desde el 87% hasta el 96%. Muchos de éstos sistemas ya han entrado en su tercera o cuarta generación, permitiendo una mayor precisión:

- 1) API 20-E: Analytab Products, Plainview, N.Y.
- 2) Autobac 1: Pfizer Inc., Groton, Connecticut.
- 3) Automicrobic System (ASM): Vitek (Hazelwood, Mo.,) subsidiary of Mc Donnell-Douglas Corp., St Louis, Mo.
- 4) Dynatech MIC 2000: Cooke Engineering Co., Alexandria, Va.
- 5) Enterotube: Roche Diagnostics, Nutley, N.J.
- 6) Entero - Set: Fisher Scientific Co., Orangeburg, N.Y.
- 7) Enteric-Tek: Flow Laboratories, Inc., subsidiary of Flow General, Inc., Mc Clean, Va.

- 8) Minitek: Bio Quest (BBL), Cockeysville. Md.
- 9) Micro-ID: General Diagnostics, Morris Plains, N.J.
- 10) Micro-media Quand Enteric panel: Micro-media Systems, Ins., San Jose, Calif.
- 11) Microscan: American Scientific Products, McGow Park, Ill
- 12) MS-2: Abbott Laboratories, Dallas, Tex.
- 13) MORLOC System: Biotrol Co., Jamaica, N.Y.
- 14) Patho tec: General Diagnostics Division, Warner-Lambert, Morris Plains, N.J.
- 15) Repliscan: Cathra International, Ontario, Canada.
- 16) r/b Enteric: Diagnostics Research, Long Island, N.Y.
- 17) Sensititre: Gibco Laboratories, Lawrence, Mass.

Para la identificación rápida, los resultados obtenidos con las reacciones bioquímicas fueron interpretados en base a sistemas de codificación numérica utilizando programas en computadora. (6)

La sensibilidad y especificidad de las pruebas individuales en micrométodo no necesariamente son iguales a las de los métodos convencionales o estándar, pero la identificación de los organismos debe ser la misma a la de los métodos estándar. Entendiéndose como método convencional o estándar aquel sistema con un alto grado de seguridad, reproducibilidad y confiabilidad. El empleo de estos equipos en el laboratorio de microbiología es muy conveniente, ya que con su estructura compacta requieren poco espacio para su almacenamiento, son fáciles de usar y de interpretar, tienen un tiempo de conservación prolongado, el costo es menor y el control de calidad estandarizado es proporcionado por los fabricantes.

Son especialmente útiles en laboratorios que trabajan en pequeña escala, ya que ayudan a identificar bacterias que de otro modo-

pueden requerir de medios especiales donde el control de calidad es -
más difícil de mantener.

Con el uso de los micrométodos existe la posibilidad de rea-
lizar numerosas pruebas que permitan determinar un patrón bioquímico -
que correlacione con factores de virulencia bacteriana, como podría -
ser el caso de la Escherichia coli enteropatógena (EPEC) que es una de
las causas principales de diarrea, en la cual uno de los marcadores pa-
ra definir cepas patógenas es el ensayo de adherencia a células HE_p-2.

IDENTIFICACION POR CLASIFICACION NUMERICA

Se han desarrollado fórmulas matemáticas con las que los resultados de las pruebas bioquímicas son transformados en códigos numéricos, haciendo posible el uso de computadoras para ayudar en la identificación definitiva de las bacterias.

Estos sistemas de codificación numérica se basan en datos obtenidos a partir del análisis de miles de reacciones bioquímicas (62).

La identificación rutinaria de microorganismos se ha basado en métodos de probabilidad con el teorema de Bayes utilizando computadoras. El método ofrece ventajas seleccionando las mejores pruebas para una identificación definitiva (63).

Dito y colaboradores (60) desarrollaron uno de los primeros sistemas de codificación numérica para la identificación de enterobacterias. Este sistema llamado Enterobacteriaceae Numerical Coding and Identification System (ENCISE) utiliza números binarios para representar características binarias positivas y negativas; es decir; una reacción positiva se designa " 1 " y una negativa " 0 ", de esta forma los datos pueden ser fácilmente almacenados en computadora.

La mayoría de los códigos binarios han sido transformados en sistemas más simples denominados "octales".

Los equivalentes octales de las 8 combinaciones de un número binario de 3 dígitos son los siguientes:

Binario	Octal
- - -	0
- - +	1
- + -	2

-	+	+	3
+	-	-	4
+	-	+	5
+	+	-	6
+	+	+	7

Los derivados octales se conocen como número de biotipo. - Analizando los resultados de biotipos de algunas especies bacterianas, se puede hacer una mejor interpretación acerca de como la variación de las características de identificación, pueden estar relacionadas con diferencias conocidas en cuanto a la virulencia de diferentes cepas. (93, 99)

Por lo tanto, de acuerdo a las características determinadas por el sistema API 20 E y asignando a las reacciones un valor numérico, se obtiene un código de dígitos ejemplificado del modo siguiente.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
1	0	4	0	0	0	0	0	4	0
	5			0			4		

GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
0	4	1	0	4	0	0	4	0	2
4			5			4			2

OXI

-
0

5044542

E. coli

DESARROLLO DE UN MICROMETODO PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS.

RESUMEN

Los sistemas miniaturizados ofrecen al laboratorio un método conveniente y simple para la identificación rápida de las bacterias, - estos equipos han sido evaluados favorablemente en otros países por su confiabilidad y reproducibilidad. El objetivo del trabajo fue el desarrollar un micrométodo para la identificación de enterobacterias, el - cual permita una estandarización en la identificación, así como una - disminución en el tiempo y costo de su realización.

Para el desarrollo del micrométodo INNSZ se seleccionaron - 20 tipos de pruebas bioquímicas usadas en la estandarización del ma - crométodo tradicional. Se determinó la concentración óptima del sustra - to, el volumen adecuado y el sistema de secado. Se evaluó la reprodu - cibilidad de cada una de las pruebas utilizando cepas de referencia de la ATCC (American Type Culture Collection) y se hizo un análisis de concordancia utilizando 122 cepas aisladas de especímenes clínicos. - Estas fueron identificadas por tres métodos: el sistema convencional - en tubo, el micrométodo comercial API 20 E y el micrométodo desarrolla - do por nosotros. En base a los resultados se hicieron algunas modifi - caciones de las pruebas bioquímicas. Además se diseñó una placa con - microtubos.

La concentración de los sustratos se incrementó con respecto a la utilizada en el macrométodo, para obtener una reacción colorimé - trica visible a las 24 horas de incubación a 37°C.

El volumen de medio de cultivo con el que obtuvimos un aspecto aceptable posterior a la liofilización fue de 10 ul. La reproducibilidad por prueba fue del 100%. La correlación en la identificación - obtenida entre el micrométodo INNSZ y los medios convencionales en tubo fue de una K de 0.83, y con el sistema API 20 E fue de una K = .81 (p= 0.001.). Utilizando el índice de concordancia de Kappa.

Las modificaciones de la pruebas fueron realizadas en base a la estabilidad de sustratos, disponibilidad y costo de materia prima, así como por la calidad de información proporcionada para la diferenciación tanto de género como de especie. Las placas se diseñaron de tal manera que fuera posible visualizar de forma adecuada la reacción bioquímica. El micrométodo desarrollado puede ser usado para caracterizar bacterias a nivel de género y especie.

INTRODUCCION

Existen en el comercio extranjero una variedad de equipos miniaturizados con diferentes procedimientos para la identificación bacteriana como el API 20 E, Enteric Tek, Enterotube II, Entero Set, Micro ID, Minitex, r/b Enteric, etc., los cuales han sido evaluados favorablemente en otros países. En estos sistemas se emplean microtubos de plástico conteniendo sustratos deshidratados, los cuales son reconstituidos agregando una suspensión bacteriana. Su precisión ha demostrado ser comparable a la de los sistemas convencionales de identificación.

Los estudios más amplios han sido realizados en el CDC (Center for Disease Control) por Smith y col (84)., utilizando diferente número de cultivos, probando varias veces las mismas cepas con cada uno de los micrométodos comerciales y, simultáneamente, con los métodos convencionales. Estos micrométodos se han utilizado sobre todo para diferenciar e identificar miembros de las Enterobacteriaceas.

Desafortunadamente en nuestro país no es posible disfrutar de esas ventajas ya que es necesario la importación de esos productos y por consecuencia esto eleva los costos. Es por ello que se requiere que estos métodos sean desarrollados en México.

ANTECEDENTES

En las evaluaciones realizadas en el extranjero para determinar la eficacia de los diferentes sistemas de identificación, se observaron algunas ventajas de los micrométodos sobre el sistema convencional. Estas fueron: una mayor precisión del producto para identificar organismos; períodos de conservación mas prolongados, que van de 6 meses a 1 año, ya que el envejecimiento de los medios es el problema principal con los métodos convencionales; mínimo de espacio para su almacenamiento e incubación; así como facilidad en su manejo, ya que la inoculación es simple, las reacciones son generalmente claras dentro de las 24 horas, y la disponibilidad de registros y programas de computación hacen que la identificación sea fácil y exacta.

Sin embargo, es conveniente señalar algunas desventajas potenciales:

a) El costo puede ser relativamente más elevado. Para algunos laboratorios pequeños, el empleo de equipos comerciales puede ser más caro que el uso de los medios convencionales cuando no se toman en cuenta los costos adicionales del control de calidad, envejecimiento de los medios y el riesgo potencial siempre presente de contaminación que implica el uso de medios convencionales.

b) Existe el peligro de que el operador pueda considerar el equipo como un dispositivo infalible para la identificación de bacterias. Se debe recordar que un buen diagnóstico microbiológico no depende sólo de una serie de características diferenciales. Los datos bioquímicos deben integrarse con las características de las colonias (color, tamaño, textura, olor, reacciones hemolíticas), tinción de Gram y las reacciones serológicas, antes de poder efectuar una identificación final en forma confiable. El empleo o no de los sistemas comerciales de identificación y la selección de los mismos, es de preferencia personal. Antes de elegir el sistema, hay que considerar -

el que mejor se adapte a las necesidades particulares de cada laboratorio.

Cada uno de los micrométodos ha sido evaluado y comparado mostrando los siguientes resultados:

API 20 E

El equipo consta de una tira de plástico con 20 sustratos - los cuales, probados en paralelo con medios convencionales, presentan un 93% de seguridad en la identificación (95). En estudios en otros - laboratorios, utilizando un número grande de cultivos, se logró identificar correctamente al 96.4% de las muestras. (84)

Sin embargo, tras estandarizar algunas variables que afectan los resultados, como son tamaño del inóculo y el tiempo de incubación, se obtiene un porcentaje mayor de reproducibilidad 97.3% en la identificación de género y especie (15).

Existe una versión abreviada del API 20 E que es el API - 10S con 10 pruebas, el cual tiene una seguridad de 93.5% a nivel de género y un 85.6% de concordancia a nivel de especie. (76)

En 1976, en el National Institute of Health, Bethesda, - Maryland, se realizó un análisis de costos de tiempo y material requerido para el diagnóstico de Enterobacteriaceae en pruebas convencionales con 17 tubos (20 pruebas). El costo fué de \$7.98 dolares - por aislamiento identificado. Usando el API 20 E se tenía un costo - de identificación de \$3.02. Por otra parte, el uso de tubos con 10 - pruebas convencionales costó \$3.60 comparado con \$2.33 del API 10 - S, lo cual representa un incremento del 30%, mientras el número de - aislamiento correctamente identificado se aumentaba en un 3%. (77) Este sistema puede ser usado para caracterizar bacterias a nivel sub especie lo cual es muy importante para estudios epidemiológicos (74).

.. También se ha evaluado el uso de API 20 E en la identifica-

ción de bacterias gram - negativas no fermentadoras (80) y miembros de la familia Vibrionaceae con excelentes resultados. (75)

AUTOBAC I

Es un sistema en el que se usan datos de susceptibilidad a 11 agentes antimicrobianos, encontrando aproximadamente el 86% de concordancia con pruebas convencionales. (12)

AUTOMICROBIC SYSTEM (AMS)

Es un sistema automatizado con gran capacidad para identificar miembros de la familia Enterobacteriaceae, en 4 a 6 horas, con un alto índice de correlación con el sistema API 20 E hasta de un 98% -- (2, 17, 40, 46, 51, 85)

ENTEROTUBE

Contiene ocho medios con los que se pueden determinar 11 características diferenciales. Comparado con el método convencional se ha obtenido un 82% de concordancia en la identificación de bacterias entéricas. (73)

Este sistema fué rediseñado por los fabricantes, agregando una prueba que es la decarboxilación de la ornitina con lo que el porcentaje de identificación se incrementó a 89%. (90)

Técnicamente el sistema tiene ventajas sobre el API 20 E ya que la inoculación es más rápida y no es necesario un mechero (48). Pero para lograr el 85% de la identificación de las cepas estudiadas Enterotube requirió de pruebas adicionales. (47, 71)

ENTERO - SET

El sistema permite elegir entre una o dos series de pruebas bioquímicas. La primera ha sido ideada para una identificación preliminar a nivel de género y la segunda cuando se requiere una identifi-

cación final de especie. Su correlación con los medios convencionales - ha sido buena en un 89%, con un alto grado de seguridad y reproducibi - lidad. (3)

ENTERIC - TEK

El sistema permite la determinación de 14 parámetros bioquí - micos. Los estudios para evaluar el método han tenido buenos resulta - dos como lo muestra el realizado por Esias y colaboradores en el CDC. Estos investigadores probaron 270 cepas de Enterobacterias, logrando - identificar el 97.6% de las comunes y el 83.9% de las no comunes, con un 96.3% de seguridad. (30)

MINITEK

Este método es bastante flexible, pues permite al laborato - rista seleccionar las pruebas deseadas de una bacteria de 34. Según el nivel de identificación que se desee, ya sea de género o de especie. - La concordancia con sistemas convencionales ha sido reportada desde un 90% a 95%. (39, 58) Puede también ser usado para la identificación de - bacilos no fermentadores y de fermentadores oxidasa positivos. (4, 16, 22, 98)

MICRO - ID

Permite una identificación rápida en 4 horas. Consiste de 15 pruebas. Ha sido evaluado con bacterias comunes, identificando el 98%, y con poco usuales, el 76%. (10) También se ha utilizado en la identi - ficación rápida de Enterobacterias aisladas de hemocultivos con un -- 96.1% de concordancia con el sistema convencional. (27) Comparado con - el API 20 E, la correlación en la identificación va del 85.7% al 97.8%. (7, 1, 26, 13). Micro - ID es un sistema limitado a identificar sólo - Enterobacteriaceas.

