

120

204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Facultad de Ciencias
Biología**

**DESARROLLO DE UN METODO
MINIATURIZADO PARA LA
IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ERNESTO MARAVILLA FRANCO

Cd. Universitaria, D.F.

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE:

	Páginas
1. INTRODUCCION.....	1 - 9
2. JUSTIFICACION.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIALES Y METODOS.....	12 - 17
5. RESULTADOS.....	18 y 19
6. DISCUSION.....	20 - 28
7. CONCLUSION.....	29
8. BIBLIOGRAFIA.....	30 - 33
APENDICE I.....	34 -36
APENDICE II.....	37 - 39
APENDICE III.....	40 - 51
TABLAS.....	52 - 64
FIGURAS.....	65 y 66
LISTA DE ABREVIATURAS.....	67
RESUMEN.....	68

1. INTRODUCCION:

En la etapa previa al descubrimiento de los microorganismos, se pensaba que los seres vivos eran solo plantas o animales, pronto con la utilización del microscopio se abrieron nuevos campos en el estudio del microcosmos. A mediados del siglo XIX, Louis Pasteur, creador de las Ciencias Microbiológicas, demostró entre otras cosas, la enorme trascendencia de los microorganismos, no solo como agentes causantes de enfermedades, sino responsables de cambios importantes en diferentes regiones del mundo. Debido a que solo eran visibles al microscopio, durante muchos años, la morfología fue la base de su identificación, así A. Leeuwenhoek, ya establecía diferenciación en tres ordenes de morfología; cocos, bacilos y espirilos.

Existen evidencias de que gran parte de la tecnología del futuro tendrá que utilizar sistemas vivos, es decir tecnología biológica o biotecnología. Problemas comunes del hombre como son el hambre y la enfermedad son susceptibles de ser tratados con tecnología biológica. Numerosas interacciones entre huésped-parásito culminan generalmente en enfermedades al atribuir factores de infectividad, invasividad, patogenicidad y toxicidad. (Jawetz, 1987; CIIG-UNAM 1986; Lennette, 1985).

Los gobiernos, así como la industria privada de varios países han canalizado importantes esfuerzos, tanto humanos como económicos para estructurar y llevar a cabo planes de desarrollo biotecnológico. (Salval, 1989; Koneman, 1988; Lennette, 1985).

La biotecnología puede definirse como la aplicación de sistemas biológicos a técnicas y procesos industriales, lo que implica la integración de toda biología. Estos procesos están basados en el uso de algunas de las formas de catálisis orgánica en la conversión de un sustrato a un producto final. Así mismo, cada proceso está asociado a un material primordial (bacterias, hongos, levaduras, células de plantas o animales, ó enzimas producidas por ellos mismo) y a una manipulación técnica (fusión celular, inmovilización celular o enzimática, ingeniería genética, etc.), (Morris, 1989; Demain, 1986; Gaden, 1981).

Desde el punto de vista académico e industrial, las aplicaciones de biotecnología son definidas en dos categorías generales: Investigación y Desarrollo-producción. La investigación representa un esfuerzo indagativo, el cual podría aportar el desarrollo de un procedimiento, aplicado a la producción de materiales específicos (organismos ó metabolitos) para desarrollar y controlar procedimientos.

Obstáculos específicos en biotecnología están asociados con tres propiedades de los microorganismos a) la potencialidad de causar enfermedad, b) la potencialidad para alterar una prueba o procesos aprobados y c) la ubicación de un organismo el cual puede contaminar al sistema (Lieberman, and Demain, 1986; Phaff, and Gaden, 1981; Demain, and Solomon, 1981).

En los cultivos positivos de los laboratorios de microbiología clínica se observa que el 90% corresponden a bacilos gram negativos, de estos, el 80% pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Rahn), y de el total de aislamientos el 50% son también enterobacterias.

Muchos organismos "entéricos" -la mayoría patógenos- causan enfermedades principalmente gastrointestinales en el hombre y animales, pueden ser parásitos en vegetales o bien saprófitos permitiendo la descomposición de materia orgánica en el medio ambiente. El ataque bacteriano sobre plantas incluye síntomas como: pudriciones blandas, manchas foliares, amarillamientos, tizones, enfermedades vesiculares y agallas, siendo agentes causales importantes de estas manifestaciones Erwinia carotovora, E. stewartii y E. chrysantemi; Pseudomonas phaseolicola y P. rubrilineans; Xanthomonas sp. y Corynebacterium sp. De las enfermedades en animales ocasionadas por bacterias se reportan diarreas, mastitis, edemas, úlceras intestinales, etc. que pueden ocurrir en mamíferos, aves, reptiles y peces. Algunos agentes etiológicos son: Escherichia coli, Shigella spp. y Salmonella spp. (en ganado vacuno, bovino, porcino, etc.); Edwardsiella ictaluri, E. tarda, Yersinia ruckeri (en peces); Salmonella pullorum, S. gallinarum (en aves); S. arizonae (en reptiles); Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis (en roedores).

Finalmente las enterobacterias están asociadas a todo tipo de infecciones humanas, incluyendo abscesos, neumonías, meningitis, septicemias e infecciones

urinarias, en heridas, etc. Los géneros mas representativos son: E. coli en sus 5 tipos de enfermedad entérica (enteropatógena, enterotoxigena, enteroadherente, enteroinvasiva y hemorrágica), siendo además frecuente en infecciones de tracto urinario; Salmonella choleraesuis, S. paratyphi y S. typhi en gastro-enteritis; Shigella spp. en disenteria bacilar; Y. enterocolitica en gastro-enteritis invasiva; Enterobacter aerogenes, E. cloacae, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis y Serratia marcescens que se asocian a infecciones nosocomiales en heridas, tracto respiratorio, sangre, etc. (Koneman, 1988; De la I, 1987; Jawetz, 1987; Bailey and Scott's, 1986; Trigo y Mateos, 1986; Lennette, 1985; Ewing, 1980; Washington II, 1971).

La nomenclatura, clasificación e identificación de la familia Enterobacteriaceae ha sido objeto de controversia, dando lugar a un número considerable de cambios en la última década. La clasificación de enterobacterias está basada principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano, reflejado en sus exigencias nutricias, y capacidad sintética; vías metabólicas que pueden reconocerse a través de medios especiales utilizados en las técnicas de cultivo in vitro. (Koneman, 1988; Jawetz, 1987; Lennette, 1985; Sonnenwirth, 1980; Seeley, 1973).

El sistema taxonómico de Ewing y Edwards para enterobacterias es práctico y útil, ha sido ampliamente aceptado y ha servido como base para el sistema de nomenclatura propuesto por Ewing et al., el cual se basa en resultados obtenidos a partir del análisis de reacciones bioquímicas de un número grande de cultivos de la familia Enterobacteriaceae. Se han utilizado más de 50 pruebas y sustratos para identificar a este tipo de bacterias; no obstante, con una batería de 14 pruebas sería suficiente. Así, Kelly, Brenner y Farmer proponen las siguientes pruebas: fermentación de adonitol (ADO), presencia de arginina deshidrolasa (ADH), DNAsa, utilización de citrato (CIT), producción de gas y fermentación de glucosa (GLU), producción de ácido sulfhídrico (H₂S), producción de indol (IND), lisina descarboxilasa (LDC), movilidad, ornitina descarboxilasa (ODC), fenilalanina desaminasa (FDA), fermentación de sacarosa (SAC), hidrólisis de urea (URE) y producción de acetofina

ó reacción de Voges-Proskauer (VP). Para aquellos gérmenes de difícil determinación se adicionarán pruebas.

El uso de reacciones bioquímicas y otros caracteres fenotípicos en la clasificación de la familia Enterobacteriaceae, se ha extendido por análisis de datos computarizados sobre 50-200 o más caracteres de morfología, cultivo y bioquímica de la bacteria.

Las bacterias también se clasifican por comparación entre sus genes según su razón genotípica y niveles fenotípicos; mediante hibridación ADN-ADN, clasificación que refleja en gran medida, relaciones naturales entre los microorganismos.

Otros métodos de identificación son; la tipificación de bacteriófago, serología, patrones de resistencia a antibióticos y determinación del contenido de guanina y citosina en ADN (proporción G + C), técnicas que han aportado nuevos géneros y especies, y cambios en la clasificación de la familia Enterobacteriaceae. Ciertamente estos sistemas no son convenientes para diferenciar enterobacterias en un laboratorio de diagnóstico, en realidad, serían empleados para la caracterización de cepas atípicas. (Koneman, 1988; Jawetz, 1987; Bailey and Scott's, 1986; Lennette, 1985; Farmer III, 1984; Sonnenwirth, 1980; Ewing, 1980)

En la fase transitoria de la metodología clásica a la contemporánea usada para la identificación microbiana, se ha cambiado de múltiples métodos a procedimientos con énfasis sobre estandarización, rapidez, reproducibilidad, miniaturización, mecanización y automatización; llegando a establecer en muchos laboratorios el uso de uno o más sistemas disponibles para la identificación de ciertos grupos de microorganismos, proporcionando así, una herramienta especial para obtener resultados más exactos que reducen el costo y el tiempo de estancia de un paciente hospitalizado.

Muchos de estos sistemas han sido usados por más de una década, tiempo suficiente para que la mayoría de los microbiólogos vencieran su aversión a ellos. Este tipo de instrumentos, presenta grados de automatización basados en diversas técnicas siendo divididos en 4 categorías generales: a) Bioquímica (manual), b) Bioquímica (mecanizada/semiautomatizada/automatizada), c) Inmunológica, y d)

Radiométrica.

El término mecanización se refiere a procedimientos efectuados por instrumentos mecánicos o electrónicos que no involucran interpretación directa de resultados sustituyendo una operación manual (Kämpfer, and Dott, 1989; Rhoden, and O'Hara, 1989; Koneman, 1988; Lennette, 1985; Yamane, et al, 1984; D'Amato, Holmes, and Bottone, 1981; Sonnenwirth, 1980).

Hoy en día la comercialización de sistemas automatizados en la identificación microbiana es notoria, sin embargo, varios de los sistemas automatizados o semiautomatizados no cumplen con las necesidades de laboratorios pequeños, por su alto costo. Los laboratorios de microbiología clínica de E. U. confían casi exclusivamente en sistemas rápidos de identificación bacteriana. Las pruebas bioquímicas usadas para este fin, toman gran interés en la investigación y desarrollo de métodos microbiológicos miniaturizados. (Vuye, 1989; Overman, et al, 1985; Murray, Ganthier, and Niles, 1984; Yamane, et al, 1984; Castillo, and Brickner, 1984; D'Amato, Holmes, and Bottone, 1981; Smith, et al, 1972; Jeffery, 1971).

Los microsistemas son tan eficientes como los sistemas completamente automatizados, de hecho podrían ser menos caros. La identificación de los bacilos gram negativos patógenos y la determinación de su susceptibilidad para agentes antimicrobianos, se realiza frecuentemente con microtécnicas. Los pequeños sistemas pueden leerse manualmente o en forma automatizada, la visualización de las reacciones químicas es clara, requieren poco espacio en almacen e incubación, presentan larga vida de conservación (de 6-12 meses, a 4-6°C), incluyen selección de pruebas bioquímicas diferenciales estandarizadas que mejoran la exactitud en la identificación, los tiempos de incubación son generalmente cortos, lo que permite una rápida determinación del germen, facilitada además, por un registro computarizado. El control de calidad se lleva a cabo por el fabricante. Todo esto ofrece grandes ventajas para los laboratorios de microbiología, especialmente para aquellos de espacio reducido, donde el tiempo es escaso o no se cuenta con los técnicos expertos dedicados a la identificación de los microorganismos y, donde además, el control de calidad es mucho mas difícil de mantener.

Muchos de los sistemas miniaturizados contienen medios deshidratados en pequeños pozos, medios sólidos en tubos o sustratos preparados en discos, tabletas o tiras para lectura, en los cuales una vez agregada la suspensión bacteriana, se obtiene la identificación después de incubar a 35 - 37°C durante 18 a 24 hrs. o bien de 4 a 5 hrs, si se emplea mayor inóculo.

Los microsistemas han sido ideados para la determinación de un grupo variado de microorganismos de importancia médica y veterinaria tales como bacilos gram negativos fermentadores (especialmente enterobacterias), bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores oxidasa positiva, aeróbicos y anaeróbicos, cocos gram positivos, levaduras, etc. (Rhoden, and O'Hara, 1989. Koneman, 1988. Rhoden, Schable, and Smith, 1987. Wenger, Tissieres, and Praplan, 1987. Smith, and Baker, 1985; Lennette, 1985; Overman, et al, 1985; Murray, Gauthier, and Niles, 1984; Castillo, and Bruckner, 1984; Izard, et al, 1984; Kelly, Matsen, and Morello, 1984; Langlois, Harmon, and Akers, 1983; Sonnenwirth, 1980; Swanson, and Collins, 1980; Robertson, et al, 1976; Lapage, 1974; Vermeulen, et al, 1972).

Algunos de los sistemas miniaturizados mas conocidos son:

ENTEROTUBE II

Se constituye de un armazón plástico con 12 compartimientos que contienen 15 pruebas (medios de agar base), con un asa integrada especial para inocular los 12 compartimientos. Se incuba a 35-37°C, por 18 a 24 hrs. Los resultados se obtienen a partir de un código de 4 dígitos que se localiza en un manual de referencia. (Holmers, 1989; Leighton, and Little, 1983; Sonnenwirth, 1980; Hayek, and Willis, 1976).

MINITEK

Presenta 34 cartuchos con discos impregnados con los reactivos. Una selección de 10 discos se coloca en una tira plástica con 12 pozos, que son inoculados con 50 µl de suspensión bacteriana. Se incuba a 37°C por 18 a 24 hrs, y se obtiene un código de 5 dígitos que se localiza en un índice computarizado para identificación. (Lennette, 1985; Sonnenwirth, 1980).

API 20E

Consta de una microplaca plástica que contiene 20 sustratos liofilizados distribuidos en pozos, cada pozo se inocula con 100 μ l de suspensión bacteriana, la microplaca se incuba a 35-37°C por 18 a 24 hrs. Se interpretan los resultados en base a un código de 7 dígitos que se encuentra en un manual computarizado (Overman, 1985, Lennette, 1985; Aldridge, and Hodges, 1981; Aldridge, et al 1978; Holmer, Willcox, and Lapage, 1978).

MICRO-ID

Lo integra una tira plástica con 15 "cámaras de reacción", las 5 primeras contienen un sustrato y un disco, las 10 restantes contienen solo un disco "sustrato detector". Cada cámara se inocula con 200 μ l de la suspensión bacteriana, se incuba a 35-37°C por 18 a 24 hrs, y se obtienen resultados interpretando un código de 5 dígitos. (Harrison, and Williams, 1985; Sonnenwirth, 1980).

