

50524
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMPARACIÓN DE CONFIABILIDAD DIAGNÓSTICA ENTRE UN
MICROSISTEMA MANUAL DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y
LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

SERGIO AMARO ALVAREZ

DIRECTOR:

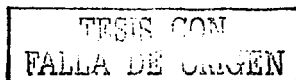
QFB ROBERTO GONZÁLEZ MELÉNDEZ

ASESOR:

QFB ROSALBA CERVANTES CRUZ



MEXICO. DF



ABRIL 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**COMPARACIÓN DE CONFIABILIDAD DIAGNÓSTICA ENTRE UN
MICROSISTEMA MANUAL DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y LAS
PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES.**

Tesis que se realizó en el laboratorio de análisis clínico de la Unidad Multidisciplinaria de Atención Integral "Estado de México", de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de:

QFB. Roberto C. González Meléndez.

QFB. Rosalba Cervantes Cruz.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, DF. 2003



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (ta) señor (ta):

Amaro Alvarez Sergio

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Comparación de confiabilidad diagnóstica entre un microsistema manual de identificación bacteriana y las pruebas bioquímicas convencionales.**

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

PRESIDENTE	Q.B.P. DORA ALICIA PEREZ GONZÁLEZ
VOCAL	Q.F.B. ROBERTO C. GONZÁLEZ MELÉNDEZ
SECRETARIO	Q.F.B. ROSALBA CERVANTES CRUZ
SUPLENTE	Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA
SUPLENTE	Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 12 de marzo de 2003.

Roberto Cruz González Meléndez
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

c c p Departamento de Control de Egresados
c c p interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

Dedicado a la memoria del hombre que más he admirado en mi vida, por su fortaleza, su trabajo, su honestidad y su cariño. A quién el tiempo no me esperó para poner en sus manos este trabajo, que sería para agradecer la vida que el abandono entre las mías.

A ti Papá, sigues vivo en mi corazón.

Al ángel más hermoso de este mundo, que es capaz de arrancarse el alma por la pasión de su vida... ..sus hijos.

A ti mamá; gracias por permitir que viviera, por enseñarme a vivir y por vivir conmigo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Por darnos la oportunidad del desarrollo profesional y personal, por dotarnos de los elementos necesarios para representar dignamente a nuestro país y por darnos el orgullo de ser universitarios.

A mis asesores:

QFB Roberto C. González Meléndez
QFB Rosalba Cervantes Cruz

Gracias por todo el apoyo y los valiosísimos consejos que me dieron antes, durante y después de la realización de esta tesis.

A quien revisó el proyecto y presidente del jurado

QBP Dora Alicia Pérez González

Gracias por la invaluable experiencia en bacteriología que compartió conmigo para revisar y terminar esta tesis.

A mis sinodales:

QFB Yolanda Flores Cabrera
QFB Fco. Javier Parada García

Por las importantes aportaciones que realizaron a este trabajo con su experiencia y por el siempre amable trato que me brindaron.

A mis profesores.

Dr. Rubén Marroquín Segura
QFB Antonino Sáenz Prieto †
QFB J. Ángel Rojas Zamorano
QFB José Oscar González
QFB Enriqueta Castrejón

Por todas las enseñanzas que nunca olvidare, le pido a la vida que les recompense la vocación que tienen para desempeñar la noble tarea de la docencia.

A mis hermanos:

Rocío Amaro Álvarez
Angélica Amaro Álvarez
Rogelio Amaro Álvarez

Por creer que esta meta era posible de alcanzar.

A mis amigos:

QFB Ruth González
QFB Melina Laguna
QFB Cesar Ibáñez
QFB E. Guadalupe Sánchez
QFB Vero Elizarraras
QFB Noemí Aguilar
QFB Vladimir Vargas
QFB Hilda Aranda
Biol. Yolanda Cortés
QFB Rogelio Luna

Gracias por brindarme su amistad sincera e incondicional que en mi vida será imposible de olvidar, por estar en las buenas y en las malas, por ser testigos y cómplices de mi formación profesional y por todo lo que vivimos y viviremos juntos, mil gracias chicos.

De manera especial quiero agradecer a:

Sra. Carmelita Valencia
Sra. Paty

Por todo el cariño y apoyo que recibí de su parte, durante todas las etapas difíciles de la carrera.