MS - 2

Este sistema puede identificar varios bacilos gram-negativos dentro de 3 a 8 horas. En un estudio de validación identificó el 86% de los aislamientos correctamente. (24)

OTROS SISTEMAS

Otros micrométodos menos comunes también han sido evaluados y comparados, como el Micro-medio Quand Enteric panel, Repliscan y Sensitre, los que han mostrado una correlación que va desde el 62% hasta el 94%. (57, 87, 100)

Como pudimos observar, el sistema API 20 E ha sido considerado en otros países como el mejor de los micrométodos basado en el gran número de estudios realizados, ya que algunas variables que son consideradas importantes están bien controladas. No es necesario el criterio del técnico para elección de sustratos y con esto se elimina la variabilidad interobservador.

Es importante que el sistema desarrollado por nosotros sea validado y comparado con el sistema convencional o tradicional en tubo, ya que este método aún continúa siendo el estándar de oro.

JUSTIFICACION

El porcentaje de aislamientos de Enterobacterias en especímenes clínicos continúa incrementándose, requiriendo una identificación confiable. Dicha identificación en nuestro país no es confiable en la mayoría de las situaciones, ya que los laboratorios clínicos utilizan métodos y nomenclaturas diversas. Desgraciadamente los sistemas comerciales existentes no están al alcance de la mayoría de estos laboratorios.

ESTRATEGIA DE TRABAJO

Fases

- 1.- Estandarización de los 20 sustratos en un sistema en tubo.
- 2.- Estandarización de los mismos sustratos en micrométodo, evaluando sistemas de secado, concentración óptima de sustrato y reproducibilidad de cada uno de ellos.
- 3.- Evaluación interna, del sistema y modificación de sustratos.
- 4.- Elaboración de un código de identificación basado en un sistema por computadora.

OBJETIVOS

- 1) Desarrollar un micrométodo INNSZ basado en el sistema API 20 E.

- II) Comparar el micrométodo desarrollado con el API 20 E y el sistema de medios convencionales para la identificación de Enterobacterias.

- III) Modificar el micrométodo desarrollado, haciéndolo diferente en cuanto a pruebas y diseño de placa, con la posibilidad de que sea factible su industrialización.

MATERIALES Y METODOS.

1) Cepas de referencia.- Se utilizaron microorganismos bien caracterizados del American Type Culture Collection (ATCC).

Acinetobacter calcoaceticus 19606, Enterobacter aerogenes 13048.

Enterobacter cloacae 23355, Escherichia coli 25922, Klebsiella pneumoniae 13883, Proteus vulgaris 13315, Pseudomonas aeruginosa

27853, Salmonella typhimurium 14028, Serratia marcescens 8100

Shigella sonnei 25931 y Yersinia enterocolitica 27729. También se utilizaron aislamientos clínicos de Proteus mirabilis y Morganella morganii las que fueron identificadas en el INNSZ por métodos convencionales.

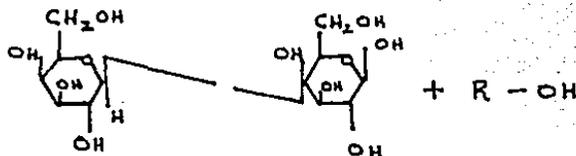
.II) Cepas problema.- Se utilizaron 122 cepas aisladas de diversos especímenes clínicos provenientes de orina, heridas, esputo, heces, vagina, sangre, cavidad abdominal, ulcera, oído y hueso. (Tabla 1.)

. III) Identificación convencional.- Cada aislamiento fue probado en el sistema de medios convencionales en tubo, utilizando una serie de 20 sustratos. (21, 68, 70).

. IV) Micrométodo API 20-E (Analytab Products, Plainview, N.Y.) Las tiras fueron usadas acorde a las instrucciones del fabricante.

. V) Micrométodo INNSZ.- Se utilizaron los siguientes 20 sustratos.

1) ONPG; para demostrar la presencia o ausencia de la enzima β galactosidasa utilizando el compuesto orgánico o-nitrofenil β -D-galactopiranosido. (19, 78, 79, 64)



a.- Solución de ONPG

ONPG (Sigma chemical Company)	0.6g
Isopropylthio-galactopiranosido (ITPG) (Sigma Chemical Company)	0.008g
Solución reguladora salina de fosfatos (PBS)	10ml

b.- Agua peptonada.

Peptona (Difco Laboratories)	0.5g
NaCl (J.T. Baker)	0.5g
PBS	10ml

Mezclar a y b

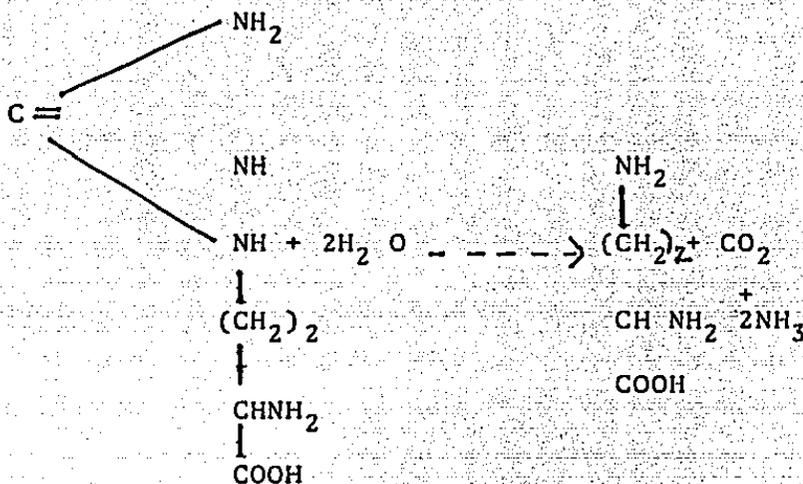
c.- ONPG	2.5ml
Peptona	7.5ml

Prueba positiva: Color amarillo

Prueba negativa: Incoloro

2) ADH para probar la capacidad enzimática de un microorganismo para hidrolizar la arginina transformándola en ornitina, -

amonio y dióxido de carbono, causando un aumento en el pH. (83)

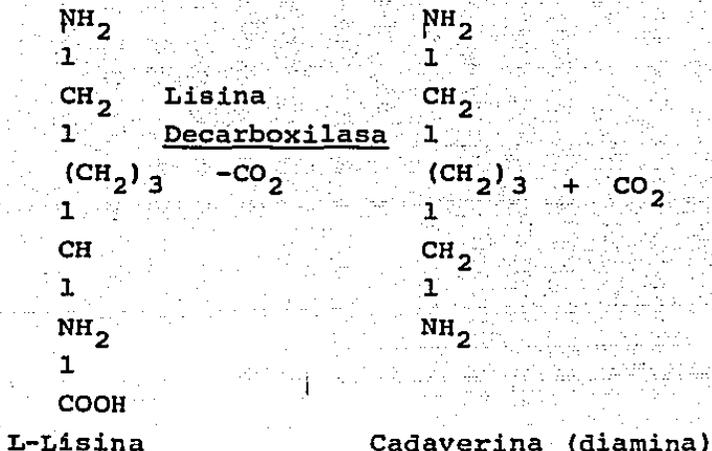


Peptona (Difco Laboratories)	0.5 g
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.5 g
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.05 g
Arginina (Sigma Chemical Company)	2.0 g
Na ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	0.1 g
Rójo de fenol (Sigma Chemical Company)	0.0006g
PBS	10 ml.

Reacción positiva: Rojo rosado.

Reacción negativa: No se produce cambio de color
(amarillo naranja).

3) LDC; Para detectar la enzima lisina decarboxilasa que -
transforma a la lisina en una amina primaria básica, que es cadaveri-
na, con la consiguiente alcalinidad. (33, 18, 8)

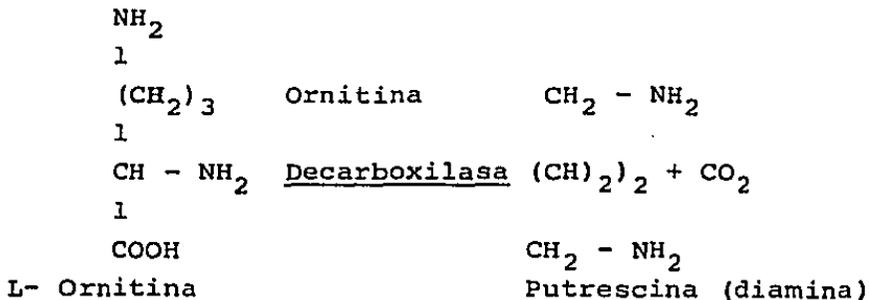


- Peptona (Difco laboratories) 0.5 gr.
- Extracto de levadura (Difco laboratories) 0.5 gr.
- Fosfato de piridoxal (Sigma Chemical Company) 0.0005 gr.
- Glucosa (Sigma Chemical Company) 0.5 gr.
- L - Lisina (Sigma Chemical Company) 2.0 gr.
- Rojo de fenol (Sigma Chemical Company) 0.0006 gr.
- PBS 10 ml.

Prueba positiva: Rojo

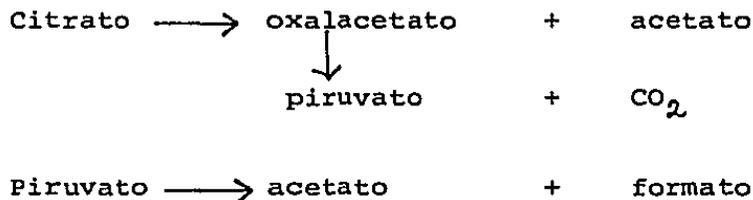
Prueba negativa: Amarillo anaranjado.

4.- ODC; para demostrar la capacidad de producir la enzima ornitina decarboxilasa con el aumento de pH provocado por la presencia de putrecina. (35)



Peptona (Difco Laboratories)	0.5 gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.5 gr.
Fosfato de piridoxal (Sigma Chemical Company)	0.0005 gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.5 gr.
L-Ornitina (Sigma Chemical Company)	2.0 gr.
Rojo de fenol (Sigma Chemical Company)	0.006 gr.
PBS	10 ml.
Reacción positiva: Rojo	
Reacción negativa: Amarillo anaranjado.	

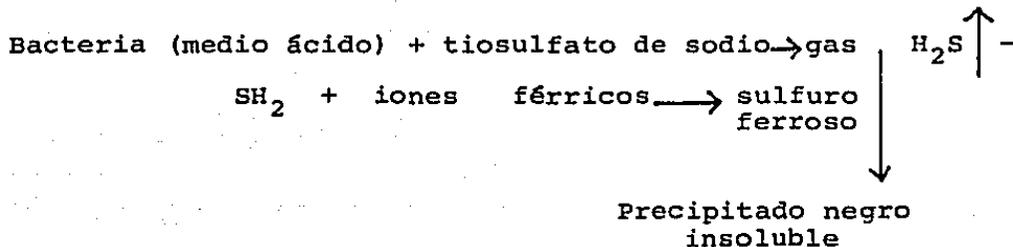
5.- CIT; para determinar la capacidad de utilizar citrato - como fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad - por la producción de Piruvato.



Citrato de sodio (J.T. Baker)	0.8 gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.02 gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.05 gr.
Monoclorhidrato de cisteina (Sigma Chemical)	0.01 gr.
Fosfato monopotásico (J.T. Baker)	0.1 gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.5 gr.
Sulfato de Magnesio (J.T. Baker)	0.02 gr.
Azul de bromotimol (Sigma Chemical Company)	0.02 gr.
PBS	10 ml.
Prueba positiva: Azul intenso	

Prueba Negativa: No hay cambio de color (verde)

6) H_2S para determinar si se libera ácido sulfhídrico (H_2S) por acción enzimática, de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible color negro. (14, 72)

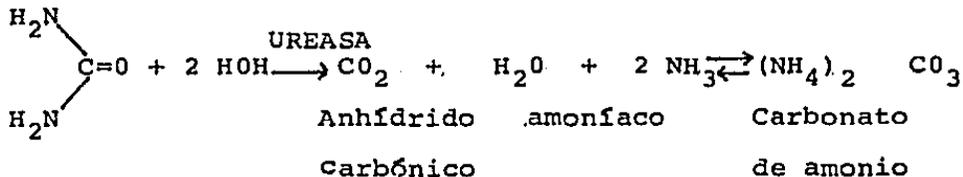


Peptona (Difco Laboratories)	2 gr.
Citrato férrico (Sigma Chemical Company)	0.025 gr.
Citrato amonio (Sigma Chemical Company)	0.025 gr.
Tiosulfato de sodio (Sigma Chemical Company)	0.08 gr.
K_2HPO_4 (J.T. Baker)	0.01 gr.
PBS	10 ml.

Positiva: Ennegrecimiento del medio.

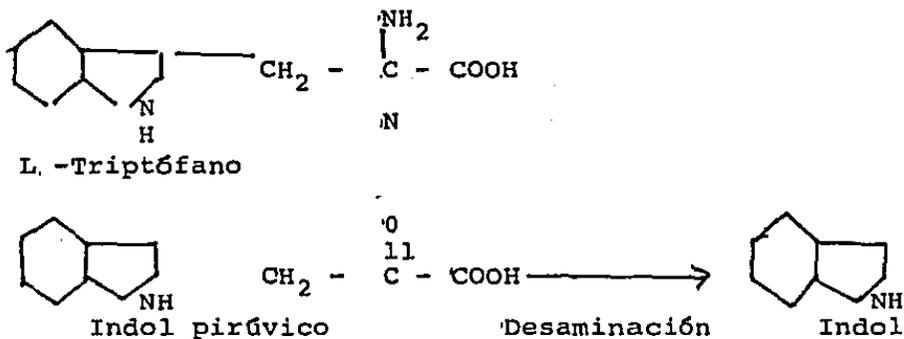
Negativa: No se observa cambio.

