



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

FALLA DE ORIGEN

" COMPARACION DE PRUEBAS BIOQUIMICAS
PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS
EN PLACA Y TUBO "

T E S I S

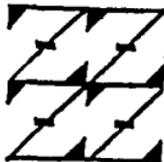
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

MARIA GALIA MARTINEZ FLORES

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1995



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a usted como Sinodal del Examen Profesional del (la) señor (ita):

MARTINEZ FLORES MARIA GALIA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo:

Le agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: _____

"Comparación de pruebas bioquímicas para la identificación de entero-
bacterias en placa y tubo"

y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE M. EN C. LUIS MORA GUEVARA _____

VOCAL Q.F.B. ROBERTO GONZALEZ M. _____

SECRETARIO Q.B.P. NA. LUISA DELGADO B. _____

SUPLENTE Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLAN _____

SUPLENTE Q.F.B. HAQUEL RETANA UGALDE _____

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. 24 de marzo de 1995.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados.
c.c.p. Interesado.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR DARME LA VIDA

**A MI MADRE ANGELA FLORES ROSAS POR SER SIEMPRE MI GUIA Y POR
TODO SU AMOR.**

**A MI PADRE FIDEL MARTINEZ FLORES POR SER MI MEJOR MAESTRO Y
HABERME GUIADO POR CAMINOS DE INQUIETUD INTELECTUAL.**

**A MIS HERMANOS ROCIO, IRELA, CORAL, RAUL, YURIA, VOLGA, ARGEL,
URIEL Y ZAIRE POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO.**

**A ILSE POR SER EL EJE DE MI VIDA
A ALBERTO POR TODO SU APOYO Y CARINO**

A MIS CUNADOS Y SOBRINOS POR SU APOYO INCONDICIONAL

A MIS MAESTROS Y AMIGOS

**A TODOS AQUELLAS PERSONAS TAN MARAVILLOSAS QUE DE ALGUNA MANERA
CONTRIBUYERON A LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.**

**A MI ASESOR DE TESIS MA. LUISA DELGADO BRISEÑO POR SUS CONSEJOS
Y APOYO INCONDICIONAL**

**A MI DIRECTOR DE TESIS ROBERTO GONZALES MELENDEZ POR TODA SU
AYUDA, PACIENCIA Y APOYO INCONDICIONAL**

**A LOS PROFESORES: RAQUEL RETANA UGALDE
PATRICIA VIDAL MILLAN
Y LUIS MORA GUEVARA
POR CONTRIBUIR EN LA REALIZACION DE ESTE
TRABAJO.**

A INES POR TODA TU AYUDA.

CONTENIDO

Capítulo		Páginas
	Resumen	3
	Introducción	5
1	Fundamentación del tema	9
2	Planteamiento del problema	50
3	Objetivos	52
4	Hipótesis	53
5	Material, reactivos y equipo	55
6	Metodología	58
7	Resultados	64
8	Discusión de resultados y sugerencias	73
9	Conclusiones	78
11	Bibliografía	81

RESUMEN

La importancia que representa el laboratorio de análisis clínico es apoyar al médico en la identificación de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas en un periodo de tiempo corto y a un costo razonable.

Las enfermedades diarreicas junto con las infecciones respiratorias agudas constituyen las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países subdesarrollados, como México, y entre sus agentes etiológicos de tipo bacterial se encuentran con mucha frecuencia a miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Aproximadamente el 90% de todos los cultivos clínicos positivos son bacilos gram negativos, y aproximadamente el 95% de éstos pertenecen a la familia enterobacteriaceae.

Hoy en día existen sistemas multipuebas comerciales rápidos, semiautomáticos y automáticos que permiten identificar con rapidez y exactitud a miembros de la familia Enterobacteriaceae, pero éstos no son accesibles a las poblaciones suburbanas y rurales por sus bajos recursos económicos.

Por todos estos factores se determinó la confiabilidad diagnóstica; con respecto al método tradicional en tubo, de una técnica de inoculación múltiple en placa para la identificación de Enterobacterias que reduzca el costo de las pruebas bioquímicas. Este método es una variante del sistema replicador que es fácil de usar y de implementar en cualquier laboratorio, no requiere la adquisición de material, reactivos o equipo adicionales.

Obteniéndose para los medios caldo rojo de fenol con Sacarosa y agar citrato de Simmons una sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica del 100% en caja con respecto al método convencional en tubo. Por ello se concluyó que el modificar el

volumen y soporte de éstos medios no afectó la confiabilidad diagnóstica de los medios, teniéndose así una técnica alternativa para la identificación de especie de Enterobacterias a un costo menor por la reducción en la cantidad de medio, reactivos y material que el requerido en el método convencional. Pero éste método presenta las siguientes desventajas: requiere de un mayor tiempo para la preparación de las cajas con medio de prueba y además es muy altas la probabilidad de contaminación debido a que el tiempo y área de exposición al medio ambiente es mayor al momento de sembrar en cajas que en tubo, pero estas pueden ser eliminadas teniendo precaución al momento de sembrar las muestras para evitar que se contamine el medio y teniendo siempre medios listos para su uso.

Para la prueba de Voges Proskauer y caldo urea se tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad del 0%, debido a que ninguna de las cepas estudiadas dió un resultado positivo por lo que se concluye que es 100% confiable en caja siempre y cuando la prueba sea negativa. Mientras que para la prueba rojo de metilo y caldo rojo de fenol con Manitol se tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 0% por que no hubo ningún resultado negativo en las cepas estudiadas por ello es confiable al 100% siempre y cuando prueba sea positiva. Deduciéndose que es necesario probar una variedad más amplia de cepas que den tanto resultados positivos como negativos para éstas pruebas para poder determinar su confiabilidad diagnóstica en caja.

Para los medios KIA, MIO y SIM; se concluyó que la prueba bioquímica en tubo es mas confiable que en caja, y por ser éstos minisistemas multipuebas implícitamente ya hay una reducción de costos al ser usados en la identificación de microorganismos.

Se concluye finalmente que el método de pruebas bioquímicas en placa reduce la cantidad de material, medio y reactivos utilizados en la identificación de enterobacterias para los medios citrato de Simmons y caldo rojo de fenol con Sacarosa, para los medios caldo rojo de fenol con Manitol, caldo urea y rojo de metilo-Voges Proskauer es necesario estudiar una variedad de cepas en las que se tenga tanto resultados positivos como negativos para determinar su confiabilidad diagnóstica y para los medios KIA, MIO y SIM es necesario hacer una serie de modificaciones a las variables controladas en éste estudio para encontrar las condiciones óptimas para que el método en placa sea tan confiable como el tradicional.

INTRODUCCION

No cabe duda de que entre las clases importantes de enfermedad las infecciones han constituido la carga más pesada para la humanidad. No solamente eran la causa principal de muerte, sino que estas muertes eran a menudo especialmente dolorosas por su frecuencia entre los jóvenes. Además, por su naturaleza epidémica, las infecciones han desmantelado y aterrorizado a las comunidades y han determinado el destino de los ejércitos y de las naciones; así, la viruela permitió a unas pocas docenas de españoles subyugar la floreciente civilización mexicana. Evidentemente el control sobre las infecciones y sobre la polución microbiana del medio ambiente ha sido el gran logro de la ciencia médica. Actualmente es fácil tomar estos adelantos por naturales, pero en épocas pasadas se tuvo a Pasteur y a Roberto Koch (1843-1910) por héroes nacionales. (1)

Los primeros microbios patógenos reconocidos fueron los hongos, cuyo tamaño era superior a las bacterias. En 1836, Agostino Bassi demostró experimentalmente que un hongo era la causa de una enfermedad de los gusanos de seda y Schonlein descubrió, 3 años más tarde, la asociación de un hongo con una enfermedad cutánea humana (tiña favosa). En 1865, Pasteur penetró en el campo de la microbiología patógena con el descubrimiento de un protozoo que amenazaba con arruinar la industria europea de gusano de seda. El papel etiológico de las bacterias fué establecido inequívocamente por Roberto Koch en 1876 para el Antrax. (1,2)

La clave de la identificación de las bacterias como gérmenes patógenos fué el aislamiento de cultivos puros. Koch perfeccionó meticulosamente las técnicas de identificación que se usan actualmente, incluyendo el uso de medios sólidos, en los que las células individuales dan origen a colonias separadas, y el uso de tinciones. El genio de Koch se refleja con más claridad aún en las pacientes modificaciones de sus propios métodos, que le condujeron en 1882, a identificar el bacilo de la tuberculosis. (1,2)

Después de identificar el bacilo tuberculoso, Koch formalizó los criterios introducidos por Henle en 1840, pero reconocidos como postulados de Koch para distinguir un agente patógeno de un microbio accidental: 1) el organismo se encuentra siempre en las lesiones de la enfermedad. 2) puede ser aislado en cultivos puros en medios artificial; 3) la inoculación de estos cultivos origina un proceso parecido en los animales de experimentación, y 4) el agente patógeno puede recuperarse a partir de las lesiones producidas en estos animales. Estos criterios han sido muy valiosos para la identificación de agentes patógenos, aunque no todos ellos se cumplen siempre: Ciertos organismos (entre los que se incluye la totalidad de los virus) no crecen en medio artificial, y otros son patógenos tan sólo para el hombre. (1.2)

Con la poderosa metodología desarrollada por Koch se inició la época dorada de la bacteriología médica. Varios miembros de la escuela Alemana aislaron, entre 1879 y 1889 (además del bacilo de la tuberculosis) el vibrión colérico, bacilo tífico, bacilo difterico, neumococo, estafilococo, estreptococo, meningococo, gonococo y bacilo tetánico. A ello siguieron naturalmente una serie de estudios sobre los mecanismos patogénicos de éstos microorganismos, las respuestas del huésped y los métodos de prevención y tratamiento. (1-3)

El trabajo más importante de los microbiólogos en la medicina es aislar e identificar los agentes causales de las enfermedades infecciosas a un costo razonable y en un periodo de tiempo corto (3,4). Esta importante área de la Microbiología recibe el nombre de Microbiología clínica; en los últimos años este campo se ha ampliado de manera importante debido a la creciente necesidad de identificar al patógeno para el tratamiento adecuado de la enfermedad. (3)

Como el goce de la salud es uno de los derechos fundamentales de todo ser humano, sin distinción de raza, religión, credo político o condición económica o social, lo afirman las cartas de las Naciones Unidas y la declaración de principios de la Organización Mundial de la Salud. La humanidad y la historia son testigos del progreso de los pueblos cuando sus tasas de morbilidad y mortalidad descienden por las políticas de los sistemas de salud. Es preocupación prioritaria del gobierno no sólo la adquisición de tecnología para brindar un servicio médico, sino que éste sea completamente accesible a toda la población. (5)

Aproximadamente el 90% de todos los cultivos bacteriológicos positivos son bacilos gram negativos y aproximadamente el 95% de estos aislamientos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (1,6-8). La mayor parte de éstas bacterias se encuentran en el intestino del hombre y de otros animales, en los que se comportan como comensales de potencial patógeno cuando llegan a infectar algún lugar del cuerpo que no sea el intestino (*Escherichia ssp*, *Klebsiella ssp*, *Serratia ssp* y *Proteus ssp*) (1,9-13). Los bacilos gramnegativos de importancia médica producen infecciones que causan generalmente diarrea o disentería o ambas, tales como *Salmonella ssp*, *Shigella ssp*. (14), *Escherichia coli*, *Vibrio ssp*, *Yersinia ssp* y *Campylobacter ssp* (1,4,15-18). *Klebsiella pneumoniae* es el agente etiológico de la neumonía, especies de *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *E. coli* son encontradas en heridas traumáticas contaminadas con tierra, materia vegetal o de incisiones abdominales luego de la cirugía gastrointestinal (7,10,13).

La enfermedad diarreica aguda constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo y según estudios de laboratorio para la identificación del agente causal se encuentran principalmente virus (Rotavirus, virus Norwalk, Adenovirus), bacterias (*E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella ssp*, *Salmonella ssp*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*) y Parásitos (*G. Lamblia*, *E. histolytica*). Los agentes bacterianos gramnegativos que causan generalmente diarrea o disentería o ambas pertenecen en su gran mayoría a la familia *Enterobacteriaceae*. La Organización Mundial de la Salud señala que en 1988 ocurrieron 1,300 millones de casos de diarrea en niños menores de cinco años y que aproximadamente mueren anualmente en el mundo, por esta causa, 4 millones de niños. (15)

En México la enfermedad diarreica contribuye, junto con la infección respiratoria aguda, con cerca del 80% de las consultas médicas, particularmente a lactantes y preescolares. Pero además, la enfermedad diarreica es la causa más frecuente de defunción en los menores de cinco años de edad. Las tasas de mortalidad más elevadas por esta patología son Oaxaca, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Guerrero y Tabasco (19-21). El desarrollo más significativo en este campo, en los últimos años incluye: a) el conocimiento de que la deshidratación de la diarrea aguda de cualquier etiología puede ser tratada en forma segura y efectiva por el método de hidratación oral y b) La posibilidad de identificar a los agentes causales de la diarrea. (15,19,20)

La identificación preliminar de cualquier microorganismo es posible con pruebas presuntivas, características de las colonias y reacciones bioquímicas en medios de aislamiento primario y morfología microscópica. La identificación de especie requiere la determinación de otras características fenotípicas que reflejan el código genético e identidad única del microorganismo(3,7,8). En el trabajo diagnóstico, las pruebas bioquímicas son pruebas simples que están diseñadas para identificar en una forma clara y concisa la presencia o ausencia de una característica bioquímica, como una enzima. La base de todas estas pruebas puede ser la presencia o ausencia en el microorganismo de una enzima, un grupo de enzimas o una vía metabólica completa. Estas pruebas se han desarrollado en los últimos 75 años y han sufrido numerosas modificaciones, sustituciones y supresiones. Muchas de ellas en la actualidad se realizan en equipos de medios miniaturizados preparados en forma comercial, que constan de una serie de pequeños recipientes que contienen varios medios y reactivos útiles para el diagnóstico. La mayoría de estos equipos están diseñados para ser inoculados de forma sencilla con el microorganismo previamente aislado. Después de un periodo de incubación adecuado, los resultados de las pruebas se leen al observar un cambio de color o alguna reacción interpretada con facilidad (3,6-8,22-34). A pesar de que las pruebas diagnósticas se emplean con más frecuencia en la identificación de bacterias médicamente importantes, pueden también usarse para bacterias de importancia no médica (3).

La identificación de microorganismos gram negativos, especialmente miembros de la familia Enterobacteriaceae, que constituyen en su mayor parte la carga de trabajo en el laboratorio clínico microbiológico, se puede realizar hoy en día por muchos métodos rápidos, estos incluyen pruebas bioquímicas convencionales, sistemas comerciales, técnicas semiautomáticas y automatizadas, métodos serológicos y métodos microscópicos (6-8,23-32,35).

1. FUNDAMENTACION DEL TEMA

1. Enterobacteriaceae

La familia *Enterobacteriaceae* está compuesta por un grupo de bacterias heterogéneas en forma de bastones Gram negativos, no esporógenos, crecen sobre medios simples en condiciones aerobias; anaerobios facultativos, fermentan glucosa, reducen nitratos a nitritos; oxidasa negativos; catalasa positivos, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. (7,8,10,12,17,36,38)

1.1 Importancia médica

Ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en suelos y agua, en plantas y, como lo indica el nombre de la familia, en el tubo digestivo de humanos y animales. Algunas, por ejemplo, *Escherichia coli*, son parte de la flora normal y producen de manera incidental infecciones, en tanto que otros, como *Salmonella ssp.* y *Shigella ssp.* causan síndromes diarreicos y disintéricos acompañados por fiebre y septicemia en los casos típicos de fiebre tifoidea (7,8,18). En la tabla 1.1 se enlistan la flora residente y patogénica del tubo digestivo (1,2,4,7-13,17,18,37,38). Los bacilos Gram negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* son los aislamientos bacterianos hallados con mayor frecuencia en muestras clínicas en el laboratorio. (1,6-8)

1.2 Taxonomía de las *Enterobacteriaceae*

Antes de comentar los métodos para la recuperación e identificación de aislamientos clínicos de la Familia *Enterobacteriaceae*, debe hablarse de la nomenclatura y clasificación actuales de este grupo de bacterias. La taxonomía de esta familia, alguna vez relativamente simple en la actualidad es más compleja y fluida porque la aplicación de nuevas tecnologías a llevado a reexaminar viejos enfoques. Estos avances permiten una clasificación más exactas de los

microorganismos, pero a corto plazo causan confusión a medida que se reordenan nombres y categorizaciones familiares. (4,7,8,10)

tabla 1.1 Flora del tracto gastrointestinal

Residentes: <i>Staphylococcus ssp.</i> no patógenicos <i>Bacteroides ssp.</i> levaduras <i>Streptococcus ssp.</i> <i>Clostridia ssp.</i> <i>Enterobacteriaceae</i>
Patógenos: <i>Salmonella ssp.</i> <i>Shigella ssp.</i> <i>Yersinia ssp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Vibrio ssp.</i> <i>Campylobacter ssp.</i> <i>Aeromonas ssp.</i> <i>Clostridium difficile</i>

Fuente: Koneman, E. 1992

1.2.1 Sistemas de Nomenclatura

Actualmente se usan tres enfoques para denominar a los diversos géneros y especies de la familia Enterobacteriaceae: 1) la nomenclatura propuesta por Ewing, por medio de subagrupamientos fenotípicos en 8 tribus; 2) la clasificación propuesta por Brenner y col., publicada en la edición de 1984, del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, en la cual se definen 14 géneros mayores y 6 adicionales, basados sobre todo en estudios de relacioness de DNA, y 3) el sistema publicado por Farmer y col. en el que las Enterobacteriaceae, estan subagrupadas en 22 géneros, 69 especies y 29 grupos entéricos basados en estudios de relaciones de DNA y características fenotípicas obtenidas del estudio de cientos de aislamientos clínicos enviados para identificación. (7,38)

Si se examinan las similitudes y diferencias de cada género en los tres sistemas, con pocas excepciones, la clasificación de especies bacterianas es similar.(7)

1.2.2 Clasificación de la familia Enterobacteriaceae de acuerdo al *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