ENTERIC-TEK

Se compone de un recipiente plástico multicompartimientos, de 11 pozos periféricos y uno central los cuales contienen un medio de agar base específico, que una vez inoculado con la suspensión bacteriana se incuba a 35-37 °C por 18 a 24 hrs. Se interpretan resultados obteniendo un código de 5 dígitos. (Lennette, 1985).

SPECTRUM-10

Es un sistema microtubo, que presenta dos cartuchos de 10 sustratos bioquímicos en cada uno. La suspensión bacteriana se añade a cada cartucho y se incuba a 37 °C por 18 a 24 hrs. La interpretación es visual. En caso de utilizar solo un cartucho se obtiene un código de 4 dígitos, o bien, uno de 7 dígitos si se usaron los dos. La determinación se da a partir del manual de códigos computarizado. (Vuye, 1989).

Haciendo mención de otros sistemas o equipos miniaturizados, semiautomatizados o automatizados tenemos el Rapid E, Quantum II, Automicrobic, Cobas-Bact, Auto SCAN-4, PASCO-MIC-ID, Mini-ID, Eiken, MS-2, Autobac IDX, etc. utilizados para Enterobacteriaceae y otros bacilos gram negativos. El sistema N/F, Oxi-Ferm, Rapid NFT, Titertek NF, etc. para gram negativos fermentadores y no fermentadores oxidasa positivos, API 20A, Anaerobe-Tek, ODS Rapid ANA para

anaerobios; API 20S, Rapid Strep, Staph-Ident, Staph-Trac para estreptococos y estafilococos, y API 20C, Uni-Yeast-Tek para levaduras. Tales equipos son costosos, sin embargo, muchos de ellos han logrado reducir el tiempo de incubación hasta 5 hrs. a una temperatura de 35°C. (Kämpfer, and Dott, 1989; Kamm, Wenger, and Bille, 1989; Rhoden, and O'Hara, 1989; Smith, and Schable, 1988; Koneman, 1988; Rhoden, Schable, and Smith, 1987; Wenger, et al, 1987; Lennette, 1985; Rhoden, et al, 1985; O'Hara, Kelly, et al, 1984; Sonnenwirth, 1980).

La identificación de la familia Enterobacteriaceae y otros grupos de bacterias de interés médico, ecológico, industrial y agropecuario han sido facilitados por el uso de equipos y sistemas automatizados con los que los organismos son identificados a través de códigos numéricos computarizados. Todos los fabricantes que tienen equipos y sistemas manuales de identificación en el mercado utilizan un registro de códigos, en los cuales cientos de biotipos numéricos se comparan con una o mas especies bacterianas, exclusivas para ese número, es decir, varias características de identificación propias de ese grupo de bacterias se convierten en una secuencia de números que representa a la especie del microorganismo estudiado. Estos códigos están basados en un sistema numérico binario que representa a cada reacción, en donde el número "1" y "0" denotan convencionalmente una reacción positiva y una negativa respectivamente.

Tal caso se puede ilustrar en la secuencia de características bioquímicas de la tira del sistema miniaturizado API 20E; donde una vez convertidas las reacciones bioquímicas positivo-negativo a números binarios, se obtienen 21 dígitos, por ejemplo:

101100001001101101010

Este código se transcribe a un lenguaje matemático fácil de usar como es el sistema octal de 8 dígitos, un dígito octal se representa con 3 espacios binarios ó "bits", por lo que a cada valor positivo o negativo, corresponde un octal de 2^3 u 8 combinaciones posibles, las cuales pueden indicarse con uno de los 8 números en un intervalo de 0 a 7.

Ya que los números binarios se leen de derecha a izquierda, se divide el número en bloques de tres:

101	100	001	001	101	101	010
++	+-	--	--	++	++	--
5	1	4	4	5	5	2

el octal equivalente es 5144552, biotipo numérico, que es la representación numérica de una serie de características fenotípicas expresadas y únicas para una especie bacteriana. El número 5144552 codifica para la especie E. coli "muy buena identificación". Evaluación basada en el cálculo computarizado, de una amplia base de datos derivados de reacciones bioquímicas de cientos o miles de organismos probados.

Los sistemas de identificación bacteriana proveen un impreso que indica el número de cepas seleccionadas y la proporción examinada para ajustar exactamente el biotipo numérico, el cual puede ser interpretado conjuntamente con otra información disponible sobre el organismo desconocido, como es la morfología colonial, comportamiento en medios de aislamiento, morfología celular, reacciones bioquímicas presuntivas y patrones de sensibilidad a antibióticos.

El mejoramiento de la sensibilidad y especificidad de las reacciones bioquímicas en los equipos compactos, a través de sustratos alternativos o adicionales, ha corregido inexactitudes en los sistemas. La reproducibilidad podría ser una de las mayores ventajas. El tiempo de identificación, el alto porcentaje de exactitud y bajo costo, determinan la eficiencia de un sistema de identificación.

Pruebas realizadas en laboratorios de diagnóstico e investigación han demostrado que un 95% o más de concordancia se manifiesta entre la mayoría de los sistemas de identificación y métodos convencionales en la determinación de microorganismos. (Lennette, 1985; D'Amato, Holmes, and Bottone, 1981; Sonnenwirth, Lewis III, and Jarett, 1980).

2. JUSTIFICACION:

Los laboratorios de microbiología clínica de los hospitales de la Secretaría de Salud y particulares de nuestro país, no cuentan en su gran mayoría, con técnicas eficientes para la identificación bioquímica, por lo que se importa tecnología para solucionar este problema.

Por tal razón es necesario implementar nuevas ramas en la investigación en biotecnología, que ofrezcan la posibilidad de desarrollar sistemas de identificación que eleven la eficiencia y rapidez en la diferenciación e identificación de microorganismos patógenos.

Los nuevos métodos de identificación permitirán la uniformidad de el lenguaje de la microbiología clínica, promoverán la automatización de procesos de rutina, incrementarán la productividad de los laboratorios y disminuirán el gasto de divisas, además de aportar mayores conocimientos en microbiología y áreas afines.

Al generar mecanismos que requieran de conocimientos básicos y producir biotecnología propia, se promoverá la vinculación entre los centros nacionales de investigación, de asistencia y educación.

3. OBJETIVO GENERAL:

Desarrollo de un micrométodo con biotecnología nacional que pueda ser utilizado en la identificación de enterobacterias aisladas de muestras clínicas de humanos y animales, así como la disminución del tiempo y costo en su realización.

3.1 OBJETIVO ESPECIFICO:

Desarrollo de sistemas para identificación bioquímica de enterobacterias, confiable, reproducible, económico y que potencialmente se pueda industrializar a corto plazo.

4. MATERIALES Y METODOS:

4.1 OBTENCION DE CEPAS.

Se emplearon 844 cepas de recién aislamiento clínico, miembros de la familia Enterobacteriaceae, del Laboratorio de Microbiología Clínica, del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

4.2 MACROMETODO

4.2.1 Las cepas incluidas en agar nutritivo y conservadas a 4°C, se identificaron con el sistema convencional (bioquímica tradicional) con los siguientes sustratos: TSI, LIA, CIT, SIM, MIO, UREA/SACAROSA y VP/RM (Apéndice I). Para aquellas cepas con un cuadro bioquímico fuera de lo común se prepararon pruebas adicionales tales como: DNAsa, Gelatinasa, Lisina y Ornitina descarboxilasas, Arginina deshidrolasa, Malonato y Caldo rojo de Fenol para los carbohidratos xilosa, sorbitol, arabinosa, manitol, adonitol, inositol, rafinosa y ramnosa.

4.2.2 En la fase comparativa, además de utilizar los 7 tubos convencionales, se anexaron las pruebas de hidrólisis de DNA, arginina deshidrolasa, utilización de malonato y fermentación de xilosa e inositol.

4.2.3. Cada uno de los siete sustratos del macrométodo se probó con cepas de referencia del "American Type Culture Collection" (ATCC), Rockville, Maryland.

Los puntos de referencia para la interpretación de las reacciones bioquímicas diferenciales se incluyen en el Apéndice I.

4.3 ESTANDARIZACION DEL MICROSISTEMA INNSZ.

Se reunieron y trataron 600 microplacas, 600 placas de hidratación y soporte, y 900 vasijas para suspensión bacteriana; todas de reuso, del microsistema API 20E. (API Analytab Products, Plainview, NY).

La batería de sustratos del micrométodo INNSZ (MINNSZ) fue:

4.3.1 PRUEBA DE LA β -GALACTOSIDASA (ONPG): para demostrar la presencia de la enzima β -galactosidasa se utiliza un sustrato artificial y se observa la hidrólisis del o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG).

4.3.2 REACCION VOGES-PROSKAUER (VP): para demostrar la producción de un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína) por fermentación de glucosa.

4.3.3 PRODUCCION DE INDOL (IND): determina la capacidad de utilizar triptofano (indol-alanina) por acción de la enzima triptofanasa, liberando indol.

4.3.4 PRUEBA DE PRODUCCION DE ACIDO SULFHIDRICO (H_2S): por acción enzimática se libera H_2S a partir de los aminoácidos que contienen azufre, produciendo un precipitado visible de color negro (FeS), con sales solubles de hierro presentes en el medio.

4.3.5 PRUEBA DE LA FENILALANINA-DESAMINASA (FDA): identifica la producción de ácido fenil pirúvico liberado por la desaminación de la fenilalanina.

4.3.6 REACCION DE LA UREASA (URE): se aprecia la cualidad de un organismo para hidrolizar la urea, formando dos moléculas de amoníaco (NH_3) por acción de la enzima ureasa.

4.3.7 PRUEBA DE LA DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS: esta prueba diferencia grupos bacterianos con capacidad enzimática para descarboxilar aminoácidos formando aminas con la consiguiente alcalinidad del medio (Lisina descarboxilasa LDC, Ornitina descarboxilasa ODC y Arginina deshidrolasa ADH).

4.3.8 UTILIZACION DE FUENTES DE CARBONO: propiedad específica de algunos microorganismos para utilizar como única fuente de carbono al Citrato de sodio (CIT) o Malonato de sodio (MAL).

4.3.9 PRUEBA DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS: es útil para apreciar la capacidad de un organismo de degradar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico produciendo ácido ó ácido y gas. GLUCOSA (GLU), ADONITOL (ADO), INOSITOL (INO), DULCITOL (DUL), RAFINOSA (RAF), RAMNOSA (RAM) y XILOSA (XIL).

La batería de sustratos elegidos, se fundamenta en las características bioquímicas de géneros y especies de la familia Enterobacteriaceae, descritos por Farmer et al., del "Centers for Disease Control" (CDC), Atlanta, GA. U.S.A." y Ewing et al. Así mismo eficacia en la determinación, disponibilidad, toxicidad y costo del material (Apendice II).

4.4 PREPARACION DE SUSTRATOS DEL MICROSISTEMA INNSZ.

4.4.1 Se prepararon 300 microplacas nuevas y aditamentos del sistema API 20E

(microplacas caducas), sin haber sido inoculadas con suspensión bacteriana, se lavaron con detergente Extrán, (Laboratorios Merck-México) para remover los sustratos liofilizados y se esterilizaron con gas (óxido de etileno).

4.4.2 Se determinó la concentración de medios de cultivo, reactivos e indicador para cada prueba y se ajustó el pH, procediendo a su elaboración. Los sustratos del MINNSZ se procesaron cuidadosamente siguiendo con detalle las indicaciones del instructivo (Apéndice III). Todos los sustratos, se esterilizaron por filtración con membranas "MF-Millipore", con talla de poro 0.45 μm , y diámetro de 25 mm, colocada en un filtro plástico "swinex" de 25 mm tipo HA (Millipore Corporation, Bedford, MA.). A cada uno de los 20 pozos de las 270 microplacas plásticas, se añadieron 10 μl de la solución del sustrato, con una micropipeta multicanal ajustable de 8 canales de 5-50 μl (Dynatech Laboratories, INC. Chantilly, VA.). Cada dos pozos contendrían el mismo sustrato en la primera y segunda línea (para evitar contaminación por productos volátiles) con la siguiente distribución:

1er. BLOQUE	ONPG / LDC / CIT / ADH / FDA FDA / ADH / CIT / LDC / ONPG	Línea I Línea II
2o. BLOQUE	IND / MAL / URE / VP / H ₂ S H ₂ S / VP / URE / MAL / IND	Línea I Línea II
3er. BLOQUE	GLU / XIL / RAF / RAM / ADO GLU / XIL / RAF / RAM / ADO	Línea I Línea II
4o. BLOQUE	INO / DUL / ODC / - / - INO / DUL / ODC / - / -	Línea I Línea II

4.4.3 Las microplacas con sustratos, se congelaron en un refrigerador Biofreezer, Forma Scientific, Marietta, Ohio), a una temperatura de -70°C y se deshidrataron al vacío en liofilizadora (Model 75040, 8811 Prospect, Labconco Corporation, Freeze dry 8, Kansas City, MO.). Aproximadamente 50 microplacas se liofilizaron en la cámara del aparato a -60°C y 25 micrones (0.025 Torr) de presión, durante 90 minutos, en paquetes de 15 microplacas envueltas en papel aluminio, los conjuntos se colocaron en bolsas de polietileno con un paquetito de desecador (CaSO₄). Una vez selladas herméticamente se almacenaron a 4 °C, hasta por 2 meses.

4.5 ENSAYO COMPARATIVO ENTRE EL METODO CONVENCIONAL Y EL MICROSISTEMA "INNSZ".

4.5.1 Tres cepas control del ATCC y 121 cepas de aislamiento clinico reciente se eligieron para el ensayo comparativo en paralelo con un macrométodo estándar y 4 lectores en doble ciego. La cepas se sembraron en placas de agar McConkey y se resembraron a las 24 hrs. en gelosa sangre de carnero. De los cultivos de 48 hrs. se tomó una colonia aislada y se suspendió en 2 ml de solución salina al 0.85% estéril, PH 7, para obtener un grado de turbidez de 0.5 McFarland, que corresponde aproximadamente a 1.5×10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml). De esta suspensión, 150 μ l se añadieron a 15 ml más de la solución salina amortiguada, con una pipeta digital de 100-1000 μ l (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.), para obtener una dilución 1:100. Cada micropozo con sustrato específico, se reconstituyó con 100 μ l de suspensión bacteriana diluida, con una micropipeta multicanal no ajustable de 8 canales de 100 μ l y puntas estériles (API Analitab Products, New York). Los pozos de H₂S, LDC, ODC, ADH y URE se sellaron con 3 gotas de aceite mineral (nujol), 100 μ l más de la suspensión se agregó a los pozos de CIT, MAL, VP y GEL.