7) UREA; para detectar la presencia de la enzima ureasa, la cual forman dos moléculas de amoniaco a partir de la urea (23,81)



Glucosa (Sigma Chemical Caompany)	0.1 gr.
Urea (Sigma Chemical Company)	2 gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.5 gr.
K ₂ HPO ₄ (J. T. Baker)	0.2 gr.
Rojo de fenol (Sigma Chemical Company)	0.0006gr.
PBS	10 ml.
Reacción positiva: Rojo rosado	
Reacción negativa: Amarillo - naranja	

8) TDA; para demostrar la formación de ácido indolpirúvico - a partir de triptófano, por la presencia de la enzima triptófano dea - minasa. El ácido indol pirúvico produce un color café en presencia de cloruro férrico. (82)



Triptófano (Sigma Chemical Company)	0.2 gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.3 gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.5 gr.
Na ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	0.1 gr.
PBS	10 ml.

Agregar el reactivo posterior a la incubación antes de interpretar el - resultado.

Reactivo

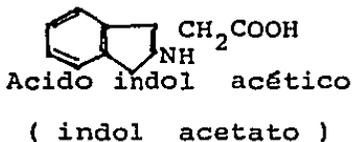
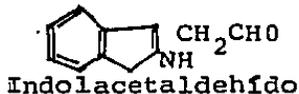
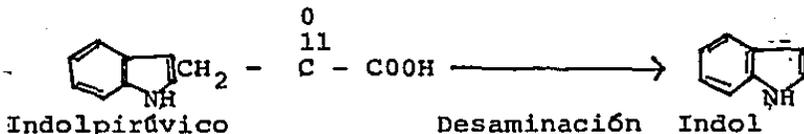
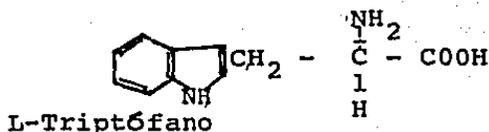
Cloruro férrico (Sigma Chemical Company)	10 gr.
Agua destilada	100 ml.

Reacción positiva: Formación de color café.

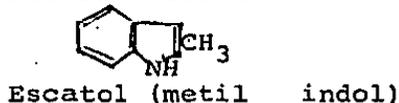
Reacción negativa: No se produce cambio; color amarillo.

9) IND; para determinar si un organismo es capaz de desdoblar la molécula de triptófano dando como resultado la formación de indol y que en presencia del reactivo de Kovack forme un complejo coloreado rosa.

IND (94, 52, 41, 88)



Decarboxilación



Triptófano (Sigma Chemical Company)	0.4 gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.5 gr.
Peptona (Difco Laboratorios)	0.5 gr.
PBS	10 ml.

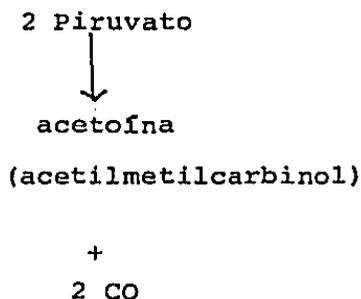
Antes de interpretar la reacción agregar el reactivo posterior a la incubación.

Reactivo

Alcohol amílico o iso	
Amílico (J.T. Baker)	150 ml.
p-dimetil aminobenzaldehído.	
(J.T. Baker)	10 gr.
HCL (J.T. Baker)	50 ml.

Prueba positiva: Un anillo rojo en la superficie del medio -
Prueba negativa: No se produce color.

10) VP; Para detectar si a partir de la fermentación de la -
glucosa la bacteria es capaz de producir un producto final neutro, el
acetilmetilcarbinol (acetofina) que con la presencia de KOH y naftol-
de un complejo de color rosa. (54, 55, 56.)



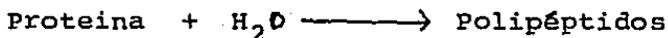
Peptona (Difco Laboratories)	0.7 gr.
Creatina (Sigma Chemical Company)	0.0 gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	2.0 gr.
K_2HPO_4 (J.T. Baker)	0.5 gr.
PBS	10 ml.

Posterior a incubación agregar los reactivos en el siguiente orden para realizar la interpretación.

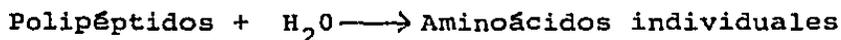
Reactivo

- a) α - naftol (Sigma Chemical Company) 5.9 gr.
alcohol etílico 100 ml.
(absoluto) (J.T. Baker)
- b) Hidróxido de potasio (J.T. Baker) 40 gr.
Agua destilada 100 ml.
- Reacción V.P. positiva: Color de rosado a rojo
Reacción V.P. negativa: Color amarillo - cobrizo.

11) GEL; Para determinar la producción de enzimas de tipo-proteolítico (gelatinasa) que licuan la gelatina liberando un producto negro difuso. (59)



Gelatinasa



Peptidasas

- a) Gelatina nutritiva (Difco) 7.5 gr.
Carbón inactivado (Sigma Chemical Company) 1.5 gr.
Agua 50 ml.

Hacer hervir la mezcla de gelatina dejar enfriar, dejar - que la gelatina se endurezca en la siguiente solución.

- b) Formaldehído (J.T. Baker) 10 ml.
Carbonato de calcio (J.T. Baker) 1 gr.
Cloruro de sodio (J.T. Baker) 0.9 gr.
Agua destilada 90 ml.

Positivo: Presenta una nube negra.

Negativo: No se observan partículas libres de carbón en el medio.

12) GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA; Para determinar la fermentación (degradación) de un carbohidrato específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido con la consecuente caída de pH.

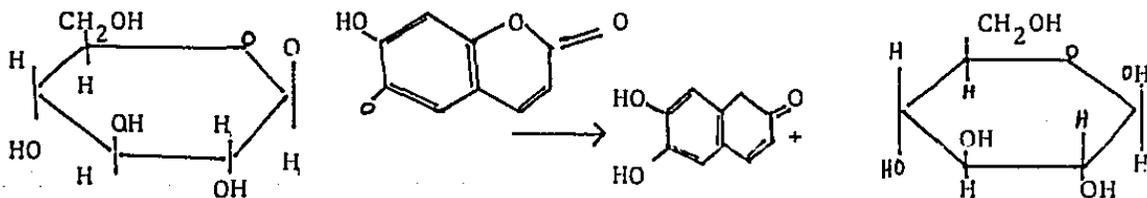
Carbohidratos: Glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa. (25, 45, 49, 69)

Peptona (Difco Laboratories)	1.0	gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.5	gr.
K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	0.003	gr.
Carbohidrato (Sigma Chemical Company)	2.0	gr.
Azul de bromotimol (Sigma Chemical Company)	0.008	gr.
PBS	10 ml.	

Positiva: Acido (amarillo)

Negativo: Alcalino (azul)

13) ESC; Para determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa. (67, 28, 50 29).



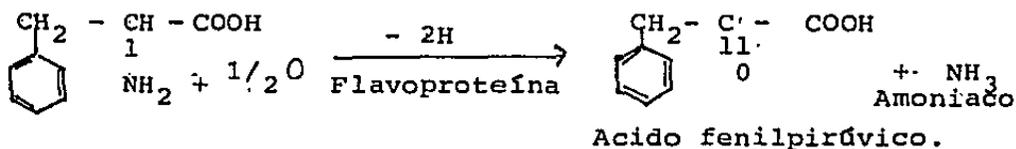
Esculina (Sigma Chemical Company)	0.5	gr.
Citrato férrico (Sigma Chemical Company)	0.025	gr.
Citrato amonio (Sigma Chemical Company)	0.025	gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.8	gr.
K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	0.01	gr.

KH_2PO_4 (J.T. Baker)	0.01 gr.
PBS	10 ml.

Prueba positiva: Presencia de un color negro.

Prueba negativa: No se produce ennegrecimiento del medio.

14) FEN; para demostrar la capacidad de una bacteria de desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico por actividad enzimática; con la consiguiente acidez, la cual se detecta con un reactivo de cloruro férrico formando un complejo de color verde. (31)

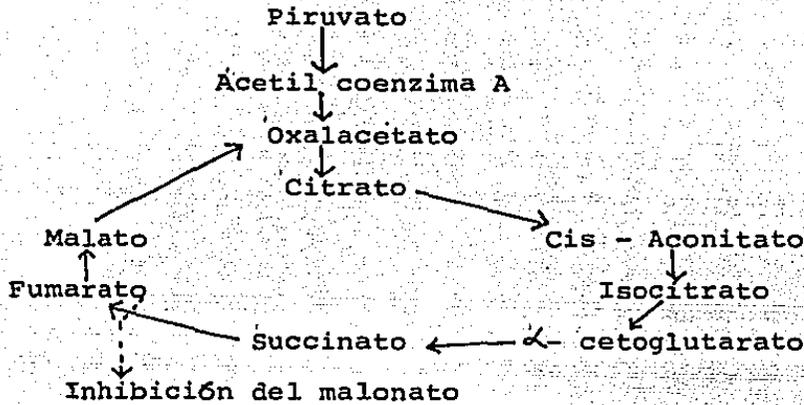


Fenilalanina (Sigma Chemical Company)	0.2 gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.3 gr.
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	0.5 gr.
Na_2HPO_4 (J.T. Baker)	0.1 gr.
PBS	10 ml.

Prueba positiva: Formación de un color verde.

Prueba negativa: No se produce cambio de color.

15) MAL; para detectar si un microorganismo es capaz de utilizar malonato de sodio como fuente de carbono, con la consiguiente alcalinidad. (65)



Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.1 gr.
Sulfato de amonio (J.T. Baker)	0.2 gr.
K_2HPO_4 (J.T. Baker)	0.06 gr.
KH_2PO_4 (J.T. Baker)	0.04 gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.2 gr.
Malonato de sodio (Sigma Chemical Company)	0.3 gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.025 gr.
Azul de bromotimol (Sigma Chemical Company)	0.0025 gr.
Prueba positiva: Color azul claro a intenso	
Prueba negativa: No hay cambio de color (verde - amarillo)	

16) ADO y RAF adonitol y rafinosa (ya mencionado el objetivo y material para los carbohidratos)

17) OXI; para determinar la presencia de la enzima citocromo oxidasa (44)

Peptona (Difco laboratories)	0.5 gr.
NaCl (J.T. Baker)	0.5 gr.
PBS	10 ml.

Acido sulfanílico (ácido para amino
benceno sulfónico) (J.T. Baker) 0.8 gr.

Acido acético al 30% (J.T. Baker) 100 ml.

Prueba positiva: color rosado a rojo - café intenso.

Prueba negativa: No desarrolló color

Esterilización de los sustratos.- Los medios de cultivo -
ONPG, ADH, LDC, ODC, URE, VP, y carbohidratos se esterilizaron por -
filtración.

CIT, H₂S, TDA, IND. Se esterilizaron en autoclave a 121 C,
por 15 min. a 15 libras de presión.

GEL. Se esterilizó con vapor circulante.

Estandarización de un macrométodo.- Se utilizaron las 20 -
pruebas del sistema API 20 E. Se probaron varias fórmulas para cada -
medio, con el fin de seleccionar la que permitiera detectar la reac -
ción en 24 horas y fuera más sensible.

Estandarización del micrométodo.- Las fórmulas más sensi -
bles obtenidas en el macrométodo se utilizaron en el desarrollo del -
sistema miniaturizado.

Método de secado.- Fueron usados dos sistemas para la des -
hidratación de los sustratos, evaporación - vacío a 60°C con una pre -
sión de 10 libras durante 2 horas y liofilización por 2 horas. (53,91)

Concentración de sustratos.- Se determinó la concentración
óptima de sustrato para obtener una reacción colorimétrica visible a -
las 24 horas de incubación a 37°C. (42)

Volumen óptimo de los sustratos para su desecación. Se de -

terminó el volumen óptimo de medio de cultivo para cada prueba, el cual permitiera un aspecto aceptable posterior a la deshidratación semejante a la formación de una película en el microtubo. Los sustratos fueron depositados en placas de poliestireno.

Con el objeto de determinar que volumen es el más adecuado para obtener una película homogénea del sustrato desecado, se llevaron a cabo pruebas con volúmenes de 100, 50, 25, 10 y 5 ul. Se obtuvo el peso seco constante de los sustratos, posterior a la deshidratación por ambos sistemas. Los sustratos fueron resuspendidos con solución salina estéril y la concentración fue leída en un espectrofotómetro (Gilford 250 Instrument).

Preparación del inóculo.- A partir de un cultivo puro, crecido en agar Mc Conckey de 24 horas, se tomaron varias colonias para preparar una suspensión en solución salina 0.85% estéril, pH 7, ajustando al estandar de Mc Farland 0.5 equivalente a 2×10^8 UFC /ml.

Reproducibilidad de las pruebas.- Cada uno de los medios ya deshidratados fueron probados 36 veces tanto con cepas control positivas como negativas.

Procedimiento para llevar a cabo la identificación.- Se prepararon placas, cada una de ellas con los 20 sustratos, las cuales fueron inoculadas con 100 ul de la cepa problema. En forma simultánea se inoculó el API 20 E; y el sistema en tubo de medios convencionales. Los medios para ADH, LDC, ODC, H₂S y URE fueron cubiertos con aceite mineral, ya que las reacciones se efectuaron mejor en condiciones anaeróbicas. Todos los equipos se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Identificación.- Después de 24 horas de incubación los resultados de las pruebas bioquímicas fueron interpretados en un código numérico en el libro de identificación del API 20 E.

VI) Modificación de los sustratos.- El número de pruebas y algunos sustratos del sistema API 20 E fueron modificados de acuerdo a factores tales como mejor información para la identificación de género y especie (89, 32, 34, 66), mayor estabilidad del sustrato, más barato y de fácil disponibilidad de materia prima. Se determinó la concentración óptima de los nuevos sustratos y se probó la reproducibilidad de cada uno de ellos con cepas control tanto positivas como negativas.