Sección 5. Bacilos gram negativos anaerobios facultativos

Familia I. *Enterobacteriaceae*

- Género I. *Escherichia*
- Género II. *Shigella*
- Género III. *Salmonella*
- Género IV. *Citrobacter*
- Género V. *Klebsiella*
- Género VI. *Enterobacter*
- Género VII. *Erwinia*
- Género VIII. *Serratia*
- Género IX. *Hafnia*
- Género X. *Edwardsiella*
- Género XI. *Proteus*
- Género XII. *Providencia*
- Género XIII. *Morganella*
- Género XIV. *Yersinia*

Otros géneros de la familia Enterobacteriaceae:

- Género *Obesumbacterium*
- Género *Xenorhabdus*
- Género *Kluyvera*
- Género *Rahnella*
- Género *Cedecea*
- Género *Tatumella*

Fuente:(7,18,37,38)

1.3 Identificación presuntiva

Las características presuntivas para la identificación en muestras que no sean de material fecal es por medio de una tinción de gram que revele células bacilares o cocobacilares. Sin embargo la diferenciación de especie no puede hacerse sólo en base a la tinción de Gram y características del cultivo al ser aislados en medios diferenciales como Agar de MacConkey, Agar-Eosina-Azul de Metileno (EMB), Agar Salmonella-Shigella (SS), aunque la morfología colonial es utilizada como segundo indicio para su identificación. (1,7,8,12,13,17)

La determinación de especie se basa principalmente en el metabolismo bacteriano regido principalmente por enzimas que han sido codificadas por el material genético de la bacteria y reflejan la identidad única de la bacteria.(3,7)

Una fracción relativamente pequeña de la información genética total de las bacterias está implicada en la producción de enzimas que metaboliza diversos sustratos. Estas enzimas han sido usadas tradicionalmente como marcadores para diferenciar grupos de especies.(3,8)

Si un microorganismo posee una enzima dada y es capaz de utilizar un sustrato, podrá formar un producto final capaz de modificar el pH del medio, lo que podrá visualizarse por el cambio de color de un indicador de pH. En algunos casos la capacidad de un organismo para desarrollar en un medio puede detectarse por aumento de la turbidez o presencia de colonias en la superficie. Este enfoque ha sido modificado en muchas formas durante los últimos años pero aún es útil para la identificación de patógenos poco comunes, de patógenos difíciles de clasificar y como estándar con el cual se comparan las otras pruebas metabólicas.(8)

Los primeros indicios para que un aislamiento desconocido recuperado de una muestra pueda pertenecer a la familia *Enterobacteriaceae* son los siguientes:

- a) células bacilares o cocobacilares Gram negativas
- b) Metabolizan la glucosa de forma fermentativa
- c) No hay actividad citocromooxidasa
- d) Los nitratos son reducidos a nitritos

Con muy pocas excepciones todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presentan estas características.(7,8,10,17)

1.4 Características diferenciales de Identificación

Para la identificación de la especie se requiere la determinación de otras características metabólicas. Las más ampliamente usadas en el laboratorio clínicos por el cual pueden identificarse las enterobacterias excepto unas especies raras o atípicas:

Utilización de hidratos de carbono
Actividad de orto-nitrofenilgalactosidasa (ONPG)
Producción de Indol

Rojo de Metilo

Prueba de Voges-Proskauer (producción de acetyl-metilcarbinol)

Utilización de citratos

Producción de ureasa

Descarboxilación de lisina, ornitina y arginina

Producción de fenilalanina desaminasa

Producción de sulfuro de hidrógeno

Motilidad

(7,8,13,17)

1.4.1 Utilización de hidratos de carbono

Su fundamento se basa en la capacidad de un organismo de fermentar o degradar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas. Es posible usar una variedad de diferentes medios líquidos o de agar para medir la capacidad de un microorganismo de utilizar hidratos de carbono en forma fermentativa. Se agrega al medio un indicador de pH, generalmente rojo de fenol, éste virará de color al acidificarse el medio que contenga el hidrato de carbono a evaluar a una concentración del 1%. (36,39)

Es común que los microbiólogos se refieran a todos los hidratos de carbono como azúcares. Esto es conveniente desde el punto de vista operativo, si bien se comprende que los alcoholes polihídricos como dulcitol o manitol o sales catiónicas de acetato o tartrato, no son hidratos de carbono, y por ende, en un sentido químico no son verdaderamente azúcares. (7) Por todo esto los clasificaremos como: 1) monosacáridos, aldehidos polihidroxicos o cetonas; 2) polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos (polímeros de los monosacáridos) o 3) alcoholes polihídricos. (7,8,36)

tabla 1.2 hidratos de carbono

monosacáridos	polisacáridos	alcoholes polihidricos
ribosa	sacarosa	adonitol
ribulosa	maltosa	dulcitol
xilosa	lactosa	manitol
arabinosa		sorbitol
glucosa		
fructuosa		
galactosa		
manosa		

Fuente:Macfaddin, J. 1990

Por definición la fermentación, es un proceso metabólico de oxidorreducción que ocurre en un medio ambiente anaerobio, y en lugar de oxígeno, un sustrato orgánico sirve como el aceptor final de electrones.(1,7,10,18,36)

Algunas bacterias pueden fermentar anaerómicamente a la glucosa, otras la oxidan y algunas pueden metabolizarla por ambos métodos, mientras que otras, aún, son incapaces de utilizar la glucosa. No todos los monosacáridos son degradados por todas las especies bacterianas; sus formas de fermentación difieren, ayudando a la identificación del grupo, género o especie. Asimismo, las bacterias muestran diferencias en los ciclos utilizados para la fermentación del mismo sustrato dando como resultado diferentes productos finales.(1,10,18,36)

El más importante ciclo fermentativo de la degradación de la glucosa es el ciclo de Embden-Meyerhof, aún cuando también puede producirse por la vía hexosa monofosfato o el ciclo de Entner Duoderoff o en combinación con ellos (Fig. 1.1). No obstante, los tres ciclos requieren de la fosforilación de la glucosa como paso inicial antes de que pueda producirse la degradación. El ácido pirúvico es el intermediario clave en la degradación de glucosa y la desasimilación del ácido pirúvico pasa por muchos mecanismos diferentes que forman una variedad de productos terminales característicos de las fermentaciones bacterianas.(1,4,10,18,36)

VÍA DE EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS

VÍA DE ENTNER-DOUDEROFF

VÍA HEXOSA MONOFOSFATO DE WARBURG-DICKINS

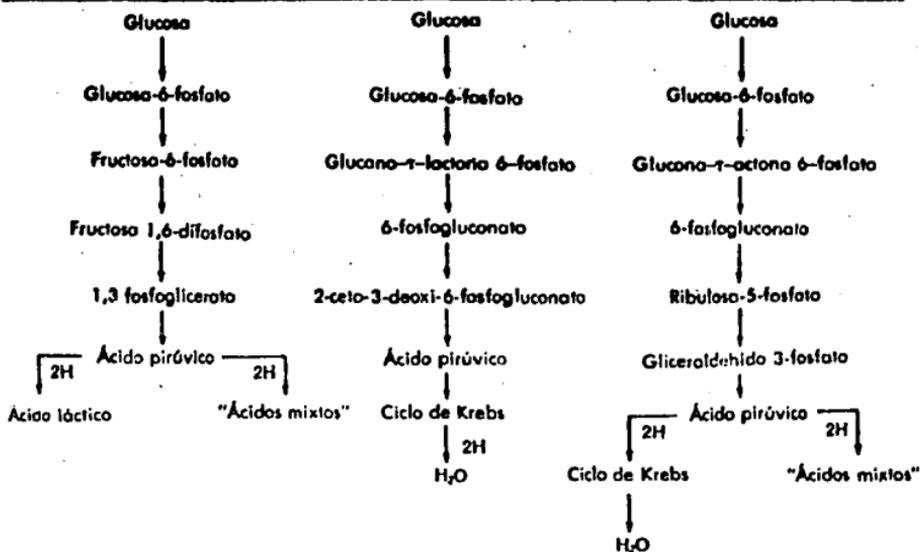
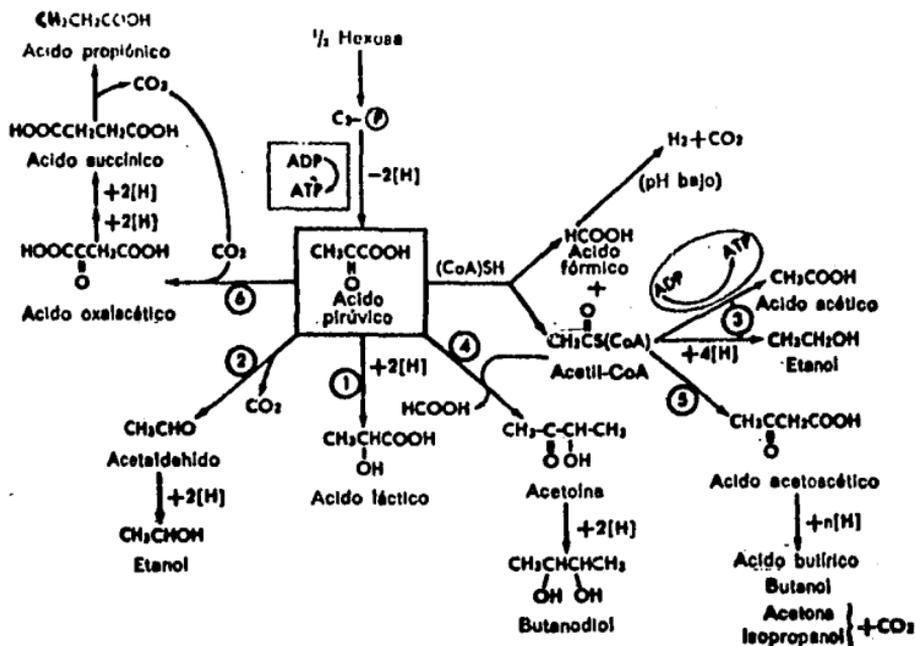


Fig. 1.1 Vías metabólicas de la degradación bacteriana de glucosa.

Fuente: KONEMAN, E. 1992

Las bacterias que fermentan un hidrato de carbono son por lo general anaerobios facultativos. Los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono son: dos gases, hidrógeno y anhídrido carbónico; algunos ácidos, algunos alcoholes y una cetona. Los productos finales varían con cada especie bacteriana, y depende del sistema enzimático existente en la especie. Existen varios tipos principales de fermentación en la figura 1.2 se señala cada una de ellas. (1,18,36)

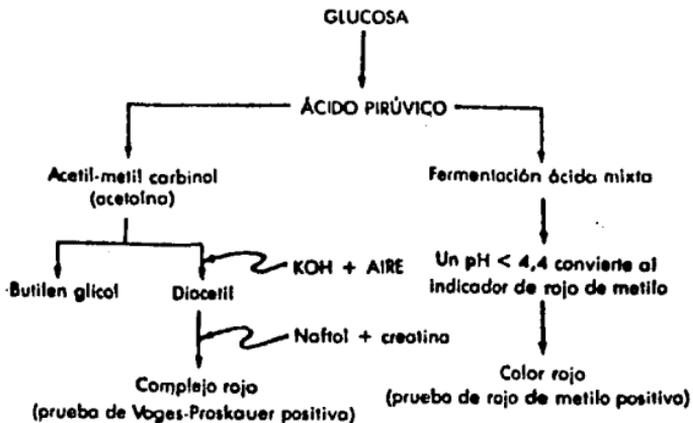
Fig. 1.2 Principales tipos de fermentación



Fuente: Davis, B. 1990

La fermentación ácido mixta es característica de los miembros de las Enterobacterias y estos organismos degradan la glucosa con la formación de una variedad de productos finales, pueden ser divididos en dos categorías: 1) las que producen diversos ácidos mixtos, y 2) las que producen butilenglicol como principal producto final (figura 1.3). El tipo o las combinaciones y cantidades del producto final producido dependen del género o la especie que se este estudiando. (1,7,18,36)

fig. 1.3 Vías de ácidos mixtos y butilenglicol de la fermentación de glucosa.

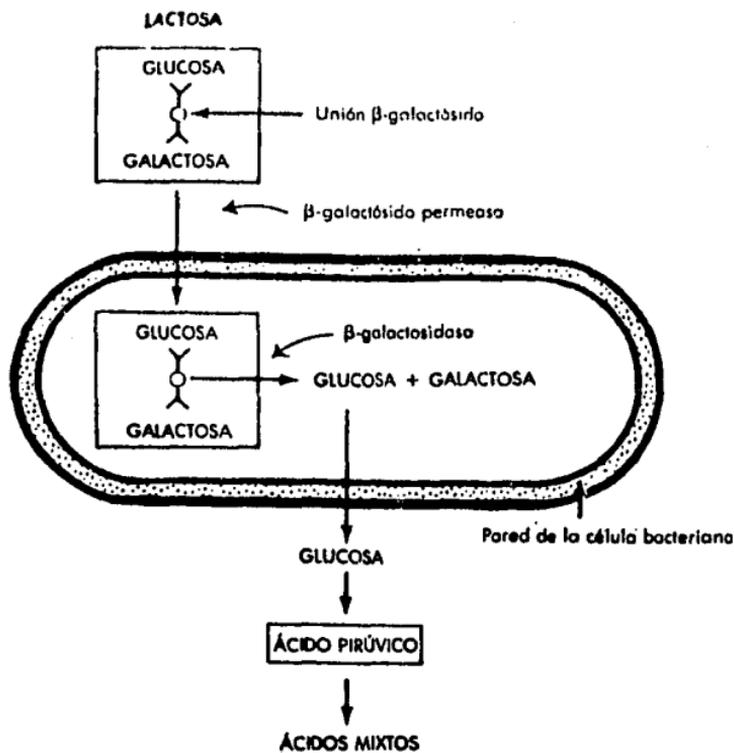


Fuente: Koneman, E. 1992

La fermentación bacteriana de la lactosa es más compleja que la de glucosa. La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa conectada por medio de un vínculo de oxígeno conocido como enlace B-galactósido. Con hidrólisis, este enlace se rompe, liberando glucosa y galactosa. Para que una bacteria utilice lactosa, deben estar presentes dos enzimas: 1) B-Galactósido

permeasa, que permite el transporte de B-Galactósido, como lactosa, a través de la pared celular bacteriana y 2) B-galactosidasa, una enzima necesaria para hidrolizar el enlace B-galactósido una vez que el disacarido ha entrado en la célula. La reacción ácida final es resultado de la degradación de glucosa como se muestra en la fig. 1.4. (7,8,36,39)

Fig. 1.4 Fermentación bacteriana de la lactosa.



Fuente: Koneman, E. 1992

Dado que la fermentación de lactosa finalmente ocurre por medio de la degradación de glucosa a través de la vía de Embden-Meyerhof, se deduce que cualquier microorganismo incapaz de utilizar glucosa no puede formar ácido a partir de lactosa. Esto explica por qué se omite la glucosa de las fórmulas de medios de aislamiento primario como el agar MacConkey o agar EMB; si no se omitiera, se perdería la facultad para detectar la capacidad de fermentación de lactosa de las bacterias en estudio. En el medio de prueba, el punto final de la fermentación de la lactosa es la detección de la producción de ácido. un microorganismo no fermentador de lactosa es aquel que carece de B-galactosidasa o no puede atacar a la glucosa. Se cree que los denominados fermentadores de lactosa tardíos son microorganismos que tienen actividad de B-galactosidasa, pero muestran una lenta actividad de B-galactósido permeasa. (7)

En la práctica, microorganismos que son incapaces de fermentar glucosa por lo general se detectan por las reacciones que producen al crecer en agar hierro de Kligler (KIA) o agar hierro tipo azúcar (agar TSI). Una reacción de pico de flauta alcalino/profundidad alcalina (no cambio) en cualquiera de estos medios indica ausencia de producción ácida y una incapacidad del microorganismo para fermentar la glucosa y otros hidratos de carbono presentes en el medio. Esta reacción sola es suficiente para excluir un microorganismo de la familia Enterobacteriaceae. (7,8,17,36)

La fórmula del KIA se muestra en la tabla 1.3, debe hacerse notar que la fórmula del agar TSI es idéntica excepto por el agregado de 10 grs. de sacarosa. (7,8,36,39)

Son importantes algunas observaciones para el estudio de las fórmulas KIA y TSI. La incorporación de cuatro derivados proteicos (extracto de carne, extracto de levadura, proteasa y proteasa peptona) hace que los medios sean muy ricos nutricionalmente. La ausencia de inhibidores permite el crecimiento de todas las especies bacterianas, excepto aquellas más exigentes y anaerobios obligados. Por este motivo estos medios pueden usarse sólo cuando se estudia una especie bacteriana seleccionada de una colonia única recuperada en medios primarios o selectivos. (7)

La concentración de lactosa y sacarosa es 10 veces superior a la glucosa. El sulfato ferroso como detector de ácido sulfídrico es menos sensible que las otras sales férricas o ferrosas; por ende puede haber discrepancia en las lecturas de H₂S entre KIA, TSI y

otros medios de prueba. El indicador rojo de fenol es amarillo con un pH menor de 6.8. Dado que el pH del medio no inoculado está estabilizado en 7.4, cantidades relativamente pequeñas de productos ácidos dan como resultado un visible cambio de color.(7,8,36)

tabla 1.3 Agar hierro de Kligler

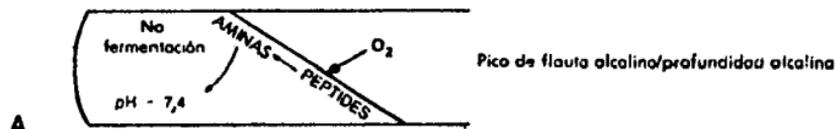
Extracto de carne	3	g
Extracto de levadura	3	g
Peptona	15	g
Proteosa peptona	5	g
Lactosa	10	g
Glucosa	1	g
Sulfato ferroso	0.2	g
cloruro de sodio	5	g
tiosulfato de sodio	0.3	g
agar	12	g
rojo de fenol	0.024	g
agua destilada hasta completar un litro		
pH final 7.4		

Fuente:Koneman, E. 1992

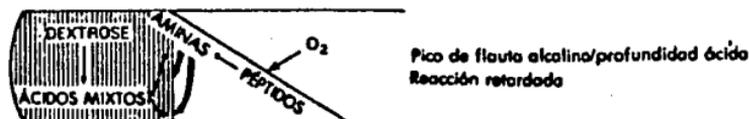
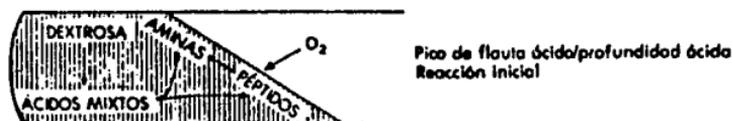
La figura 1.5 ilustra los principios químicos subyacentes observadas en KIA y TSI. El agar se deja que solidifique en pico de flauta, esta configuración da como resultado dos cámaras de reacción en el mismo tubo. La porción pico de flauta expuesta en toda su superficie al oxígeno atmosférico, es aerobia; la porción inferior, denominada profundidad, esta protegida del aire y es relativamente anaerobia. Cuando se prepara el medio, es importante que el pico de flauta y la profundidad tenga igual longitud, alrededor de 3cm cada uno, de modo que se conserve este efecto de dos cámaras.(7)

Los tubos con KIA se inoculan con una asa recta. La colonia bien aislada recuperada en una placa de agar se toca con el extremo de la asa recta, que luego se pica hacia la profundidad del tubo, hasta llegar a 3 a 5 mm de fondo. La asa se retira de la profundidad del tubo con un movimiento hacia adelante y hacia atrás a través de la superficie de pico de flauta. Los tubos inoculados se incuban a 35 C durante 18 a 24 horas.(7,8,17,36)

Figura 1.5 Agar hierro de kligler
NO FERMENTADOR

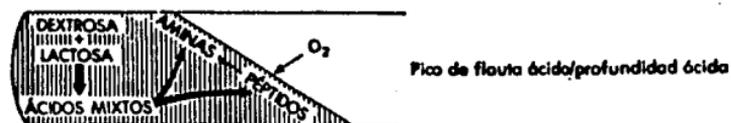


NO FERMENTADOR DE LACTOSA



B

FERMENTADOR DE LACTOSA (SACAROSA)



C

Los tres tipos generales de reacciones producidas por bacterias que crecen en agar-hierro de Kligler. En A se ilustran bacilos no fermentadores que son incapaces de producir ácidos a partir de la fermentación de glucosa o lactosa; no existe ningún cambio en el medio (representado como blanco). B ilustra una acidificación inicial de la profundidad y el pico de flauta del medio (líneas verticales) por bacterias que fermentan glucosa, pero el pico de flauta retorna a un pH alcalino a medida que se forman aminas alcalinas a partir de la decarboxilación oxidativa de péptidos (derivados de proteínas en el medio) cerca de la superficie. C ilustra la completa acidificación permanente de la profundidad y el pico de flauta por bacterias que fermentan lactosa.