A mis amigos de toda la vida

Carmen Martínez
Alicia Martínez
Lic. Elizabeth Miramontes
Karina, Evelyn y Flor.
Adrian, Juan, Christian y Rebeca.

Por las importantes contribuciones que cada uno de ustedes ha hecho en mi vida.

F

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Capítulo	Página
1 Resumen	1
2 Introducción	2
3 Marco teórico	3
3.1 Metabolismo bacteriano.....	3
3.2 Identificación bacteriana.....	3
3.3 Pruebas bioquímicas.....	5
3.4 Automatización en microbiología.....	7
3.4.1 Sistemas comerciales.....	7
3.4.2 Sistemas de identificación con microtubos.....	9
3.4.3 Sistemas de identificación semiautomáticos y automáticos..	10
3.5 Bacilos Gram-negativos.....	13
4 Planteamiento del problema.....	17
5 Hipótesis	18
6 Objetivos	18
7 Material y métodos	19
7.1 Tipo de estudio.....	19
7.2 Población.....	19
7.2.1 Criterios de inclusión.....	19
7.2.2 Criterios de exclusión.....	19
7.3 Variables.....	19
7.4 Recursos.....	20
7.4.1 Material de vidrio.....	20
7.4.2 Equipo mayor.....	20
7.4.3 Equipo menor.....	21
7.4.4 Material biológico.....	21
7.4.5 Medios de cultivo.....	22
7.4.6 Reactivos.....	22
7.5 Metodología experimental.....	23

8 Diseño estadístico.....	27
8.1 Parámetros de confiabilidad.....	27
8.2 Intervalos de confianza.....	28
8.3 Teorema de Bayes.....	28
8.4 Índice Kappa de Cohen.....	28
8.5 Grado de concordancia.....	30
9 Resultados	31
9.1 Confiabilidad general del micrométodo.....	31
9.2 Confiabilidad por el estado físico del medio.....	31
9.3 Confiabilidad por cada prueba bioquímica.....	32
9.3.1 Medios líquidos.....	32
9.3.2 Medios sólidos.....	38
10. Análisis y discusión de resultados.....	47
10.1 Confiabilidad diagnóstica del micrométodo.....	47
10.1.1 Confiabilidad general del micrométodo.....	47
10.1.2 Confiabilidad según es estado físico del medio.....	48
10.1.3 Confiabilidad de cada prueba bioquímica.....	49
12. Conclusiones	56
Sugerencias.....	57
13. Referencias	58
Anexos.....	60
Anexo A. Fundamentos de pruebas bioquímicas.....	I
Anexo B. Nefelómetro de Mc Farland.....	IX
Anexo C. Glosario de siglas y abreviaturas.....	X

I.-RESUMEN

En el laboratorio de bacteriología se identifican bacterias por medio de pruebas bioquímicas, es necesario que esta actividad sea más económica, rápida y que genere menos contaminantes.

Buscando una alternativa diagnóstica, se comparó la confiabilidad de una microtécnica de pruebas bioquímicas en placas de ELISA con 100 µL de medio con el método convencional en tubo utilizando bacilos Gram negativos, se realizaron en total 672 determinaciones de cada método, 264 en medios líquidos y 408 en medios sólidos.

Se obtuvo que la microtécnica globalmente es 64.4% sensible y 82.3 % específica. En medios líquidos la confiabilidad diagnóstica es satisfactoriamente mayor al 80%, mientras que los sólidos no tuvieron buenos resultados. Individualmente tienen la misma confiabilidad: la fermentación de arabinosa, lactosa, manitol, sacarosa y xilosa en caldo RF, así como RM con 18 hs de incubación; sólo cumplieron con la sensibilidad deseada: caldo RF + glucosa, sacarosa en TSI y la prueba de O/F; sólo tuvieron especificidad aceptable: urea, caldo KCN, caldo RF + sorbitol, VP, H₂S en LIA, TSI y SIM, citrato, indol, fenilalanina, movilidad y ornitina.

Como resultado de la comparación al disminuir el volumen de reactivos y abatir los costos, sólo los medios líquidos son confiables.