VII) Diseño de la placa.- Se utilizaron 3 diferentes series - de microtubos de poliestireno. (37)

1.- Tubos con fondo plano, con un diámetro de 7 mm. y 12 mm de longitud.

2.- Tubos con fondo en punta, diámetro de 5 mm y 4.5 mm de longitud.

3.- Tubos con fondo en forma U, con un diámetro de 5 mm y - 20 mm. de longitud.

Con una distancia entre cada uno de ellos de aproximadamente 2 mm., lo que permita que la suspensión sea inoculada con multipipeta.

VIII) Análisis estadístico.- Se utilizó el índice de concordancia de Kappa, analizando primeramente la reproducibilidad de cada uno de los sistemas con las siguientes cepas de referencia: Klebsiella Pneumoniae ATCC 134883, Enterobacter cloacae ATCC 13047, Proteus vulgaris ATCC 13315 y Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 y posteriormente a la correlación. (38,6)

En el análisis de concordancia se compararon el micrométodo INNSZ con el sistema convencional y el API 20 E.

IX) Método de conservación del producto terminado.- Las - placas se envasaron dentro de una bolsa de polipropileno aluminizado con un desecante, en este caso usamos gel de silica. Un lote se guardó en refrigeración a 4°C y otro paquete a 42°C. Se evaluó la activi-

dad de cada uno de los sustratos resuspendiendo cada semana con cepas de referencia que presentan tanto actividad positiva como negativa - (37).

RESULTADOS

a) Método de secado.- La estabilidad del sustrato se pudo lograr utilizando como método de secado la liofilización.

Con el de evaporación - vacío solo se pudo lograr un mejor aspecto siendo este muy similar a una película fina adherida a la pared del microtubo.

b) Evaluación del sistema de secado.- En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el espectrofotocolorímetro, probando la estabilidad de los sustratos utilizando ambos sistemas de secado - evaporación - vacío y liofilización.

c) Obtención de la concentración óptima del sustrato.- Para obtener una reacción colorimétrica visible a las 24 horas de incubación, en la mayoría de los casos fue necesario incrementar la concentración de sustrato al doble y en otros hasta 10 veces más a la habitualmente usada en macrométodo. (Tabla 3)

d) Determinación del volumen óptimo de medio de cultivo. - El volumen óptimo de medio de cultivo para obtener un aspecto similar a una película posterior a la deshidratación fue de 10 ul. Con los otros volúmenes probados, el sustrato deshidratado se esparcía en todo el microtubo.

e) Reproducibilidad de las pruebas.- Durante la estandarización de todos los sustratos probados con microorganismos de referencia de la ATCC encontramos un 100% de reproducibilidad para cada uno de ellos, probados 18 veces. La reproducibilidad de los dos sistemas de identificación utilizando cepas de referencia mostraron un valor de $K=.85$ (Tabla 4)

Comparando el sistema de medios convencional (A) con el micrométodo INNSZ (C) encontramos un índice de concordancia de $Kappa = 0.82$ con un valor de $p = 0.001$ (Tabla 5)

El sistema API 20 E (B) y el sistema miniaturizado INNSZ (C) mostró una concordancia de $K=0.81$ y una $p = 0.001$ (Tabla 6)

II.- Modificación de sustratos.- De acuerdo a varios factores, como información proporcionada para la diferenciación de género y especie, disponibilidad y costo de materia prima, y estabilidad del sustrato se realizaron algunas modificaciones.

Se sustituyeron algunos sustratos y se incluyeron otros como en el caso de triptófano, el cual fué sustituido por fenilalanina ya que, independientemente de identificar la tribu Proteae, nos ayuda a diferenciar la especie de Enterobacter agglomerans y Enterobacter sakazaki que muestran actividad positiva comparados con las otras especies de Enterobacter.

Amigdalina es un sustrato cuya disponibilidad es difícil por ser una sustancia carcinogénica y que prácticamente la información que proporciona en la diferenciación tanto de género como de especie no depende exclusivamente de esta prueba. Esto último también es aplicable para melobiosa.

La gelatina es un sustrato que presenta inestabilidad en su actividad y que puede ser sustituido por un carbohidrato como rafinosa que nos diferencia principalmente las especies de Serratia, siendo S. marcenses negativa, S. liquefaciens y S. rubidaea positiva. Además es útil en la especiación de el género Citrobacter, siendo C. amalonaticus y C. freundii positivo y C. diversus negativo. En la diferenciación de especie en este género también se requiere de otras pruebas como utilización de malonato y fermentación de adonitol; este último es una prueba clave en la diferenciación de especie de Providencia, no mostrando actividad sobre dicho sustrato P. stuarti pero si P. rettgeri. Malonato es un sustrato que proporciona aún más información en la diferenciación de especie del género Klebsiellae y Serratia, siendo una prueba muy importante en la clasificación de Salmonella y Arizona.

La esculina otro sustrato más que contribuye en la agrupación de las diferentes especies de *Enterobacter* y *Serratia*, es una prueba importante en la diferenciación de *Yersinia enterocolitica* que no muestra actividad sobre dicho sustrato y de *Yersinia frederiksenii* que da una reacción positiva.

Las pruebas de nitratos y oxidasa son demasiado importantes en la detección de dos características elementales de la familia Enterobacteriaceae.

La determinación de la concentración óptima de sustrato para obtener reacción colorimétrica visible a las 24 horas con los sustratos introducidos al nuevo sistema de pruebas, mostró resultados similares a los ya mencionados para las pruebas anteriores (tabla 7), con un 100% de reproducibilidad con las cepas control. Probadas 18 veces.

III) Diseño de la placa.- Los microtubos con fondo en forma de U mostraron los mejores resultados, ya que permitían observar toda la reacción a lo largo del tubo.

En los tubos con diámetro de 7 mm. y fondo plano no fué posible visualizar la reacción en su totalidad por el diámetro tan grande y el volumen tan pequeño que se usa.

La última serie de microtubos probados, con fondo en punta, mostró varias desventajas, como la formación de burbujas en el momento de la resuspensión del sustrato. (Fig. 1.)

El orden de los sustratos de nuestro sistema desarrollado ya modificado es el siguiente: Adonitol, arabinosa, glucosa, inositol, manitol, rafinosa, ramnosa, sacarosa, sorbitol, arginina, lisina, ornitina, fenilalanina, indol, esculina, H₂S, urea, ONPG, VP, utilización

de citrato, utilización de malonato, nitratos, oxidasa. El tubo número 24 se empleará para el control de crecimiento. Este orden solo facilita el trabajo del laboratorista.

Sistema de almacén.- Analizando la estabilidad de los sustratos, a través del tiempo, hemos podido observar que 19 de 20 de los sustratos, almacenados en refrigeración aún muestran estabilidad a los 10 meses, excepto la gelatina. (Tabla 8) Sin embargo, en las mismas condiciones de almacén, pero a 42°C, se observó que la actividad de las bacterias sobre algunos sustratos como lisina, ornitina, arginina, glucosa, melobiosa, arabinosa y ramnosa no pudo ser determinada después de 2 meses de almacenamiento a esta temperatura. (Tabla 9)

ANALISIS DE COSTOS (Micrométodo)

Materia prima

Prueba	Precio por prueba
Adonitol	\$ 45.18
Arabinosa	10.28
Glucosa	1.36
Inositol	4.21
Manitol	1.90
Rafinosa	15.20
Ramnosa	45.15
Sacarosa	1.77
Sorbitol	1.40
Arginina	3.20
Lisina	1.73
Ornitina	7.50
Fenilalanina	0.90
Indol	3.27
Esculina	11.00
Acido sulfhidrico.	1.87
Urea	0.75
ONPG	20.50
V-P	7.17
Citrato	1.35
Malonato	1.00
Nitratos	1.45
Oxidasa	1.57
Placa de poliestireno	10.00
<u>Total</u>	<u>\$ 199.75</u> por placa

Produciendo 5 000 placas por día Total \$ 1 000 000 .00 por día.

Mano de obra

Personal 5 personas Salario mínimo \$ 6 240.00 por día
Total \$ 31 200.00 por día.

Gastos indirectos

Energía eléctrica \$ 2 667.00 por día
Renta de local 16 667.00 " "
Agua 340.00 " "

Total \$ 19 674.00 por día

Materia prima \$ 1 000 000.00
Mano de obra 31 200.00
Gastos indirectos 19 674.00
Total de gastos por día 1 050 874.00

PRECIO POR PLACA \$ 210.17

Inversión inmediata aproximada \$ 100 000 000.00

Costo de micrométodo importado API 20 E = \$ 4.5 (dolares).

ANALISIS DE COSTOS (Macrotecnica)

Materia prima

Prueba	Precio por prueba
Adonitol	\$ 684.5
Arabinosa	155.0
Glucosa	41.2
Inositol	63.25
Manitol	28.50
Rafinosa	230.30
Ramnosa	684.0
Sacarosa	26.30
Sorbitol	21.20
Arginina	48.40
Lisina	39.0
Ornitina	31.95
Fenilalanina	27.27
Indol	12.50
Esculina	162.0
H ₂ S	12.5
Urea	22.72
ONPG	621.21
V-P	217.2
Citrato	29.0
Malonato	30.30
Nitratos	43.93
Oxidasa	1.57
Tubo de vidrio (1)	194.0
Total por juego de pruebas	<u>\$ 7 307.80</u>

Elaborando 100 juegos por día Total \$ 730 780.00

Mano de obra

Personal

5 personas Salario mínimo \$ 6 240.00

Total \$ 31 200.00 por día

Gastos indirectos

Energía eléctrica \$ 2 667.00 por día

Renta del local 16 667.00 " "

Agua 340.00 " "

Total \$ 19 674.00 por día.

Materia prima \$ 730 780.00

Mano de obra 31 200.00

Gastos indirectos 19 674.00

Total de gastos por día \$ 781 654.00

Costo por juego de pruebas \$ 7 816.00

ADO
ARA
GIU
INO
MAN
RAF
RAM
SAC
SOR
ARG
LIS
ORN
FEN
IND
ESC
H₂S
URE
ONP^G
VP
CIT
MAL
NIT
OXI

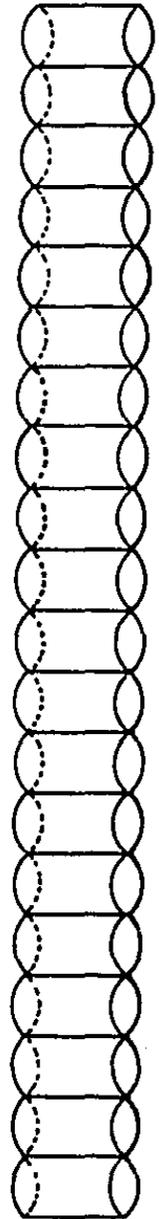
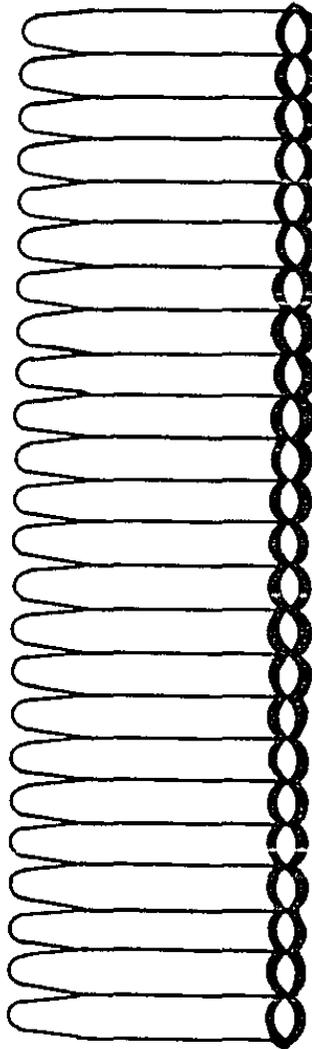
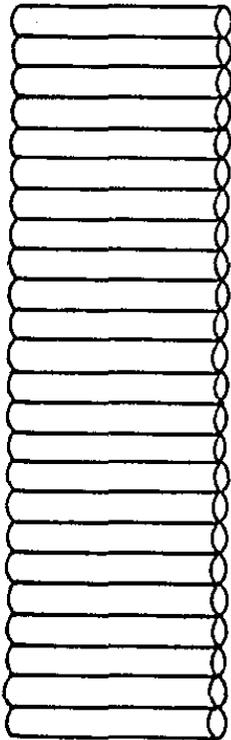


Fig 1. - DISEÑO DE LOS DIFERENTES JUEGOS DE MICROTUBOS

ORGANISMO	No. DE AISLAMIENTOS IDENTIFICADOS
<u>Escherichia coli</u>	28
<u>Shigella sonnei</u>	1
<u>Shigella dysenteriae</u>	1
<u>Citrobacter freundii</u>	12
<u>Salmonella spp</u>	7
<u>Salmonella tyhpi</u>	6
<u>Arizona</u>	1
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	7
<u>Klebsiella oxytoca</u>	5
<u>Klebsiella ozaenae</u>	1
<u>Enterobacter aerogenes</u>	2
<u>Enterobacter cloacae</u>	7
<u>Enterobacter sakazaki</u>	1
<u>Serratia marcescens</u>	4
<u>Serratia liquefaciens</u>	8
<u>Serratia odorifera</u>	2
<u>Proteus mirabilis</u>	10
<u>Proteus vulgaris</u>	1
<u>Morganella morganni</u>	7
<u>Providencia rettgeri</u>	2
<u>Edwarsiella tarda</u>	1
<u>Yersinia enterocolitica</u>	8

TABLA 1.- RESUMEN DE 122 AISLAMIENTOS CLINICOS DE ENTEROBACTERIACEAE IDENTIFICADOS EN ESTE ESTUDIO.