Fuente: KONEMAN, E. 1992

Si el tubo de KIA se inocula con un microorganismo fermentador de glucosa que no puede utilizar lactosa, sólo puede obtenerse una cantidad relativamente pequeña de ácido a partir de la concentración del 0.1% de glucosa en el medio, ya que las enzimas que utilizan la glucosa están presentes como constituyentes de las bacterias y éstas pueden obtener la mayor energía por utilización del azúcar más simple. Al principio durante las primeras 8 a 12 horas de incubación, incluso esta cantidad de ácido puede ser suficiente para que tanto la profundidad como el pico de flauta tomen una coloración amarilla; ya que la utilización de la glucosa se realiza en forma aerobia sobre la estria, y en la parte terminal de la columna en anaerobiosis. Sin embargo, en las horas siguientes, la degradación de aminoácidos en la porción pico de flauta del tubo, bajo la acción del oxígeno y bacterias comienza a liberar aminas que rápidamente contrarrestan las pequeñas cantidades de ácido. En 18 a 24 horas, todo el pico de flauta revierte a un pH alcalino y retoma un color rojo. Sin embargo en la profundidad del tubo la degradación de aminoácidos no es suficiente para contrarrestar al ácido formado y el medio permanece amarillo. Así una reacción de pico de flauta alcalino/profundidad ácida en KIA (o TSI) es un indicador inicial importante de que el microorganismo no es un fermentador de lactosa. Pero para los fermentadores de lactosa, después de haber agotado la cantidad limitada de glucosa comenzará a degradarla, como su concentración es diez veces mayor que la glucosa, el microorganismo encontrará sustrato suficiente para continuar la formación de productos finales ácidos dando una reacción alcalina/alcalina. (7,8,36,39)

Muchos microbiólogos prefieren el agar TSI más que el KIA porque el agregado de sacarosa a la fórmula ayuda a evaluar especies de *Salmonella* y *Shigella*, puesto que ninguna de éstas utiliza la lactosa o sacarosa. Por ende cualquier reacción ácida/ácida en TSI indica que se ha fermentado lactosa, sacarosa o ambas. (7,8,36)

Para detectar sulfuro de hidrógeno, el medio contiene tiosulfato de sodio como fuente de átomos de azufre y la sal de sulfato ferroso como indicador de la generación de ácido sulfídrico. Es necesario un medio ambiente ácido para que un microorganismo produzca H₂S, y por ende debe proporcionarse una fuente de iones H⁺. Dado que la profundidad de los tubos con KIA y agar TSI se torna ácido con la fermentación de glucosa (aumentan los iones H⁺), el ennegrecimiento a menudo se ve primero o está limitado a esa zona, en especial con bacterias no fermentadoras de

lactosa. Así se deduce que una profundidad negra se debe leer como ácida aun cuando el color amarillo usual está oscurecido por el precipitado negro. El KIA y el agar TSI son menos sensibles para la detección de H₂S que otros medios que contienen hierro, como el medio SIM.(7)

Si un microorganismo puede excluirse de la familia de las Enterobacteriaceae sin recurrir a una amplia batería de pruebas bioquímicas, será posible ahorrar una considerable cantidad de tiempo, trabajo y costo. Se aconseja recurrir a KIA o TSI cuando se sospecha que un aislamiento pertenece a la familia Enterobacteriaceae.(7,8,)

1.4.2 Beta-galactosidasa y la prueba ONPG

El principio de esta prueba es demostrar la presencia o ausencia de la enzima beta-galactosidasa utilizando el compuesto orgánico ortonitrofenil-beta-D-galactopiranosido, que es un compuesto estructuralmente similar a la lactosa, excepto en que la glucosa ha sido remplazada por un grupo ortonitrofenilo. Esta prueba permite detectar la enzima galactosidasa mucho más rápidamente que la prueba de fermentación de lactosa ordinaria. Esto es útil para identificar fermentadores de la lactosa tardios. La prueba ONPG no es un sustituto de la determinación de la fermentación de la lactosa porque sólo se mide la enzima beta-galactosidasa.(2,3,7,8,11,17,36,40)

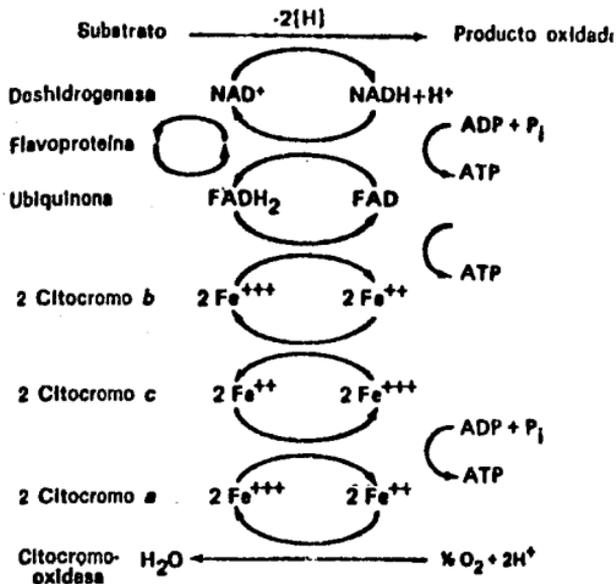
1.4.3 Actividad de citocromooxidasa.

La prueba de la oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo c reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa final de electrones (fig. 1.6) (1,2,17,36). Muchos microorganismos facultativos carecen de citocromo c. Su presencia o ausencia puede ser detectada por la prueba de la oxidasa, útil en el diagnóstico, en que las células que contienen la enzima catalizan rápidamente la oxidación del N,N,dimetil-p-fenilendiamina en un producto coloreado.(1,7,36)

Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor del hidrógeno final, producido a partir del

peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana y su sistema enzimático. (1,10,18,36)

Fig. 1.6 Transporte de electrones y fosforilación oxidativa



Fuente: Davis, B. 1990

El sistema citocromo sólo se encuentra por lo general en los organismos aerobios, o microaerófilos, y anaerobios facultativos, de modo que la prueba de la oxidasa es importante para identificar microorganismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados. Por ello todos los microorganismos que

muestran actividad de citocromooxidasa se excluyen de la familia Enterobacteriaceae, por lo que se considera como prueba presuntiva para la identificación de esta familia.(2,3,7,17,36)

A menudo se utilizan goteros comerciales para realizar la prueba debido a su conveniencia. Las reacciones de color son claramente visibles en 10 segundos. Deben usarse asas o alambres de inoculación de platino, en lugar de aquellos de acero inoxidable o níquel-cromo, para transportar bacterias al reactivo de oxidasa porque rastros de óxido de hierro en la superficie flameada del acero inoxidable pueden producir reacciones falsopositivas, más habitualmente se utiliza tetrametil-p-fenilenediamina, en lugar del derivado dimetilo, porque el reactivo es más estable, más sensible y menos tóxico.(7)

Los colorantes p-fenilendiaminas son aminas aromáticas primarias, diamino derivados del benceno. La citocromooxidasa, en presencia del oxígeno atmosférico oxida el reactivo fenilendiamina oxidasa para formar un compuesto coloreado, el indofenol.(36)

1.4.4 Reducción de nitratos.

Todas la Enterobacteriaceae, con excepción de ciertos biotipos de *Enterobacter agglomerans* y especies de *Erwinia*, reducen nitratos (NO₃) a nitritos (NO₂) y algunas veces a gas nitrógeno (N₂) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato (2,3,7,8,17,36,39). El oxígeno sirve como un aceptor de hidrógeno, por ejemplo el aceptor final de protones y electrones. La mayoría de las bacterias aeróbicas son anaerobios facultativos y solo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaeróbica (tabla 1.4) es un proceso de oxidación por el cual las sustancias inorgánicas especialmente nitrato y sulfato o raramente hidrato de carbono proporcionan oxígeno para que sirva como aceptor de electrones para suministrar energía. En la reducción del nitrato los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculas aceptoras específicas, Gunsalus y Stainer aseguran que hay pruebas de que el nitrato actúa como el oxidante final en los sistemas citocromo.(36)

Sin embargo las posibilidades del producto final de reducción del nitrato son muchas: nitrito (NO₂), amoníaco (NH₃), nitrógeno molecular (N₂), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) o hidroxilamina (R.NH.OH). El producto final de la reducción que

se forme depende de la especie bacteriana. El más común es nitrógeno molecular (un gas) por medio de la reducción del nitrito. Estos productos según las condiciones del medio, ya no son más oxidados o asimilados en el metabolismo celular sino que se excretan en el medio circundante. La reducción de nitrato en gas nitrógeno u óxido nitroso se denomina desnitrificación. (36)

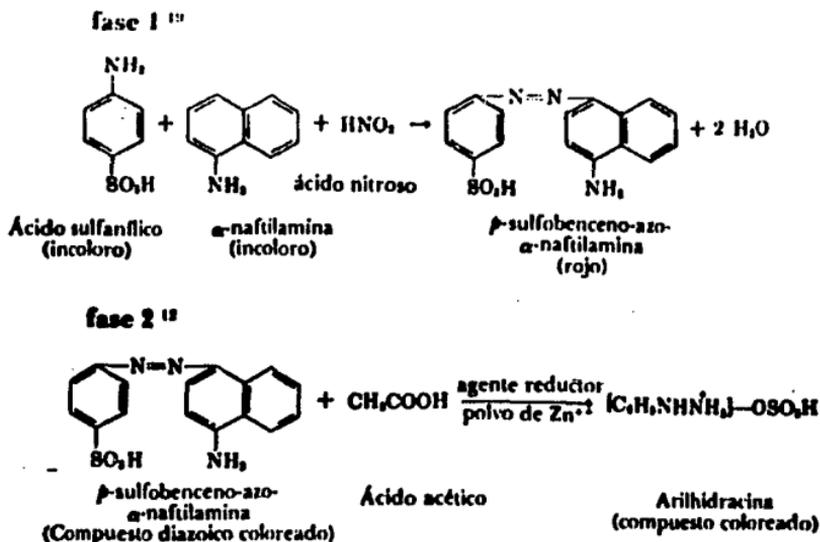
tabla 1.4 Comparación de respiración aeróbica, respiración anaeróbica y fermentación				
proceso productor de energía	condiciones de crecimiento	aceptor final de electrones	tipo de fosforilación para generar ATP	moléculas de ATP producidas por molécula de glucosa
respiración aeróbica	aeróbica	oxígeno molecular (O)	nivel sustrato y oxidativo	36 o 38*
respiración anaeróbica	anaeróbica	usualmente sustancias inorgánicas (NO, SO o CO) pero no oxígeno molecular (O)	nivel sustrato y oxidativo	variable (no más de 38 pero más de 2)
Fermentación	aeróbica o anaeróbica	nivel sustrato	2	

*en respiración procariota anaeróbica, 38 moléculas de ATP son producidas, respiración eucariota aeróbica, 36 moléculas de ATP son producidas.

Fuente: Tortora, G. 1992.

Cualquier medio basal que permita el crecimiento del microorganismo y contenga una concentración al 0.1% de nitrato de potasio (KNO₃) es adecuado para esta prueba. El caldo de nitrato y el agar nitrato en un pico de flauta son los medios más usados en laboratorios clínicos. Dado que la enzima nitrato reductasa es activa al máximo en condiciones anaeróbicas, se ha aconsejado el uso de agar semisólido. Los medios semisólidos también aumentan el crecimiento de muchas especies bacterianas y proporcionan el medio ambiente anaerobio necesario. Como rutina debe agregarse polvo de cinc a todas las reacciones negativas, para asegurar que no existen nitratos en el medio (figura 1.7 Fase 2). (7)

Fig.1.7 Química de la acción de los reactivos para leer la prueba de reducción de nitratos.



Fuente: MacFaddin, J, 1990

La mayor parte de los microorganismos capaces de reducir nitratos lo hacen en 24 horas, algunos pueden reducir cantidades detectables en 2 horas. La reducción del nitrato a nitrito esta indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los reactivos -naftilamina y el ácido sulfanílico, . La reacción de color resultante (figura 1.7 fase 1) se debe a la formación de un compuesto diazoico (2,3,7,8,17,36). Estos reactivos son relativamente inestables de modo que su actividad debe determinarse con intervalos frecuentes por medio de pruebas

con microorganismos control positivos y negativos. El compuesto diazonio que se forma a partir de la reacción del nitrato reducido y reactivos también es relativamente inestable y el color tiende a desaparecer; por ende, deben efectuarse lecturas tempranas después de agregar el ácido sulfanílico. (7,36)

1.4.5 Producción de Indol

El indol es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido Triptófano. La enzima triptofanasa cataliza la reacción de desaminación, atacando la molécula triptofano solamente en su cadena lateral y dejando intacto el anillo aromático en la forma de Indol (2,3,7,17,32). La degradación del triptófano libera Indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía (fig 1.8). El indol puede detectarse con un medio de prueba con triptófano observando la aparición de color rojo luego de agregar una solución que contiene p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich o Kovacs). La figura 1.9 esquematiza la reacción. (2,3,7,17,36)

Fig. 1.8 Degradación del triptófano

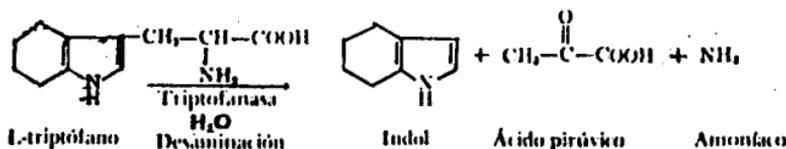
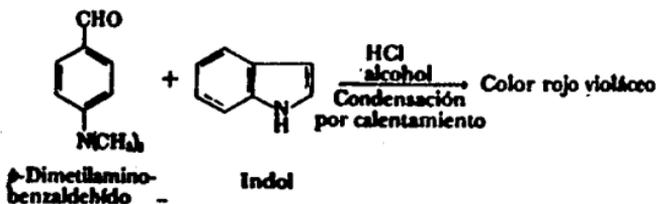


Fig. 1.9 Reacción del Indol con el reactivo de kovacs



Fuente: MacFaddin, J. 1990

1.4.6 Rojo de Metilo (RM)

El piruvato formado a partir de la fermentación de glucosa es metabolizado por dos vías alternas (Ácidos mixtos y butilenglicol). En la figura 1.3 se ilustran estas dos vías alternas. Las bacterias que primariamente siguen la vía de fermentación de ácidos mixtos a menudo producen suficiente ácido como para mantener un pH por debajo de 4.4, el punto ácido límite del indicador rojo de metilo. Las diferentes formas de fermentación se deben a variaciones en las enzimas vinculadas con el metabolismo del ácido pirúvico que se encuentran en el organismo. (2,3,7,8,17,36,39)

1.4.7 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Como ya se había mencionado anteriormente el Ac. pirúvico puede ser metabolizado por dos vías alternas (fig 1.3). Cuando el pirúvico es transformado a acetyl-methyl-carbinol (acetoina) esta es convertida en diacetyl por acción del KOH y oxígeno atmosférico, el diacetyl es convertido en un complejo rojo bajo la acción catalítica del alfa-naftol. Las bacterias que utilizan esta vía, producen sólo pequeñas cantidades de ácidos mixtos que pueden ser insuficientes para disminuir el pH del medio de rojo de metilo lo bastante como para producir un cambio de color. Por este motivo, Muchas de las especies de Enterobacteriaceae que son Voges-Proskauer-positivas, con pocas excepciones, son rojo de metilo-negativas y viceversa. (2,3,7,8,17,36,39)

1.4.8 Utilización de citrato

El principio de esta prueba es determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para metabolismo y crecimiento, provocando alcalinidad. (2,3,7,8,17,36,39)