TESIS COMI

FALTA DE PAGINAR

2.- INTRODUCCIÓN

La bacteriología clínica es fundamental en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, el microbiólogo utiliza estrategias científicas reproducibles que deben ser vigiladas para controlar su calidad.¹

Tradicionalmente se identifican bacterias evaluando su actividad metabólica, se necesita de tiempo para el análisis y un presupuesto moderado además de la experiencia del analista, elementos que si se carece de ellos se puede retrasar la atención al paciente, los anteriores problemas en medida han sido resueltos por la tecnología en el laboratorio microbiológico, misma que no se encuentra al alcance de cualquier presupuesto.

En la actualidad existen sistemas automatizados que reportan resultados altamente confiables con un mínimo gasto de reactivo y en un tiempo mucho más rápido pero tienen costos elevados y sólo convienen cuando el laboratorio maneja un gran número de pacientes. La importancia de este trabajo es diseñar una microtécnica como la de los equipos automatizados pero operada manualmente en cualquier laboratorio de microbiología.

Algunos trabajos realizados con anterioridad han manejado microtécnicas de identificación, por ejemplo en la FES Zaragoza Galia Martínez en el año de 1995 evaluó la confiabilidad diagnóstica de una técnica de inoculación múltiple para la identificación de enterobacterias en cajas Petri de 9 cm. de diámetro y disminuyendo el volumen de medio, se obtuvo que la fermentación de carbohidratos con RF y el citrato son confiables.² Lilia Tequines en el año 2000 aisló bacterias del género *Aeromonas* de aguas de la FES Zaragoza, utilizó entre otros un método miniaturizado en placa para evaluar la fermentación de carbohidratos.³ Barentanger en Illinois, E.U. en 1999, comparó los beneficios económicos y clínicos de los sistemas de identificación rápida, comparando manual y automatizadamente, concluyendo que el contar con un sistema rápido de identificación VITEK representa una ventaja invaluable para la salud del paciente.⁴ Holmes, Costas y Stever en Inglaterra, evaluaron sistemas de identificación para bacterias Gram-negativas, oxidasa positivas comparando placas manuales contra sistemas automáticos, teniendo como resultados que las placas manuales en la mayoría de los casos reportaron identificaciones correctas.⁵ Robinson Y, Mc Carter w. y Tetraud realizaron una comparación entre los sistemas automatizados, encontrando que la identificación correcta de los microorganismos probados fue mayor al 95.5%.⁵

En este trabajo se probó la confiabilidad diagnóstica de un microsistema de pruebas bioquímicas para identificar bacterias manualmente, tanto medios líquidos como sólidos utilizando 100 µL de medio en placas de ELISA, comparando mediante el teorema de Bayes su eficacia con la de las pruebas bioquímicas convencionales en tubo. Si la confiabilidad diagnóstica del microsistema de identificación es $\geq 80\%$, se cuenta con una alternativa que disminuye tanto los costos de operación como los contaminantes generados.

3.-MARCO TEÓRICO

3.1 METABOLISMO BACTERIANO

El término metabolismo denota todas las actividades químicas organizadas de una célula, las cuales comprenden dos aspectos generales: la producción de energía y la utilización de la misma.^{7,8}

La multiplicidad de procesos que efectúan los sistemas biológicos se puede seguir, directa o indirectamente hasta determinadas reacciones químicas, aún la forma de una bacteria depende de tales reacciones, pues está determinada por el componente péptidoglucano rígido de la pared celular, el cual a su vez está determinado por una serie de reacciones químicas propias de la síntesis celular.

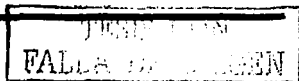
La energía se utiliza para construir estructuras celulares, para la síntesis de enzimas, ácidos nucleicos, polisacáridos y otros componentes bioquímicos, para la reparación de daños genéticos, mantener la perpetuación de la especie, para la movilidad, así mismo para mantener equilibradas las diferencias de concentración dentro y fuera de la célula. Por ello se necesitan grandes cantidades de energía para desarrollar esas diversas actividades, bajo condiciones favorables algunas bacterias son capaces de metabolizar una cantidad de sustancias nutritivas equivalentes a su propio peso en pocos segundos, una célula bacteriana podría compararse con un dinamo de enorme producción de energía.⁵

3.2 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Existen diferentes sistemas de identificación bacteriana, pero las más comunes son las pruebas bioquímicas, la identificación de una bacteria es la asignación de esta a un taxón según una clasificación dada, consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada, las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que persigue la identificación.⁹

Las técnicas clásicas del análisis microbiológico comprenden varios pasos que no pueden ser evitados, como el aislamiento de la(s) cepa(s) a partir de una muestra, la identificación bioquímica de la(s) misma(s) y si es necesario el recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC), estos métodos generalmente son tardados.⁹

Para la identificación bioquímica de una bacteria, se sigue el siguiente sistema de identificación.