PLACA	HUMEDAD (PESO) *	ABSORBANCIA DEL SUSTRATO HIDRA- TADO +	REACCION DEL SUSTRATO ++
SUSTRATO LIQUIDO	4.3940	0.018	N.D.
SUSTRATO DESHIDRATADO (LIOFILIZACION)	4.0510	0.018	100
SUSTRATO DESHIDRATADO (EVAPORACION-VACIO)	4.0100	0.000	0

TABLA 2.- EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LOS SUSTRATOS POSTERIOR AL METODO DE SECADO.

* GRAMOS

+ UNIDADES DE ABSORBANCIA LEIDAS A 450 nm.

++ LA REACCION DEL SUSTRATO SE MIDIO POR LA CAPACIDAD DE SER UTILIZADO POR CEPAS DE REFERENCIA, MOSTRANDO POSITIVIDAD DADA EN PORCENTAJE.

N.D. NO DETERMINADA.

CONCENTRACION DEL SUSTRATO

PRUEBA	MACROMETODO+	MICROMETODO+
ONPG	0.2%(+)	0.2%(+)
AMINOACIDOS (ADH, LDC, ODC, TDA)	1.0%(+)	1%(-) 2%(+)
CIT	0.3%(+)	0.3%(-) 0.6%(-) 0.9%(+)
H ₂ S	0.008%(+)	0.008%(-) 0.016%(-) 0.032%(-) 0.64%(-) 0.08%(+)
URE	0.8%(+)	0.8%(-) 2%(+)
IND	1.0%(+)	1%(FALSAS +) 0.4%(VERDADERAS +)
VP	1.0%(+)	1%(-) 2%(+)
GEL	15%(+)	15%(-) 10%(-) 5%(-) 1%(+)
Carbohidratos (GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA)	1%(+)	1%(-) 2%(+)

TABLA 3.- CONCENTRACION OPTIMA DE SUSTRATO PARA OBTENER UNA REACCION COLORIMETRICA VISIBLE A LAS 24 HRS. DE INCUBACION A 37°C

*CADA PRUEBA SE REALIZO 18 VECES.

+LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO PARA LA REACCION BIOQUIMICA ESTA DADA EN, POR CIENTO.

+EN PARENTESIS SE MUESTRA EL RESULTADO POSITIVO (+) O NEGATIVO (-) DE LA REACCION.

E. AEROGENES
 K. PNEUMONIAE
 P. AERUGINOSA
 P. VULGARIS

	E. AEROGENES	K. PNEUMONIAE	P. AERUGINOSA	P. VULGARIS	NO IDENTIFICADA.
MICROMETODO	5	5	5	4	1
INNSZ	5	5	5	4	1

TABLA 4.- REPRODUCIBILIDAD DE LOS DOS SISTEMAS MINIATURIZADOS EN LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS, PROBADAS 5 VECES CON 4 CEPAS DE REFERENCIA.

INDICE DE KAPPA K=0.85 P =0.001

	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>C. freundii</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>S. typhi</i>	Arizona	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazaki</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. odorifera</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. morganni</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	No identificado.
<i>E. coli</i>	28																						
<i>S. sonnei</i>	0																						1
<i>S. dysenteriae</i>		0																					1
<i>C. freundii</i>			12																				1
<i>Salmonella</i> spp				6																			1
<i>S. typhi</i>					6																		1
Arizona						1																	1
<i>K. pneumoniae</i>							1	7			1												1
<i>K. oxytoca</i>									5														1
<i>K. ozaenae</i>										1													2
<i>E. aerogenes</i>											7												2
<i>E. cloacae</i>										1		0		1									1
<i>E. sakazaki</i>													1										1
<i>S. marcescens</i>									1					4	3								1
<i>S. liquefaciens</i>														3	4								1
<i>S. odorifera</i>																1							1
<i>P. mirabilis</i>																	9						1
<i>P. vulgaris</i>																	1						1
<i>M. morganni</i>																			7				1
<i>P. rettgeri</i>																				2			1
<i>Edwardsiella tarda</i>																							1
<i>Y. enterocolitica</i>																							8

TABLA 5.- CONCORDANCIA ENTRE EL MACROMETODO (A) Y EL MICROMETODO
 INNSZ (C).
 INDICE DE KAPPA $K=0.82$ $p=0.001$

	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>C. freundii</i>	Salmonella spp	<i>S. typhi</i>	Arizona	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazaki</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. odorifera</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>M. morganni</i>	<i>P. rettgeri</i>	Edwardsiella tarda	<i>Y. enterocolitica</i>	No identificado		
<i>E. coli</i>	0																							1	
<i>S. sonnei</i>		0																							1
<i>S. dysenteriae</i>			0																						1
<i>C. freundii</i>				10			1																		1
Salmonella spp					6																				1
<i>S. typhi</i>						5																			1
Arizona				1			2																		1
<i>K. pneumoniae</i>								8																	1
<i>K. oxytoca</i>									5																1
<i>K. ozaenae</i>										1															1
<i>E. aerogenes</i>											6														3
<i>E. cloacae</i>												0		2											3
<i>E. sakazaki</i>													1												1
<i>S. marcescens</i>														4	5										1
<i>S. liquefaciens</i>														4	3										1
<i>S. odorifera</i>																1									1
<i>P. mirabilis</i>																	8								1
<i>P. vulgaris</i>																		1							1
<i>M. morganni</i>																			7						1
<i>P. rettgeri</i>																					3				1
Edwardsiella tarda																						1			1
<i>Y. enterocolitica</i>																									8

TABLA 6.- CONCORDANCIA ENTRE EL MICROMETODO API 20 E (B) Y EL MICROMETODO INNSZ (C)
INDICE DE KAPPA K=0.81 p= 0.001

. C O N C E N T R A C I O N D E L S U S T R A T O

PRUEBA	MACROMETODO	MICROMETODO		
ADONITOL	1 (+)	1 (-)	2 (+)	
ESCULINA	0.5 (+)	0.5 (-)	1 (+)	
FENILALANINA	1 (+)	1 (-)	2 (+)	
UTILIAZACION MALONATO	0.3 (+)	0.3 (-)	0.6 (-)	0.9 (+)
NITRATOS	0.1 (+)	0.1 (+)		
RAFINOSA	1 (+)	1 (-)	2 (+)	

TABLA 7.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE NUEVOS SUSTRATOS PARA OBTENER UNA REACCION COLORIMETRICA VISIBLE A LAS 24 H. de incubacion a 37°C.

+LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO PARA LA REACCION BIOQUIMICA ESTA DADO EN POR-CIENTO.

	M E S E S					
	0	2	4	6	8	10
SUSTRATO ONPG	100%	100%	100%	100%	100%	100%
AMINOACIDOS (LDC, OCD, ADH, TDA)	100%	100%	100%	100%	100%	100%
IND, URE, CIT, H ₂ S, V.P.	100%	100%	100%	100%	100%	100%
GEL	100%	100%	33.3%	66.6%	100%	66.6%
CARBOHIDRATOS (GLU, MAN, INO, SAC, MEL, AMY, ARA)	100%	100%	100%	100%	100%	100%

TABLA 3.- ESTABILIDAD DE LOS SUSTRATOS EN CONDICIONES IDEALES DE ALMACENAMIENTO*

* REFRIGERACION 4°C, BOLSAS DESECANTES.
 LOS SUSTRATOS FUERON PROBADOS CADA SEMANA CON CEPAS DE REFERENCIA.
 EL VALOR INDICADO REPRESENTA EL % DE POSITIVIDAD DE NUEVE PRUEBAS.
 REALIZADAS POR SUSTRATO.

PRUEBA	M E S E S				
	0	1	2	3	4
ONPG	100%	100%	100%	100%	100%
AMINOACIDOS (LDC, OCD, ADH)	100%	100%	N.D.	N.D.	N.D.
IND, TDA, URE, CIT, H ₂ S	100%	100%	100%	100%	100%
V.P.	100%	100%	N.D.	N.D.	N.D.
GEL	100%	100%	66.6%	33.3%	33.3%
GLU, MEL, ARA, RHA	100%	100%	N.D.	N.D.	N.D.
SOR	100%	100%	100%	100%	F.P.66.6% N.D.
SAC, INO, AMY	100%	100%	100%	100%	100%

TABLA 9.- ESTABILIDAD DE LOS SUSTRATOS ALMACENADOS EN ENVASES ADECUADOS * A 42°C.

N.D. NO DETERMINADO.

F.P. FALSAS POSITIVAS.

* BOLSAS DE PROPILENO ALUMINIZADO Y DESECANTE GEL DE SILICA
LOS SUSTRATOS FUERON PROBADOS CADA SEMANA CON CEPAS DE REFERENCIA.
EL VALOR INDICADO REPRESENTA EL % DE POSITIVIDAD DE NUEVE PRUEBAS
REALIZADAS POR SUSTRATO.

DISCUSION

En años recientes se han desarrollado algunos sistemas miniaturizados para sustituir a los ya conocidos para la identificación bacteriana. Dentro de estos sistemas, que han sido ampliamente evaluados y comparados entre sí, se destaca el sistema API 20 E por su alta reproducibilidad y confiabilidad. Por tal motivo nosotros elegimos este micrométodo para tratar de reproducirlo.

Una de las principales ventajas con que se cuenta al utilizar micrométodos es la conservación de los sustratos por largos períodos ya que se encuentran deshidratados. Se conoce un gran número de técnicas de secado, pero para nuestros fines y dadas las características del micrométodo se decidió ensayar con evaporación vacío y liofilización; al comparar tales técnicas se observó que la liofilización era la que redituaba mejores resultados, esto confirma una vez más que este método continúa siendo el de elección para la deshidratación de medios de cultivo. (42)

Un punto importante de los sistemas miniaturizados es el poder leer la reacción bioquímica después de 24 horas de incubación, lo que se logró incrementando las concentraciones de cada uno de los sustratos con respecto a las utilizadas en macrométodo.

Uno de los problemas con el que nos enfrentamos durante el montaje del micrométodo fué tratar de mejorar el aspecto obtenido después de que los sustratos eran deshidratados, ya que éste no era to -

talmente aceptable. Se pensó en la posibilidad de utilizar un encapsulante, ya fuera de tipo natural o sintético, pero esto nos llevaría a un nuevo problema, podría suceder que las bacterias en estudio no tuvieran la capacidad de degradar tal encapsulante y por ende no hidrolizarían el sustrato, con lo que obtendríamos resultados falsos negativos. (43) Por lo que el mejoramiento del aspecto sólo puede lograrse optimizando el proceso de deshidratación, con un vaciado tipo aspersión y congelación inmediata, obteniendo un aspecto semejante a una película. Cabe hacer notar que tales procesos sólo pueden efectuarse a nivel industrial. (53, 91)

Nuestro método se diseñó para la identificación de aislamientos de la Enterobacteriaceae, por lo que será necesario en estudios posteriores utilizar otro sistema para bacterias no fermentadoras.

Revisando los datos de control de calidad de nuestro sistema se pudo observar un excelente grado de reproducibilidad, cuando el sistema es inoculado con un Mac Farland No. 0.5. El porcentaje de discordancia con el método convencional estándar y el API 20 E fue muy pequeño $K=0.81$ y no significativo; semejante con otros estudios en los que se ha comparado API 20 E con el macrométodo por lo que se puede decir que cuando menos es tan seguro en su reproducibilidad como el API 20 E. (74, 84, 95)

Uno de los objetivos del proyecto y quizá el más importante fué no sólo reproducir el Sistema API 20 E, sino modificarlo de acuerdo a nuestras necesidades.

Varios fueron los factores que se tomaron en cuenta para modificar el micrométodo original de API 20 E, algunos fueron sustituidos y otros incluidos considerando además las condiciones imperantes en los laboratorios de nuestro país. Los nuevos sustratos ayudan sobre todo en forma importante a diferenciar las diversas especies de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia* microorganismos de gran interés que deben ser identificados con precisión por ser algunos de los principales causantes de infecciones a nivel nosocomial. (32, 34)

En el micrométodo desarrollado se incluyeron algunas pruebas claves para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* como la prueba de nitratos y oxidasa, por considerarlas esenciales.

Algunas de las sustancias utilizadas en la elaboración de los medios de cultivo no son producidas en México y es necesario importarlas. Sin embargo a pesar de este inconveniente, el desarrollo de estos sistemas en nuestro medio son ventajosos.

Nos propusimos diseñar un soporte que nos permitiera hacer una lectura individual y visualizar la reacción en su totalidad y que al mismo tiempo pudiera leerse en espectrofotómetro automatizado. Esto se logró utilizando placas de poliestireno transparente con 24 microtubos de 0.5 cm. de diámetro y 2 cm. de longitud cada uno; además, en esta serie de microtubos está incluido uno cuyo propósito es controlar el crecimiento de el microorganismo problema. Esto es importante para eliminar la posibilidad de registrar reacciones falsas negativas que pueden ser interpretadas de esta forma al no existir desarrollo de la bacteria.

El desarrollo de los sistemas de identificación miniaturizados es sumamente importante y conveniente en nuestro país, ya que su uso no sólo se limita a los laboratorios clínicos, sino también tiene aplicación en las industrias alimentaria y farmacéutica para el control de calidad por lo que estos métodos, pueden utilizarse en cualquier laboratorio que requiera la identificación de Enterobacterias.

Por otro lado, no sólo es posible identificar Enterobacterias por estos sistemas, sino que se han empleado en la identificación y caracterización de otros grupos bacterianos como son: cocos gram positivos, bacilos gram negativos no fermentadores, anaerobios, levaduras y algunos microorganismos fastidiosos como Neisserias, Haemophilus, etc. También se han utilizado en la definición de biotipos y la identificación de algunos microorganismos especiales.

Hasta ahora los sistemas miniaturizados han contado con la computadora, un gran aliado que les ha permitido incrementar su campo de acción y su desarrollo, con la elaboración de claves para la identificación basada en evaluaciones matemáticas.

La creación de modelos matemáticos hace posible determinar las mejores pruebas con el más alto poder de diferenciación de acuerdo con aproximaciones probabilísticas.