Normalmente, el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetyl con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido a través del ciclo del ácido tricarbóxico o el ciclo de fermentación del citrato. En las bacterias, el desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina citratasa (citrato oxalacetato-liasa) o citratodesmolasa (36). La enzima requiere un catión bivalente para su actividad, que es suministrado por el magnesio o manganeso. (36)

Para esta prueba se usa Citrato de Simmons en tubos con agar inclinado. Se siembra un pequeño inóculo de una colonia de crecimiento de microorganismo a estudiar en la superficie del pico de flauta, si el inóculo es demasiado grande, compuestos orgánicos preformados dentro de la pared celular de bacterias que están muriendo pueden liberar suficiente carbono y nitrógeno para dar un resultado falso-positivo. Cuando se inocula una serie de tubos de medios de cultivo diferenciales con un microorganismo desconocido es importante sembrar primero el medio con citrato para prevenir el arrastre de proteínas o hidratos de carbono de los otros medios.(7,8,36)

La aparición de color azul, se utiliza como indicador azul de bromotímol, en el medio de prueba después de 24 horas de incubación a 35 C indica la presencia de productos alcalinos y un resultado positivo de la prueba de utilización de citratos. Si se utiliza carbono a partir de citato de sodio, también se extrae nitrógeno del fosfato de amonio contenido en el medio liberándose amoníaco. En ocasiones se detecta un crecimiento visible a lo largo de la línea de siembra antes de la aparición del color azul. Este crecimiento visible también indica un resultado positivo. Malonato, acetato y mucato son otros radicales aniónicos comúnmente usados para determinar la capacidad de las bacterias de utilizar estos compuestos simples como una fuente de carbono.(7)

1.4.9 Producción de ureasa

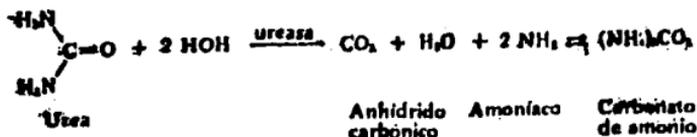
Los organismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan urea, liberan amoníaco y producen un cambio de color rojo-rosado en un medio que contiene rojo de fenol como indicador de pH. (2,3,7,8,17,36,39)

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida (RCO-NH), son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco(NH). En solución la urea se hidroliza, dando carbonato de amonio como producto final (fig 1.10).(36)

La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Las enzimas bacterianas se clasifican en constitutivas o adaptativas. Una enzima adaptativa o inducida es aquella que es producida por una bacteria solamente cuando se encuentra presente un sustrato específico. La ureasa es considerada una enzima constitutiva

dado que es sintetizada por varias bacterias sin tener en cuenta la presencia o ausencia de su sustrato, la urea. (36)

Fig. 1.10 Hidrólisis de la urea



Fuente: MacFaddin, J. 1990

Se utiliza el caldo con urea de Stuart y el agar con urea de Christensen. Ambos medios están amortiguados con sales de fosfato con un pH de 6.8, el agar urea de Christensen está menos amortiguado que el caldo Stuart lo que permite la detección de menores cantidades de amoníaco para aquellos microorganismos que producen menos ureasa. Se utiliza como indicador el rojo de fenol en ambos medios. Una prueba positiva para el caldo de urea Stuart se detecta con el virre de color a rojo rosado intenso en todo el caldo, y negativa sin cambio de color (amarillo anaranjado). Para la urea de Christensen la reacción positiva se lee cuando se presenta un color rojo rosado intenso (rojo violáceo) en el pico de flauta, el color puede penetrar en el agar, y negativa cuando no hay cambio de color (color de ante a amarillo pálido). (7,8,36)

1.4.10 Descarboxilasas

Muchas especies de bacterias poseen enzimas capaces de descarboxilar aminoácidos específicos en el medio de prueba, liberando aminas y dióxido de carbono, dando una reacción alcalina que provoca un cambio de color en el indicador de pH. (2,3,7,8,17,36,39)

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar

a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico (fig 1.11)

Fig. 1.11 Descarboxilación de un aminoácido.



Fuente: MacFaddin, J. 1990

Las enzimas descarboxilasa son numerosas y cada una es específica para un sustrato determinado, las tres descarboxilasas importantes utilizadas para la identificación bacteriana son lisina, ornitina y arginina. Se puede utilizar el agar-hierro-lisina (LIA), agar semisólido-indol-ornitina (MIO), Caldo de Moeller o caldo con lisina de Falkov.(36)

Estas descarboxilasas son enzimas adaptativas o inducidas, son formadas en presencia de un sustrato específico, y los productos de la descarboxilación provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad. La descarboxilación esta limitada a aquellos aminoácidos que poseen por lo menos un grupo químicamente activo que no sea una amina (-NH) o un grupo carboxilo (-COOH) y la descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo, y requiere una coenzima común, el tosfato de piridoxal.(36)

El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina (una diamina) y anhídrido carbónico por acción de la enzima específica lisina-descarboxilasa (fig 1.12).(36)

El aminoácido L-ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina-descarboxilasa para dar la diamina putrescina y anhídrido carbónico (fig. 1.13). (36)

La cadaverina como la putrescina son estables cuando son producidas en condiciones anaeróbicas. Se cultiva la bacteria estudiada en anaeróbiosis recubriendo la superficie del medio con parafina o vaselina. Con el sellado de los tubos todo el oxígeno no combinado es consumido por el organismo presente

durante la fase de crecimiento inicial y durante la descarboxilación el pH del medio aumenta (hacia la alcalinidad) a medida que se produce anhídrido carbónico. Como el pH puede ser controlado, es posible incorporar un indicador de pH, ya sea púrpura de bromocresol y/o rojo de cresol, en el medio que contiene el aminoácido.(36)

Fig. 1.12 Descarboxilación de L-lisina.

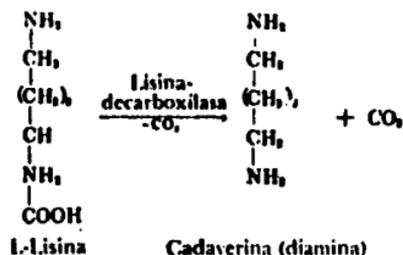
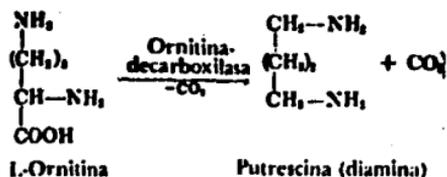


Fig. 1.13 Descarboxilación de L-Ornitina.

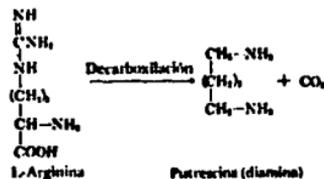


Fuente: MacFaddin, J. 1990

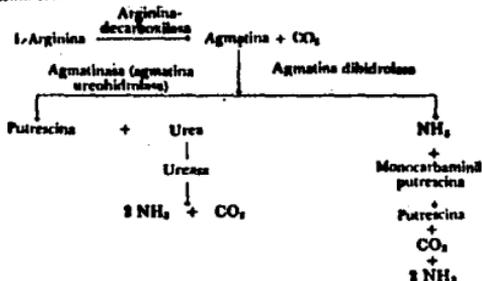
Fig. 1.14 Catabolismo de L-arginina

Sistema de la arginina-decarboxilasa

Reacción general

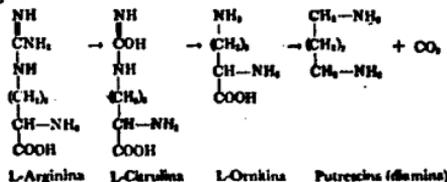


Sistema total

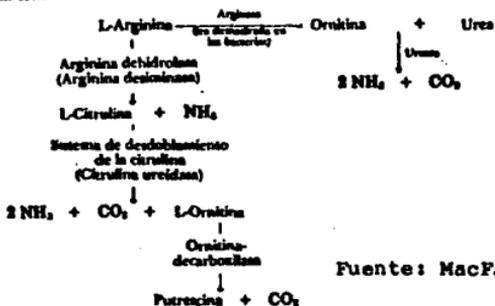


Sistema de la arginina-dehidrolasa ^{16,22}

Reacción general



Sistema total



Fuente: MacFaddin, J. 1990

El aminoácido L-arginina es catabolizado a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultánea o separadamente (fig. 1.14). Estos dos caminos son el sistema de la arginina-dehidrolasa y el sistema arginina descarboxilasa. Cuando el desvío del indicador del pH hacia la alcalinidad es rápido y energético, ello indica que el catabolismo de la L-arginina se debió al sistema de la arginina-dehidrolasa. Un desvío de pH más lento o más débil sin formación de amoniaco se produce cuando la L-arginina es degradada solamente por el sistema de la arginina descarboxilasa. (36)

Para la interpretación de resultados cualquier aminoácido da los mismos resultados en color; prueba positiva: púrpura turbio a un púrpura amarillento apagado (producido por la cadaverina), Prueba negativa: color amarillo claro y brillante (solamente por la fermentación de glucosa). (36)

1.4.11 Producción de fenilalanina deaminasa

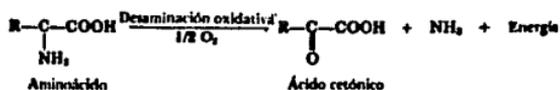
Esta prueba determina la capacidad de un organismo de desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico por la actividad enzimática de la deaminasa (2,3,7,8,17,36,39). El medio utilizado para determinar la fenilalanina desaminasa es el medio de fenilalanina, la aparición de un color verde luego del agregado del reactivo de cloruro férrico indica la presencia de esta enzima (7,36). Como la fenilalanina esta desaminada el color producido como consecuencia del agregado de cloruro férrico al 10% se debe a la formación de un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. (36)

El aminoácido aromático fenilalanina sufre la desaminación oxidativa catalizada por un aminoácido oxidasa, una flavoproteína para producir el ácido cetónico, ácido fenilpirúvico. La desaminación oxidativa da como resultado la extracción del grupo amino (NH_2) el aminoácido para formar un doble enlace -cetoácido y libre de amoniaco (NH_3). Es este un proceso en dos etapas; en un principio es, extraído el hidrógeno dando un iminoácido y el hidrógeno se combina con el oxígeno para formar agua, luego el iminoácido es hidrolizado en un cetoácido (fig. 1.15) (36)

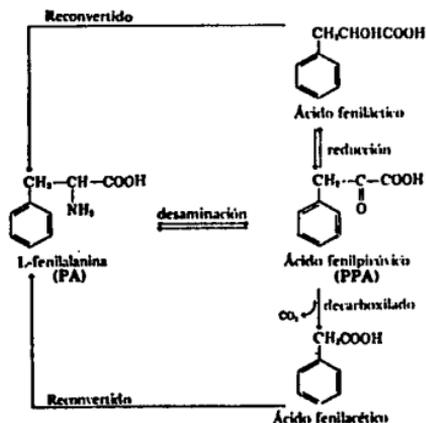
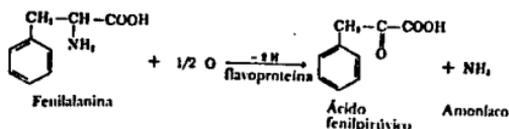
La fenilalanina es desaminada a ácido fenilpirúvico el que luego es reducido a ácido feniláctico mediante incubación. Este último puede ser reconvertido en fenilalanina, con lo que el ciclo de la desaminación vuelve a repetirse. Una pequeña cantidad de

Acidofenilpirúvico es susceptible de ser descarboxilado a ácido fenilacético, el cual también puede ser reconvertido en fenilalanina. (36)

Fig. 1.15 La desaminación de fenilalanina.



Reacción neta:



Fuente: MacFaddin, 1990

1.4.12 Producción de Sulfuro de Hidrógeno

La capacidad de ciertas especies bacterianas de liberar azufre de aminoácidos u otros compuestos que contengan azufre es una característica importante para su identificación (2,3,7,8,17,36). Para realizar la prueba es necesario que el medio contenga una fuente de azufre como cisteína, metionina o tiosulfato de sodio, el azufre es liberado en forma de ácido sulfídrico que es un gas incoloro por medio de un sistema enzimático productor de H₂S. El gas es detectado al reaccionar con el hierro o plomo, presentes en el medio, formando un precipitado negro. la sensibilidad para detectar ácido sulfídrico varía dependiendo de la sal de hierro o plomo que se use, los medios que contienen acetato de plomo son los más sensibles para las más pequeñas cantidades de (H₂S). Los medios de prueba más utilizados se muestran en la tabla 1.5. (7,8,36)

tabla 1.5 Medio para la detección de ácido sulfídrico		
Medios	Fuente de azufre	Indicador de H ₂ S
Sultito de bismuto	peptonas más sulfito	sulfato ferroso
Agar-citrato-sulfato	tiosulfato de sodio	citrato férrico y amonio
Agar desoxicolato-citrato	peptonas	citrato férrico
Agar-lisina-hierro	tiosulfato de sodio	citrato férrico y amonio
Agar-hierro de Kligler	tiosulfato de sodio	sulfato ferroso
Agar-hierro-triple azúcar	tiosulfato de sodio	sulfato ferroso
Agar acetato de plomo	tiosulfato de sodio	acetato de plomo
Agar <i>Salmonella-Shiga</i> IIa	tiosulfato de sodio	citrato férrico
Medio SIM	tiosulfato de sodio	Hierro peptonizado
Agar XLD o HE	tiosulfato de sodio	citrato férrico y amonio.

Fuente: Koneman, E. 1992

1.4.13 Motilidad

Esta prueba determina si un organismo es móvil o inmóvil, la motilidad bacteriana es importante para la identificación de

especie (2,3,7,8,17,36). Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y ubicación varían entre las diferentes especies. La motilidad bacteriana puede observarse directamente colocando una gota de caldo de cultivo en un portaobjetos y observarla directamente al microscopio. Se disponen de cámaras para gotas pendientes de modo que el preparado pueda verse con mayor aumento sin peligro de introducir los objetivos en la gota. Esta técnica se usa sobre todo para detectar la motilidad de especies bacterianas que no crecen bien en agar semisólido. Sin embargo, las Enterobacteriaceae crecen bien y es más común que se empleen tubos con medio semisólido que contienen concentraciones de agar del 0.4% o menos. Los medios combinados SIM o MIO se utilizan mucho porque puede evaluarse más de una característica en el mismo tubo. La prueba es positiva cuando los organismos migran de la línea de siembra y se difunden en forma radial en el medio, provocando una turbiedad. (7,36)

Se ha aconsejado el uso de sales de tetrazolio en el medio como ayuda para la detección visual de crecimiento bacteriano. Las sales de tetrazolio son incoloras, pero son convertidas en complejos de forasazán rojo e insolubles por las propiedades reductoras de las bacterias en crecimiento. En un medio de prueba de motilidad con tetrazolio, la aparición de color rojo ayuda a rastrear la diseminación de bacterias desde la línea de inoculación. Sin embargo, estas sales pueden inhibir a ciertas bacterias exigentes y no pueden usarse en todos los casos.(7)

La motilidad bacteriana puede variar con la temperatura de incubación, muchas especies móviles pueden detectarse a 35 C; sin embargo, la *Yersinia enterocolitica*, en la cual las proteínas flagelares se desarrollan más rápidamente con temperaturas más bajas, es móvil a 22 C (temperatura ambiente). Algunas como *Pseudomonas aeruginosa*, crecen bien sólo en presencia de oxígeno, producen una película que se disemina en la superficie de agar para motilidad y no muestra el característico abanico a partir de la línea de inoculación porque no crece en la parte más profunda deficiente en oxígeno del tubo.(36,7)

1.5 Diagramas secuenciales para la identificación de Enterobacteriaceae.

Hay reportadas una gran variedad de diagramas secuenciales para facilitar la identificación de Enterobacteriaceae, todos ellos rastrean una serie de puntos de ramificación positivos y

FAMILY LENTHOBACTERACEAE

Table 26—continued

Characteristics	<i>Nitidulidopsis</i>	<i>Nitidulidopsis</i> <i>subsp. conosa</i>	<i>Nitidulidopsis</i> <i>subsp. parvula</i>	<i>Nitidulidopsis</i> <i>subsp. rufobrunnea</i>	<i>Myriococcus</i>	<i>Myriococcus</i> <i>Myriococcus</i>	<i>Myrioglyphis</i> <i>Myrioglyphis</i>	<i>Chromobacterium</i> parvum <i>Chromobacterium</i> parvum	<i>Chromobacterium</i> parvum <i>Chromobacterium</i> parvum	<i>Proteus</i> solubilis	<i>Proteus</i> erythrinae	<i>Proteus</i> subsp.	<i>Providencia</i> stabilis	<i>Providencia</i> vulgaris	<i>Providencia</i> maris	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella</i> I	<i>Shewanella</i> II	<i>Shewanella</i> III = <i>Arcton</i>
Indole production	+	-	-	+	[+]	[+]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red	d	+	[-]	+	+	+	+	d	-	[-]	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate, Simmons'	+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide on TSI	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Urease, Christensen's	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine desaminase	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	d	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Omithine decarboxylase	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]
Motility	-	-	-	-	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction at 22°C	-	-	-	-	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KCN, growth in	+	[+]	+	+	+	[+]	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate utilization	+	+	+	+	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose, acid production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose, gas production	+	d	+	-	+	+	[+]	-	-	+	+	[+]	[+]	-	-	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	[+]	-	-	d	-	+	-	-
D-Adonitol	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
myo-Inositol	+	d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d	[-]	-
D-Sorbitol	+	[+]	+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	[+]	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Rhamnose	+	d	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	d	-	+	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Methyl-D-glucoside	+	d	[+]	-	+	+	-	-	-	-	+	[+]	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	[+]	+	d	+	+	-	-	-	-	-	[+]	-	-	d	+	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-Arabitol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Mucase	+	[-]	[+]	-	+	[+]	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	+	d
Lipase, corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Deoxyribonuclease at 25°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₂ ⁻ → NO ₃ ⁻	+	[+]	+	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase, Kovacs'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG (β-galactosidase)	+	[+]	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+
Yellow pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Symbols: +, 90-100% of strains are positive; [+], 75-89% positive; d, 26-75% positive; [-], 11-25% positive; -, 0-10% positive. Data are calculated for a 48-h incubation period unless otherwise indicated (gelatin liquefaction and deoxyribonuclease). The incubation temperature was 30 ± 1°C for all species except *Yersinia ruckeri* and *Koehlerbacter* species, which were incubated at 25 ± 1°C.