4.5.2 Los compartimientos de las placas plásticas de soporte (Fig.A), se llenaron de agua, y una vez tapadas se incubaron durante 24 hrs. a una temperatura de 37 °C. Las pruebas anexas del método convencional, se inocularon con una colonia aislada, tomada directamente del agar sangre de carnero, y se incubaron al mismo tiempo y temperatura. A las 24 hrs, se hicieron pruebas de control de pureza, tomando una asada al azar de un micropozo para cada cepa probada, sembrandose en placas de agar MacConkey y gelosa sangre de carnero, incubadas por 24 hrs.

4.5.3 Para revelar las reacciones bioquímicas del micrométodo, se añadieron 2 gotas de reactivo de Kovac al pozo de Indol; 1 gota de hidróxido de potasio (KOH) al 40%, mas 1 gota de reactivo de α -naftol al 5% al pozo de Voges-Proskauer, tomando datos de 5 a 15 mins. Finalmente 2 gotas de Cloruro férrico (FeCl₃) al 40% para el pozo de Fenilalanina-desaminasa.

4.6 RECOPIACION DE DATOS

4.6.1 Los datos fueron registrados en formatos especiales, tanto para el sistema miniaturizado, como para el método convencional, incluyendo las lecturas de 24 y 48 hrs, por 5 lectores en forma independiente.

4.7 ANALISIS ESTADISTICO.

4.7.1 Para determinar la eficiencia de cada una de las pruebas bioquímicas del sistema miniaturizado, se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad y exactitud. La primera indica la frecuencia de resultados positivos de un sustrato en particular (verdadero positivo), esto es, positividad expresada en porciento.

$$S = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

VP = verdaderos positivos

FN = falsos negativos

La especificidad por su parte, indica la frecuencia de resultados negativos para un sustrato no metabolizado (verdadero negativo):

$$Es = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

VN = verdaderos negativos

FP = falsos positivos

por último, la exactitud de una prueba indica el porcentaje de aquellos sustratos (positivos y negativos) interpretados correctamente (Sonnenwirth, 1980).

$$Ex = \frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN} \times 100$$

4.7.2 Con el fin de observar el grado de concordancia en la identificación de organismo, entre el método convencional y el microsistema, y la variación interobservador de los 4 lectores, se aplicó la prueba "kappa estadística" (Fleiss, 1981).

La ecuación de kappa para múltiples valoraciones por sujeto (Fleiss, 1971) es:

$$\hat{\kappa} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k x_{ij}^2}{nm(m-1) \sum_{j=1}^k p_j q_j}$$

donde: n = número de sujetos, m = no. de evaluaciones, k = categorías, x = no. de eventos, i = número de razones sobre el sujeto i (i = 1, ..., n) en la categoría j (j = 1, ..., k).

5. RESULTADOS:

5.1 SISTEMA CONVENCIONAL

El resultado de las reacciones bioquímicas, dadas por 844 cepas (12 géneros, 26 especies) de aislamiento clínico reciente, se presentan en la Tabla 1. Los resultados se compararon con la tabla de reacciones bioquímicas del Centers for Disease Control (CDC), (Farmer, et al, 1984).

El porcentaje de positividad de las reacciones bioquímicas de las 121 cepas probadas en el ensayo comparativo se da en la Tabla 2.

El esquema bioquímico de las cepas de referencia efectuado por triplicado para Escherichia coli ATCC 25922, Klebsiella pneumoniae ATCC 13883, Proteus vulgaris ATCC 13315, Enterobacter cloacae ATCC 23355, Salmonella typhimurium ATCC 14028 y Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145 se presenta en la Tabla 3.

5.2 ESTANDARIZACION DEL MICROSISTEMA

La concentración y pH óptimos para cada sustrato, se refieren en la Tabla 4. El patrón bioquímico de respuesta de las cepas de referencia en el microsistema; K. pneumoniae ATCC 13883, E. coli ATCC 25922 y S. typhimurium ATCC 14028, se incluye en la Tabla 5.

5.3 ENSAYO COMPARATIVO

Concordancia Macrométodo Convencional-Microsistema.

De 121 organismos probados, 112 (92.5%), se determinaron correctamente a nivel de género (Tabla 6); 90 (87.4%) a nivel de especie (Tabla 7), y se observa un total de 17 identificaciones erróneas, 9 (7.5%) y 13 (12.6%) a nivel de género y especie respectivamente. Los organismos comunmente mal identificados por el microsistema fueron: Serratia liquefaciens (2/2), Yersinia sp. (3/4), Klebsiella ozaenae (1/2), Enterobacter cloacae (3/9) y Escherichia coli atípica (3/10). La determinación errónea y sus causas, se dan en las Tablas 8 y 9. Las reacciones responsables de varias de las identificaciones incorrectas fueron: presencia de β -galactosidasa (ONPG), fermentación de xilosa (XIL), y en menor proporción, producción de ureasa (URE), acetoina (VP) y descarboxilación de arginina (ADH). En la Tabla 10, se presentan aquellas cepas mal identificadas por macrométodo.

Variación Interobservador.

La lectura de las reacciones bioquímicas del macrosistema, por los 4 observadores, presentó 91 (75%) lecturas idénticas, 24 (20%) de tres códigos, 6 (5%) de dos códigos y ninguna (0%) de códigos diferentes. En las Tablas 11 y 12 se representa además el porcentaje de variación del biotipo numérico para género y especie.

El microsistema por su parte, presentó un total de 46 (38%) lecturas idénticas, es decir, cuatro códigos iguales; 29 (24%) de tres códigos, 39 (32%) de dos códigos y 7 (6%), de códigos diferentes.

5.4 ANALISIS ESTADISTICO

En la Tabla 13, se exponen los valores de sensibilidad, especificidad y exactitud para cada uno de los sustratos bioquímicos del MINNSZ, comparados con el macrométodo.

Datos de sensibilidad menores al 80% se presentaron en LDC (77.2%), VP (77.1%), INO (72.9%) y XIL (65.8%); para especificidad, se muestran valores mayores del 87% y, finalmente para exactitud, solo el carbohidrato xilosa fue el mas bajo con 74.2%, todos los demás tuvieron valores por encima del 88%.

El análisis estadístico por prueba de kappa (Cohen, 1960) fue de $k=0.936$, $s.e.=0.030$, $z=30.764$, con una $p<0.0001$ para concordancia entre Sistema Convencional y Microsistema a nivel de género; $k=0.867$, $s.e.=0.022$, $z=38.362$, con una $p<0.0001$ concordancia Sistema Convencional-Microsistema a nivel de especie; $k=0.907$, $s.e.=0.009$, $z=93.500$ con $p<0.0001$ para concordancia de lectura interobservador del Sistema Convencional y, $k=0.565$, $s.e.=0.006$, $z=81.880$ con $p<0.0001$ concordancia de lectura interobservador del Microsistema.

El valor de la magnitud de kappa en los tres primeros casos, indica un "excelente" grado de concordancia, sin embargo, en el cuarto caso, con $k=0.565$, el nivel de concordancia es moderado (Michael, 1981; Fleiss, 1981). La fracción de k y su $s.e.$ presenta para los cuatro casos, un estandar de distribución normal (z) muy grande, el cual, indica un valor total de k , en términos estadísticos, altamente significativo y notoriamente diferente a cero, con una $p<0.0001$.

6. DISCUSION

Las reacciones bioquímicas por método convencional, para 844 enterobacterias del cepario del Departamento de Infectología (Tabla 1), mostraron ser compatibles con los resultados obtenidos por Farmer, et al 1981, del Centers for Disease Control (CDC), cuyos resultados se basan en mas de un millón de reacciones bioquímicas practicadas sobre miembros de la familia Enterobacteriaceae (Rahn) por 30 años.

De 100 Morganella morganii recolectadas 36, produjeron ácido sulfhídrico, el gas se detectó unicamente en el tubo de SIM. El precipitado de sales férricas fue escaso, mas no hubo problema para apreciarlo. Farmer, et al reportan producción de sulfhídrico en un 5% para cepas comunes de M. morganii, y un 41% para cepas de M. morganii biogrupo 1, con LDC (+), MOV (-) y fermentación de glicerol (+). Ewing reporta que en la línea de inoculación del tubo de TSI, M. morganii llega a producir ácido sulfhídrico, después de 48 hrs. de incubación, reacción que resulta del metabolismo de compuestos orgánicos o inorgánicos sulfurados.

En base a lo anterior, las cepas de M. morganii en discusión, se reportaron como "M. morganii H₂S (+)". De 90 Proteus mirabilis 31% dieron reacción de VP (+), Farmer et al reporta el 50% , y Sussana et al 15.6% a 37°C, y 51.6% a 25°C. 1 de 36 E. coli produjo ácido sulfhídrico, según Ewing, algunas cepas de E. coli llegan a producir H₂S en forma abundante y en ocasiones también algunos cultivos hidrolizan la urea, siendo esto aparente después de las 24 hrs., ambas reacciones son mediadas por plásmidos diferentes. Diez cepas de Serratia marcescens produjeron pigmento rojo, Ewing reporta el 16.8% (Ewing, 1986; Farmer, et al 1981).

El mayor número de especies aisladas para el estudio fueron: E. coli, M. morganii, P. mirabilis, C. freundii, E. cloacae y K. pneumoniae. Por la morfología colonial tan característica que presentaban E. coli, P. mirabilis y K. pneumoniae, fue posible determinarlas con un mínimo de pruebas bioquímicas, disminuyendo tiempo de identificación y costo.

Debido a su alta incidencia en los aislamientos clínicos, se eligieron cepas no típicas de E. coli (fermentación de lactosa negativa).

Es importante mencionar, que la recopilación del conjunto de microorganismos

se hizo sin considerar la uniformidad de su fenotipo bioquímico, es decir, expresando o no, un metabolismo bacteriano típico.

En lo que se refiere a los resultados contemplados en la Tabla 4, fueron necesarios ensayos meticulosos de variación de la concentración y de inclusión o exclusión de cada una de las sustancias seleccionadas. En esta tabla se indica la concentración óptima que por dilución, una vez reconstituido el sustrato, se obtuvo para diferenciar visualmente cada una de las pruebas. Con el pH indicado para cada solución, se diferenció una reacción positiva de una negativa, determinadas por la producción de compuestos alcalinos o ácidos a partir del metabolismo de los sustratos bioquímicos.

Antes de proceder al ensayo comparativo, las cepas de referencia del ATCC, se probaron con el MINNSZ, los resultados coincidieron totalmente con el esquema bioquímico propuesto por el sistema API 20E y el macrométodo (Tabla 5).

Los cultivos que han sido almacenados por largos períodos de tiempo, tienden a perder algo de actividad metabólica, por esta razón, las cepas a ser probadas se subcultivaron 2 veces en un medio de enriquecimiento, para restaurar la actividad metabólica (D'Amato, 1981).

En referencia al sistema convencional, algunas pruebas bioquímicas ocasionaron la mala identificación de K. ozaenae y E. coli, utilizando por otra parte, antisueros para determinar correctamente el género Shigella sp. (Tabla 10).

De 121 cepas 17 fueron mal identificadas, 9 para género y 13 a nivel de especie. Analizando la Tabla 8, la cepa 111 de E. coli dada como Enterobacter sp. por VP (+) a 24 y 48 hrs. no hay explicación precisa acerca de esta discrepancia, la prueba de VP fue positiva en el sistema miniaturizado, exclusivamente para aquellas cepas que lo eran en verdad (Tabla 13). Esta bacteria, podría ser un enterobacter no común, cuya producción de acetoina se demuestre en macrosistema después de las 72 hrs. de incubación. Paretzky y Werkman hallaron que la formación de acetoina se acumula cuando un organismo es cultivado en condiciones aeróbicas, E. coli es incapaz de producir acetoina en el período de incubación normal, no obstante, Cowan y Steel encontraron que la incubación a 30°C durante 5 días, es el tiempo mínimo para

detectar todos los organismos VP (+) entre las enterobacterias. La prueba de VP se utiliza para separar la tribu Escherichieae (Bergey, Breed, and Murray) de la tribu Klebsiellae (Trevisan), siempre y cuando el periodo de incubación no exceda 3 días. Se sabe que todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae son capaces de producir acetoina a partir de glucosa, aunque no todos la fermentan (MacFaddin, 1984). Es posible que la E. coli en cuestión halla sido capaz de producir acetil-metil-carbinol detectándose a las 24 hrs. El microorganismo no fue de nuevo probado por microsistema, lo que descartó la posibilidad de que se encontraran residuos contaminantes en la microplaca reusada.

La cepa 124 E. coli reportada como Shigella sp., no descarboxiló lisina, ni fermentó xilosa a 48 hrs. al igual que la 126, que además, fue ONPG (-). Los miembros de la tribu Escherichieae (Bergey, Breed y Murray), en términos específicos E. coli y las 4 especies de shigella: Shigella flexneri, S. sonnei, S. dysenteriae y S. boydii presentan características genéticas muy estrechas en un 70 y 100% aproximadamente, determinadas por técnicas de hibridización de ADN. De hecho, constituyen una sola especie genética (Brenner, 1984; Ewing, 1986). Debido a esto, las características fenotípicas manifestadas a través de las diferentes reacciones bioquímicas son muy parecidas, lo que ocasiona confusión. Ante tal problema, se recomienda el uso de antisueros específicos para todos los sistema de identificación bacteriana, que confirmen o corrijan la determinación dada, aún cuando antígenos O de serotipos conocidos de shigella excepto S. sonnei, esten relacionados de una u otra forma con muchos de los grupos de antígenos O de Escherichieae (Ewing 1953, Ewing et al, 1952-56, 1986).

Las dos cepas en discusión, se identificaron correctamente al presentar aglutinación negativa, tanto para E. coli antígeno O grupos A-D y Shigella sp.

De cuatro cepas de Yersinia sp., tres fueron mal identificadas, las dos primeras cepas como E. coli por URE y ONPG falso (+), y la tercera como M. morganii por ONPG (-). Algunas de las reacciones bioquímicas y fisiológicas de la tribu Yersinieae (Mortinevskij), pueden ser mediadas o controladas por la temperatura de incubación; a excepción de Y. pestis, Yersinia sp. es móvil en un medio incubado a 22 - 25°C y

negativa a 37°C. Y. enterocolitica produce acetoina VP (+), presenta acción lipolítica y es mucho más activa incubada a temperatura ambiente de 22 - 25°C, así mismo, Y. enterocolitica exhibe incremento de la actividad β -galactosidasa (prueba de ONPG) (Archer, *et al.*, 1987; Ewing, 1986).