El siguiente paso de este proceso es la industrialización del micrométodo desarrollado, para lo que se requiere la elaboración de un libro de identificación mediante la prueba de miles de cepas de microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

Posteriormente debe efectuarse una fase de valoración del sistema comparándolo con el método convencional y el API 20 E, y otra última que sería una fase abierta que se llevaría a cabo en varios laboratorios de Microbiología Clínica.

CONCLUSIONES

- 1) Fué posible reproducir en micrométodo el sistema API 20 E
- 2) La identificación de los aislamientos probados en este estudio fué confiable tanto a nivel de género como de especie con un 82%.
- 3) Los resultados de este estudio indican que el micrométodo-INNSZ es comparable en forma favorable con los sistemas convencional y API 20 E en la identificación de Enterobacteriaceae.
- 4) Es factible que estos equipos puedan ser desarrollados en nuestro país para su industrialización.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aldridge, K.E., Gardner, B.B., Clarck. S.J.: Comparison of Micro ID. API 20 E, and Conventional Media Systems in Identification - of Enterobacteriaceae. 1978. J Clin Microbiol., 7:507.
- 2.- Aldridge, C., Jones, P.W., Gibson, S.: Automated Microbiological detection / Identification System. 1977. J. Clin Microbiol., 6:400.
- 3.- Aldridge, K., and Hodges, R.L.: Correlation studies of Entero - Set 20, API 20 E and Conventional Media Systems for Enterobacteria ceae Identification. 1981. J Clin Microbiol., 13:120.
- 4.- Appelbaum, P.C., Stavitz, J., Bentz, M.S. and von Kuster, L.C.: Four methods for identification of gram - negative non fermenting rods: organisms more commonly encountered in clinical specimens.- 1980. J. Clin Microbiol., 12: 271.
- 5.- Bachmann, B., and Weaver, R.H.: Rapid Microtechnics for identifi- cation of cultures. V. Reduction of nitrates to nitrites. 1951. Am J Clin Pathol., 21:195.
- 6.- Baer, H., and Washington, L.: Numerical Diagnostic Key for the - Identification of Enterobacteriaceae. 1972. Appl Microbiol., 23: 108.
- 7.- Barry, A.L., and Badal, R.E.: Rapid Identification of Enterobac-

teriaceae with the Micro - ID System versus API 20 E and Conventional Media. 1979. J. Clin Microbiol., 10:293.

- 8.-Belliveau, R. R., Grayson, J.W., and Butler, T.J.: A rapid, simple method of Identifying Enterobacteriaceae. 1968. Am J Clin Pathol., 50:126.
- 9.- Biussiere, J., et Nardon, P.: Micromethode d'identification des bacteries. 1968. Ann Inst Past., :218.
- 10.- Blazevic, W. J., Rhoden, D.L., Esaias, A.O.: Evaluation of the Modified Micro - ID System for identification of Enterobacteriaceae. 1979. J Clin Microbiol., 9:605.
- 11.- Borchardt, K.A.: Scheme for screening and identifying and other gram negative bacteria using reagent - impregnated strips. 1968. Am J Clin Pathol., 50:129.
- 12.- Buck, G.E., Sielaff, B.H., Boshard, R., and Matren, J.M.: Automated, rapid Identification of bacteria by Pattern Analysis of Growth Inhibition Profiles Obtained with Autobac 1. 1977. J Clin Microbiol., 6:46.
- 13.- Bueshing, W.J., Rhoden, D.L., Esaias, A.O.: Evaluation of the Modified Micro - ID System for identification of Enterobacteriaceae. 1979. J Clin Microbiol., 10:454.
- 14.- Bulmash, J.M., and Fulton, M.D.: Discrepant test for hydrogen sulfide. 1964. J Bacteriol., 88:1813.
- 15.- Butler, D.A., Lobregat, C.M., and Gavan, T.: Reproducibility of the Analytab (API 20 E) System. 1975. J Clin Microbiol., 2:322.

- 16.- Burdash, N.M., Bannister, E.R., Manos, J.P., and West, M.E.: A - comparison of four commercial systems for the identification of - non fermentative gram - negative bacilli. 1980. Am J Clin Pathol., 73:564.
- 17.- Burdash, N.M. Tets. G., West, M.E.: Evaluation of an Automated - Computerized System (Auto Microbic System for Enterobacteriaceae Identification. 1981. J Clin Microbiol., 13:331.
- 18.- Carlquist, P.R.: A Biochemical test for separating Paracolon Gro - ups. 1955. J Bacteriol., 71:339.
- 19.- Cohen, G.N. and Monod, J.: Bacterial permease. 1957. Bacteriol - Rev., 21:169.
- 20.- Conn. H.J.: On the detection of nitrate reduction. 1936. J Bac - teriol., 31:225.
- 21.- Cowan, S.T., and Steel, K.J.: Manual for the Identification of - Medical Bacteria. Cambridge: Cambridge University Press. 1982.
- 22.- Chester. B., and Cleary, T.J.: Evaluation of the Minitex system for the identification of non fermentative and non enteric fer - mentative gram - negative bacteria. 1980. J Clin Microbiol., 12: 509.
- 23.- Christensen, W.B.: Urea descomposition as a means of differentia - ting Proteus and paracolon cultures from each other and from -- each other and from Salmonella and Shigella types. 1946. J. Bac - teriol., 52:461.

- 24.- Di Persio, J.R., Dyke, J.W., and Vannest, R.D.: Evaluation of the Updated MS - 2 Bacterial Identification System in Comparison with the API 20 E System. 1983. J Clin Microbiol., 18:128.
- 25.- Du Pree, M.R., Wilcox, G.: Bromothymol Blue and Carbohydrate Sensitive Plating Media. 1977. J Clin Microbiol., 6:343.
- 26.- Edberg, S.C., Atkinson, B., Chambers, C., Moore, H.M.: Clinical - Evaluation of The Micro - ID, API 20 E, and Conventional Media - Systems for Identification of Enterobacteriaceae. 1979. J Clin - Microbiol., 10:161.
- 27.- Edberg, S.C., Clare, D., Moore, H.M., and Singer, J.M.: Rapid - Identification of Enterobacteriaceae from blood culture with the Micro - ID System. 1979. J Clin Microbiol., 10:693.
- 28.- Edberg, S.C., Pittman, S., and Singer, J.M.: Esculin Hydrolysis by Enterobacteriaceae. 1977. J. Clin Microbiol., 6:111.
- 29.- Edberg, S.C. Gam, K., Bottenbley, C.J., and Singer, J.M.: Rapid - Spot Test for the Determination of Esculin Hydrolysis. 1976. J - Clin Microbiol., 4:180.
- 30.- Esaias, A.O., Rhoden, D.L., Smith, P.B.: Evaluation of the Ente - ric Tek system for identifying Enterobacteriaceae. 1982. J Clin Microbiol., 15:419.
- 31.- Ewing, W.H., Davis, B.R., and Reaves, R.W.: Phenylalanina and - malonate media and their use in enteric bacteriology. 1957. Public Health Lab., 15:153.

- 32.- Ewing, W.H.: Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York. 1986.
- 33.- Falkow, S.: Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of Salmonella and Shigellae. 1958. Am J Clin Pathol., 29,598.
- 34.- Farmer III, J.J., Davis, B.R. Hickman - Brennen, F.W. Mc Whorter, A.: Biochemical Identification of New Species and Biogrups of Enterobacteriaceae isolated from Clinical Specimens. 1985. J. Clin Microbiol., 21:46.
- 35.- Fay, G.D., and Barry, A.L.: Rapid ornithine decarboxylase test for the identification of Enterobacteriaceae. 1972. Appl Microbiol., 23,710.
- 36.- Finegold, S.M.: Diagnostic Microbiology, 6 th ed. The C.V. Mosby Company. 1982.
- 37.- Fisher, A., and Thomas, R.: Packaging Materials Science in: The theory and Practice of Industrial Pharmacy. 2nd edition. Lea - Febiger Philadelphia. 1976.
- 38.- Fleiss. J.L.: Statistical Methods for Rates and Proportions Second Ed. John Wiley and Sons. 1981.
- 39.- Franklea, P.J., Cole, M.E., Sodeman, T.M.: Clinical evaluation of the Minitex differential system for identification of Enterobacteriaceae. 1974. Appl Microbiol., 28:668.

- 40.- Freeman, J.W., Rowland, R.W., Overman, S.B.: Laboratory Evaluation of the Auto Microbic System for identification of Enterobacteriaceae. 1981. J Clin Microbiol., 13:895.
- 41.- Gabebusch, H.H., and Gabriel, S.: Modified stable Kovacs' reagent for the detection of indol. 1956. J Bacteriol., 26:1373.
- 42.- Gerhardt, P.: Manual of methods for General Bacteriology 2nd ed, American Society for Microbiology Washington, D.C.
- 43.- Glicksman, Martin.: Gum technology in the food Industry, Academic Press. 1969.
- 44.- Gordon, J., and McLeod, J.W.: The practical application of the direct oxidase reaction in the bacteriology. 1928. J Pathol Bacteriol., 31:185.
- 45.- Haisman, D.R., and Knight, D.J.: The Enzymic Hydrolysis of Amygdalin. 1967. Biochemical J., 103:528.
- 46.- Hasyn, J.J., Cundy, K.R., Dietz, C.C. and Wong, W.: Clinical Laboratory Evaluation of the Auto Microbic System for Rapid Identification of Enterobacteriaceae. 1981. J Clin Microbiol., 13:491.
- 47.- Haysk, L.J., and Willis, G.W.: A comparison of two commercial methods for the identification of the Enterobacteriaceae API 20 E and the Enterotube with conventional methods. 1976. J Clin Pathol., :158.
- 48.- Holmes, B., Willcox, W.R., Lapage, S.P.: Test reproducibility of the API 20 E, Enterotube, and Pathotec systems. 1977. J Clin Pathol., 30:381.

- 49.- Hugh, R., and Leifson, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. 1953. *J Bacteriol.*, 66:24.
- 50.- Hussain Qadri, S.M., De Silva, M.I., and Zubain, S.: Rapid test for determination of Esculin Hydrolysis. 1980. *J Clin Microbiol.*, 12:472.
- 51.- Isenberg, H.D., Gavan, T.L., Smith, P.B.: Collaborative Investigation of the Auto Microbic System Enterobacteriaceae Biochemical Card. 1980. *J Clin Microbiol.*, 11:694.
- 52.- Isenberg, H.D., and Sundheim, L.N.: Indole reactions in Bacteria. 1958. *J Bacteriol.*, 75:682.
- 53.- Jellinek, M.: Liofilización. en: *Farmacotecnia teorica y Practica*. CECSA, México, 1982.
- 54.- Juni, E., and Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimulation of 2, 3 - butanediol, acetyl methyl carbinol, and diacetyl. I. General aspects of the 2, 3 - butanediol cycle, 1956. *J Bacteriol.*, 71:425.
- 55.- Juni, E., and Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial dissimulation of 2, 3 - butanediol, acetyl methyl carbinol, and diacetyl, II. The synthesis of diacetyl methyl carbinol from diacetyl, a new diphosphothiamina catalyzed reaction. 1956. *J Bacteriol.*, 72:746.
- 56.- Juni, E., and Heym, G.A.: A cyclic pathway for the bacterial -

- dissimilation of 2,3 --butanediol, acetylmethylcarbinol, and dia -
cethyl. III. A comparative study of 2,3 - butanediol dehydrogenase
from various microorganisms. 1957. J Bacteriol., 74:757.
- 57.-Kelly, S.A., and Washington II, J.A.: Evaluation of the Micro Me -
dia Quand Panels for the Identification of the Enterobacteriaceae.
1979. J Clin Microbiol., 10:515.
- 58.-Kiehn, T.E., Brennan, K., Ellner, P.D.: Evaluation of the Minitex
system for the identification of the Enterobacteriaceae, 1974. Appl
Microbiol., 28:668.
- 59.-Kohn, J.: A preliminary report of new gelatin liquefaction method.
1953, J Clin Pathol., 6:249.
- 60.-Koneman, E.W.: Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology,
2 nd. J.B. Lippincott Company. 1983.
- 61.-Kramer, M.S., Feinstein, A.R.: Clinical Biostatistics. LIV The -
biostatistics of the concordance. 1981. Pharmacol. Ther., :111.
- 62.-Lapage, S.P.: Practical Aspects of probabilistic identification of
bacteria. 1974. Internat J Syst Bacteriol., :500.
- 63.-Lapage, S.P., Shoshama, B., Willcox, W.R. and Curtis, M.A.: Iden -
tification of bacteria by Computer: General Aspects and Perspec -
tives. 1973. J Gen Microbiol., 77:273.
- 64.-Lederberg. J.: The beta - galactosidase of Escherichia coli, strain
K - 12. 1950. J Bacteriol., 60:381.
- 65.-Leifson, M.J.: On the detection of nitrate reduction. 1936. J Bac -
teriol., 31:225.

- 66.- Lennette, E.H.: Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- 67.- Lindell, S.S., and Quinn, P.: Use of Bile - Esculin agar for Rapid Differentiation of Enterobacteriaceae, 1975. J Clin Microbiol., 11:440.
- 68.- Mac Faddin, J.F.: Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria, 2nd ed, Baltimore, Williams and Wilkins, 1980.
- 69.- Mc Dade., J.L. and Weaver, R.H.: Rapid methods for detection of - carbohydrate fermentation. 1958. J Bacteriol., 77:65.
- 70.- Manual Difco, Decima Edición. Difco.
- 71.- Marymont, J.H., III., Marymont, J.H., Jr., and Gavan, T.L.: Performance of Enterobacteriaceae identification systems. An analysis of College of American Pathologists Survey data. 1978. Am J - Clin Pathol., 70:539.
- 72.- Morse., M.L., and Weaver, R.H.: Rapid microtechnics for identification of cultures. III Hydrogen sulfide production. 1950. Am - J Clin Pathol., 20:481.
- 73.- Morton, H.E. and Monaco, M.A.: Comparison of Enterotubes and routine media for the identification of enteric bacteria. 1971. Am - J Clin Pathol., 56:64.
- 74.- Murray, P.: Standarization of the Analytab Enteric (API 20 E) System to increase Accuracy and Reproducibility of the test for Biotype Characterization of Bacteria. 1978. J Clin Microbiol., 8:46.