SECTION 5. FACULTATIVELY ANAEROBIC GRAM-NEGATIVE RODS

Table 2.6—continued

Characteristics	<i>Salmonella</i> IV	<i>Salmonella</i> (H ₂ O ₂ -sensitive)	<i>Salmonella</i> gallicum	<i>Salmonella</i> paratyphi A	<i>Salmonella</i> pullorum	<i>Salmonella</i> typhi	<i>Serratia</i> faecalis	<i>Serratia</i> fontinalis	<i>Serratia</i> liquefaciens	<i>Serratia</i> marcescens	<i>Serratia</i> odorifera	<i>Serratia</i> ph ₁ /suishe	<i>Serratia</i> rubra	<i>Klebsiella</i> boydii	<i>Shigella</i> dysenteriae	<i>Shigella</i> flexneri	<i>Shigella</i> sonnei	<i>Yersinia</i> enterocolitica	<i>Yersinia</i> enterocolitica
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate, Simmons'	-	[-]	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide on TSI	+	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease, Christensen's	-	-	-	-	-	-	-	-	[-]	-	[-]	-	-	-	-	-	-	-	+
Phenylalanine deaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	d	d	-	[-]	d	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction at 22°C	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KCN, growth in	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose, acid production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose, gas production	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	[-]	+	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	[-]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gellicin	d	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol	d	-	-	-	-	-	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulose	[-]	-	-	[-]	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	d	+	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mucate	-	-	d	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase, corn oil	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deoxyribonuclease at 25°C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₂ ⁻ → NO ₃ ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase, Kovacs'	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG (β -galactosidase)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Yellow pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Symbols: +, 90-100% of strains are positive; [+], 70-89% positive; d, 20-75% positive; [-], 11-25% positive; -, 0-10% positive. Data are calculated for a 48-h incubation period unless otherwise indicated (gelatin liquefaction and deoxyribonuclease). The incubation temperature was 36 ± 1°C for all species except *Yersinia mackerr* and *Xenorhabdus* species, which were incubated at 25 ± 1°C.

FAMILY I. ENTEROBACTERIACEAE

Table 26—continued

Characteristics	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Yersinia indicusana</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Xerophilobacterium</i>	<i>Xerophilobacterium</i>
Indole production	+	+	d	-	-	-	d	d
Methyl red	+	+	+	[+]	+	+	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate, Simmons'	[-]	-	-	-	-	-	d	-
Hydrogen sulfide on TSI	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease, Christensen's	[+]	[+]	+	-	+	-	[-]	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	[+]	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	[+]	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	[+]	+	+	-	-	+	-	-
Motility	-	-	-	-	-	[+]	+	+
Gelatin liquefaction at 22°C	-	-	-	-	-	-	d	d
KCN, growth in	-	-	-	-	-	d	-	-
Malonate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose, acid production	+	+	+	+	+	+	[+]	[+]
D-Glucose, gas production	d	[-]	d	-	-	[-]	-	-
Lactose	d	d	d	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	[+]	+	d	d	[-]	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
myo-Inositol	[-]	[-]	d	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	d	-	-	-
Raffinose	d	d	-	-	[-]	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	-	-	+	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	[-]	-
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	-	-
Trehalose	-	+	+	+	+	+	-	-
Cellobiose	+	+	+	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	[+]	-	-	-	-	-	-
Eserulin hydrolysis	[+]	+	-	[+]	+	-	-	-
Melibiose	-	[+]	-	d	+	-	-	-
D-Arabinol	+	d	d	-	-	-	-	-
Mucate	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipase, corn oil	d	[-]	-	-	-	d	-	-
Deoxyribonuclease at 25°C	-	-	-	-	-	-	-	[-]
NO ₂ ⁻ → NO ₃ ⁻	+	+	+	[+]	+	[+]	-	[-]
Oxidase, Kovacs'	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG (β-galactosidase)	+	+	+	[+]	d	d	-	-
Yellow pigment	-	-	-	-	-	-	d	d
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	[+]

*Symbols: +, 90-100% of strains are positive; [+], 75-89% positive; d, 25-74% positive; [-], 11-25% positive; -, 0-10% positive. Data are calculated for a 48-h incubation period unless otherwise indicated (gelatin liquefaction and deoxyribonuclease). The incubation temperature was 36 ± 1°C for all species except *Yersinia ruckeri* and *Xerophilobacterium* species, which were incubated at 25 ± 1°C.

Fuente: Krieg, N. 1984

negativos en un algoritmo dicotómico (4,6-8,10,36). Así es como se tienen una gran variedad de baterías (primarias y secundarias, rápidas, etc), de pruebas bioquímicas para diferenciar todas las Enterobacteriaceae. (2,7,8,13,17,39)

Se podrá observar una similitud entre todas ellas puesto que el fin es la identificación de Enterobacteriaceae. Los resultados de estas baterías se encuentran reportados en tablas y están basados en pruebas convencionales (tabla 1.6). Los resultados obtenidos con las pruebas individuales que se realizan como parte de un microsistema de identificación o de un sistema de identificación bioquímica automatizado no pueden ser comparados con los resultados obtenidos con los métodos convencionales. Las identificaciones obtenidas mediante microsistemas están basadas en patrones generados por el sistema completo y no en los resultados de las pruebas individuales. (8)

Con el advenimiento de instrumentos automatizados y sistemas de identificación que se basan en análisis computarizados de las diversas reacciones de las características a evaluar, hoy en día los diagramas secuenciales se usan con menor frecuencia en los laboratorios clínicos. (7)

La ventaja de el uso de baterías es que es flexible de acuerdo al las necesidades y recursos del laboratorio (7). Si la función principal de este es la identificación de organismos causantes de enfermedades infecciosas, y estos han sido clasificados previamente por los taxonomistas estudiando todas sus características posibles sin escatimar costo y tiempo. En contraste, la utilidad del laboratorio clínico es la identificación de aislamientos clínicos lo más rápido posible y a un costo razonable. Es por eso que debe usarse un mínimo de pruebas diagnósticas sin afectar la calidad del diagnóstico, seleccionando las pruebas bioquímicas claves para economizar tiempo y dinero. (4)

1.6 Estrategias para la reducción de costos en el laboratorio de microbiología.

El aumento de costos del cuidado médico ha sido causa de mucho interés en los últimos años. El grado de incremento de los costos ha excedido el grado de inflación. Por ello ha tenido que intervenir el estado, para controlar estos aumentos específicamente por interferencia gubernamental a partir de 1983 (8,41). Para ello se implementaron los grupos de diagnóstico relacionados (Diagnosis Related Grups, DRG) para muchos

hospitales en los Estados Unidos. El sistema DRG, establecido oficialmente para detener el constante incremento de la atención médica por Medicare, asignan a los hospitales un reembolso por costos basándose sobre todo en el diagnóstico principal del paciente y no en el costo de la atención médica generado por el paciente.(8,16,41). Es obvio que mantener los costos tan bajos como sea posible constituyen una ventaja financiera para el hospital.(8)

El laboratorio microbiológico es impactado por esta reducción de presupuesto. Por muchos años el laboratorio tenía, entre otras funciones, trasladar nuevos desarrollos en ciencias biomédicas para el beneficio del cuidado del paciente, el avance tecnológico en instrumentación que proporcionó exactitud, precisión y rapidez en la obtención de resultados. Esto podría marcar el fin de una era de crecimiento del laboratorio clínico (41).

El desafío que enfrentan los microbiólogos que actúan sobre bases hospitalarias, así como los que trabajan en laboratorios de referencia, es seguir proporcionando resultados de calidad a bajo costo (42). La industria también ha respondido con el aumento de sus esfuerzos para desarrollar nuevos métodos rápidos y formas novedosas de aplicación de la tecnología reciente en beneficio de la microbiología.(8)

Durante los últimos años se han introducido diversas modificaciones a las pruebas bioquímicas convencionales para facilitar la inoculación de los medios, disminuir el tiempo de inoculación, automatizar el procedimiento o sistematizar la determinación de la especie según las reacciones obtenidas(2). Todas estas modificaciones han buscado brindar un servicio rápido, confiable y económico al paciente. Algunas de estas modificaciones se enlistarán más adelante.(7,8)

1.6.1 Reducción de costos

El conocimiento de los costos reales de los procedimientos empleados en el laboratorio de microbiología y la información acerca del presupuesto asignado para el funcionamiento son esenciales para que los laboratorios puedan controlar sus costos y rendimientos.(8,16,41)

1.6.1.1 Educación

El médico es el principal responsable de la atención del paciente; todos los procedimientos que generan costos se originan de los pedidos de análisis de los médicos. El primer desafío que enfrentan los microbiólogos es el de educar a los médicos para que utilicen en forma apropiada los servicios del laboratorio de microbiología. (8,42,43)

Una adecuada recolección y transporte de muestra es de suma importancia en la reducción de costos. (8,44)

1.6.1.2 Limitación en el número de pruebas.

Los laboratorios pueden reducir el número de pruebas de diversas maneras sin disminuir la calidad de la atención del paciente (8,42,44,45). Toda identificación microbiana que exceda al diagnóstico, pronóstico o requerimiento terapéutico es de poco valor clínico (43). Debe evitarse el cultivo de materiales si la coloración de gram u otro examen visual directo proporciona suficiente información para el diagnóstico (8,35,42). También pueden ser reducidas el número de placas primarias que se inoculan usualmente con el material clínico. Los cultivos de heces pueden sembrarse en dos medios selectivos y diferenciales. (8,42)

1.6.2 Rapidez en los resultados de pruebas de identificación

Una vez que se ha obtenido el desarrollo microbiano pueden emplearse diversos métodos para obtener los resultados de identificación con mayor prontitud. La medida más efectiva en función del costo que dispone el microbiólogo es la identificación presuntiva de las bacterias sobre la base de morfología colonial y simples ensayos bioquímicos a la gota. Para la identificación de especie hoy en día existen muchas variantes de las pruebas bioquímicas convencionales. (8)

1.6.2.1 Sistemas modificados de pruebas bioquímicas convencionales que emplean volúmenes pequeños. Es posible obtener resultados más rápidamente mediante diversos métodos convencionales si se emplea un volumen pequeño con un inóculo abundante. Muchas pruebas, entre ellas la hidrólisis del hipurato, reducción de nitratos, producción de ureasa, descarboxilaciones y deaminaciones han sido modificadas para obtener resultados rápidos. En estas pruebas se inoculan volúmenes pequeños de medio con una suspensión concentrada de microorganismos en estudio. Key Scientific Products fué uno de

los primeros proveedores de sustratos individuales. En el sistema Key se agregan pequeñas tabletas comprimidas que pueden conservarse a temperatura ambiente y que se agregan a pequeños volúmenes de agua, según se necesite, para preparar el sustrato correspondiente a una reacción específica. Estas pruebas en pequeño volumen, con sustratos aislados, son extremadamente útiles para diferenciar dos especies semejantes que difieren sólo en una característica o para descartar un microorganismo caracterizado por un único parámetro. También se han adaptado otras pruebas para la determinación rápida con reactivos en papel de filtro.(7,8)

1.6.2.2 Sistema multipuebas. El sistema multipueba más sencillo consiste en un formato de tipo convencional que con una inoculación puede proporcionar más de un resultado. Con la combinación de los reactantes, por ejemplo, un sustrato puede ser usado para determinar indol y nitrato; indol y movilidad, indol y ornitina u otras combinaciones.(7,8)

En los sistemas comerciales multipuebas de identificación rápida, los medios para las reacciones bioquímicas convencionales se han fraccionado en pequeños volúmenes y envasado de modo que pueden ser inoculados fácilmente con una sola manipulación. Cuando se emplean en combinación con una base de datos generada por computadora, los modelos bioquímicos obtenidos pueden ser usados para predecir la identificación de la especie con mayor precisión que la obtenida cuando se emplean métodos convencionales con unos cuantos parámetros. Los fabricantes de MicroScan y Micromedia systems producen los medios convencionales en placa para microdilución (policubetas) que se envían al usuario congeladas, las que se mantienen de esta forma hasta el momento de su uso en el que se descongelan e inoculan. Estos sistemas requieren una incubación durante toda la noche como los sistemas convencionales. También es necesario el agregado de reactivos para la demostración de los productos finales de las reacciones.(7,8)

El sistema Sceptor (BBL, Microbiology Systems) también está basado en un ordenamiento de policubetas, pero los sustratos están deshidratados en las placas y son rehidratados con una suspensión del organismo al inocularlos. El sistema Minitek (BBL, Microbiology Systems) se presenta como una serie de microcaldos que permite al usuario determinar las reacciones que requiere realizar mediante el agregado de discos de papel filtro impregnados con el sustrato apropiado para las policubetas con el caldo. Muchos grupos de bacterias, entre ellos las

Enterobacterias, pueden ser estudiados en el versátil sistema Minitek. Si se emplean inóculos abundantes, pueden obtenerse los resultados dentro de las cuatro horas.(7,8)

El API 20E para la identificación de bacilos gram negativos (Analytab Products) incorpora reactivos desecados en cavidades plásticas dentro de las cuales se coloca una suspensión del organismo en estudio. Con un inóculo abundante los resultados pueden leerse en algunos casos después de 4-6 horas de incubación.(6-8,13)

El sistema API RapidE para enterobacterias (Analytab Products) emplea el mismo formato aunque se han incorporado diversos sustratos cromogénicos como reactantes para permitir resultados más rápidos. Los sistemas API cuentan con una base de datos generada por computadora que incorpora los resultados de 21 pruebas (incluyendo las reacciones para oxidasa que se realiza separadamente), el uso del sistema API para la identificación de Enterobacterias ha facilitado el reconocimiento de varias especies nuevas y ha permitido que los laboratorios designaran las especies en forma más precisa (basándose en el biotipo) de lo que era posible anteriormente, en función de la relación costo-eficiencia.(7,8)

En otros sistemas se encuentran formas novedosas para la presentación de los medios. En el Enterotube II (Roche Diagnostics) los medios están contenidos en un tubo grande. Se toma una colonia en el extremo de una aguja para inoculación larga que se introduce en el tubo de plástico a través de una serie de compartimientos de agar que contienen los distintos sustratos. El Enteric-Tek (Flow Laboratories) emplea medios que contienen los sustratos en cavidades con forma de cuñas radiales sobre una placa circular de plástico. Los sustratos incorporados en placas de agar permiten probar varias bacterias simultáneamente con una buena relación costo-efectividad (Catha Replicans II System, MCT Diagnostics).(7,8,13)

En los últimos años varios de los sistemas múltipruebas han sido adaptados para obtener los resultados más rápidamente; con frecuencia, sin necesidad de incubación de un día para el otro. El sistema Micro-ID (General Diagnostics) fue uno de los primeros en aplicar el principio de que las enzimas bacterianas pueden actuar en ausencia de un crecimiento o multiplicación real de un germen. La detección de enzimas preformadas se basa en la inoculación de soluciones que contienen el sustrato con una suspensión muy concentrada de microorganismos (1×10

bacterias por ml). En este volumen de microorganismos habrá suficiente cantidad de enzima para que se produzca la reacción con el sustrato, aunque los microorganismos ya no estén viables. (7,8,13)

El sistema Micro-ID emplea diversos sustratos que detectan enzimas preformadas, además de las pruebas convencionales para la identificación de Enterobacterias. La suspensión del microorganismo es inoculada en cavidades de una policubeta de plástico, se incuba y luego se inclina para mezclar los reactivos que se encuentran en una cámara separada con la suspensión. Pueden obtenerse los resultados después de 4 horas de incubación. Las pruebas de este tipo proporcionan los resultados después de pocas horas de incubación en vez de la incubación de un día para el otro exigida por muchos métodos convencionales. (7,8,13)

Los sistemas para pruebas bioquímicas también pueden utilizar sustratos cromogénicos. Las enzimas actúan sobre estos sustratos al formar productos coloreados, siendo innecesario un sistema indicador adicional. (7,8)

Los sistemas que incluyen en la misma placa pruebas de sensibilidad así como parámetros de identificación (incluyendo los producidos por American MicroScan y MicroMedia Systems) deben ser incubados durante la noche para obtener el grado de desarrollo suficiente para obtener resultados precisos. (7,8)

1.6.2.3 Sistemas automatizados para identificación microbiana. Algunos sistemas que utilizan una placa para microdilución han sido automatizados para permitir una lectura de los resultados totalmente automática o parcialmente manual. Los sistemas MicroScan (American MicroScan) y Sceptor (BBL, Microbiology Systems) emplean lectores que se conectan con el sistema de base de datos para identificación por computación. (7,8,13)

El sistema Sceptor incluye un dispositivo de llenado automatizado, para rehidratar las cavidades con la suspensión del organismo en estudio. Los sistemas compatibles con API (UniScept y Aladin, Analytab Products) también incorporan un lector automático que se conecta con su extensa base de datos. (7,8,13)

El Autobac IDX (General Diagnostics) fue uno de los primeros sistemas automatizados para medir sensibilidad y ha sido modificado para proporcionar también identificación bacteriana. (7,8,13)

Los microorganismos son inoculados en cubetas plásticas que contienen diversas sustancias inhibidoras. Luego de 3 a 6 horas de incubación la identificación del microorganismo es determinada por su patrón de crecimiento en presencia de los diferentes agentes antibacterianos, medido por fotometría de dispersión. El AutoMicrobic System (Vitek Systems) determina por turbidimetría el crecimiento de la cepa en estudio dentro de cavidades muy pequeñas que contienen el sustrato, sobre una tarjeta de plástico. Una vez que el sistema ha sido inoculado, el instrumento realiza todas las lecturas sin ayuda del operador; los resultados están disponibles luego de 4 a 6 horas de incubación. El sistema Advantage (Abbott Laboratories) emplea un cartucho de plástico con un cierto número de cavidades que contienen sustratos liofilizados, que son inoculados manualmente en una sola operación. El instrumento controla la turbidez en función del tiempo y da los resultados sobre la base de patrones cinéticos de desarrollo y metabolismo. Pueden obtenerse cartuchos independientes para la determinación de levaduras, bacilos gramnegativos no fermentadores y Enterobacterias. (17,8)

1.6.2.4 Sistema de base de datos por computación. Los principios que fundamentan los sistemas de base de datos por computación para la identificación de especies son sencillos. El primer paso para desarrollar una base de datos es acumular un gran número de microorganismos de especies conocidas. Cada cepa se somete a baterías idénticas de pruebas bioquímicas y enzimáticas. Las reacciones se registran como positivas (+) o negativas (-) y los resultados acumulativos de cada prueba se expresan en el porcentaje de cada género o especie que posee esa característica. Luego se estudia un microorganismo desconocido X frente a los mismos sustratos. Los resultados de las pruebas con las cepas conocidas se convierten en porcentaje de probabilidad de que la cepa desconocida sea un miembro de uno de los géneros conocidos basándose en el resultado de cada prueba por separado. (7,8,13)

Finalmente se multiplican las probabilidades individuales del microorganismo estudiado para obtener una probabilidad calculada para X, con respecto a uno u otro género. Cuantos más organismos estén incluidos en la base de datos más precisa será la

designación del género o especie. Todos los proveedores comerciales de sistemas de pruebas bioquímicas por multicomponentes proporcionan a sus clientes una computadora, un libro de código derivado de la computadora o acceso a un centro de consulta telefónica para comparar los perfiles de las especies.(7,13)

Existen una gran variedad de sistemas comerciales para la identificación rápida de microorganismos. Hay sistemas multipuebas y sistemas semiautomatizados y automatizados.(2) Si bien los sistemas proporcionan resultados de 4 h o 18-24 h de inoculación con un alto grado de especificidad tienen ciertas desventajas como un alto costo, reentrenamiento del personal y poca flexibilidad de uso, por lo que no son ampliamente utilizados en los laboratorios de Microbiología.(7)

En la tabla No. 1 se enlistan las pruebas bioquímicas para algunos sistemas multipueba para la identificación de bacterias.