Las cuatro cepas de Yersinia sp., se probaron con una batería más amplia de sustratos bioquímicos por método convencional, incubándose a temperatura ambiente. Fueron determinadas como Y. enterocolitica MOV (+), ODC (+), VP (+) y ONPG (+) a 22 - 25°C. Las microplacas de estas cepas se dejaron a temperatura ambiente 24 hrs. más, la cepa 25 presentó actividad β -galactosidasa y ureasa, la 53 y 80 dieron también ONPG (+), aunque esta última no dió ureasa (+), más produjo acetoina VP (+). Los 3 gérmenes se determinaron a 48 hrs. como Y. enterocolitica por microsistema.

Dos cepas de shigella no se identificaron a causa de la fermentación falsa (-) de glucosa, aún a las 48 hrs. Estas cepas crecieron bien aisladas en las cajas para control de pureza de gelosa sangre de carnero, lo que demuestra que se encontraban presentes en cada micropozo. Una posible explicación, es que fermentaron el carbohidrato en menos de 24 hrs. (de 15 a 18 hrs.), una vez que la bacteria fermentó totalmente la glucosa, metabolizó los productos aminados alcalinizando el medio de nuevo.

Finalizando con la Tabla 8, una de dos K. ozaenae se identificó como Citrobacter freundii por H₂S falso (+), el punto a tratar es sobre la alta sensibilidad de esta prueba (McFaddin, 1984). Las reacciones bioquímicas para K. ozaenae y K. rhinoscleromatis son ciertamente atípicas (Ewing, 1986) en comparación con K. pneumoniae, el género Klebsiella presenta un metabolismo particular sobre hidratos de carbono y, al igual que otras enterobacterias, degradan activamente compuestos orgánicos sulfurados provenientes de peptonas, extractos de carne, etc. llegando a producir ácido sulfhídrico (Ewin, 1986; MacFaddin, 1984). Por tal razón, el microsistema detectó, mínimas concentraciones del gas. La prueba de producción de ácido sulfhídrico puede afinarse para obtener aún mejores resultados a las 24 hrs. La sensibilidad de esta prueba, al parecer, depende del tiempo de incubación, esto abre

la posibilidad de continuar perfeccionando el microsistema para ofrecer la identificación de bacterias entéricas en un tiempo mucho menor, empleando tiempo mínimo para observar la reacción positiva.

Analizando la Tabla 9, tres de nueve E. cloacae no se determinaron a nivel de especie, la cepa 52 se identificó como E. taylorae por RAF Y URE negativos. Pocas son las pruebas bioquímicas con las que cuentan la mayoría de los laboratorios de nuestro país para diferenciar especies con estrecha relación entre sus ADN. Estas dos especies presentan un 60% de relación entre sus ADN aislados (Ewing, 1986) y, aunque tal vez no sea necesario diferenciarlos para fines clínicos, es importante elevar el nivel de identificación de microorganismos problema en los hospitales.

Los micropozos de RAF y URE continuaron negativos a 48 hrs. Por método convencional, no se comprobó la fermentación de rafinosa, el microorganismo se determinó como E. cloacae por dar SAC (+). La cepa 73 se reportó como Enterobacter sp. VP (-), XIL (-), con respecto al VP, faltó tiempo para leer la prueba, el tiempo para observar la reacción después de agregar los reactivos correspondientes, es de 15 minutos máximo y 5 minutos mínimo. La fermentación de xilosa fue débilmente positiva a 24 hrs. y totalmente positiva a las 48 hrs. El caso 99 Enterobacter sp. con FDA (+), LDC (+), XIL (-) y ADH (-). En sistema convencional, esta cepa no descarboxiló arginina ni lisina a las 24 hrs. dando únicamente positiva la ornitina; inicialmente, se manifestó como E. cloacae atípico. No siempre fue posible seguir pruebas bioquímicas en sistema convencional, mas allá de 24 hrs., por lo que en este caso el reporte de E. cloacae se dió únicamente para 24 hrs. Con seguridad el germen descarboxilaría la lisina de 48 - 72 hrs. o más. La microprueba de FDA fue débil (+) a 24 hrs. y negativa a las 48 hrs. la xilosa finalmente dió (+). La determinación por microsistema se basó en las pruebas de desaminación y descarboxilación de aminoácidos.

Un 2o. género importante fue Serratia, en el primer caso S. marcescens dado como Serratia sp. por ADH (+). Farmer reporta 0% y 4% de positividad para S. marcescens y S. marcescens biogrupo 1 respectivamente; Ewing reporta 0.9%, especificando que son reacciones débilmente positivas. En el caso de S. liquefaciens

dada como S. marcescens por XIL falso (-), se puede fundamentar en el mismo análisis hecho para Shigella sp. en cuanto al tiempo de incubación. La fermentación del carbohidrato fue notoria en el sistema convencional. En la siguiente S. liquefaciens reportada como Serratia sp. ONPG (-), VP (-), algunos observadores encontraron ONPG débilmente (+) a las 24 hrs. y totalmente positivo a las 48 hrs. En el VP pudo haber faltado tiempo para ser interpretado correctamente.

Providencia rettgeri se determinó como Providencia sp. ODC, ADH y H₂S falsos (+) a 24 o 48 hrs., esta cepa se aisló de un exudado nasal mostrando una morfología colonial fuera de lo común, muy mucosa, de crecimiento irregular (no define colonia aislada), pigmentación grisácea y confundiendo a simple vista con Pseudomonas sp. Lo que se puede afirmar acerca de este organismo, es que con certeza, se trata de una cepa no típica de P. rettgeri, la cual es susceptible de estudios posteriores.

El último germen a analizar es C. freundii reportado como Citrobacter sp., en la placa de control de pureza se encontró mezclado, repitiéndose su bioquímica. Durante la transcripción de cada prueba bioquímica a código numérico, se registró el dato erróneo.

Un aspecto importante es con relación al tiempo de incubación ideal para identificar un microorganismo problema. La mayoría de los microsistemas, como ya se indicó en la introducción, reportan resultados a 24 hrs. ó menos, y para aquellos gérmenes problema, los indican de 36 a 48 hrs.

El análisis de concordancia, se basa en resultados de 24 hrs. de incubación exclusivamente, sin embargo, es necesario mencionar que el comportamiento fisiológico (bioquímico) ó morfológico de las bacterias suele sufrir cambios temporales ó permanentes, debido a la variación de las condiciones físicas o químicas del ambiente en que se desarrollan, y si bien, los cambios temporales llegan a normalizar de nuevo en condiciones favorables, no sucede así, generalmente, para aquellos cambios permanentes que se dan a nivel del ADN. (de la I, 1987, Ewing, 1986, Lennette, 1985)

Los microorganismos recopilados se almacenaron como ya se indicó, a 4°C, en agar nutritivo, durante un año 6 meses. Muchas de las cepas mas viejas murieron y

otras aún después de la doble resiembra, mostraban un comportamiento bioquímico poco activo. Por tal motivo, y con el fin de dar una explicación lo mas acertada posible de los resultados obtenidos, fue necesario incluir en discusión datos de 48 hrs.

Reportes de concordancia en la identificación de microorganismos patógenos por sistemas miniaturizados, han sido de un 88% a un 97.4% a nivel de especie y de 89% a 97.9% a nivel de género (Washington II, 1971, Vuye, 1989).

Los resultados de concordancia para el microsistema INNSZ después de 24 hrs. de incubación con 92.5% a nivel de género y 87.4% a nivel de especie (Tablas 6 y 7), indican un muy buen grado de identificación de enterobacterias aisladas en los laboratorios de microbiología clínica. Es importante considerar, que el microsistema INNSZ fue diseñado no solo con el fin de determinar con exactitud la gran mayoría de enterobacterias problema, sino con el de lograr eficacia en la identificación de aquellas de mayor incidencia en nuestro país, tales como Shigella spp., Salmonella spp. y E. coli, causantes de serias enfermedades entéricas.

En particular, el microsistema INNSZ demostró ser muy eficaz en cuanto a la determinación a 24 hrs. de Salmonella sp. (5 de 5), Salmonella typhi (4 de 4) y Salmonella arizonae (4 de 4) sin presentar problema alguno.

La gran mayoría de las diferentes especies de shigella reportadas como Shigella sp. (12 de 14), Shigella sonnei (4 de 5), y E. coli (3 de 10), también se identificaron aceptablemente.

El análisis estadístico global para concordancia, por kappa, refiere una alta significancia estadística con $k=0.936$ y $k=0.867$ para género y especie respectivamente, y el valor de z, notoriamente diferente a cero, indica que los resultados fueron superiores ó se dieron mas allá de la probabilidad ($p<0.0001$).

El excelente grado de concordancia referido por kappa, confirma la apreciación hecha por el microsistema INNSZ, acerca de su eficacia en la identificación.

El análisis de variabilidad interobservador (Tabla 11), fue muy aceptable en el sistema convencional, de hecho solo dos códigos de los 484, no codificaron para la misma especie, y a pesar, de que se podría pensar que tal resultado es obvio, dado que todos los laboratorios de microbiología clínica del país, y la gran mayoría de

países en el mundo lo utilizan; un gran número de estos, aún no han logrado estandarizar las técnicas de preparación, uso e interpretación del sistema bioquímico, por falta de recursos humanos y económicos.

El análisis estadístico dió una $k=0.907$ "excelente", en base a este resultado se considera que el sistema convencional es muy confiable para la diferenciación e interpretación de las reacciones bioquímicas que presenta un microorganismo, determinado con exactitud para género y/o especie.

El valor de kappa estadístico que se obtuvo para variabilidad interobservador en el microsistema INNSZ, fue de $k=0.565$ "moderada". Los 4 biotipos obtenidos por observador (Tabla 12), refieren el siguiente análisis: para aquellos datos con un código desigual de 4 (1:3), 4(14%) difirieron en la identificación a nivel de género, y 5(17%) a nivel de especie; de 2 códigos discordantes (2:2) ó (2:1:1), 10(26%) y 8(20.5%) no tuvieron la misma identificación para género y especie respectivamente; finalmente para 4 códigos diferentes (4:4), no codificaron 3(43%) y 1(15%) para el mismo género y especie.

El análisis porcentual global de códigos discordantes para 484 biotipos numéricos es de 14% en género y 11.6% a nivel de especie, estos datos son más significativos en relacion al microsistema. Conjuntando el análisis estadístico y porcentual, es importante considerar la experiencia que tienen cada uno de los observadores para leer e interpretar pruebas bioquímicas de un sistema miniaturizado. Este personal trabajó en la determinación de enterobacterias con microplacas de API 20E durante 3 años, de 1985 a 1988, realizando la lectura del microsistema INNSZ a finales de 1989, tiempo mas que suficiente para uniformizar la interpretación de reacciones, sin embargo, la batería de pruebas del MINNSZ, presentaba algunos sustratos diferentes del API 20E, tales como FDA, H_2S (en opinión del personal, mas sensible que el del API 20E) y MAL. Debido a esto, hubo cierto descontrol durante la etapa de interpretación.

Las pruebas bioquímicas de un sistema miniaturizado, proveen resultados mas rápidos que su contraparte convencional, es decir, muchos de los sustratos son metabolizados en un tiempo menor, en muchos casos después de 48 hrs. llegan a dar

reacciones falsos positivas (D'Amato, 1981). En macrotécnicas, reacciones positivas de descarboxilación de aminoácidos se presentan para algunas especies a 48 hrs, a los 3 días o más (Ewing, 1958; Lennette, 1965; MacFaddin, 1984; Farmer *et al*, 1981), sin embargo, estas pueden percibirse en un sistema miniaturizado en solo 24 hrs.

En la Tabla 13 los valores de positividad para las pruebas LDC, ODC y ADH en micrométodo, son mayores a las del macrométodo, siendo considerados como resultados falso positivos a 24 hrs, no obstante, muchas de ellas en el sistema convencional son positivas a las 48 hrs. En relación a los carbohidratos xilosa e inositol, valores de sensibilidad y exactitud son menores al 80% para xilosa, mientras que para el inositol, sólo el valor de sensibilidad es menor al 80%. Los 2 sustratos muestran, por otra parte, una exactitud de 100 y 95.9% respectivamente. Como ya se explicó, muy probablemente, la fermentación del carbohidrato se produjo en un tiempo mucho menor a las 24 hrs, registrándose un valor falso negativo, sin embargo, como se puede apreciar, su exactitud es muy alta, lo que hace confiar el uso de ellos. La prueba de VP con una sensibilidad de 77.1%, se justifica por la falta de tiempo para su interpretación; los valores de especificidad y exactitud mayores al 89%, en contraparte, refieren la confiabilidad para esta prueba. En general, los valores de exactitud para cada sustrato, mayores al 88%, denotan la eficiencia del MINNSZ para la determinación de miembros de la familia Enterobacteriaceae, en comparación con el macrométodo.

Aún no se han efectuado estudios en el Departamento de Infectología acerca de la variabilidad interobservador para el API 20E, el cual, de acuerdo con comentarios del personal, no siempre fue uniforme la interpretación de las microplacas. Se sugiere en base a lo anterior, la posibilidad de realizar a corto plazo, un estudio comparativo con el microsistema API 20E. Si bien, la comparación en cuanto a lectura e interpretación con el sistema convencional ha sido de vital ayuda, se obtendría una comparación mucho más específica entre sistemas del mismo orden.

Estudios posteriores de validación, reproducibilidad, exactitud y desarrollo de base de datos computarizada para el MINNSZ, se llevarán a cabo a futuro.

7. CONCLUSIONES:

a) El MINNSZ es capaz de identificar con exactitud, a un alto porcentaje de enterobacterias recién aisladas de muestras clínicas.

b) La concentración y pH óptimos especificados para cada sustrato, son ideales para visualizar, diferenciar e interpretar las diferentes reacciones bioquímicas de microorganismos problema, lo que permite una identificación rápida, exacta y confiable. Con esto, finaliza la etapa de estandarización del MINNSZ.

c) El MINNSZ puede ser utilizado para identificar eficazmente a aquellos gérmenes causantes de serias enfermedades entéricas en México, tales como: Salmonella sp., S. typhi, S. arizonae, Shigella sp. y E. coli.

d) El MINNSZ es práctico y de fácil manejo, el biotipo numérico transcrito, facilita al clínico la identificación del germen en poco tiempo.

e) La mínima cantidad de sustratos incluida en cada microplaca, disminuye considerablemente el costo del material utilizado para fines bacteriológicos y clínicos. Así mismo, el espacio ocupado por las microplacas en almacén es pequeño.

f) El Sistema Convencional de 19 tubos utilizado en el laboratorio de microbiología del Departamento de Infectología es confiable y exacto, y puede ser utilizado para otros estudios comparativos.

g) El MINNSZ representa una muy buena alternativa como un sistema de identificación que uniforma y mejora la determinación de enterobacterias aisladas de muestras clínicas en nuestro país.