- 75.- Overman, T.L., and Overley, J.K.: Feasibility of same - day Identification of Members of the Family Vibrionaceae by the API 20 E-System. 1986. J Clin Microbiol., 23:715.
- 76.- Phillips, S.B., and Amsterdam, D.: API Computer Profiles: Correlation of API 20 E with API 10 S. 1977. J Clin Microbiol., 6:645.
- 77.- Robertson, A.E., Macks, G.C. and Mac Lowry, J.D.: Analysis of -- Cost and Accuracy of Alternative Strategies for Enterobacteriaceae Identification. 1976. J Clin Microbiol., 3:421.
- 78.- Schaeffler, S. and Malany, A.: Taxonomic Investigation on Expressed and Cryptic Phospho - B - Glucosidase in Enterobacteriaceae. 1969. J Bacteriol., 99:422.
- 79.- Shaeffler, S., Malamy, A., and Green, I.: Phospho - B - glucosidase and B - Glucoside Permeases in Streptococcus, Bacillus, and Staphylococcus. 1969. J Bacteriol., 99:434.
- 80.- Shayegani, M., Maupin, P.S., and Mc Glynn, D.M.: Evaluation of - the API 20 E System for Identification of Non Fermentative Gram - Negative Bacteria. 1978. J Clin Microbiol., 7:539.
- 81.- Singer, J.: Culture of Enterobacteriaceae III. Detection of Urea se and Indol in a Single Medium. 1951. J Bacteriol., 59:987.
- 82.- Singer, J., and Volcani, B.E.: An improved ferric chloride test for differentiating Proteus - Providence group from other Enterobacteriaceae. 1955. J. Bacteriol., 69:255.

- 83.- Slade, H.D., and Slamp, W.C.: The formation of arginine dehydro-
lase by Streptococci and some properties of the enzyme system.
1952, J Bacteriol., 64:455.
- 84.- Smith, P.B., Tomfohrde, K.M., Rhoden, D.C., and Balows, A.: API-
System: a multitube Micromethod for identification of Enterobac-
teriaceae. 1972. Appl Microbiol., 24:449.
- 85.- Sonnenwirth, A.C.: Preprototype of and Automated Microbiol Detec-
tion and identification System: a developmental Investigation.
1977. J Clin Microbiol., 6: 400.
- 86.- Sonnenwirth, A.C., and Jarett, L.: Gradwohl's Clinical Laboratory
Methods and diagnosis. 8th ed. The C.V. Mosby Company. 1980.
- 87.- Staneck, J.L., Vincelette, J., Lamothe, F.: Evaluation of the -
Sensititre System for identification of Enterobacteriaceae. 1983.
J Clin Microbiol., 17:647.
- 88.- Sutter, V.L., and Carter, W.T.: Evaluation of media and reagents
for indole - spot test in anaerobic bacteriology. 1972. Am J Clin
Pathol., 58:335.
- 89.- Taylor, W.I., and Achanzar, D.: Catalase test as an Aid to the-
Identification of Enterobacteriaceae. 1972. Appl Microbiol., 24:
58.
- 90.- Tomfohrde, K.M., Rhoden, D.L., Smith, P.B., and Balows, A.: Eva-
luation of the Redesigned Enterotube - a System for the Identi -

- fication of Enterobacteriaceae. 1973. Appl Microbiol., 25:301.
- 91.- Treydal, R.E.: Secado. En: Operaciones de transferencia de Masa. 3 th ed. Mc Graw Hill. México. 1980
- 92.- Vaughn, R.H., Osborne, J.T., Wedding, G.T., Tabachnick, J., Beisel, C.G., and Broxton, T.C.: The utilization of citrate by *Escherichia coli*. 1950. J Bacteriol., 60, 119.
- 93.- Vermeulen, G.D., Schwab, S.V., Young, V.M.: A Computerized system for clinical microbiology. 1972. Am J Clin Pathol, 57:413.
- 94.- Vracko, R., and Sherris, J.C.: Indole - Spot test in Bacteriology. 1963. Am J Clin Pathol., 39:429.
- 95.- Washington II, J.A., Yu, P.K.W. and Martin, W.F.: Evaluation of Accuracy of Multitest Micromethod System for Identification of Enterobacteriaceae. 1971. Appl Microbiol., 22:267.
- 96.- Washington II, J.A., and Timm, J.A.: Un classified, Citrate Positive Member of the Family Enterobacteriaceae Resembling *Escherichia coli*, 1976. J Clin Microbiol., 4:165.
- 97.- Weaver, D.K., Lee, E.K.H., and Leahy, M.S.: Comparison of reagent impregnated paper strips and conventional methods for identification of Enterobacteriaceae. 1968. Am J Clin Pathol., 49:494.
- 98.- Wellstood - Nuesse, S.: Comparison of the Minitex system with conventional methods for identification of nonfermentative and oxi -

dase - positive fermentative gram - negative bacilli. 1979. J Clin Microbiol., 9:511.

99.- Willcox, W.R., Lapage, S.P., Shoshaba, B.: Identification of bacteria by computer: theory and programming. 1977. J Gen Microbiol-77:317.

100.- Woolfrey, B.F., Quall, CH. O., and Fox, J.M.: Evaluation of the Repliscan System for Enterobacteriaceae. 1981. J Clin Microbiol., 13:58.

BIOTIPIFICACION POR MICROMETODO PARA IDENTIFICACION DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENA (EPEC) ASOCIADAS A DIARREA Y CORRELACION CON EL ENSAYO DE ADHERENCIA A CELULAS HE_p-2.

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) se ha considerado como un agente causal de diarrea y la adherencia a células HE_p-2 es uno de los marcadores para definir cepas patógenas. El objetivo del trabajo fué desarrollar un método más accesible para identificar cepas patógenas de los serotipos clásicos.

Se estudiaron 74 cepas EPEC Serotipificadas por el método de aglutinación en portaobjetos, de niños con diarrea y 16 de niños asintomáticos utilizando un micrométodo desarrollado en INNSZ que contiene diferentes carbohidratos, el Sistema de API 20 E, la producción de hemólisis y la adherencia a células HE_p-2. Se usaron los programas de Cluster y Discriminantes de SPSS para el análisis de datos y los biotipos fueron finalmente definidos de acuerdo a la actividad con 7 carbohidratos y un aminoácido.

En el análisis de discriminantes, las cepas fueron agrupadas dentro de 8 biotipos además de los siguientes subgrupos; biotipo 1 con dos subgrupos y biotipo 8 con 3. Todas las cepas EPEC de portadores excepto 4 se encontraron dentro de los biotipos 1b y 7: tales biotipos estuvieron significativamente más asociados a las cepas de portadores que los otros biotipos (P 0.001; valor predicativo positivo 71% y valor predicativo negativo del 100%. La adherencia positiva tanto difusa como localizada a células HE_p-2 estuvo significati-

vamente asociada con los biotipos 1a, 2, 3, 4, 5, 6, 8a, 8b y 8c -
(p 0.001; vpp 77% y vpn 86%).

Fué posible identificar por micrométodo bioquímico sim -
plificado los diferentes biotipos de EPEC. También se observó bue -
na correlación de biotipos con adherencia a células HE_p - 2. Estos
hallazgos preliminares sugieren que la biotipificación es útil para
la identificación de EPEC asociadas a diarrea. Sin embargo será -
necesario estudiar un mayor número de cepas particularmente de aque -
llas aisladas de personas asintomáticas.

INTRODUCCION

Las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) fueron las primeras cepas implicadas en la enfermedad diarreica y continúa - siendo una causa importante de gastroenteritis infantil en muchas partes del mundo. (2, 7, 8, 11)

Los mecanismos patogénicos de la diarrea por EPEC no son bien conocidos. Algunos estudios de niños y animales con infecciones por EPEC han sugerido que la adherencia de la bacteria a la mucosa del intestino es importante en la inducción de la enfermedad. (3.5)

Cravioto y colaboradores (1) reportaron que la mayoría de las cepas de EPEC aisladas de brotes de gastroenteritis infantil se adherían en cultivo a células HE_p - 2 pero que esa adherencia era rara en cepas no EPEC.

Esos microorganismos son reconocidos por pruebas serológicas basadas en el esquema propuesto en 1940 por Kauffmann sobre las bases de lipopolisacáridos O, flagelar H y polisacárido de antígeno K.

En 1956 Kauffmann y Orskov revisaron los resultados de serotipos de EPEC y mostraron que la mayoría o todos los serotipos de EPEC tenían características de biotipos, independientemente del tiempo de aislamiento y el país de origen. (6, 17)

OBJETIVOS

- 1) Desarrollar un sistema miniaturizado para biotipificar e identificar *E. coli* enteropatógena (EPEC) y correlacionarlo con el ensayo de adherencia a células HE_p -2.

MATERIAL Y METODO.

Cepas del estudio.- Se estudiaron 74 cepas de EPEC aisladas de niños con diarrea y 16 aisladas de niños asintomáticos, obtenidas en el Instituto Nacional de la Nutrición de un estudio de incidencia de enteropatógenos en la comunidad de San Pedro Mártir en la ciudad de México. Los aislamientos fueron previamente serotipificados por el método de aglutinación en portaobjetos utilizando los sueros comerciales Bacto E coli OK antisera (Difco Laboratories. Detroit Mich) y confirmados por aglutinación en tubo, hecho por Dr. J. Mathewson (U. of Texas Medical School At Houston) usando sueros de CDC en Atlanta, dichos aislamientos fueron probados además por los siguientes métodos:

- 1) Micrométodo diseñado en INNSZ usando 15 carbohidratos.
- 2) Sistema API 20 E (Analytab Products, Plainview, N.Y.)
- 3) Hemólisis (agar sangre de carnero).
- 4) Adherencia a células HE_p - 2 (ensayo en microcámara de cultivo) (1).

Sustratos.- Adonitol. L-arabinosa, D-celobiosa, dulcitol, N-inositol, lactosa, maltosa, D-rafinosa, L-ramnosa, salicina, D-sorbitol, sorbosa, sacarosa, D-trehalosa y D-xylosa. (Sigma Chemical - Company S. Louis. Missouri)

Estandarización del micrométodo.- Se utilizaron los 15 carbohidratos en medio base constituido por peptona, cloruro de sodio, fosfato de potasio dibásico y azul de bromotimol en solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7 0.1 M.

Los sustratos se colocaron a concentraciones del 1% y 2% en microplacas de poliestireno (Dynatech Laboratories. Alexandria, Va.) - se localizaron y se probaron con diferentes cepas de microorganismos - del American Type Culture Collection como referencia con el objeto de observar si las reacciones de los carbohidratos probados correspondían a la actividad bioquímica esperada para cada género.

Biotipificación.- Se preparó una suspensión bacteriana, con las cepas problema, en solución salina estéril con una concentración de 2×10^8 UFC/ml semejante al estándar 0.5 de Mc Farland, utilizando 100 ul para resuspender cada uno de los carbohidratos deshidratados en el micrométodo. Se incubaron a 35 C y los resultados fueron leídos a las 24 horas.

Análisis estadístico y programas de computadora.- En el análisis de correlación entre cepas diarreicas y asintomáticas con biotipos, ensayo de adherencia a células HE_p - 2 y biotipos, se utilizó la prueba de χ^2 . (13)

La clasificación de los biotipos se llevó a cabo en una computadora HP utilizando el programa de Agrupamiento (Cluster) de SPSS con los siguientes criterios: Se tomaron en cuenta 36 variables, representando los resultados de las pruebas bioquímicas codificadas con 1 como negativo y 2 como positivo, más otra variable 1 para cepas de muestra control y 2 para diarreica.

Se corrió el programa utilizando los cuadrados de la distan -

cia Euclidiana como medida de discriminación. En la corrida se utilizaron los siguientes criterios Baverage, Waverage, Single, Complete. Centroid, Median y Ward con el objeto de encontrar la mejor asociación. (4, 14, 15, 16)

También se ejecutó el programa de discriminación aprovechando que se conocía el dato de procedencia de la muestra de niño con diarrea y asintomático, esto con el fin de conocer el porcentaje de confiabilidad de la separación en los grupos de cepas provenientes de muestras control y diarreicas.

RESULTADOS

Estandarización del micrométodo.- Las pruebas bioquímicas se interpretaron en un espejo lector (Dynatech Laboratories. Alexandria Virginia). Se encontró que la concentración óptima de los azúcares fué al 2%. En la estandarización de los sustratos probados con microorganismos de referencia encontramos un 100 % de reproducibilidad.

API 20 E y hemólisis.- Ornitina fué el único sustrato útil del API 20 E. El resto de las pruebas y la hemólisis no diferenciaron biotipos de las cepas de EPEC probadas, por lo que fueron eliminados.

Análisis.- Se encontró que con el programa Complete se obtuvo un mayor grado de similitud (fig. 1) y con el de discriminantes se obtuvo 92% de confiabilidad para discriminar las cepas de casos de diarrea de las de portadores. (fig 2).

Biotipos.- De los 15 azúcares utilizados originalmente en el micrométodo, solo 7 dieron información para discriminación de biotipo. El resto de las variables fueron eliminadas ya que no daban información por mantenerse constantes. De acuerdo con el análisis, las cepas se agruparon en 8 biotipos, en el grupo 1, 2 subgrupos y en el 8,3 subgrupos. Las cepas aisladas de niños asintomáticos pertenecieron a los biotipos 1b y 7. (Tabla 1)

No fué posible agrupar 2 de las cepas ya que no fueron identificadas en algún grupo por presentar grandes diferencias en cuanto a sus reacciones bioquímicas.

Asociación de biotipos con diarrea.- Los biotipos Ib y 7 se asociaron a las cepas aisladas de portadores con una frecuencia significativamente mayor que los otros biotipos (valor predictivo positivo 71 %, valor predictivo negativo 100% p 0.001).