1) Obtención un cultivo puro

2) Examen microscópico de células vivas y del frote teñido, se determina así la morfología y la tinción del microorganismo en estudio, también es importante determinar la agrupación, presencia y posición de esporas y otras características de interés.

Las pruebas primarias son: Tinción de Gram, morfología microscópica, catalasa, oxidasa, metabolismo oxidativo o fermentativo (O/F), fermentación de azúcares, presencia y posición de esporas, crecimiento tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y movilidad.

3) Determinar las características nutricionales, que en general dependen de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo, las bacterias pueden ser fotoautótrofas, fotoheterótrofas, quimioautótrofas y quimioheterótrofas.

4) Realización de pruebas secundarias y terciarias a efectos de llegar a una identificación a nivel de especie. Estas dependerán del género o familia determinado.

A los efectos de realizar identificaciones más rápidas, o cuando las pruebas bioquímicas no son concluyentes, se recurre al uso de antisueros específicos.

Los antígenos bacterianos pueden ser capsulares somáticos (O) que corresponden al lipopolisacárido de la pared de los Gram negativos, flagelares (H) y los antisueros se identifican con esas letras y el número o letra del antígeno correspondiente.

En una primera identificación se usan sueros polivalentes y para la caracterización serológica se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno.

También se pueden utilizar métodos de cromatografía de gases para identificar productos metabólicos, en particular para la identificación de bacterias anaerobias no esporuladas.

Muchos métodos microbiológicos rápidos, alternativos a los procedimientos clásicos, han sido estudiados, ya sea para la identificación como para el recuento.¹⁰ Las técnicas instrumentales han sido identificadas como una posibilidad para disminuir los tiempos de detección de los resultados, por medio de:

- El seguimiento de la concentración de metabolitos característicos, de cambios en el medio o de la respiración celular (potencial redox, concentración de ión hidrógeno, etc.)
- La determinación de componentes celulares como ácidos nucleicos o enzimas¹¹
- El recuento directo de las células microbianas utilizando analizadores electrónicos de partículas.¹³
- El recuento indirecto de las células microbianas a través de métodos como los cristales piezoeléctricos, la resonancia plasmónica de superficie o el espejo resonante.¹⁴

3.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

La identificación de un aislamiento bacteriano puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y criterios en la evaluación de similitudes.

Las pruebas bioquímicas convencionales generalmente determinan la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y la bacteria al desarrollarse puede utilizar o no.

Las pruebas, son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar una forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad bioquímica, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a ciertas temperaturas, crecimiento en presencia de inhibidores etc., no significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano.¹⁵

Existen diferentes sistemas comerciales que facilitan la identificación de bacterias, proponen el adecuado conjunto de pruebas bioquímicas, simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico y proveen los reactivos listos para su uso o porque son totalmente automatizables.

En general, la realización de una prueba bioquímica implica:

1. Cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato o inhibidor y luego de la inoculación visualizar el crecimiento y la degradación del sustrato, ya sea por viraje de un indicador o por un reactivo revelador de la presencia del sustrato o de algún producto de degradación.
2. Cultivar el microorganismo en un medio que contenga el sustrato de una enzima y luego de la incubación, demostrar la actividad enzimática. Siempre se debe tener un cultivo joven (18-24 hs de incubación) en un medio en el que el microorganismo se desarrolle en forma óptima a pH, fuerza iónica, atmósfera y temperatura adecuados; siempre que se prepara un nuevo lote de medio de cultivo para una prueba, deben llevarse acabo las pruebas de esterilidad, además de los correspondientes controles de calidad, sembrando en dicho medio una cepa positiva y otra negativa para esa prueba.