8. BIBLIOGRAFIA:

- Aldridge, D. E., and R. L. Hodges. 1981. Correlation Studies of Entero-Set 20, API 20E, and Conventional Media Systems for Enterobacteriaceae Identification. *J. Clin. Microbiol.*, 13:120-125.
- Aldridge, C., et al. 1978. Comparison of Micro-ID, API 20E and Conventional Media Systems in Identification of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.*, 7:507-513.
- Archer, R. J., et al. 1987. Identification of Yersinia spp. with the API 20E System. *J. Clin. Microbiol.* 25:2398-2399.
- Bailey and Scott's., Finegold, M. S. and E. F. Baron. 1986. *Diagnostic Microbiology*. 7a. edición. The C.V. Mosby Co.
- Castillo, B. C., and A. D. Bruckner. 1984. Comparative Evaluation of the Eiken and API 20E Systems and Conventional Methods for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 20:754-757.
- Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (CIIG). 1986. Coordinación de la Investigación Científica. INFORME. Comité Editorial de la UNAM.
- D'Amato, F. R., B. Holmes, and J. E. Bottone. 1981. The Systems Approach to Diagnostic Microbiology. *Critical Reviews in Microbiology*. 9:1-44.
- De la I, de B. M. L. 1987. *Fitopatología*. Edit. Limusa, S.A. de C.V., México, D. F.
- Demain, L. A., and A. N. Solomon. 1981. *Industrial Microbiology*. Scientific American. 245, (3):43-51.
- Demain, L. A., and A. N. Solomon. 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology. Washington, D. C., U.S.A.
- Dewey, M. E. 1983. Coefficients of Agreement. *Brit. J. Psychiat.* 143:487-489.
- Ewing, H. W. 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4a. ed., Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York., U.S.A.
- Farmer III, J. J. et al., 1984. Biochemical Identification of new Species and Biogrups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21:46-76.
- Fleiss, L. J. 1981. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2a. ed., John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.

- Gaden Jr. L. E. 1981. Production Methods in Industrial Microbiology. Sc. Am., 245, (3):135-144.
- Harrison, N. D., and E. J. Williams. 1985. Evaluation of the Micro-ID System for the Identification of Yersinia pestis. J. Clin. Microbiol. 21:447-448.
- Hayek, L. J., and G. W. Willis. 1976. A comparison of two commercial methods for the identification of the Enterobacteriaceae API 20E and the Enterotube with conventional methods. S. Clin. Path. 29:158-161.
- Holmes, B. 1989. Comparative Evaluation of the Roche Cobas IDA and Enterotube II Systems for Identifying Members of the Family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 27:1027-1030.
- Holmes, B., W. R. Willcox, and S. P. Lepage. 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E System. J. Clin. Microbiol. 31:22-30.
- Izard, D., et al. 1984. Evaluation of the Four-Hour Rapid 20E System for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 20:51-54.
- Jawetz, E., et al. 1987. Microbiología Médica. 12a. edición. El Manual Moderno, S.A. de C.V., Mexico, D. F.
- Kamm, W., A. Wenger, and J. Bille. 1989. Evaluation of the Cobas-Bact System for Direct and Rapid Identification and Antimicrobial Susceptibility testing of Gram-negative Rods from Positive Blood Culture Broths. J. Clin. Microbiol. 27:102-105.
- Kämpfer, P. and W. Dott. 1989. Evaluation of the Titertek-nF System for Identification of Gram Negative Nonfermentative and Oxidase-Positive Fermentative Bacteria. J. Clin. Microbiol. 27:1201-1205.
- Kelly, T. M., et al. 1984. Collaborative Clinical Evaluation of the Auytobac IDX System for Identification of Gram-negative Bacilli. J. Clin. Microbiol. 19:529-533.
- Koneman, W. E., et al. 1988. Diagnostic Microbiology. 3ra. ed., J.B. Lippincott Company. Philadelphia.
- Kramer, S. M., and R. A. Feinstein. 1981. Clinical Biostatistics. The Biostatistics of Concordance. Clin. Pharmacol. Ther. 29:111-123.
- Langlois, B. E., J. R. Harmon, and K. Akers. 1983. Identification of Staphylococcus sp. of Bovine Origin with the API Staph-Ident System. J. Clin. Microbiol. 18:1212-1219.

- Lapage, S. P. 1974. Practical Aspects of Probabilistic Identification of Bacteria. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 24:500-507.
- Leighton, P. M., and J. A. Little. 1983. Clinical Comparison of the Enterotube II and API 20E System for Bacterial Identification. *A.M. J. Clin. Pathol.* 79:367-370.
- Lennette, H. E., *et al.* 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. 4a. edición. American Society for Microbiology., Washington. D. C., U.S.A.
- Mac Faddin, F. J. 1984. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Edit. Médica Panamericana, S.A., México, D. F.
- Murray, R. P., A. Gauthier, and A. Niles. 1984. Evaluation of the Quantum II and Rapid E Identification Systems. *J. Clin. Microbiol.* 20:509-514.
- O'Hara, C. M., P. B. Smith, and B. A. Schable. 1988. Evaluation of the Mini-ID Enterobacteriaceae Screen System. *J. Clin. Microbiol.* 26:2604-2607.
- Overman, L. T., *et al.* 1985. Comparison of the API Rapid E Four-Hour System with the API 20E Overnight System for the Identification of Routine Clinical Isolates of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 21:542-545.
- Phaff, J. H. 1981. *Industria Microbiología*. *Sc. Am.*, 245, (3):53-66.
- Robertson, E. A. *et al.* 1976. Analysis of Cost and Accuracy of Alternative Strategies for Enterobacteriaceae Identification. *J. Clin. Microbiol.* 3:421-424.
- Rhoden, L. D., and M. C. O'Hara. 1989. Evaluation of the Updated QUANTUM II System for the Identification of Gram-negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 27:2420-2422.
- Rhoden, L. D., B. Schable, and B. P. Smith. 1987. Evaluation of PASCO MIC-ID System for Identifying Gram-negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 25:2363-2366.
- Rhoden, L. D., *et al.* 1985. autoSCAN-4 System for Identification of Gram-negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 22:915-918.
- Saval, S., y A. Blancas. 1989. Escalonamiento de Procesos Biotecnológicos. *Inf. Cient. y Tec.* 11:48-51.
- Seeley, H. W., J. P. VanDemark Jr. 1973. *Manual de Laboratorio para Microbiología*. 1ra. edición. Blume., Madrid, España.

-Sonnenwirth, C. A. 1950. Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. 8va. edición. The C. V. Mosby Co., St. Louis, MS., U.S.A.

-Smith, P. B., K. M. Tomfohrde, D. L. Rhoden, and Balows. 1972. API System: a Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 24:449-452.

-Spitznagel, L. E., E. J. Helzer. 1985. A Proposed Solution to the Base Rate Problem in the Kappa Statistic. *Arch. Gen. Psychiatry.* 42:725-728.

-Swanson, C. E. and T. M. Collins. 1980. Use of the API 20E System to Identify Veterinary Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 12:10-14.

-Trigo, T. F., and P. A. Mateos. 1986. Patología General Veterinaria. Fac. de Med. Veterinaria y Zootecnia., División del Sist. de Universidad Abierta. U.N.A.M., México.

-Vuye, A. 1989. Evaluation of Spectrum-10 System for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 27:2366-2368.

-Washington II, A. J., K. W. Yu, M. W. Jeffery. 1971. Evaluation of Accuracy of Multitest Micromethod System for Identification of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 22:267-269.

-Wenger, A., et al. 1987. Cobas-Bact System for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae in 4 h 20 min. *J. Clin. Microbiol.* 25:61-66.

-Windholz, M., S. Budavari, F. R. Blumetti, and S. E. Otterbein. 1983. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck & CO., Inc. New York, U.S.A.

-Yamane, N., et al. 1984. Reproducibility of the MS-2 System for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae: a Collaborative Study with Blindly Assigned Reference Strains. *J. Clin. Microbiol.* 20:1135-1139.

APENDICE I.

Los puntos de referencia para la interpretación de las reacciones en los medios diferenciales (MacFaddin, 1984) fueron:

-Vire del indicador por variación del pH.

-Aspecto del sustrato.

Interpretación de reacciones.

1. TSI (Agar Hierro Triple Azúcar).

Prueba: fermentación de glucosa y lactosa, producción de H_2S y gas.

Indicador del pH: rojo de fenol

- Reacción de fermentación positiva.
 - a) Pico de flauta y capa profunda: reacción ácida (A) color amarillo.
- Reacción de fermentación negativa.
 - a) Pico de flauta y capa profunda: reacción alcalina (K) color rojo.
- Producción de gas.
 - a) Presencia de CO_2 y H_2 provocando desplazamiento total o parcial del medio, ruptura del agar o presencia de pequeñas burbujas.
- Producción de ácido sulfhídrico (H_2S).
 - a) Presencia de precipitado negro (sulfuro ferroso) distribuido total o parcialmente en el medio.

2. LIA (Agar Lisina Hierro).

Prueba: descarboxilación y desaminación de lisina, producción de H_2S .

Indicador del pH: púrpura de bromocresol.

- Reacción de descarboxilación positiva.
 - a) Pico de flauta y capa profunda: reacción alcalina (K), color púrpura intenso.
- Reacción de descarboxilación negativa.
 - a) Pico de flauta y capa profunda: reacción ácida (A) color amarillo paja.
- Reacción de desaminación positiva.
 - a) Pico de flauta y capa profunda: reacción muy alcalina (R), color rojo.
- Producción de ácido sulfhídrico (H_2S).

a) Reacción positiva con presencia de precipitado negro.

3. CIT (Citrato de Simmons).

Prueba: utilización de citrato.

Indicador del pH: azul de bromotimol.

- a) Acidez reacción negativa (-)
color amarillo (no se observa).
- b) Alcalinidad reacción positiva (+)
color azul de prusia intenso.

4. SIM (Agar Sulfhídrico - Indol - Movilidad) medio semisólido.

Prueba: movilidad, producción de H₂S e Indol.

- Producción de ácido sulfhídrico.
 - a) Reacción positiva (+): ennegrecimiento del medio (línea de inoculación o de la capa superficial).
 - b) Reacción negativa (-): sin cambio.
 - Producción de Indol.
 - a) Reacción positiva (+): al agregar reactivo de Ehrlich ó Kovacs en la superficie del medio, vira a rosa o rojo intenso.
 - b) Reacción negativa (-): sin cambio.
 - Observación de Movilidad.*
 - a) Reacción positiva (+): se observa turbidez homogénea en todo el medio.
- * La movilidad puede también observarse al microscopio en campo oscuro o contraste de fases.

5. MIO (Agar Movilidad - Indol - Ornitina) medio semisólido.

Prueba: movilidad, producción de indol y descarboxilación de ornitina.

Indicador del pH: púrpura de bromocresol.

- Detección de Movilidad.
 - a) Reacción positiva (+): turbidez homogénea en todo el medio.
- Producción de Indol.
 - a) Reacción positiva (+): al agregar reactivo de Kovacs en la superficie del medio, vira a rosa ó rojo intenso.
 - b) Reacción negativa (-): sin cambio.
- Descarboxilación de la Ornitina.

- a) Reacción alcalina positiva (+): color púrpura intenso.
- b) Reacción ácida negativa (-): color amarillo brillante.

6. Caldo UREA-SACAROSA (SURRECO).

Prueba: fermentación de sacarosa e hidrólisis de urea.

Indicador del pH: rojo de fenol.

- Producción de la enzima ureasa.
 - a) Reacción alcalina positiva (+)
color rojo a púrpura intenso.
- Reacción de fermentación de la sacarosa.
 - a) Reacción ácida positiva (+)
color amarillo canario.

7. Medio de Clark y Lubs ROJO DE METILO/VOGES-PROSKAUER, caldo RM/VP).

Prueba: producción de acidez y/o acetofna a partir de glucosa.

-Reactivos para revelar la reacción:

Reactivo para RM:

- Solución Rojo de Metilo pH 4 (indicador del pH).
 - a) Reacción RM positiva (+)
el medio ácido mantiene el color del reactivo (rojo).
 - b) Reacción retardada (+)
color naranja.
 - c) Prueba RM negativa (-)
color amarillo.

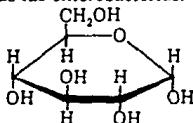
Reactivos para VP:

- α -naftol 5% .
- KOH ó NaOH 40% .
 - a) Reacción VP positiva (+)
color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetofna).
 - b) Reacción VP negativa (-)
color amarillo en la superficie del medio.

APENDICE II.

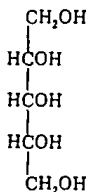
Carbohidratos:

GLUCOSA (Dextrosa). $C_6H_{12}O_6$, PM 180.16 gr.; PF 83°(descomponiéndose). Azúcar de la sangre, maíz, uva. Un gramo de glucosa es soluble en 1.1 ml de agua a 25°C; en 0.8 ml a 30°C; en 0.41 ml a 50°C; en 0.28 ml a 70°C y en 0.18 ml a 90°C. Prueba preliminar muy importante para englobar a aquellos organismos fermentadores. Prueba positiva para todas las enterobacterias.



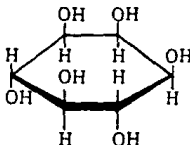
α -D-glucosa

ADONITOL (Ribitol). $C_5H_{12}O_5$, PM 152.15 gr.; PF 102°C. Pentitol de Adonis spp. Ranunculaceae. Soluble en agua y en alcohol caliente.



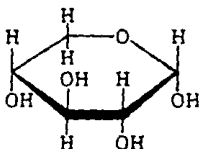
Diferencia entre los géneros de la tribu Proteaceae: Proteus spp. y Morganella sp. (-), de Providencia rettgeri y P. alcalifaciens (+). Dentro de la tribu Klebsiellae: E. cloacae (+), de E. agglomerans (-). S. marcescens (v) de S. liquefaciens (-).

INOSITOL (mio-Inositol). $C_6H_{12}O_6$, PM 180.16 gr.; PF 225-227°C. Factor de crecimiento en animales y microorganismos. Soluble en agua a 25°C: 14 gr/100 ml; a 60°C: 28 gr/100 ml. Ligeramente soluble en álcalis.