Adherencia a células HE_p 2.- La adherencia positiva a células HE_p -2 estuvo asociada significativamente con los biotipos en los que se agruparon las cepas diarreicas. (p = 0.001, valor predictivo positivo 77% y valor predictivo negativo 86%). (fig. 3). La asociación serotipo, biotipo y patrón de adherencia se muestra en (Fig. 4)

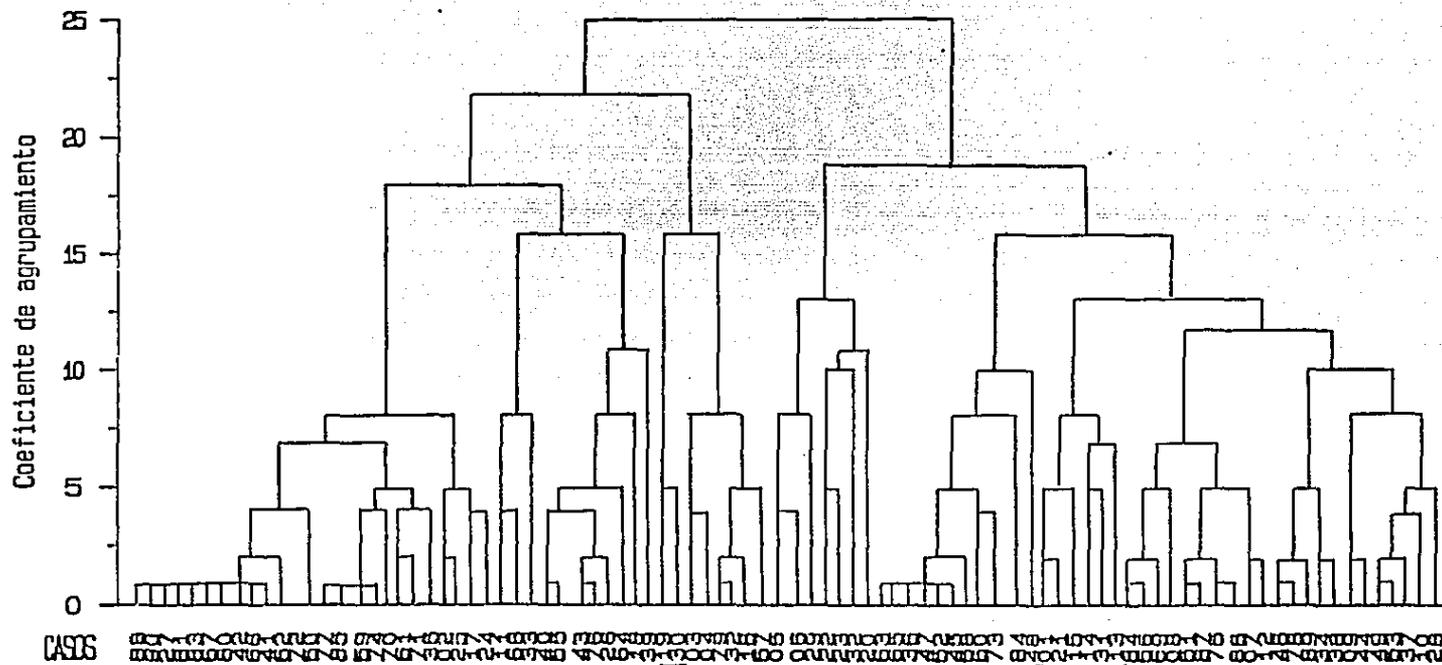
BIOTIPOS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENA

	CEL	DUL	RAF	RAM	SOR	SOS	SAC	ODC	CEPAS	
									DIARREICAS	ASINTOMATICA
1a	-	-	-	+	+	-	-	-	21	4
1b	-	-	-	+	+	+	-	-		
2	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+	-	3	
3	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	8	
4	-	-	-	-	+	-	-	+/-	5	1
5	+	+/-	+	+	+	-	+	+	4	3
6	-	-	+	+	+	-	+/-	+	11	
7	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-		6
8a	-	-/+	+	+/-	+	-	+	-	10	
8b	-	-	+	+	+	+	+	+	5	
8c	-	-/+	-/+	+	+	-/+	+	+	7	

CEL=Celobiosa DUL=Dulcitol RAF=Rafinosa RAM=Ramnosa
 SOR=Sorbitol SOS=Sorbosa SAC=Sacarosa ODC=Ornitina

TABLA 1.- Las cepas aisladas de niños asintomáticos pertenecieron a los biotipos 1b y 7.

Fig. 1- Dendograma usando el criterio Complete Linkage



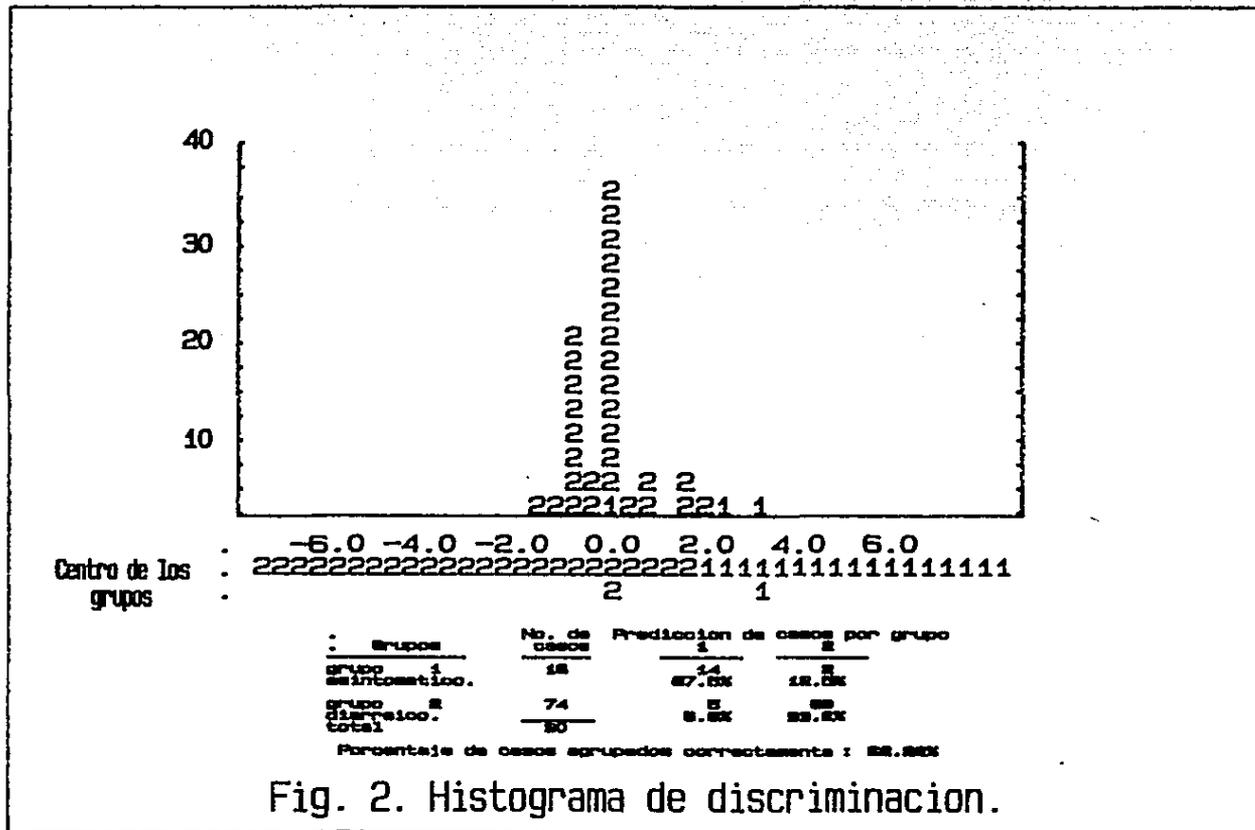


Fig. 2. Histograma de discriminacion.

		CEPAS	
		DIARREA	ASINTOMATICO
B I O T I P O S	1b y 7	0	10
	OTROS	74	4

$$X^2 = 66.93$$

$$P < = 0.001$$

VALOR PREDICTIVO POSITIVO = 71%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO = 100%

		BIOTIPOS	
		1b y 7	OTROS
ENSAYO DE ADHERENCIAS A CELULAS HE _p -2	+	2	38
	-	7	14

$$X^2 = 11.18$$

$$P < = 0.001$$

VALOR PREDICTIVO POSITIVO = 73%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO = 77.7%

FIGURA 3 CORRELACION DE CEPAS AISLADAS DE NIÑOS -
CON DIARREA Y ASINTOMATICOS CON BIOTIPOS
Y ENSAYO DE ADHERENCIA A CELULAS HE_p-2

	SEROTIPOS	BIOTIPOS	PATRON DE ADHERENCIA
DIFUSO	O _{18AC} : K ₇₇ O ₂₆ : K ₆₀ O ₁₁₁ : K ₅₈ O ₁₁₁ : K ₅₈ O ₁₁₁ : K ₅₈ O ₁₁₁ : K ₅₈ TOTAL 6 - 42%	8A 8B 3 1A 8C 3	
LOCALIZADO	O ₁₁₁ : K ₅₈ O ₁₁₁ : K ₅₈ O ₅₅ : K ₅₉ O ₅₅ : 59 O ₅₅ : K ₅₉ O ₁₁₁ : K ₅₈ TOTAL 6 - 42%	3 3 2 8A 2 -	
AUTOAGLUTINACION	O ₁₁₁ : K ₅₈ O ₂₆ : K ₆₀ TOTAL 2 - 14%	6 8B	

FIG. 4.- ASOCIACIÓN ENTRE SEROTIPO, BIOTIPO Y PATRON DE ADHERENCIA A CELULAS HEP-2.

DISCUSION

Reportes recientes de algunos investigadores han mostrado que la adhesión a la mucosa puede ser importante en la patogénesis de EPEC. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que utilizando un micrométodo simplificado de pruebas bioquímicas es posible definir biotipos de EPEC que se asocien a diarrea.

A la fecha los únicos marcadores de virulencia de EPEC demostrados son la producción de citotoxinas (Shiga like y toxina Veroto) y la adherencia a células HE_p - 2.

Prácticamente se ha demostrado una asociación entre adherencia a células He La, serogrupos, serotipos y bioserotipos de E. coli (9, 12). Okerman y colaboradores (10) en un estudio realizado con cepas EPEC aisladas de conejos mostró una correlación de biotipo, serotipo y cepas patógenas.

Nuestra asociación de biotipos relacionados a cepas aisladas de niños con diarrea y asintomáticos, y ensayo de adherencia a células HE_p - 2 de una manera apoya el concepto propuesto por Kauffmann y Oroskov desde hace muchos años, que las cepas de E. coli enteropatógena -- corresponde a biotipos. Sin embargo será necesario estudiar un número mayor de cepas principalmente aquellas provenientes de sujetos asintomáticos antes de establecer una conclusión definitiva.

CONCLUSIONES

- 1) Fué posible identificar biotipos significativamente más asociados a diarrea.
- 2) Se encontró buena correlación entre los biotipos asociados a diarrea y una prueba positiva de adherencia a células HE_p - 2.
- 3) La biotipificación puede ser útil en la identificación de EPEC.
- 4) Los micrométodos tienen gran utilidad y perspectiva en el estudio de patógenos de difícil identificación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M. and Rowe, B.: An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotype. 1979. *Curr Microbiol.* 3:95.
- 2.- Edelman, T., Levine, M.M.: Summary of a Workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*. 1983, *J. Infect Dis.*, 147: 1108.
- 3.- Evans, D.J., Jr., and Evans, D.G.: Classification of Pathogenic *Escherichia coli* According to Serotype and the Production of Virulence Factors, with Special Reference to Colonization - Factor Antigens. 1983. *Rev Infect Dis.*, 5 (Suppl) 4: S 692.
- 4.- Goddfellow, M., Jones, D., Priest, F.G.: Computer - Assisted Bacterial Systematics. First ed. Society for General Microbiology Academic Press.
- 5.- Karch, H., Heesemann, J., and Laufs, R.: Phage - Associated Cytotoxin Production by and Enteroadhesiveness of Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Infants with Diarrhea in West Germany - 1987. *J Infect Dis.*, 155:707.
- 6.- Kauffmann, F., Orskov, F.: Die Bakteriologie der *Escherichia coli* Enteritidis. In: Adams A. ed. *Saglings - Enteritidis*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1956.

- 7.- Levine, M.M.: Escherichia coli that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. 1987. J Infect Dis: 155:377
- 8.- Levine, M.M., and Edelman, R.: Enteropathogenic Escherichia coli classic serotype associated with Infant diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. 1984. Epidemiol Rev., 6:31.
- 9.- Nataro, J.P., Scaletsky, I.C.A., Kaper, J.B., Levine, M.M., and Tribulsi, L.R.: Plasmid - Mediated Factors Conferring Diffuse and localized adherence of Enteropathogenic Escherichia coli. 1985. Infect Immun., 48:378.
- 10.- Okerman, L., and Devoriese, L.A.: Biotypes of Enteropathogenic Escherichia coli strains from Rabbits. 1985. J Clin Microbiol., :955
- 11.- Robins - Browne. R.M.: Traditional Enteropathogenic Escherichia coli of Infantile Diarrhea. 1987. Rev Infect Dis., 9:28
- 12.- Scaletsky, I.C.A., Silva, M.L.M., Toledo, M.R.F., Davis, B.R., Blake, P.A., and Tribulsi, L.R.: Correlation between Adherence to HeLa Cells and Serogroups, Serotype, and Bioserotype of Escherichia coli. 1985. Infect Immun. 49:528
- 13.- Siegel, S.: Estadística no paramétrica. Trillas. 2nd edición, México, 1985.

- 14.- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R.: Numerical taxonomy. W.H. Freeman Company. 1973.
- 15.- Sneath, P.H.A.: Test reproducibility in relation to identification. 1974. Int J Syst Bacteriol., :508
- 16.- SPSS Inc. Norusis, M.J. SPSS/ PC + Advanced Statistics. SPSS Inc. 1986
- 17.- Stenderup, J., and Orskov, F.: The clonal nature of Enteropathogenic Escherichia coli of Infantile Diarrhea. 1987. Rev Infect Dis., 148:1019.