Si bien existe gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, entre los más comunes se encuentran:

1. Enzimas vinculadas con la respiración

- Oxidasa
- Catalasa
- Descomposición de azúcares simples, ácidos orgánicos y otros
- Requerimientos de oxígeno para su metabolismo
- Oxidación - Fermentación (O/F)

- Crecimiento en caldo tioglicolato.
 - Producción de ácido o ácido y gas
 - Fermentación de carbohidratos.
 - Detección de enzimas y vías metabólicas
 - RM -VP (Rojo de metilo - Voges Proskauer)
 - Gluconato
 - O.N.P.G. (orto nitro β -D-galactopiranosido)
 - Hidrólisis de bilis esculina
 - Hidrólisis del hipurato
2. Asimilación de una única fuente de carbono
- Citrato de Simmons
 - Malonato
3. Utilización de compuestos nitrogenados
- 3.1 Reducción de nitrato
- Asimilación
 - Desnitrificación
- 3.2 Descomposición de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados
- Fenilalanina
 - Lisina, arginina y ornitina
 - Urea
4. Medios multiprueba
- TSI (Triple Azúcar Hierro)
 - LIA (Agar Hierro Lisina)
5. Detección de exoenzimas
- Lecitinasa
 - Proteasas, coagulasa
 - Amilasas
 - Celulasas
 - Desoxirribonucleasa
 - Hemolisinas
6. Misceláneos
- Crecimiento en caldo cianuro de potasio (KCN)
 - Producción de pigmentos

- H₂S
7. Pruebas de promoción o inhibición de crecimiento
- Temperatura
 - Concentración de cloruro de sodio (NaCl)
 - Sensibilidad a antibióticos

Los fundamentos de las pruebas bioquímicas empleadas en este trabajo, se encuentran en el anexo A de esta tesis.

3.4 AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Hoy en día se cuenta con sistemas de identificación bacteriana como productos comerciales. Las casas comerciales utilizan modificaciones de las pruebas bioquímicas convencionales, ya sea sustratos deshidratados, tiras de papel filtro impregnadas de reactivos o pequeños compartimentos con medios listos para sembrar. En todos los casos se emplean códigos numéricos para la interpretación de resultados.

3.4.1 SISTEMAS COMERCIALES

Los sistemas comerciales más comúnmente usados son:

I.-BBL, ENTEROTUBE II (Becton Dicknson). Es un sistema rápido para la identificación de enterobacterias, definida como bastones Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa (-). Consiste en un tubo de plástico con 12 medios de cultivo contenidos en compartimentos individuales que se inoculan simultáneamente en una etapa y permiten la detección de 15 características bioquímicas.^{3,6}

II.-OXI / FERMENT TUBE II. (Becton Dicknson). Es un sistema listo para identificar bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, oxidasa (+). Consiste en un tubo de plástico de 12 medios de cultivo que permite la realización simultánea de 14 pruebas bioquímicas.^{3,6}

III.-API 20 E. Es un sistema estandarizado para la identificación de bacterias Gram (-). Consiste en una plantilla con microtubos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se reconstituyen al agregar una suspensión bacteriana. Permite la realización de 23 pruebas bioquímicas a partir de una única colonia bacteriana. El sistema identifica un elevado porcentaje de bacterias en 24 hs sin necesidad de determinar características fisiológicas adicionales. El API Profile Index, que puede usarse en forma manual o computarizada, proporciona la frecuencia de probabilidad de diversas cepas que deben considerarse para cada número de biotipo. Así, se maximiza la exactitud de la identificación de miembros de la familia Enterobacteriaceae. Castillo y Bruckner hallaron que el sistema API 20 E identificó correctamente un 97.7% de 339 aislamientos clínicos.^{3,8,10}

El sistema aunque difícil de inocular es práctico, las tiras deben manipularse con cuidado de modo que las suspensiones bacterianas no se derramen. Se requiere práctica para interpretar reacciones límite, lo que puede afectar el número de biotipo y la identificación final.^{8, 10}

IV.-API RAPID E. Sistema similar a la tira 20 E que evalúa en 4 hs las cúpulas del sistema son más pequeñas y los sustratos no están amortiguados lo que da como resultado reacciones más rápidas. Debido a que los volúmenes de las cúpulas son pequeños y el inóculo se prepara sólo hasta una densidad de 0.5 de un estándar de sulfato de bario en el nefelómetro de Mc Farland, únicamente se requieren una o dos colonias bien aisladas. Un estudio reveló que este sistema identificó un 94% de enterobacterias de 441 aislamientos clínicos con un 3% de identificaciones erróneas.