Diferencia Proteus spp. 0% (-) de Providencia spp. (+) a excepción de P. alcalifaciens (-); E. aerogenes 95% (+) de E. cloacae, E. agglomerans y E. gergoviae generalmente negativos.

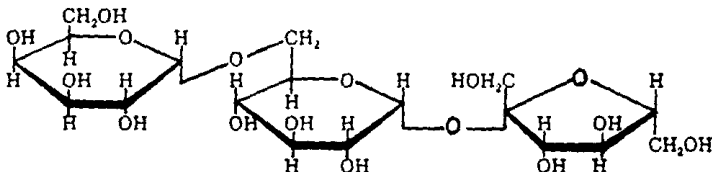
XILOSA (D-Xilosa). $C_5H_{10}O_5$, PM 150.13 gr.; PF 153-154°C (descomponiéndose). Azúcar de madera. No se encuentra en estado libre. En forma de xilán (polisacárido) se asocia con celulosa. 1 gr. se disuelve en 0.8 ml de agua; soluble en alcohol y piridina.



α -D-xilosa

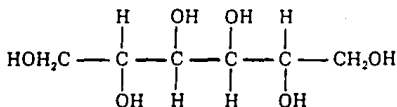
Diferencia S. marcescens de 0 a 7% (-), de S. liquefaciens 100% (+); Proteus spp. (+), de Providencia spp. (-); Shigella serogrupos A, B y C y Shigella sonnei 2% (-), de E. coli activa 70% (+) y E. coli inactiva 95% (+).

RAFINOSA (o- α -D-Galactopiranosil-(1 6)- α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido). $C_{18}H_{32}O_{16}$, PM 504.46 gr.; PF 80°C. Trisacárido constituido de una molécula de D-galactosa, D-glucosa y D-fructosa. Se encuentra en Eucaliptus spp. Myrtaceae. 1 gr. se disuelve en 7 ml de agua y en 10 ml de metanol.



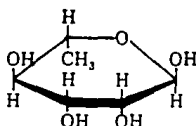
Conjuntamente con la xilosa diferencia: S. marcescens 0 a 2% (-) de S. liquefaciens 85% (+); Y. enterocolitica 5% (-), de Y. frederiksenii y Y. kristensenii 30 y 45% (+); C. freundii 30% (v), de C. diversus y C. amalonaticus 0% (-).

DULCITOL (Galactitol). $C_6H_{14}O_6$, PM 182.17 gr.; PF 188-189°C. Se encuentra en Melampyrum spp. Scrophulariaceae. 1 gr. se disuelve en 30 ml de agua y en 2 ml de agua hirviendo; ligeramente soluble en álcalis.



Diferencia E. coli inactiva 40% (+), de Shigella serogrupos A, B, C y S. sonnei 2 y 0% (-); Yersinia spp. 0% (-), de E. coli 60% (+); S. typhi y S. choleraesuis 0 y 5% (-), de serotipos de Salmonella subgrupo 1, 96% (+).

RAMNOSA (6-Desoxi-L-manosa; L-ramnosa). $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$, PM 164.16 gr.; PF 82-92°C. Se encuentra en forma natural en el veneno zumaque de Rhus toxicodendron L., Anacardiaceae. También ha sido aislada de la pared de bacterias gram (-). Soluble en agua.



α -L-ramnosa

Diferencia Citrobacter spp. (+) de Edwardsiella spp. (-); Shigella serogrupos A, B y C 5% (-), de E. coli activa 80% (+) y E. coli inactiva 65% (+). Salmonella spp. (+) de Proteus spp. (-); Serratia spp. (-), de Enterobacter sp. y Klebsiella sp. (+).

Otros sustratos:

FENILALANINA-DESAMINASA.- Diferencia la tribu Proteeae de la tribu Salmonellae y Citrobacter. En ventaja con la prueba de triptofano-desaminasa (TDA) es útil en la determinación de especies de E. agglomerans y E. sakasakii siendo por otro lado fácil de preparar.

Los sustratos LDC, ADH, ODC, CIT, MAL, IND, VP, ONPG y URE son pruebas preliminares sin duda de gran utilidad en la diferenciación bacteriana, además de delimitar los niveles taxonómicos familia y tribu, determinan con precisión un gran porcentaje de géneros y/o especies de enterobacterias (Koneman, 1988; Lennette, 1985; Mac Faddin, 1984; Farmer III, 1984; Windholz, Budavari, Blumetti, and Otterbein, 1983; Ewing, 1980).

APENDICE III.

INSTRUCTIVO PARA LA ELABORACION DE SUSTRATOS BIOQUIMICOS DEL SISTEMA MINIATURIZADO DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN" (INNSZ).

o-NITROFENIL-β-D-GALACTOPIRANOSIDO (ONPG).

Ingredientes:

a) Solución de ONPG

ONPG (Sigma Chemical Company)	0.6	gr.
IPTG (Isopropil-tiogalactopiranósido) (Sigma Chemical Company)	0.008	gr.
PBS (Buffer de fosfatos)	10	ml.

b) Agua peptonada (1%)

Peptona (Difco Laboratories)	1	gr.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker) (NaCl)	0.5	gr.
PBS	10	ml.

Preparación de la base:

- Disolver por calentamiento la peptona y el NaCl en los 10 ml de PBS, ajustar a pH 8 - 8.4 .
- Hervir durante 10 minutos "suavemente" sin permitir evaporación excesiva.
- Reajustar a pH 7.2 - 7.4 .

Preparación de la solución de ONPG:

-Se disuelve el ONPG en los 10 ml de PBS calentando a baño maría y agitando constantemente, en caso de no ceder, calentar a fuego directo con precaución, hasta aclarar la solución.

Nota: no exceda la estancia a fuego directo, ni use ácidos o bases para su disolución.

- Agregar el isopropil-tiogalactopiranosido (ITPG).
- Estando aún caliente la solución de ONPG mezclarla inmediatamente con la solución peptonada 3 partes por 1:

ONPG	2.5 ml.
Peptona	7.5 ml.
- Esterilizar por filtración.
- Incluir 10 μ l de la solución en los micropozos cuidando no precipite al ir enfriando.

Interpretación:

- Reacción positiva (+): color amarillo tenue.
- Reacción negativa (-): sin cambio (incolore).

VOGES-PROSKAUER (VP).

Ingredientes:

Peptona (Difco Laboratories)	0.7	gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	2	gr.
Fosfato Dipotásico (K_2HPO_4) (J. T. Baker)	0.5	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Agregar la base a los 10 ml de PBS y calentar "suavemente" hasta ebullición.
- Una vez fría, agregar la glucosa y disolver.
- Ajustar a pH 6.9 - 7 .
- Esterilizar por filtración.
- Vaciar 10 μ l de la solución a la microplaca estéril.

Interpretación:

- Reactivos para revelar la reacción:
 - a) α - naftol al 5% .
 - b) Hidróxido de Potasio (KOH) ó Hidróxido de Sodio (NaOH) al 40% .
- Añadir una gota de KOH y enseguida una gota de α -naftol.
- Reacción VP positiva (+): color rojo en la superficie del medio (presencia de acetofna).
- Reacción VP negativa (-): superficie del micropozo incolora después de 10 mins.

PRODUCCION DE INDOL (IND).

Ingredientes:

Triptofano (Sigma Chemical Company)	0.4	gr.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker) (NaCl)	0.5	gr.
Peptona (Difco Laboratories)	0.5	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Disolver la base calentando "suavemente" hasta ebullición.
- Agregar el aminoácido a la base y calentar a fuego directo agitando continuamente hasta completa disolución (no se debe exceder la exposición a fuego directo).
- Ajustar el pH a 7.4 - 7.8 .
- En caso de ser necesario, calentar nuevamente y esterilizar por filtración.
- Vaciar en la microplaca manteniendo caliente la solución en baño maría en ebullición.

Interpretación

- Reactivo para revelar la reacción:
Reactivo de Kovac.
- Añadir 2 gotas del reactivo al micropozo.
- Reacción positiva (+): el reactivo vira de verde amarillo a violeta intenso.
- Reacción negativa (-): sin cambio.

PRODUCCION DE ACIDO SULFHIDRICO H₂S.

Ingredientes:

Extracto de carne (Difco Laboratories)	0.3	gr.
Extracto de levadura (Difco Labs.)	0.3	gr.
Peptona (Difco Laboratories)	2	gr.
Citrato Férrico Amoniaco (J. T.Baker)	0.05	gr.

Tiosulfato de Sodio (J. T. Baker) ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.2	gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.1	gr.
Cisteína (Sigma Chemical Company)	0.0008	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Agregar los 4 primeros ingredientes al PBS y disolver por calentamiento moderado hasta ebullición.
- Dejar enfriar completamente y agregar la glucosa y la cisteína.
- Ajustar a pH 7 - 7.3 .
- Esterilizar por filtración y vaciar en las microplacas.

Interpretación:

- Reacción positiva (+): se observa ennegrecimiento del micropozo.
- Reacción negativa (-): sin cambio (incolores).

FENILALANINA-DESAMINASA (FDA).

Ingredientes:

Fenilalanina (Sigma Chemical Company)	0.4	gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.3	gr.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker) (NaCl)	0.5	gr.
Fosfato Disódico (J. T. Baker) (Na_2HPO_4)	0.1	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Disolver la base por calentamiento "suave" hasta ebullición.
- Agregar el aminoácido y disolver en baño maría a 55°C.

- Ajustar a pH 7.3 .
- Esterilizar por filtración y vaciar en las microplacas estériles.

Interpretación:

- Reactivo para revelar la reacción:
Cloruro Férrico (FeCl_3) al 40% .
- Añadir 2 o 3 gotas del reactivo al micropozo y tomar lectura al momento.
- Reacción positiva (+): precipitado verde oscuro.
- Reacción negativa (-): no cambia el color del reactivo.

REACCION DE UREASA (URE).

Ingredientes:

Peptona (Difco Laboratories)	0.1	gr.
Urea (Merck & CO., Inc.)	2	gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.1	gr.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker) (NaCl)	0.5	gr.
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (J. T. Baker)	0.2	gr.
Rojo de Fenol (Sigma Chemical Company)	0.01	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Añadir los ingredientes de la base al solvente, calentar "suavemente" hasta ebullición.
- Fría la solución, agregar la urea y la glucosa (no se añada si no está totalmente fría la solución), y disolver.
- Ajustar a pH 5 .
- Esterilizar por filtración.
- Vaciar 10 μl a cada pozo de la microplaca.

Interpretación:

- Reacción positiva (+): presenta un color naranja intenso a rojo.
- Reacción negativa (-): color original, amarillo canario.

DESCARBOXILACION DE AMINOACIDOS:

LISINA DESCARBOXILASA (LDC).

Ingredientes:

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	gr.
Rojo de fenol (Sigma Chemical Company)	0.01	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Se calienta "suavemente" la base hasta ebullición.
- Fría la solución, agregar el aminoácido y la glucosa agitando continuamente.
- Ajustar a pH 5 .
- Esterilizar por filtración.
- Vaciar 10 µl a cada pozo de la microplaca.

Interpretación:

- Reacción positiva (+): presenta un color de naranja intenso a rojo.
- Reacción negativa (-): color original, amarillo canario.

ORNITINA DESCARBOXILASA (ODC).

Ingredientes:

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	gr.
Rojo de fenol(Sigma Chemical Company)	0.01	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Se agregan todos los componentes al PBS, exceptuando el aminoácido y la glucosa, disolviendo por calentamiento "suave" hasta ebullición.
- Esperar que enfíe la solución y agregar reactivos faltantes.
- Ajustar a pH 5 .
- Esterilizar por filtración.
- Vaciar 10 μ l a cada pozo de la microplaca.

Interpretación:

- Reacción positiva (+): presenta un color naranja intenso a rojo.
- Reacción negativa (-): color original, amarillo canario.

ARGININA DESHIDROLASA (ADH).

Ingredientes:

Peptona (Difco Laboratories)	0.5	gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.5	gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.05	gr.
Arginina (Sigma Chemical Company)	2	gr

Fosfato disódico (J. T. Baker) (Na_2HPO_4)	0.1	gr
Rojo de fenol (Sigma Chemical Company)	0.01	gr.
PBS	10	ml.

Preparación:

- Se disuelven los ingredientes en el PBS por calentamiento "suave".
- El aminoácido y la glucosa se añaden una vez fría la solución, agitando continuamente.
- Ajustar a pH 5 .
- Esterilizar por filtración.
- Vaciar 10 μl a cada pozo de la microplaca.

Interpretación:

- Reacción positiva (+): presenta un color naranja intenso a rojo.
- Reacción negativa (-): color original, amarillo canario.

UTILIZACION DE CITRATO (CIT).

Ingredientes:

Citrato de Sodio (J. T. Baker)	0.8	gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.02	gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.05	gr.
Cisteína (monoclorhidratada)	0.01	gr.
Fosfato monopotásico (J. T. Baker) (KH_2PO_4)	0.1	gr.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker) (NaCl)	0.5	gr
Sulfato de Magnesio (J. T. Baker) (MgSO_4)	0.02	gr

Azul de Bromotimol (Merck & CO., Inc.)	0.022 gr 1.5 ml (solución alcohólica).
--	---

PBS	10 ml.
-----	--------

Preparación:

a) Caldo de Citrato de Sodio.

- Se disuelven los ingredientes de la base sin el indicador en los 10 ml de PBS, calentando "suavemente" hasta ebullición.
- Una vez fría, añadir el citrato de sodio, la glucosa y la cisteína agitando hasta disolver.
- Ajustar a pH 6 .
- Esterilizar por filtración.

b) Indicador.

- Agregar 0.08 gr de azul de bromotimol en 5.3 ml de alcohol etílico absoluto ó al 96%, para obtener una concentración al 1.5%. Disolver perfectamente.

c) Mezcla de las soluciones.

- Añadir 1.5 ml (0.022 gr) del indicador a la solución de citrato de sodio en condiciones asépticas y homogeneizar.
- Vaciar 10 μ l del sustrato preparado a cada pozo de la microplaca estéril, lo más pronto posible para evitar precipitación del indicador.

Interpretación:

- Alcalinidad, reacción positiva (+): color azul de Prusia intenso.
- Acidez, reacción negativa (-): color amarillo a verde claro.

UTILIZACION DE MALONATO (MAL).

Ingredientes:

Malonato de Sodio (Sigma Chemical Company)	0.5 gr.
Glucosa (Sigma Chemical Company)	0.025 gr.
Extracto de levadura (Difco Laboratories)	0.1 gr.