Siglas utilizadas en la tabla No. 1

Automicrobic System (AMS)

API (API)

Enterotube (ENT)

Micro-ID (MID)

Micro-Media Systems (MMS)

Abbott Quantum II (QII)

Rapid 20E (R20)

API 20E (A20)

Eiken SysteK (ES)

Enterosistem 18-R (18R)

AutoScan-3 (S3)

AutoScan-4 (S4)

Prueba bioquímica	ANS	API	ENT	MID	MMS	QII	R20	A20	ES	16R	S3	S4
Arginina dihidrolasa	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Adonitol	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Amigdalina	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lactosa	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Malonato	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Maltosa	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Manitol	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
Rafinosa	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Ramnose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xilosa	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Utilización de citra	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de esculi	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Hidrólisis de gelati	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Sulfuro de hidrógeno	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Indol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina descarboxilasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Ornitina descarboxil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B-Galactosidasa (ONP)	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina deamina	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Triptofeno deaminasa	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Hidrólisis de urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
O/F de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Acetamida	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Polimixina B	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Tartrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cetrimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Penicilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kanamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrofurantoina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Colistina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Cefalorina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Tobramicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

- + Prueba incluida
 - Prueba no incluida
- Fuente: (23-32)

Los productos mencionados que intentan reducir costos deben ser evaluados según su utilidad en cada laboratorio y debe considerarse su aplicación cuando sea conveniente. (46)

1.6.2.5 Sistema replicador.

El sistema replicador es otro método que se emplea con frecuencia en laboratorios diagnósticos para identificar bacterias. Este método es fácil de usar, versátil y barato, razones por las cuales supera algunas de las desventajas de los sistemas mencionados previamente. El usuario puede elegir cualquier número y secuencia de características a evaluar. Cada determinación cuesta muy poco en contraste con pruebas de procedimientos convencionales y comerciales. Con esta técnica, además de Enterobacterias, es posible estudiar otros grupos de bacterias, como cocos gram positivos. La base del sistema es el replicador de Steers, un dispositivo utilizado durante muchos años para efectuar pruebas de susceptibilidad a antibióticos por dilución en agar. Hay dos componentes: 1) una placa para siembra que consiste en un bloque cuadrado de metal con 32 o 36 pocillos en los cuales pueden colocarse suspensiones bacterianas y 2) un cabezal de inoculación, una placa de metal con 32 o 36 puntas que tienen 0.3 cm de diámetro. Las puntas están alineadas para encajar con precisión en los pocillos de la placa para siembra. Con este método se emplean medios diferenciales convencionales de agar preparados en placas de Petri estándar redondas o cuadradas. (7)

Para su inoculación, se prepara una suspensión bacteriana de cada microorganismo desconocido transpasando colonias aisladas de los microorganismos en un tubo de caldo de soya tripticosa con extracto de levadura e incubando a 37°C durante 4 horas. Se colocan 0.5 ml de cada cultivo desconocido en los pocillos para de la placa para siembra. Luego, la placa se coloca bajo el cabezal de inoculación y se libera el embolo de modo que las puntas se sumerjan en la suspensión bacteriana. Se eleva el cabezal del dispositivo y la placa para siembra se sustituye por una placa de agar. Se desciende nuevamente el cabezal de inoculación de modo que las puntas toquen la superficie del agar, lo que da como resultado múltiples inóculos. Esta secuencia se repite con cuantas placas de medios diferenciales como se desee utilizar. De manera alternativa, puede usarse un

inoculador operado manualmente. La mayor parte de las placas de agar, se incuban de forma aerobia de 35 a 37°C durante 18 a 24 horas. Las placas para motilidad y urea se incuban a temperatura ambiente; las placas para descarboxilasas se incuban de forma anaerobia. Cada placa de agar muestra cambios de color en las colonias o en el medio que rodea a los puntos de inoculación de aquellos microorganismos que tienen reacciones positivas. Las reacciones de color son esencialmente iguales a las obtenidas con sistemas convencionales. (7,8,33)

Burman en 1978, publicó un método de inoculación múltiple de medios para pruebas bioquímicas vaciadas en placa, utilizadas en la identificación de bacterias y levaduras. (15,22) Probó la actividad bioquímica de bacterias y hongos sobre placas de agar no divididas, usando un aparato simple de inoculación múltiple manual que le permitió el análisis de 25 aislamientos en una caja de petri de 9 cm de diámetro. Concluyó que no había interferencia en los resultados por la distribución de las muestras en la superficie de una caja de petri de 9 cm de diámetro. (33)

En 1979, en una clínica del IMSS, pretendiendo encontrar un método alternativo de bajo costo por la minimización de material y medio requerido se probó una técnica que es una variante del método de inoculación múltiple de Burman (34). Es fácil de implementar en cualquier laboratorio sin necesidad de gastos extras, debido a que utiliza los mismos medios, reactivos y equipos que las pruebas convencionales y se comparó su efectividad con respecto a éstas. Ellos hicieron una modificación al método, suprimieron el aparato de inoculación múltiple, para hacerlo más práctico y manuable. Las cepas estudiadas fueron las que se aislaron de muestras recibidas en la clínica. Todas las muestras se realizaron por duplicado, corriendo como testigo las mismas pruebas bioquímicas del método tradicional en tubo. Obtuvieron reproducibilidad de datos en placa con un 95% a un 100% en la mayoría de las pruebas, lo que es suficientemente aceptable para una clara identificación. (34)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las principales funciones del laboratorio de Microbiología Clínica consiste en examinar y cultivar muestras para aislar e identificar una especie exacta para ayudar al diagnóstico y tratamiento médico de pacientes con enfermedades infecciosas. Los datos microbiológicos también ayudan a proporcionar información epidemiológica para definir orígenes comunes de infecciones.

La práctica de reducción de costos es un desafío importante para los laboratorios de Microbiología para mantener servicios de calidad frente a la disminución de recursos y constante aumento de reactivos, medios, cristalería y equipo.

La implementación de un nuevo procedimiento a menudo depende más de factores de costo que de consideraciones de exactitud y reproducibilidad.

Otro factor importante es la minimización de tiempos para poder prestar un servicio rápido y confiable al paciente, por ello los microbiólogos deben producir resultados útiles en el menor tiempo posible.

Es por ello de suma importancia prestar atención a la evaluación de técnicas nuevas que puedan proporcionar resultados confiables, más rápidos y a un costo menor.

Y aunque hoy en día en el mercado hay sistemas específicos y rápidos de identificación como API20-E, API Rapid E, Enterotube II, Miro-ID, Minitek, sistema MicroScan, Sistema Sceptor y sistemas semiautomáticos y automáticos tienen la desventaja de ser costosos, requieren de entrenar al personal para su manejo y tienen poca flexibilidad de uso ya que ciertos organismos pueden identificarse en forma adecuada con menos de 10 pruebas diferenciales y no es necesario determinar 20 características o más. (7,8,13,23-32)

La mayoría de las modificaciones que se han realizado al método tradicional para la reducción de costos ha creado sistemas de primero y segundo nivel, pero no así para niveles suburbanos o rurales que por su economía difícilmente tendrán acceso a estas nuevas técnicas.

La implementación de una metodología nueva en una clínica del IMSS(16), es de gran interés puesto que si ésta técnica se logra validar, con una serie de trabajos que precedan a la investigación ya iniciada, se tendrá un método útil para la población de bajos recursos económicos.

En la investigación que se realizó en la clínica no se controló ninguna variable, no se utilizó cepas tipificadas, las muestras únicamente se corrieron por duplicado; los resultados obtenidos por ellos fueron aceptables por lo que se pretende determinar la sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica de esta técnica como una parte del inicio de la validación de este método.

Es por todo esto que se eligió el tema de este proyecto para comparar el método tradicional de pruebas bioquímicas en tubo con un método de inoculación múltiple en placa para la identificación de enterobacterias, utilizando el mismo material, medios, reactivos y equipo que el método convencional para que esta técnica pueda ser utilizada en cualquier laboratorio microbiológico para la reducción de costos y tiempo, y pueda ser accesible a la población suburbana y rural.

3. OBJETIVOS

Objetivo general.

Realizar una técnica de inoculación múltiple en placa para la identificación de especie de Enterobacterias que reduzca el costo y tiempo en el diagnóstico de muestras clínicas. Este método es una variante del sistema replicador que es fácil de usar y de implementar en cualquier laboratorio, no requiere de la adquisición de material, reactivos o equipos adicionales. La exactitud de sus resultados serán comparados con respecto a los obtenidos en las pruebas bioquímicas convencionales realizadas en tubo.

1. Demostrar que las pruebas bioquímicas en placa como método minimizado en la obtención de resultados para la identificación de enterobacterias tiene la misma confiabilidad diagnóstica, sensibilidad y especificidad que el realizado convencionalmente en tubo.

2. Reducir la cantidad de material y volumen de medio utilizado en las pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias a través de un método minimizado de inoculación múltiple en placa.

4. HIPOTESIS

Si al método de pruebas bioquímicas en tubo le modifico el soporte y volumen del medio de prueba manteniendo constante todas las variables que puedan influir en los resultados como son tipo de organismo, volumen del medio, densidad del inóculo, atmósfera, humedad, tiempo y temperatura de incubación no se afectará la sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica del método. Si la confiabilidad diagnóstica es mayor al 80% entonces se tendrá así una técnica alternativa para la identificación de especie de enterobacterias a un costo menor que el método convencional o de referencia.

Estudio experimental:

Tipo de estudio: Estudio prospectivo, transversal, comparativo de tipo experimental.

Población: Cepas ATCC de Enterobacterias:

Escherichia coli

Salmonella typhi

Salmonella enteritidis

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Shigella boydii

Variables:

Dependientes: -Soporte del medio
-Volumen del medio
-Cantidad de inóculo

Independientes:-Temperatura
-pH
-Humedad
-Tiempo de
incubación
-Atmósfera

Criterios de Inclusión: -Cepas ATCC de enterobacterias
y de Exclusión

-Cajas de petri de 9 cm de diámetro
por 1.5 cm de altura.
-Cantidad de inóculo
-Volumen de medio marca Bioxon

5. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

5.1 MATERIAL

cajas de petri kimax de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura

tubos de ensaye 13 x 100

gradillas

mecheros fisher

matraz Erlenmeyer de 500 ml

matraz Erlenmeyer de 250 ml

probeta de 500 ml

probeta de 100 ml

frascos goteros

1 paquete de algodón

1 paquete de gasa

tela de asbesto

tripies

espatula

portaobjetos

asas y porta-asas

termómetro de -10 a 250°C

5.2 EQUIPO

EQUIPO	ESPECIFICACION
1 microscopio	marca Zeiss
1 olla express	marca Presto de 20 litros
1 refrigerador	marca American
1 balanza granataria	marca Ohaus
1 incubadora	marca Casa Rios

5.3 REACTIVOS

REACTIVOS

ESPECIFICACION: Merck, Sigma

Cristal violeta para gram

Lugol para gram

Safranina para gram

Alcohol-Acetona para gram

Aceite para objetivo de inmersión

Fenol al 5%

Reactivo de Kovacs

Indicador de pH rojo de metilo

Solución alfa-naftol al 5%

Solución de hidróxido de potasio al 40%

5.4 MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO

ESPECIFICACION: BIOXON

Agar citrato de Simmons

Agar Hierro de Kligler

Agar MacConkey

Caldo rojo de fenol con Manitol

Caldo nutritivo

Caldo rojo de fenol con Sacarosa

Caldo urea

Medio Ornitina-Motilidad-Indol (MIO)

Medio rojo de metilo-Voges Proskauer

Medio Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM)

5.6 CEPAS

Cepas ATCC:

Escherichia coli

Salmonella typhi

Salmonella enteritidis

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Shigella boydii

6. METODOLOGIA

6.1. Se sembró cada cepa de prueba por estria en cuadrantes para su aislamiento en placas de Agar MacConkey e incubó por 24+/-3 horas a 37+/-1 C.

6.2. De las colonias aisladas se observó su morfología microscópica con una tinción de gram.

6.3. Se tomó la colonia aislada para resembrarla en caldo nutritivo para estandarizar el inóculo, se incubó durante 24+/-3 horas a 37+/-1 C. La densidad de la población se ajustó a 10 unidades formadoras de colonia/ml, comparando su turbidez con un estándar de BaSO 0.5 MacFarland.

6.4. Para las pruebas bioquímicas convencionales en tubo se preparó y esterilizó los siguientes medios en tubos 13x100 como se indica por el fabricante para pruebas bioquímicas en tubo. Se prepararán 15 tubos de cada medio para cada cepa estudiada.

Agar Citrato de Simmons (agar inclinado)

Agar KIA (agar inclinado)

Caldo rojo de fenol con Manitol

Caldo rojo de fenol con Sacarosa

Caldo urea

Medio MIO (agar semisólido)

Medio SIM (agar semisólido)

Medio Rojo de Metilo-Voges Proskauer

6.5. Para las pruebas bioquímicas en Placa se prepararon los siguientes medios en matraces erlenmeyer: (6.5.1-6.5.2 y 6.5.3)

6.5.1. Para los medios sólidos:

Agar citrato de Simmons

Agar KIA

Se esterilizaron y colocaron 20 ml de cada medio en cajas de petri de 9 cm de diámetro esteriles.

6.5.2. Para los medios líquidos:

Caldo rojo de fenol con manitol

Caldo rojo de fenol con sacarosa

Caldo urea

Medio Rojo de Metilo-Voges-Proskauer

Se solubilizaron en agua y se les agregó agar bacteriológico al 2%. Se llevaron a ebullición por un minuto y se esterilizaron como lo indica el proveedor. Se colocaron 20 ml de cada medio en cajas de petri de 9 cm de diámetro esteriles.

6.5.3. Para los medios semisólidos:

Medio MIO

Medio SIM

Se suspendieron en agua, como estos ya traen una cantidad de agar, unicamente se agregó la cantidad faltante de agar bacteriológico para darles la consistencia sólida (2%). Se colocaron 20 ml en cajas de petri de 9cm de diámetro.

6.6. Una vez que se prepararon todos los medios de prueba en caja y tubo; debido a que la distribución espacial de las muestras en caja era la única barrera de separación entre ellas, era necesario que las placas de agar estuviesen completamente secas para evitar que se contaminaran unas con otras. Para lograr esto se colocaron las cajas en la incubadora a 37°C por 18 horas, pero como esto podía ser un factor que alterará los

resultados también se colocaron los tubos con medio, esto nos ayudo a comprobar que tanto cajas como tubos con medio no presentaran contaminación alguna antes de ser sembrados.

6.7. Para inocular las pruebas bioquímicas en tubo y en placa se tomó de la suspensión bacteriana estandarizada 0.002 ml, con una asa calibrada. La delimitación de espacios para la inoculación múltiple en placa se hizo con la ayuda de una base de mármol que permitió su limpieza y no sufrió deterioro alguno por el calor generado por los mecheros; la cual tiene dibujada una circunferencia de 9 cm de diámetro, y múltiples divisiones dentro de ella, las cajas con medio para pruebas bioquímicas se colocaron sobre ésta para ser inoculadas.

Como las placas al momento de inocularlas se contaminaban con mucha facilidad debido a que el tiempo y área de exposición al medio ambiente era mayor que los tubos, fué necesario trabajar entre dos mecheros fisher y evitar toda corriente de aire.

6.8. Se incubó todos los medios de prueba en placa y tubo a 35 ± 1 C por 24 ± 3 horas.

6.9. Se leyeron los resultados de las pruebas bioquímicas en tubo y en placa como habitualmente se hace para las pruebas que se leen directamente (Carbohidratos, KIA, Urea, Citratos), para las pruebas que es necesario adicionar uno ó más reactivos para su lectura cubrir las placas con sus respectivos reactivos (MIO, SIM, RN-VP).

Cepas ATCC

Aislar en placas de agar MacConkey
37°/-1 C x 24°/-3 horas

Re sembrar en caldo nutritivo
37°/-1 C x 24°/-3 horas

Ajustar la turbidez a un estandar
0.5 MacFarland

Realizar pruebas bioquímicas
en tubo

Realizar pruebas bioquímicas
en placa

Leer resultados

Tratamiento de datos
Teorema de Bayes

Diseño Estadístico: Teorema de Bayes(47).