V.-MICRO - ID. Sistema de identificación bacteriana de 4 a 6 hs, sólo requiere agregar reactivo de KOH al 20% a una de las cámaras antes de interpretar los resultados. Las reacciones son claras y pueden compararse con una guía de colores, el fabricante suministra un registro de perfiles que lista la probable identificación de microorganismos para los números de biotipos de 5 dígitos y es posible efectuar comparaciones computarizadas.

VI.-MINITEK para microbiólogos que desean libertad de elección en la selección de características para la identificación. La elección de sustratos proporciona flexibilidad para identificar microorganismos diferentes de las enterobacterias.

Las reacciones son visiblemente claras y el uso de un número de tarjetas de comparación de colores hace que la interpretación resulte relativamente fácil. El fabricante también proporciona un Minicoder, con perilla plástica que permite una rápida clasificación de candidatos bacterianos con cada perfil bioclásico elegido.

La desventaja de permitir al usuario una total libertad de elección de las características de identificación es la dificultad para estandarizar números de biotipos. A la inversa, si el usuario elige un contacto de pruebas óptimo, desde un punto de vista que puede obtener el mejor número de biotipo posible. La necesidad de comprar varias piezas de equipo y de suministros hace que la inversión inicial sea costosa. Además, el sistema requiere diversas manipulaciones manuales en los pasos de inoculación, incubación e interpretación. La necesidad de cubrir los discos y el medio de cultivo dentro de los pocillos de reacción con aceite mineral agrega un paso más al procedimiento y es considerado engorroso.

VII.-SISTEMA REPLICADOR: Es un método fácil de usar, versátil y barato, lo que puede representar ventaja ante los sistemas anteriores. El usuario puede elegir cualquier número y secuencia de características a evaluar y sólo representa un costo un poco mayor que las pruebas bioquímicas convencionales. El control de calidad de este procedimiento es máximo porque pueden evaluarse microorganismos stock de reactividad conocida junto con los microorganismos desconocidos en cada determinación y no simplemente con una muestra seleccionada de un lote, como ocurre con otros sistemas.

Construcción: la base del sistema es el replicador de Steers, tiene 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.

2) un cabezal de inoculación, una placa de metal con 32 o 36 pocillos 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 métodos diferenciales convencionales de agar preparados de cajas de Petri estándar, redondas o cuadradas.

Inoculación: Se prepara una suspensión bacteriana de cada microorganismo desconocido inoculando colonias aisladas de los microorganismos en un tubo de caldo de soya tripticasa con extracto de levadura e incubando a 35° C durante 4 hs se colocan 0.5 mL de cada cultivo desconocido, junto con los microorganismos control estándar, en los pocillos de la placa para siembra. Luego, la placa se coloca bajo el cabezal de inoculación y se libera el émbolo de modo que las puntas se sumerjan en la suspensión bacteriana. Se eleva el cabezal de 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 circulares.

Incubación: la mayor parte de las pruebas de agar, excepto aquellas designadas para evaluar la utilización de ureasa y movilidad, se incuban de forma aerobia de 35 a 37° C de 18 a 24 hs las placas para movilidad de urea se incuban a temperatura ambiente; las placas para descarboxilasas se incuban de forma anaerobia.

Interpretación: Las placas muestran cambio de color en las colonias o en el medio que rodea a la inoculación de aquellos microorganismos que tienen reacciones positivas. Las reacciones de colores son esencialmente iguales a las obtenidas con los sistemas convencionales. Las placas para la micro titulación, permiten identificaciones bacterianas por medio de una serie de identificaciones bioquímicas. Además también se a preparado una serie de tubos con diluciones de antibióticos para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), de tal manera que se pueden determinar al mismo tiempo la identificación bacteriana y la susceptibilidad a los antibióticos que a su vez representa un beneficio para el laboratorio de microbiología.