Sulfato de amonio (J. T. Baker) ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0.2 gr.
Fosfato dipotásico (J. T. Baker) (K_2HPO_4)	0.06 gr.
Fosfato monopotásico (J. T. Baker) (KH_2PO_4)	0.04 gr.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker) (NaCl)	0.2 gr.
Azul de Bromotimol (Merck CO., Inc.)	0.022 gr. 1.5 ml. (solución alcohólica).
PBS	10 ml.

Preparación:

- Se disuelven los ingredientes de la base sin el indicador en los 10 ml de PBS, calentando "suavemente" hasta ebullición.
- Una vez fría, añadir el malonato de sodio y la glucosa, agitando continuamente.
- Ajustar a pH 6.6 .
- Esterilizar por filtración.
- Preparar el indicador según se refiere en la prueba del citrato.
- Añadir 1.5 ml (0.022 gr) de azul de bromotimol a la solución de malonato.
- Vaciar 10 μl a cada pozo de la microplaca, lo mas pronto posible para evitar precipitación del indicador.

Interpretación:

- Alcalinidad reacción positiva (+): color azul de Prusia intenso.
- Acidez reacción negativa (-): color amarillo a verde claro.

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS (GLU. ADO. INO. XIL. RAF. RAM y DUL).

Ingredientes:

Peptona (Difco Laboratories)	1.0 gr.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker) (NaCl)	0.5 gr.
Fosfato dipotásico (J. T. Baker) (K ₂ HPO ₄)	0.003 gr.
Carbohidrato (Sigma Chemical Company)	2 gr.
Azul de Bromotimol (Merck, CO., Inc.)	0.022 gr. 1.5 ml. (solución alcoholica).
PBS	10 ml.

Preparación:

a) Caldo base con carbohidrato:

-Disolver los ingredientes de la base sin indicador en 10 ml del PBS, calentando "suavemente" hasta ebullición.

-Fría la base, añadir el carbohidrato deseado, agitando hasta disolución.

-Ajustar a pH 7 - 7.2 .

-Esterilizar por filtración.

* Un caso especial es el DULCITOL, el cual hay que disolver junto con la base en baño de agua en ebullición. En caso de no disolverse, aplicar fuego directo sin exceder.

b) Indicador:

-Preparar el indicador según se refiere en la prueba del Citrato.

-Esterilizar por filtración.

c) Mezcla de las soluciones.

-Añadir 1.5 ml (0,022 gr) de indicador a la solución del carbohidrato en condiciones asépticas, y homogeneizar.

-Vaciar 10 µl del sustrato preparado a cada pozo de la microplaca estéril, lo mas

pronto posible para evitar precipitación del indicador.

Interpretación:

-Reacción positiva (+): color amarillo canario.

-Reacción negativa (-): color original azul-verde.

Buffer de Fosfatos (PBS).

Fosfato disódico (J. T. Baker) (Na_2HPO_4)	9.9386	gr.
---	--------	-----

Fosfato monosódico de Sodio (J. T. Baker) (NaH_2PO_4)	3.9272	gr.
---	--------	-----

Fosfato monosódico monohidratado (J. T. Baker) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4.5264	gr.
---	--------	-----

Concentración:	0.1 M/1 lt.		
	0.05 M/2 lt.	pH	7.0

NOTA: todos los sustratos vaciados en la microplaca deberán quedar en el fondo del pozo, evitando la impregnación del sustrato en sus paredes.

La lista colorimétrica para la interpretación de cada reacción se presenta en la Figura B.

TABLA 1. REACCIONES BIOQUIMICAS DE GENEROS Y ESPECIES DE AISLAMIENTO CLINICO RECIENTE, MIEMBROS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

Especie	TRIPLE AZUCAR Superficie/Fondo					Fe-LISINA Superficie/Fondo					U R E	S A C	O D C	R M P	V P	S H S	I N D	M O V	D M A s a	
	N O .	A / A	K / A	G A S	H 2 S	K K	K /	R /	H 2 S	C I T										
<i>C. freundii</i>	86	73	27	70	60	29	69	0	69	99	3	57	10	100	0	99	0	100	0	
<i>E. cloacae</i>	84	69	31	86	0	55	45	0	0	100	0	99	95	12	39	0	0	99	0	
<i>E. agglomerans</i>	18	94	5	39	0	0	100	0	0	50	5	55	0	67	61	0	11	55	0	
<i>E. coli</i>	36	0	100	22	5	78	22	0	5	0	0	50	44	100	0	5	100	78	0	
<i>S. flexneri</i>	39	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	7	0	0	
<i>S. boydii</i>	7	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	71	0	0	
<i>S. dysenteriae</i>	2	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	50	0	0	
<i>S. sonnei</i>	28	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	
<i>K. pneumoniae</i>	74	95	5	92	0	97	3	0	0	100	89	8	0	3	100	0	0	0	0	
<i>K. oxytoca</i>	54	89	11	81	0	94	5	0	0	100	55	39	0	65	93	0	100	0	0	
<i>M. morganii</i>	100	0	100	6	0	27	20	53	36	0	100	0	100	100	0	2	100	97	0	
<i>P. mirabilis</i>	90	0	100	67	95	0	0	100	3	99	99	0	99	100	31	97	0	100	0	
<i>P. vulgaris</i>	26	100	31	42	0	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	96	100	100	0	
<i>P. rettgeri</i>	15	0	100	50	0	0	0	100	0	100	75	0	0	50	0	0	100	75	0	
<i>P. alcalifaciens</i>	50	0	100	67	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0	100	100	0	
<i>Salmonella sp.</i>	35	0	100	26	100	100	0	0	100	100	0	0	97	100	0	97	0	100	0	
<i>S. typhi</i>	32	0	100	0	100	97	3	0	97	0	0	0	0	100	0	100	0	96	0	
<i>S. marcescens</i>	27	41	59	41	0	82	18	0	0	94	29	70	100	35	94	0	0	0	100	
<i>Yersinia sp.</i>	17	100	0	0	0	0	100	0	0	0	29	18	53	100	0	0	70	0	0	
<i>Y. enterocolitica</i>	24	96	4	0	0	0	100	0	0	0	79	67	83	100	0	0	54	0	0	
TOTAL	844																			

Nota: se incluyen resultados en porcentaje de las reacciones bioquímicas a 37°C por 48 Hrs.

TABLA 2 . RESULTADO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS POR MACROMETODO, DADOS POR 121
CEPAS DE AISLAMIENTO CLINICO RECIENTE, UTILIZADAS EN EL ENSAYO COMPARATIVO.

Especie	N o	L D C	O D C	A D H	C D T	H I L	I N D	U R E	H 2 S	M O V	V P	R M	P H	D A	D N A	G L U	G A S	X I L	I N O	S A C	L A C
<i>C. freundii</i>	6	0	0	30	100	1.6	0	0	100	100	0	100	0	0	100	50	100	1.6	83	83	
<i>C. amalonaticus</i>	1	0	100	0	100	0	100	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0
<i>C. diversus</i>	1	0	100	0	100	100	100	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	100	100
<i>E. cloacae</i>	9	0	100	89	100	100	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	89	100	0	89	66
<i>E. agglomerans</i>	4	0	0	0	50	50	50	50	0	100	50	50	0	0	0	100	50	100	25	50	75
<i>E. sakazakii</i>	1	0	100	100	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100	100	0
<i>E. taylorae</i>	1	0	100	100	100	100	0	100	0	100	100	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0
<i>E. coli</i>	10	30	10	20	0	0	90	0	10	60	0	80	0	0	0	100	20	90	0	10	40
<i>Shigella sp.</i>	14	0	0	0	0	0	36	0	0	0	0	72	0	0	0	100	0	43	0	0	0
<i>S. sonnei</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	5	100	0	0	100	100	0	80	0	0	100	0	0	0	0	100	80	100	100	20	80
<i>K. oxytoca</i>	5	100	0	0	100	100	100	80	0	0	100	20	0	0	0	100	40	100	100	40	100
<i>K. ornanae</i>	2	0	0	50	50	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100	100	100	50	0	50
<i>H. morgani</i>	6	0	100	0	0	0	100	100	16	100	0	100	83	0	0	100	0	0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	6	0	100	0	100	0	0	100	100	100	66	100	100	0	0	100	83	100	0	0	0
<i>P. vulgaris</i>	7	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100	100	71	0	100	43	96	0	0	0
<i>P. penneri</i>	2	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	100	100	0	0	100	100	100	0	0	0
<i>P. rettgeri</i>	5	0	0	0	100	0	100	100	0	100	0	100	100	0	0	100	20	20	100	0	0
<i>P. alcalifaciens</i>	6	0	0	0	83	0	100	0	0	83	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0
<i>Salmonella sp.</i>	5	100	100	0	100	20	0	0	100	100	0	100	0	0	0	100	100	100	60	0	0
<i>S. typhi</i>	4	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	25	0	0
<i>S. arizonae</i>	4	100	100	0	100	100	0	0	100	100	0	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	6	100	100	0	100	0	0	16	0	100	100	33	0	100	100	66	0	50	83	0	0
<i>S. liquefaciens</i>	2	100	100	0	100	0	0	0	0	100	100	50	0	0	100	100	0	100	100	100	0
<i>Yersinia sp.</i>	4	0	100	0	0	0	50	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	100	25	0	100
TOTAL	121																				

Nota: se incluyen resultados en porcentaje de las reacciones bioquímicas a 37 °C por 24 hrs.

TABLA 3. ESQUEMA BIOQUIMICO DE CEPAS CONTROL DEL ATCC.

TRIPLE AZUCAR Fe-LISINA											S	I	M		
S	F	GAS	H ₂ S	S	F	H ₂ S	CIT	UREA	SAC	ORN	RM	VP	H ₂ S	IND	MOV

A	A	+	-	K	K	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Klebsiella pneumoniae
ATCC 13883

TRIPLE AZUCAR Fe-LISINA											S	I	M		
S	F	GAS	H ₂ S	S	F	H ₂ S	CIT	UREA	SAC	ORN	RM	VP	H ₂ S	IND	MOV

A	A	+	+	R	A	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Proteus vulgaris
ATCC 13315

TRIPLE AZUCAR Fe-LISINA											S	I	M		
S	F	GAS	H ₂ S	S	F	H ₂ S	CIT	UREA	SAC	ORN	RM	VP	H ₂ S	IND	MOV

K	A	+	-	K	A	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Enterobacter cloacae
ATCC 23355

TRIPLE AZUCAR Fe-LISINA											S	I	M		
S	F	GAS	H ₂ S	S	F	H ₂ S	CIT	UREA	SAC	ORN	RM	VP	H ₂ S	IND	MOV

K	A	+	+	K	K	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Salmonella typhimurium
ATCC 14028

TRIPLE AZUCAR Fe-LISINA											S	I	M		
S	F	GAS	H ₂ S	S	F	H ₂ S	CIT	UREA	SAC	ORN	RM	VP	H ₂ S	IND	MOV

K	K	-	-	K	K	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Pseudomonas aeruginosa
ATCC 10145

TABLA 4. CONCENTRACION Y pH OPTIMOS, PARA CADA SUSTRATO DEL MICROSISTEMA "INNSZ"

SUSTRATO	CONC. OPTIMA EN MICROPOZO (%)	pH
- CARBOHIDRATOS: GLUCOSA, XILOSA, RAMNOSA, ADONITOL, INOSITOL, DULCITOL y RAFINOSA.	2	7
- o-NITROFENIL-β-D GALACTOPIRANOSIDO (ONPG)	0.6	7.2
- AMINOACIDOS: LISINA, ORNITINA Y ARGININA	2	5
- MALONATO	0.5	6.6
- CITRATO	0.8	6
- UREA	2	5
- FENILALANINA	0.4	7.3
- PRUEBA DE INDOL TRIPTOFANO	0.4	7.6
- PRUEBA DE H ₂ S CISTEINA	0.0008	7.3
TIOSULFATO DE SODIO	0.2	
CITRATO FERRICO AMONICAL	0.05	
- PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER GLUCOSA	2	7

Nota: se da la concentración óptima de cada sustrato, después de reconstituir con 100 µl de suspensión bacteriana.

TABLA 5. PATRON BIOQUIMICO DADO POR CEPAS DE REFERENCIA DEL ATCC, EN MICROSISTEMA "INNSZ"

ONPG LDC CIT ADH FDA IND MAL URE VP H₂S

+ + + - - - + + - -

GLU XIL RAF RAM ADO INO DUL ODC

+ + + + + + + -

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883

BIOTIPO NUMERICO 7 0 3 6 7 3

ONPG LDC CIT ADH FDA IND MAL URE VP H₂S

+ + - - - + - - - -

GLU XIL RAF RAM ADO INO DUL ODC

+ + - + - - - +

Escherichia coli ATCC 25922

BIOTIPO NUMERICO 3 4 0 6 2 4

ONPG LDC CIT ADH FDA IND MAL URE VP H₂S

- + + + - - - - - +

GLU XIL RAF RAM ADO INO DUL ODC

+ - - + - - - +

Salmonella typhimurium ATCC 14028

BIOTIPO NUMERICO 6 1 0 3 2 4

TABLA 6. CONCORDANCIA DE IDENTIFICACION ENTRE EL METODO CONVENCIONAL Y MICROSISTEMA "INNSZ" A NIVEL DE GENERO

Organismos Identificados por Microsistema:

Organismos Identificados por Método Convencional	No.	C	E	E	S	K	M	P	P	S	S	Y	ND
	d	i	n	s	h	l	o	r	r	a	e	e	
e	t	r	e	c	i	e	r	o	o	l	r	r	
e	o	r	e	h	g	b	g	t	v	m	a	i	
C	b	o	r	l	l	i	n	u	d	n	t	n	
e	a	b	i	l	e	e	s	e	e	l	a	i	
p	c	a	c	a	l	l	i	n	c	l	a	i	
a	t	c	h	l	l	l	l	c	i	l	a	i	
s	e	t	i	a	a	a	a	a	a	a	a	a	
r	r	e	r										
Total	121												
<i>Citrobacter</i>	8	8											
<i>Enterobacter</i>	15		15										
<i>Escherichia</i>	10		1	7	2								
<i>Shigella</i>	19				17								2
<i>Klebsiella</i>	12	1				11							
<i>Morganella</i>	6						6						
<i>Proteus</i>	15							15					
<i>Providencia</i>	11								11				
<i>Salmonella</i>	13									13			
<i>Serratia</i>	8										8		
<i>Yersinia</i>	4			2			1					1	

CONCORDANCIA 92.5%

kappa = 0.936; z = 30.76 con p < 0.0001

TABLA 7. CONCORDANCIA DE IDENTIFICACION ENTRE METODO CONVENCIONAL Y MICROSISTEMA "INNSZ" A NIVEL DE ESPECIE

Organismos identificados por Microsistema:

Organismos identificados por Método Convencional	No de Cepas	C. freundii	C. amalonaticus	C. diversus	E. cloacae	E. agglomerans	E. sakazakii	E. taylorae	E. coli	S. sonnei	K. pneumoniae	K. oxytoca	K. ozaenae	M. morganii	P. mirabilis	P. vulgaris	P. penneri	P. rettgeri	P. alcalifaciens	Salmonella typhi	S. arizonae	S.erratia	S. marcescens	S. liquefaciens	
Citrobacter	6	1	5																						
C. amalonaticus	1		1																						
C. diversus	1			1																					
E. cloacae	9				1	2	6		1																
E. agglomerans	4						4																		
E. sakazakii	1							1																	
E. taylorae	1								1																
E. coli	10				1				7	2															
S. sonnei	5								1	4															
K. pneumoniae	5										5														
K. oxytoca	5											5													
K. ozaenae	2	1											1												
M. morganii	6													6											
P. mirabilis	6														6										
P. vulgaris	7															6									
P. penneri	2																7								
P. rettgeri	5																	2							
P. alcalifaciens	6																		1	4					
Salmonella sp.	5																				6				
S. typhi	4																					5			
S. arizonae	4																						4		
S. marcescens	6																							1	5
S. liquefaciens	2																							1	1

CONCORDANCIA 87.4%

λ ppa = 0.936; z = 30.76 con p 0.0001

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 8. ANALISIS DE IDENTIFICACIONES ERRONEAS A NIVEL DE GENERO POR EL MICROSISTEMA "INNSZ".