		Prueba en tubo		
		+ P	- N	total
Prueba en placa	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
total		a+c	b+d	a+b+c+d

a = es el número de casos verdaderos positivos

b = es el número de casos falsos positivos

c = es el número de casos falsos negativos

d = es el número de casos verdaderos negativos

$$S = \frac{a}{a + c} = P(+/P) = \text{Sensibilidad estimada}$$

$$E = \frac{d}{b + d} = P(-/N) = \text{Especificidad estimada}$$

$$C. D. = \frac{a + d}{(a + b + c + d)} = \text{Confiabilidad diagnóstica}$$

Valor predictivo:

$$\text{VPP} = \frac{a}{a + b} = \text{Valor predictivo positivo}$$

$$\text{VPN} = \frac{d}{c + d} = \text{Valor predictivo negativo}$$

Indice de falsos:

$$\text{IFP} = \frac{b}{a + b} = \text{Indice de falsos positivos}$$

$$\text{IFN} = \frac{c}{c + d} = \text{Indice de falsos negativos}$$

A continuación se enlistan los términos usados en el estudio estadístico:

SENSIBILIDAD.— Es la probabilidad de que la prueba resulte positiva, dado, que es positiva.

ESPECIFICIDAD.- Es la probabilidad de que la prueba resulte negativa, dado, que es negativa.

VALOR PREDICTIVO POSITIVO.- Si la prueba resulta positiva, que probabilidad hay de que realmente sea positiva.

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO.- Si una prueba resulta negativa, que probabilidad hay de que realmente sea negativa.

CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA.- Determina la confiabilidad de la prueba en estudio.

RESULTADOS

fig. 7.1
PRUEBA DE FERMENTACION DE MANITOL.
POSITIVA

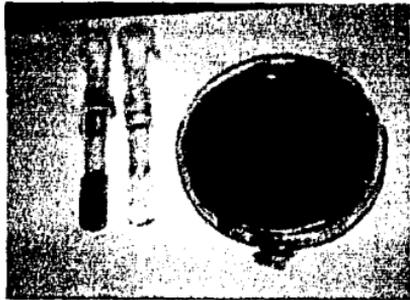


fig. 7.2
PRUEBA DE FERMENT. DE SACAROSA
POSITIVA

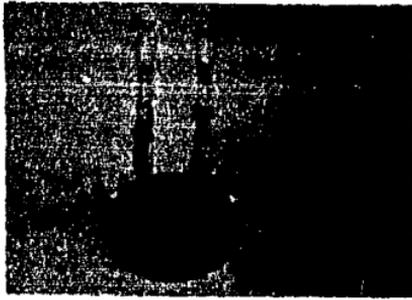


fig. 7.3
PRUEBA DE FERMENTACION DE SACAROSA
NEGATIVA

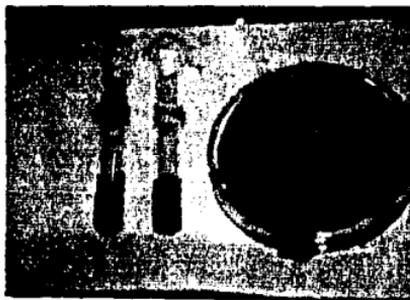


fig. 7.4
PRUEBA DE LA UREA
NEGATIVA



fig. 7.5
PRUEBA DEL INDOL DE KOVACS
POSITIVO

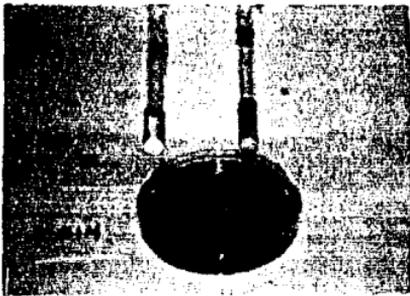


fig. 7.6
PRUEBA DEL INDOL DE KOVACS
NEGATIVO

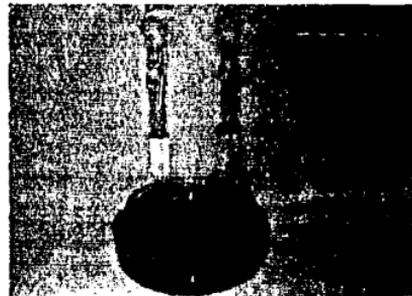


fig. 7.7
PRUEBA DE ROJO DE METILO
POSITIVA

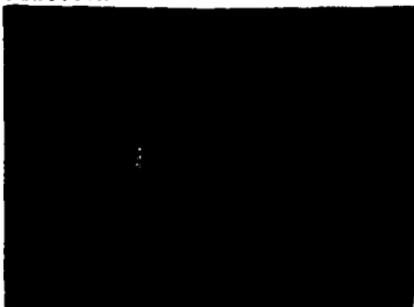


fig. 7.8
REACCION DE VOGES-PROSKAUER
NEGATIVA

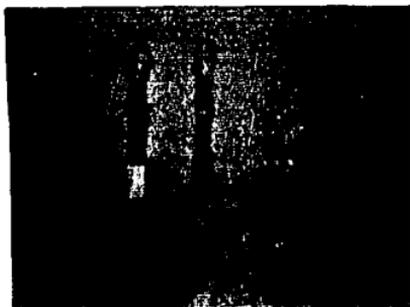


fig. 7.9
PRUEBA DE CITRATO DE SIMMONS
POSITIVA



fig. 7.10
PRUEBA DE CITRATO DE SIMMONS
NEGATIVA

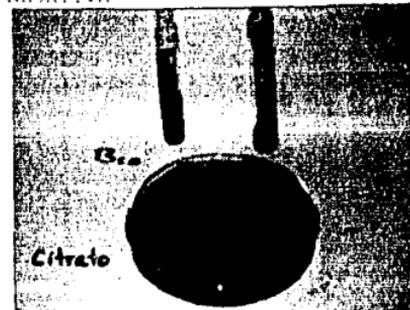


fig. 7.11
PRUEBA DE INDOL
NEGATIVA

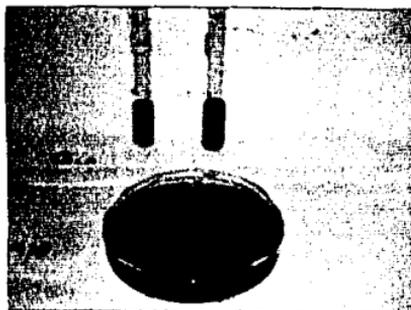


fig. 7.12
PRUEBA DE INDOL
POSITIVA

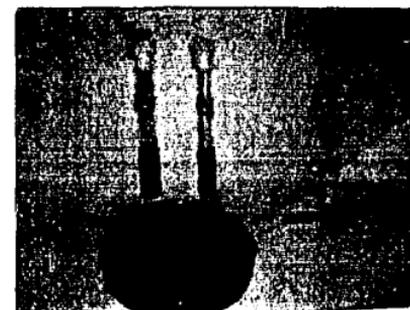


fig. 7.13
DESCARBOXILACION DE ORNITINA
POSITIVA



fig. 7.14
NEGATIVA



fig. 7.15 KIA
ALCALINO/ALCALINO.GAS



fig. 7.16 KIA
ALCALINO/ACIDO

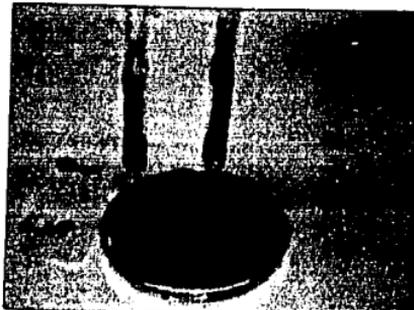
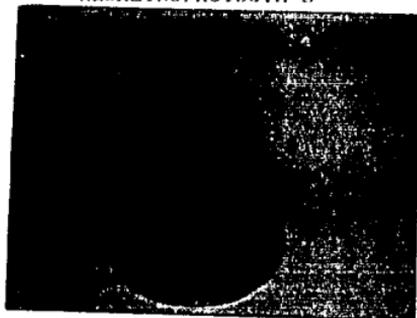


fig. 7.17 KIA
ALCALINO/ACIDO.H S



La tabla 7.1 muestra que el agar hierro de kligler en caja tiene una confiabilidad del 16.6% para determinar la fermentación de glucosa con respecto al método de referencia en tubo, debido a que solo puede detectar un 16.6% de las pruebas positivas cuando estas son positivas y su especificidad es del 0%, por lo que es nula la probabilidad de que detecte un resultado negativo (ver fig. 7.15 y 7.16).

Para la fermentación de lactosa y producción de ácido sulfhídrico es sensible y específico al 100%, por lo que es confiable al 100% con respecto al método tradicional en tubo (ver fig. 7.16 y 7.17)

Para la detección de gas a partir de la fermentación de glucosa se tiene una sensibilidad del 0.1%, y una especificidad del 100%, por lo que no es confiable puesto que sólo detecta un 0.1% de pruebas positivas (ver fig. 15)

TABLA 7.1 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA EL AGAR HIERRO DE KIGLER

P R U E B A E S T A D I S T I C A									
MET. PLACA MET. TUBO	FP	SEN	FN	ESP	VFP	VFN	IFP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
GLUCOSA	15	16.6	75	0	100	0	0	100	16.6 %
	99	100	0	100	100	100	0	0	100 %
LACTOSA	15	100	75	100	100	100	0	0	100 %
	15	100	75	100	100	100	0	0	100 %
AC. SULF.	30	100	60	100	100	100	0	0	100 %
	30	100	100	100	100	100	0	0	100 %
GAS	6	0.1	84	100	100	35	0	64	60 %
	60	100	30	100	100	100	0	0	100 %

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VFP- VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VFN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

IFP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

La tabla 7.2 enlista los parámetros estadísticos calculados para el medio SIM en caja, observándose una confiabilidad diagnóstica del 66% para la detección de motilidad, debido a que no es sensible, es decir que no puede detectar una prueba positiva porque al cambiar el soporte del medio en caja también se cambio su consistencia de semisólido a sólido y por ello no permite la migración de microorganismos móviles.

Para la detección de Indol y ácido sulfhídrico es sensible y específico al 100%, por lo que tiene una confiabilidad diagnóstica del 100% en caja con respecto a la prueba realizada en tubo (ver fig. 7.5 y 7.6)

TABLA 7.2 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA EL MEDIO SIM

P R U E B A E S T A D I S T I C A									
MET. CAJA MET. TUBO	FP	SEN	FN	ESP	VFP	VPN	IFP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
MOTILIDAD	0 30	0 100	90 60	100 100	0 100	66 100	0 0	33 0	66 % 100 %
INDOL	15 15	100 100	75 75	100 100	100 100	100 100	0 0	0 0	100 % 100 %
AC. SULF.	30 30	100 100	60 60	100 100	100 100	100 100	0 0	0 0	100 % 100 %

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VFP- VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VPN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

IFP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

La tabla 7.3 muestra los resultados obtenidos para el medio MIO en caja; para determinar la prueba de motilidad el método en caja tiene una sensibilidad del 0% y una especificidad del 100% debido a que el medio en tubo es semisólido, pero en caja es sólido por lo que no permite detectar a microorganismos móviles al impedir que migren del punto de inoculación, teniendo una confiabilidad diagnóstica baja del 66% con respecto al método de referencia en tubo.

Para detectar Indol es sensible y específica al 100%, por lo que es capaz de detectar tanto resultados positivos como negativos por lo que es confiable en un 100% el método realizado en caja (ver fig. 7.11 y 7.12)

La prueba para determinar si hay descarboxilación de Ornitina en caja es confiable en un 50%, debido a que es específica en un 100% pero no es sensible porque todas las pruebas tanto positivas como negativas dan positivas por el método en caja, debido a que el resultado de la prueba es enmascarado por la degradación de otros aminoácidos presentes en el medio (ver fig. 7.13 y 7.14)

TABLA 7.3 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA MEDIO MIO

P R U E B A E S T A D I S T I C A									
MET. CAJA MET. TUBO	FP	SEN	FN	ESP	VPP	VPN	FP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
MOTILIDAD	0 30	0 100	90 60	100 100	0 100	66 100	0 0	33 0	66 % 100 %
INDOL	15 15	100 100	75 75	100 100	100 100	100 100	0 0	0 0	100 % 100 %
ORNITIMA	90 45	0 100	0 45	100 100	0 100	50 100	0 0	50 0	50 % 100 %

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VPP- VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VPN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

FP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

En la tabla 7.4 se reportan los resultados del medio RM-VP, se observa que para la prueba Voges Proskauer no es sensible debido a que las 90 muestras estudiadas todas dieron un resultado negativo, por lo que no se puede determinar realmente la sensibilidad del método al no haber pruebas positivas para determinarlo.

Lo mismo sucedió con la prueba rojo de metilo en la que se tiene una sensibilidad del 100%, pero una especificidad del 0%, debido a que las 90 pruebas realizadas dieron resultados positivos (ver fig. 7.7)

Por ello dichas pruebas en caja son confiables en un 100% con respecto al método convencional en tubo, siempre y cuando la prueba de Vogues Proskauer sea negativa, y la prueba rojo de metilo sea positiva para un microorganismo que se pretenda identificar (ver fig. 7.8)

TABLA 7.4 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA EL MEDIO VOGES PROSKAUER - ROJO DE METILO

P R U E B A E S T A D I S T I C A

MET. CAJA MET. TUBO	FP	SEN	FN	ESP	VPP	VPN	DFP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
VOGES PROSK.	0	100	0	100	100	100	0	0	100 %
ROJO DE MET.	0	100	0	100	100	100	0	0	100 %

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VPP- VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VPN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

DFP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

En la tabla 7.5 podemos observar que la confiabilidad diagnóstica del caldo rojo de fenol con Manitol en caja es 100% confiable siempre y cuando la prueba sea positiva puesto que es sensible; pero no fue posible saber su especificidad real debido a que las 90 pruebas estudiadas dieron positivas (ver fig. 7.1)

TABLA 7.5 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA CALDO ROJO DE FENOL CON MANITOL

P R U E B A E S T A D I S T I C A									
MET. CAJA MET. TUBO	FP	SEN	FN	ESP	VFP	VPN	IFP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
MANITOL	90	100	0	0	100	0	0	0	100 %
	90	100	0	100	100	100	0	0	100 %

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VFP - VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VPN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

IFP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

La tabla 7.6 nos indica que la prueba rojo de fenol con sacarosa en caja es sensible y específica en un 100%, por lo que es confiable en relación con el método de referencia en tubo en un 100% (ver fig. 7.2 y 7.3)

TABLA 7.6 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA CALDO ROJO DE FENOL CON SACAROSA

P R U E B A E S T A D I S T I C A									
MET. CAJA MET. TUBO	FP	SEN	EN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
SACAROSA	15	100	75	100	100	100	0	0	100 %

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS.

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS.

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VPP- VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VPN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

IFP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

La tabla 7.7 muestra que la confiabilidad diagnóstica para el caldo urea en caja con respecto al método convencional en tubo es 100% confiable siempre y cuando la prueba sea negativa, dado que es específico en un 100%, pero su sensibilidad real no fue posible saberla debido a que las 90 pruebas realizadas fueron todas negativas (ver fig. 7.4)

TABLA 7.7 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA CALDO UREA

P R U E B A E S T A D I S T I C A									
MET. CAJA MET. TUBO	FP	SEN	FN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
UREA	0	0	98	100	0	100	0	0	100 %
	0	100	98	100	100	100	0	0	100%

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VPP- VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VPN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

IFP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

La tabla 7.8 enlista las pruebas estadísticas calculadas para agar citrato de Simmons en caja de las que se deduce que al ser 100% sensible y específico el método es igualmente de confiable que el convencional en tubo (ver fig. 7.9 y 7.10)

TABLA 7.8 CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA DEL METODO EN PLACA EN RELACION CON EL METODO CONVENCIONAL EN TUBO PARA AGAR CITRATO DE SIMMONS

P R U E B A E S T A D I S T I C A

MET. CAJA MET. TUBO	FP	SEN	FN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	CONFIABILIDAD DIAGNOSTICA
CITRATO	15	100	75	100	100	100	0	0	100 %
	15	100	75	100	100	100	0	0	100 %

FP- FRECUENCIA DE POSITIVOS

FN- FRECUENCIA DE NEGATIVOS

SEN- SENSIBILIDAD

ESP- ESPECIFICIDAD

VPP- VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VPN- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

IFP- INDICE DE FALSOS POSITIVOS

IFN- INDICE DE FALSOS NEGATIVOS

DISCUSION DE RESULTADOS Y SUGERENCIAS

Pretendiendo encontrar un método alterno para la reducción de costos en la identificación de Enterobacterias en 1979 se investigó en el IMSS la técnica de inoculación múltiple (25 muestras) en cajas de petri de 9 cm de diámetro no divididas. (34) Ellos reportaron que se reduce tiempo en la preparación de medios de cultivo y del material empleado, así como rapidez en su aplicación e interpretación.

Todos los datos reportados indicaban que esta técnica proporcionaba resultados confiable a un costo menor que el método convencional en tubo, y como hoy en día existen muchos sistemas comerciales multipruebas que en países como Estados Unidos han abatido los costos en la identificación de agentes etiológicos de enfermedades infecciosas pero que están muy lejos de hacer lo mismo en países subdesarrollados como México en donde las poblaciones suburbanas y rurales presentan un índice alto de morbilidad y mortalidad por éste tipo de enfermedades. Por ello la técnica propuesta por la clínica era de interés por lo que se analizó el trabajo realizado por ellos y se encontraron muchas deficiencias, es decir que no se había desarrollado un estudio puramente experimental por lo que se pretendió iniciar la validación del método planteando un estudio formal de ésta técnica con el presente trabajo.

Como el procedimiento es idéntico al realizado en el método convencional para pruebas bioquímicas en tubo se estudió como afecta al resultado (sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica) el modificar soporte y volumen de los medios de prueba al colocarlos en caja. Se controló todas las demás variables que pudieran afectar los resultados (temperatura de incubación, tiempo de incubación, humedad, atmósfera, pH).

Para realizar el estudio se analizaron cepas ATCC de la familia Enterobacteriaceae, se usaron cajas de petri de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura, una cantidad constante de inóculo y 20 ml de medio marca bioxon para todas las pruebas bioquímicas.

Como los medios estudiados incluían tanto estado líquido, sólido y semisólido fué necesario agregar agar bacteriológico en cantidad suficiente a los medios líquidos y semisólidos para obtener una consistencia sólida (2% de agar). Entonces al modificar el soporte del medio automáticamente para los medios líquidos y semisólidos se cambió su consistencia.