No.	IDENTIFICACION CORRECTA	IDENTIFICACION POR MICROSISTEMA	PRUEBA(S)BIOQUIMICA(S) DISCREPANTES
111	<u>E. coli</u>	<u>Enterobacter sp.</u>	VP(+)
124	<u>E. coli</u>	<u>Shigella sp.</u>	LDC(-), ODC(-) XIL(-), DUL(-)
126	<u>E. coli</u>	<u>Shigella sp.</u>	ONPG(-), XIL(-)
137	<u>K. ozaenae</u>	<u>C. freundii</u>	H ₂ S(+)
25	<u>Yersinia sp.</u>	<u>E. coli</u>	URE(-), ONPG(-)
53	<u>Yersinia sp.</u>	<u>E. coli</u>	URE(-), ONPG(-)
80	<u>Yersinia sp.</u>	<u>M. morgani</u>	ONPG(-)
14	<u>Shigella sp.</u>	No Identificada	GLU(-)
22	<u>Shigella sp.</u>	No Identificada	GLU(-)

TABLA 9. ANALISIS DE IDENTIFICACIONES ERRONEAS A NIVEL DE ESPECIE POR EL MICROSISTEMA "INNSZ".

No.	IDENTIFICACION CORRECTA	IDENTIFICACION POR MICROSISTEMA	PRUEBA(S)BIOQUIMICA(S) DISCREPANTES
32	<u>C. freundii</u>	<u>Citrobacter sp.</u>	FDA(+)
52	<u>E. cloacae</u>	<u>E. taylorae</u>	RAF(-), URE(-)
73	<u>E. cloacae</u>	<u>Enterobacter sp.</u>	VP(-), XIL(-), RAM(-)
99	<u>E. cloacae</u>	<u>Enterobacter sp.</u>	FDA(+), LDC(+), XIL(-), ADH(-).
120	<u>P. rettgeri</u>	<u>Providencia sp.</u>	ODC(+), ADH(+), H ₂ S(+)
68	<u>S. marcescens</u>	<u>Serratia sp.</u>	ADH(+)
103	<u>S. liquefaciens</u>	<u>S. marcescens</u>	XIL(-)
122	<u>S. liquefaciens</u>	<u>Serratia sp.</u>	ONPG(-), VP(-)

TABLA 10. ANALISIS DE IDENTIFICACIONES ERRONEAS A NIVEL DE GENERO Y ESPECIE POR EL METODO CONVENCIONAL

No.	IDENTIFICACION CORRECTA	IDENTIFICACION M.CONVENCIONAL	PRUEBA(S)BIOQUIMICA(S) DISCREPANTES
9	<u>Shigella sp.</u>	<u>E. coli</u> inactiva	XIL(+)
10	<u>Shigella sp.</u>	<u>E. coli</u> inactiva	XIL(+)
11	<u>Shigella sp.</u>	<u>E. coli</u> inactiva	XIL(+) GENERO
13	<u>Shigella sp.</u>	<u>E. coli</u> inactiva	XIL(+)
5	<u>Shigella sp.</u>	<u>Escherichia sp.</u>	XIL(+), MAL(+)
7	<u>Shigella sp.</u>	<u>E. coli</u> inactiva	XIL(+)
137	<u>K. ozaenae</u>	<u>Klebsiella sp.</u>	ADH(+) ESPECIE

**TABLA 11. VARIACION DE CODIGOS (BIOTIPOS NUMERICOS
A NIVEL DE GENERO Y ESPECIE PARA MACROMETODO CONVENCIONAL**

No. CODIGOS IGUALES	No. CEPAS Y %	No. DE CODIGOS VARIANTES (%)	
		GENERO	ESPECIE
4	91 (75)	0 (0)	0 (0)
3	24 (20)	0 (0)	2 (8.6)
2	6 (5)	0 (0)	0 (0)
0	-	-	-
TOTAL	121 (100)	0 (0) (% global)	0 (1.6) (% global)

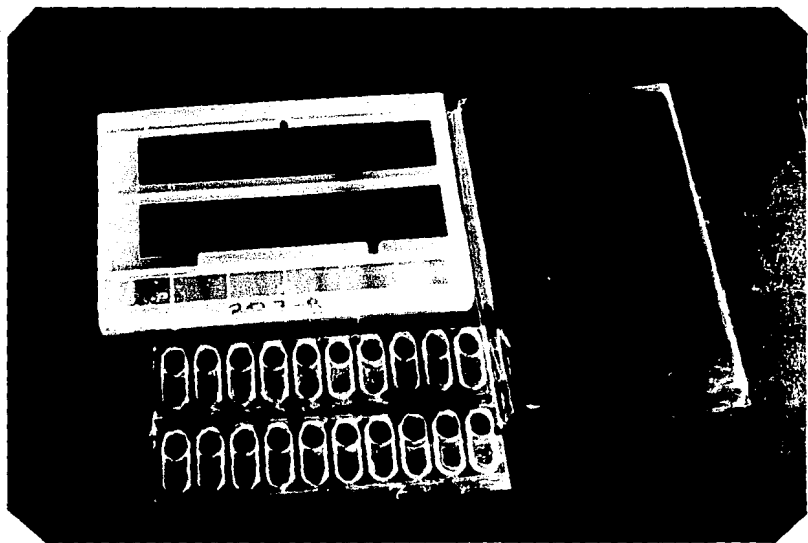
**TABLA 12. VARIACION DE CODIGOS (BIOTIPOS NUMERICOS)
A NIVEL DE GENERO Y ESPECIE PARA MICROSISTEMA**

No. CODIGOS IGUALES	No. CEPAS Y %	No. DE CODIGOS VARIANTES (%)	
		GENERO	ESPECIE
4	46 (38)	0 (0)	0 (0)
3	29 (3)	4 (14)	5 (17)
2	39 (32)	10 (25.6)	8 (20.5)
0	7 (6)	3 (43)	1 (15)
TOTAL	121 (100)	17 (14) (% global)	14 (11.6) (% global)

**TABLA 13. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y EXACTITUD DE
 SUSTRATOS BIOQUIMICOS DEL MICROSISTEMA, EN COMPARACION CON
 EL SISTEMA CONVENCIONAL**

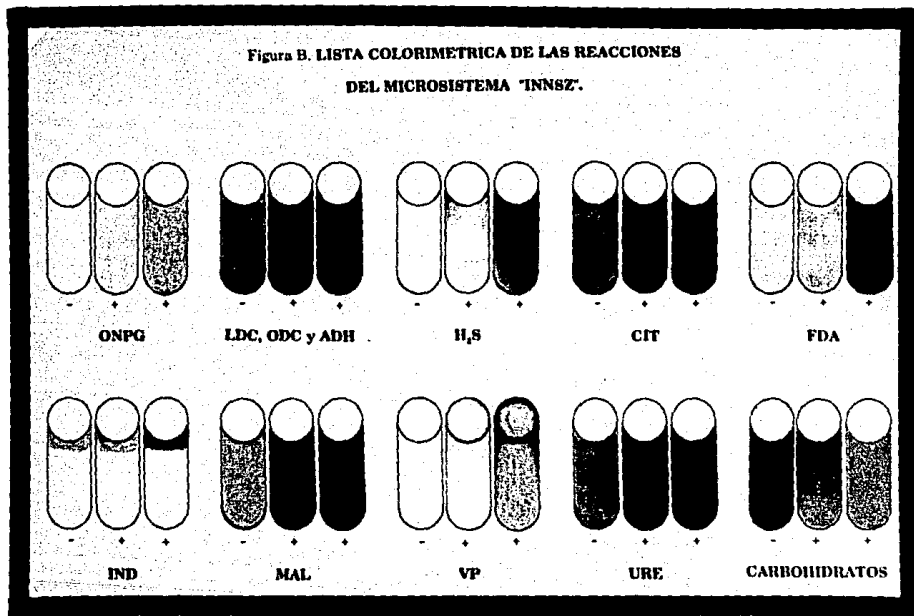
SUSTR.	MICRO. (+)	SIST. CONV. (+)	SENSI. (%)	ESPECI. (%)	EXACT (%)
LDC	34	27	77.2	96.6	90.3
ODC	56	47	97.9	89.1	93.0
ADH	29	15	93.7	87.6	88.3
CIT	65	65	97.0	98.2	97.6
MAL	33	32	86.4	93.7	91.6
IND	54	49	98.0	92.3	94.5
URE	33	40	81.6	97.6	93.0
H ₂ S	39	39	97.3	95.5	96.0
VP	28	37	77.1	96.5	89.6
FDA	27	31	86.1	98.9	95.2
GLU	119	121	98.4	100	97.6
XIL	37	81	65.8	100	74.2
INO	21	27	72.9	95.9	89.6

Figura A. MICROPLACA Y ADITAMENTOS DEL SISTEMA API 20E DE REUSO.



Microplaca, soporte de hidratación
y charola para suspensión bacteriana

Figura B. LISTA COLORIMETRICA PARA LA INTERPRETACION DE REACCIONES DEL "MINNSZ".



LISTA DE ABREVIATURAS

A	Acido
ADH	Arginina deshidrolasa
CIT	Citrato
DNAsa	Acido desoxirribonucleasa
FDA	Fenilalanina desaminasa
GLU	Glucosa
H ₂ S	Acido sulfhídrico
IND	Indol
INO	Inositol
IPTG	Isopropil-tiogalactopiranósido
K	Alcalino
LAC	Lactosa
LDC	Lisina descarboxilasa
MAL	Malonato
MOV	Movilidad
ODC	Ornitina descarboxilasa
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido
ORN	Ornitina
PBS	Buffer de fosfatos
R	Rojo
RAF	Rafinosa
RAM	Ramnosa
RM	Rojo de metilo
SAC	Sacarosa
URE	Urea
VP	Voges-Proskauer
XIL	Xilosa

RESUMEN:

DESARROLLO DE UN METODO MINIATURIZADO PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS.

OBJETIVO: el propósito de este estudio, fue desarrollar y comparar un Sistema Miniaturizado para la identificación de enterobacterias, con el Macrométodo Convencional (MC).

MATERIALES Y METODOS: el Microsistema INNSZ (MINNSZ) incluyó 19 pruebas bioquímicas: descarboxilación de lisina, ornitina e hidrólisis de arginina, (LDC, ODC y ADH), utilización de citrato y malonato de sodio (CIT, MAL), producción de ácido sulfhídrico, acetoina, ureasa e indol (H_2S , VP, URE, IND), desaminación de fenilalanina (FDA), fermentación de glucosa (GLU), xilosa (XIL), inositol (INO), ramnosa (RAM), rafinosa (RAF), adonitol (ADO), dulcitol (DUL) y presencia de β -galactosidasa (ONPG). El MC incluyó las 13 primeras pruebas, más producción de gas a partir de glucosa, fermentación de sacarosa y lactosa (SAC y LAC), movilidad, rojo de metilo (RM) e hidrólisis de ADN (DNAsa). Cada micropozo se inoculó con 100 μ l de suspensión bacteriana (0.5 McFarland) y el MC en forma habitual, incubándose 48 hrs. a 37°C. Se hicieron lecturas a 24 y 48 hrs., e informamos resultados a las 24 hrs. Se probaron 121 gérmenes de recién aislamiento por ambos métodos en forma paralela, registrando lectura de 4 observadores, evaluando los resultados en doble ciego.

RESULTADOS: la exactitud para cada sustrato del micrométodo fue $\geq 95\%$ para CIT, H_2S , FDA y GLU; $\geq 90\%$ LDC, ODC, MAL, IND y URE; $\geq 85\%$ ADH, VP e INO, y $< 80\%$ XIL. La sensibilidad $\geq 95\%$ ODC, CIT, IND, H_2S y GLU; $\geq 90\%$ ADH, $\geq 85\%$ MAL y FDA; $\leq 80\%$ LDC, URE, VP, XIL e INO. La especificidad igual al 100% GLU y XIL; $\geq 95\%$ LDC, CIT, URE, H_2S , VP, FDA e INO; $\geq 90\%$ MAL e IND; $\geq 85\%$ ODC y ADH. Se identificaron correctamente a nivel de género 113 (92.4%) cepas y 98 (87.4%) a nivel de especie. La concordancia Micro-Macrométodo por kappa fue $k=0.923$, $z=30.764$ para género, y $k=0.867$, $z=38.362$ para especie con $p<0.0001$. La variabilidad interobservador fue $k=0.907$, $z=93.500$ en MC y $k=0.565$, $z=81.880$ en MINNSZ con $p<0.0001$.

CONCLUSIONES: el MINNSZ fue confiable para la identificación de enterobacterias y comparable con los resultados del MC a las 24 hrs., dado que ofrece en términos estadísticos una concordancia excelente, y una variabilidad interobservador moderada, lo que lo hace eficaz para la identificación de las enterobacterias más comunes de muestras clínicas.