Como la distribución espacial de las muestras en la superficie de agar en caja fué la única barrera para evitar contaminación entre ellas fué indispensable que las placas antes de ser usadas estubiesen completamente secas (sin agua de condensación tanto sobre la placa de agar como en la tapa de la caja) se encontró que la mejor manera de lograr esto era preparar todos los medios en caja e incubarlos a 37°C por 18 horas antes de usarlos, esto trajo como desventaja un tiempo mayor para la identificación de Enterobacterias en placas, pero también sirvió para comprobar que las cajas con medio de prueba eran estériles en el momento de su utilización y en la práctica éste tiempo puede ser eliminado al tener día con día medios listos para su uso.

Al momento de inocular las cajas fué necesario trabajar entre dos mecheros fisher, sin ninguna corriente de aire y con mucho cuidado al momento de inocularlas, debido a que se contaminaban con mucha facilidad al aumentar considerablemente el tiempo de exposición al medio ambiente al sembrar múltiples muestras, mientras que para los tubos solo estaban expuestos por poco tiempo y además el área de exposición en tubo es muchísimo menor que la de caja.

Para la distribución de muestras en las placas de agar se utilizó una placa de marmol blanco en la que se dibujó con un marcador el perímetro de la caja con una serie de divisiones (como en un cuenta colonias) y sobre ella se colocaron caja por caja para ser sembradas, esto facilitó su limpieza con fenol al 5% y no sufrió deterioro alguno por el calor radiado por los mecheros.

Todos los medios inoculados tanto en caja como en tubo se incubaron por 24+/-3 horas a 37+/-1°C, transcurrido este tiempo se procedió a leer los resultados de las pruebas para lo cual no hubo ningún problema; inclusive para las pruebas RM-VP e Indol (MIO Y SIM) en caja únicamente se colocó una gota de cada reactivo necesario para determinar la prueba sobre el punto de inoculación de cada cepa, por lo que se observó un ahorro en

cuanto a volumen de reactivos utilizado en las pruebas bioquímicas en caja.

En cuanto a los resultados estadísticos obtenidos para el agar hierro de Kligler, se observó una confiabilidad diagnóstica del 16.6% para detectar la fermentación de la glucosa, este valor fue bajo debido a que el volumen del medio colocado en caja (20 ml) tiene un grosor aproximadamente de 6 mm, que no fue suficiente para brindar el efecto de dos cámaras, una aeróbica y otra anaeróbica, necesarias para poder observar los fermentadores de glucosa ya que estos son enmascarados por la alcalinización del medio al degradar aminoácidos favorecida en aerobiosis una vez consumida la baja concentración de glucosa.

Como la concentración de la lactosa es 10 veces superior a la glucosa si es posible detectar a los fermentadores de lactosa sin que exista el efecto de las dos cámaras pues el microorganismo primero fermenta la glucosa y cuando ésta es agotada comienza a fermentar lactosa que por su concentración tan alta no requiere llegar a la utilización de aminoácidos obteniéndose una confiabilidad diagnóstica del 100%.

Para la detección de gas en este medio debido al pequeño grosor del medio posiblemente tendió a escapar por el punto de inoculación obteniéndose una confiabilidad diagnóstica baja del 40%.

Para el medio SIM dió una confiabilidad diagnóstica del 66% para determinar la motilidad debido a que la consistencia del medio (sólido) no permite la migración del punto de inoculación de las bacterias móviles; pero si consideramos que aún en los sistemas comerciales no incluyen esta prueba, este medio es útil para la reducción de costos al ser usado en tubo puesto que es un minisistema multipruebas muy confiable.

Para el medio MIO se presentó el mismo problema para determinar motilidad con una confiabilidad diagnóstica del 66%, pero la detección de indol es altamente confiable (100%); mientras que para la prueba de ornitina es confiable en un 50%, debido a que la descarboxilación de la ornitina, lisina y arginina se favorece en anaerobiosis, por lo que el grosor del medio en caja no es suficiente para mantener esta condición, ya que en los tubos los microorganismos ornitina negativos en el fondo se observa un color amarillo y en la superficie un color púrpura debido a la degradación de otros aminoácidos presentes en el medio.

Para las pruebas rojo de metilo y caldo rojo de fenol con Manitol se observa una confiabilidad del 100% siempre y cuando la prueba sea positiva. Mientras que para las pruebas Voges Proskauer y caldo urea se tiene una confiabilidad del 100% con respecto a la convencional siempre y cuando sea negativa. Estos resultados se debieron a que las 90 muestras que se estudiaron dieron para cada una de estas pruebas un resultado positivo, dado que eran positivas y lo mismo ocurrió con los resultados negativos. Por lo que sólo se pudo determinar para las 90 pruebas que dieron positivas su sensibilidad y no su especificidad real al no haber resultados negativos que analizar y para las pruebas negativas sólo se pudo calcular su especificidad y no su sensibilidad al no haber resultados positivos que analizar. De esto se deduce que es necesario probar una gama más amplia de cepas que den tanto resultados positivos como negativos para cada una de estas pruebas para determinar su sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica real.

Para el caldo rojo de fenol con Sacarosa y agar citrato de Simmons no se afectó su resultado al modificar el soporte y volumen del medio en caja teniendo una confiabilidad del 100% con respecto al método de referencia en tubo.

Haciendo un balance de las ventajas del método de inoculación múltiple en caja tenemos: una reducción en la cantidad de medio, reactivos y cristalería que en el método convencional; y las desventajas: mayor tiempo para realizar las pruebas debido a que se debe poner por 18 horas en la incubadora a secar las cajas con medios de prueba antes de usarse, una probabilidad muy alta de contaminación al exponer las cajas con medio por un periodo de tiempo mayor al medio ambiente que en tubo, y además el área expuesta en caja al medio ambiente es muy grande en comparación con la de tubo. Pero las desventajas de este método pueden ser eliminadas teniendo día con día medios listos para su uso y al momento de sembrar las muestras se tiene cuidado se evitará la contaminación del medio.

Por todos estos resultados se deduce que el método de inoculación múltiple en caja es útil para las pruebas bioquímica de citrato de Simmons y caldo rojo de fenol con sacarosa, y para los medios caldo rojo de fenol con Manitol, caldo urea y rojo de metilo-Voges Proskauer se sugiere que se estudien una gama más variada de cepas para obtener resultados tanto positivos como negativos y así poder determinar su sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica; y para los medios

Agar Hierro de Kligler, Medio Ornitina-Motilidad-Indol y medio Sulfuro-Indol-Motilidad se propone que se realicen una serie de modificaciones a las variables estudiadas (volumen de medio, consistencia, condiciones de anaerobiosis, etc) para determinar las condiciones óptimas de el método en placa para no afectar su sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica de éstos medios.

CONCLUSIONES

Para el Agar hierro de Kligler se obtuvo una confiabilidad diagnóstica del 100% para la fermentación de lactosa y producción de ácido sulfhídrico, para determinar la fermentación de glucosa del 16.6% y para gas del 40%; pero si consideramos que los sistemas multipruebas comerciales a excepción de Enterotube, no reporta gas a partir de glucosa y que además todos los carbohidratos los reportan por separado. Se concluye que la prueba bioquímica en tubo es de mayor utilidad, puesto que por sí sola ya es un minisistema muy completo y por ello implícitamente ya lleva un abatimiento en su costo.

Para SIM se concluye que en placa es altamente confiable, siempre y cuando se determine la motilidad del m.o como una prueba extra (gota pendiente) como ocurre en algunos sistemas multipruebas.

Para MIO se concluye que la prueba bioquímica en tubo es más confiable y por ser un sistema multiprueba ya hay un reducción de costos al ser usado para la identificación bacteriana.

Para la prueba Vogues Proskauer y urea en caja son confiable siempre y cuando sean negativas. Por lo que se propone estudiar cepas que para éstas pruebas den resultados positivos y negativos para poder determinar su confiabilidad diagnóstica en la identificación de enterobacterias.

Para la prueba rojo de metilo y rojo de fenol con Manitol en caja son confiable siempre y cuando sean positiva. Y para poder determinar su confiabilidad diagnóstica en la identificación de enterobacterias es necesario estudiar una variedad de cepas para tener resultados tanto positivos como negativos.

Para el caldo rojo de fenol con Sacarosa y agar citrato de Simmons tienen una confiabilidad diagnóstica en caja del 100%; por lo que se comprueba que al modificar el volumen y soporte de

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

éstos medios no afectó su confiabilidad diagnóstica con respecto al método de referencia en tubo, teniéndose así una técnica alternativa para la identificación de especie de Enterobacterias a un costo menor del método convencional en tubo para estos dos medios.

Por lo que se llega a la conclusión de que los medios útiles en la identificación de especies de la familia Enterobacteriaceae en caja por inoculación múltiple son:

- Agar citrato de Simmons
- Caldo rojo de fenol con Sacarosa

Comprobándose que no se afecta su sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica al modificales el soporte y volumen del medio. Presentando la ventaja de reducir cantidad de medio al utilizar 20 ml para la identificación de 25 muestras, reactivos y material al usar una caja en lugar de 25 tubos como en el método convencional, y las desventajas de requerir mayor tiempo para su realización y una muy alta probabilidad de contaminación por ser mayor el área y tiempo de exposición al medio ambiente de las cajas con medio de prueba en caja que en tubo.

Para los medios:

- Agar hierro de Kligler
- Medio Ornitina-Motilidad-Indol (MIO)
- Medio Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM)

Se comprobó que modificando el soporte y volumen de medio si se afecta su sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica, siendo esta última menor al 80% por lo que no son útiles con las condiciones estudiadas en éste trabajo para realizar pruebas bioquímicas en placa para la identificación de Enterobacterias.

Para los medios:

- Caldo rojo de fenol con Manitol

- Caldo urea

- Rojo de metilo-Voges Proskauer

No fue posible determinar si se afecta su sensibilidad, especificidad y confiabilidad diagnóstica al modificar el soporte y volumen del medio debido a que las 90 pruebas realizadas para cada medio fueron todas positivas o negativas para las cepas estudiadas.

En general se llega a la conclusión final de que el método en placa de inoculación múltiple es confiable en la identificación de Enterobacterias para las pruebas bioquímicas de citrato de Simmons y Caldo rojo de fenol con Sacarosa debido a que el tiempo requerido para la preparación de medio y su contaminación son factores que se eliminan teniendo siempre medios listos para su uso, además teniendo cuidado al momento de sembrar las muestras y así evitar que se contamine el medio. Para los medios caldo rojo de fenol con Manitol, caldo urea y rojo de metilo-Voges Proskauer es necesario estudiar una variedad de cepas en las que se tenga tanto resultados positivos como negativos para poder determinar su confiabilidad diagnóstica en caja. Y para los medios Agar hierro de Kliger, Medio Ornitina-Motilidad-Indol y Medio Sulfuro-Indol-Motilidad es necesario realizar estudios posteriores para determinar las condiciones óptimas del método en placa para obtener una confiabilidad diagnóstica similar a método convencional.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Davis B, R. Dulbecco, H. Eisen, H. Ginsberg. Tratado de Microbiología. 3a. ed. Barcelona, España. Salvat Editores, 1990: 529-550
- 2.- Baker F, Beach M. Manual de Técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 1990: 69-175
3. Brock T, Smith D, Madigan M. Microbiología. 4a. ed. Prentice-Hall Hispanoamericana. D.F., México. 1987: 663-678,846-865
- 4.- Braude A, Davis Ch, Fierer J. Infectious Diseases and Medical Microbiology. 2da. ed. Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, EE.UU. 1986: 8-29,897-906
- 5.- Santacruz A. La Salud Pública en el IMSS. Rev. Med. IMSS. México. 1993; 31:37-45
- 6.- Pezzlo M. Rapid Methods in Microbiology: III. Rapid Methods for the Identification of Gram-Negative Organisms. Am. J. off Med. Technol. 1981; 47:693-700
- 7.- Koneman E, Allen S, Dowel V, Janda W, Sommers H, Winn W. Diagnóstico microbiológico. 3a. ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana, 1992: 203-267.
- 8.- Finegold S, Baron E. Diagnóstico microbiológico. 7a. ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1989: 375-394.
9. Freeman B. Microbiología de Burrows. 22a. ed. Mexico. Internacinal McGraw-Hill, 1989: 495-523
- 10.- Joklik W, Willlett M, Amos D, Wilfert C. Zinsser Microbiology. 9a. ed. California, EE.UU. Appleton & Lange. 1988: 25-60,459-485

11. Volk W, Benjamin D, Kadner R, Parsons J. Essentials of Medical Microbiology. 4a. ed. Philadelphia, EE.UU. 1991; 389-412
- 12.- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Microbiología médica. 13a. ed. México: El Manual Moderno, 1990: 238-252.
- 13.- Lennette E. Manual de Microbiología Clínica. 4a. ed. Buenos Aires, Argentina. Ed. Médica Panamericana. 1987: 80-133,336-382
14. Conde C. Historia y epidemiología de la disenteria bacilar. Infectología. 1986; 11:453-454
15. Muñoz O, Torres J. Avances en los criterios diagnósticos y terapéuticos en diarrea aguda. Gaceta Médica de México. 1192; 128:573-581
- 16.- Gilligan P, Diarrheal Disease and DRGs. Clinical Microbiology Newsletter. 1986; 8:1-4
- 17.- Fessia S, Fawcett P, Macvaugh C, Ryan S. Diagnostic Clinical Microbiology. EE.UU. ed. W.B. Saunders Company. 1988: 63-73,197-212
- 18.- Tortora G, Funke B, Case Ch. Microbiology. 4a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 1992: 101-140,624628
- 19.- Hernández F. Enfermedades diarreicas en los niños. Gaceta Médica de México. 1990; 126:359-360
- 20.- Mojarro O, Oyarzábal H, Hernández D. Epidemiología de la infección intestinal y estrategias operativas de rehidratación en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Bol. Of. Sanit Panam 1994; 1:37-46
- 21.- Boletín Epidemiológico Anual 1992. IMSS.
- 22.- Harman P. Miniaturized Microbiology Methods. Multiple Inoculation Methods. Advances in Applied Microbiology. 1968; Suplemento 1: 85-100
- 23.- Kelly M, Latimer J. Comparación of the AutoMicrobic System With API, Enterotube, Micro-ID, MicroMedia Systems, and convencional Methods for Identification of Enterobacteriaceae. J. of Clin. Microbiol. 1980; 12: 659-662.

- 24.- Davis J, Stager C, Wende R, Hussain. Clinical Laboratory Evaluation of the AutoMicrobic System Enterobacteriaceae Biochemical Card. *J. Clin. Microbiol.* 1981; 14: 370-375.
- 25.- Woolfrey B, Lally R, Quall C. Evaluation of the AutoScan-3 and Sceptor System for Enterobacteriaceae Identification. *J. of Clin. Microbiol.* 1983; 17: 807-813.
- 26.-Castillo C, Bruckner D. Comparative evaluation of the Eiken and API 20E Systems and Conventional Methods for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 754-757.
- 27.-Piccolomini R, Girolamo A, Catamo G, Cellini L, Allocati N, Ravagnan G. Enterosistem 18-R: Description and Comparative evaluation with Conventional Methods for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2300-2304.
- 28.-Izard D, Husson M, Vicent P, Leclerc H, Monget D, Boeurgras J. Evaluation of the Four-Hour Rapid 20E System for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 51-54.
- 29.-Murray P, Gauthier A, Niles A. Evaluation of the Quantum II and Rapid E Identification Systems. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 509-514.
- 30.-Rhoden D, Smith P, Baker C, Schable B. autoSCAN-4 System for Identification of Gram-negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22: 915-918.
- 31.-Keville M, Doern G. Evaluation of the DMS Rapid E System for Identification of Clinical Isolates of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 1010-1011.
- 32.-Gooch W, Hill G. Comparison of Micro-ID and API 20E in Rapid Identification of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15: 885-890.
- 33.-Burman L, Ostensson R. Time and Media Saving testing and identification of microorganisms by multipoint inoculation on undivided plates. *J. Clin. Microbiol.* 1978; 8: 219-227.
- 34.- Ramirez A. Identificación de Enterobacterias por pruebas bioquímicas en placa. *Bioquímica.* 1979; 16: 445-452.

- 35.- Washington J. Rapid Diagnosis by Microscopy. Clinical Microbiology Newsletter. 1986; 8:135-138
- 36.- MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Editorial Médica Panamericana, 1990: 27-37,61-71,94-120,134-148,168-172,183-205,259-274.
- 37.- Burton G. Microbiology For the Health Sciences. 3er. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott company, 1988: 82-94,244-253
- 38.- Krieg N, Holt J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. EEUU: Ed. Williams & Wilkins. 1984:408-447
- 39.- Bixon. Manual de Medios de Cultivo. Bioxon de México, 1980.
- 40.- Thompson J, Borczyk A. Use of a Single-tube Medium, o-Nitrophenyl-B-D-Galactopyranoside-Phenylalanine-Motility Sulfate, for Screening of Pathogenic Members of the Family Enterobacteriaceae. J. of Clin. Microbiol. 1984; 20:136-137
- 41.- Winkelman J. Clinical Laboratory Responses to Reduced Funding. J. Amer. Microbiol. Ass. 1984; 252:2435-2440
- 42.- Ellner P. Cost-Containment Strategies for the Diagnostic Microbiology Laboratory. Clinical Microbiology Newsletter. 1987; 9:117-120
- 43.- Bartlett R. Making Optimum Use of the Microbiology Laboratory. J. Amer. Medical. Ass. 1982; 247:847-859
- 44.- Washington J. The Clinical Microbiology Laboratory. Utilization and cost-Effectiveness. The Amer. J. Medicine. 1985; 78(Suppl 6B):8-16
- 45.- Winkel P, Statland B. Assessing Cost Savings when Unnecessary Utilization of Laboratory Tests Can Be Abolished. Amer. J. Clin. Patol. 1984; 82:418-432
- 46.- Bartlett R, Kohan T, Rutz Ch. Comparative Costs of Microbial Identification Employing Conventional and Prepackaged Commercial Systems. Amer. J. Clin. Patol. 1979; 71:194-200
- 47.- Méndez I, Namihira D, Moreno L, Sosa C. El Protocolo de Investigación. 2a. ed. Mexico: Trillas, 1993: 171-178