3.4.2 SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN CON MICROTUBOS

SISTEMA MicroScan: Consiste en bandejas de micro tubos de plástico con sustratos reactivos para identificación bacteriana. Algunas bandejas como las Combo incluyen microdiluciones en caldo de diversos antibióticos en algunos de los microtubos para efectuar pruebas de susceptibilidad. Los paneles MicroScan se suministran congelados o con sustratos deshidratados que pueden ser comparables en resultados de identificación una forma con la otra.

Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana a 35° C durante 15 -18 hs los paneles pueden interpretarse visualmente, lo que se puede convertir en un número de

biotipo de 7 u 8 dígitos que puede traducirse a una identificación con el libro de código del fabricante. Alternativamente se puede utilizar un lector automático para detectar crecimiento bacteriano o cambios de color por diferencias de transmisión de luz. Las diferencias de puntos electrónicos son analizadas automáticamente por una computadora que compara patrones de reacción con un programa interno para determinar la probabilidad de las identificaciones.

SISTEMAS SCEPTOR: Es un sistema que permite la hidratación e inoculación simultánea de paneles con sustratos desecados en bandejas de microtitulación para identificación enterobacterias, se hace una suspensión bacteriana (5 mL de caldo soya tripticasa) y luego se traspasa a un envase desechable. Este envase se coloca en un dispositivo de inoculación automático y las placas son hidratadas e inoculadas de manera simultánea.

Los pocillos para arginina, H₂S, lisina, ornitina y ureasa se cubren con aceite mineral estéril. Los paneles se incuban a 35° C de 18 a 24 hs inmediatamente después de la incubación se agrega reactivo de Kovac y cloruro férrico a los pocillos para indol y triptófano respectivamente, las reacciones se interpretan visualmente y se ingresa la forma manual y un módulo de computadora, los programas computarizados proporcionan un número de biotipo de 7 dígitos.

3.4.3 SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN SEMIAUTOMÁTICOS Y AUTOMÁTICOS

QUANTUM II (BIT) (Abbott Laboratories, North Chicago). Es un sistema de identificación bacteriana, con un cartucho plástico que incluye 20 microtubos que contienen sustratos bioquímicos liofilizados, también comprenden un mecanismo transportador especialmente diseñado por medio del cual es posible efectuar lecturas espectrofotométricas de las reacciones de los tubos, cada tubo se inocula con una suspensión abundante de la bacteria a identificar y el conjunto se encuba a 35° C durante 4 hs, finalizado el periodo de la incubación se agrega una solución de p-dimetilaminobenzaldehído a la cámara que contiene triptófano (detección de indol). Este resultado, junto con el de la reacción de Oxidasa (efectuado por separado), se ingresa en el analizador junto con el cartucho, las reacciones son leídas por el espectrofotómetro de longitud de onda dual y las interpretaciones son realizadas de forma automática comparadas con la microcomputadora interna con una matriz de identificación preparada con anterioridad. Correlaciones mayores al 80% se imprime como identificaciones "excelentes", "aceptables" o "buenas"; con probabilidades menores del 80% el aparato imprime un mensaje indicando que debe considerarse la evaluación de características adicionales.

En un estudio de Pfaller y Col; el sistema BID identificó correctamente un 98.2% de enterobacterias en comparación con los resultados obtenidos en forma paralela con el sistema API 20E como método de referencia. Así mismo, Murray y Col hallaron que el sistema BID identificó un 97% de 49 aislamientos clínicos de la familia Enterobacteriaceae, en comparación con un 94.1% por medio de API20E. Silvestre y Washington hallaron que el sistema BID identificó un 89.6% de 279 aislamientos clínicos frescos de bacilos Gram-negativos con la conclusión de especies de no fermentadores.

Varios autores coinciden en que este sistema es rápido, conveniente y proporciona una identificación muy exacta de los microorganismos.

Sistema Autobac IDX: se basa en la inhibición diferencial de crecimiento por acción de agentes antimicrobianos. Cuando se determinó que cambios selectivos de los patrones de resistencia microbiana a algunos antibióticos llevaban a resultados inexactos, fueron sustituidos por agentes químicos diferencialmente inhibidores en el sistema Autobac 1. Este sistema identifica enterobacterias en un lapso de 3 – 6 horas con exactitud del 95 %. Consiste en un fotómetro de dispersión de luz, incubadora- agitador, terminal de datos, distribuidor automático de discos y un tubo con 19 sustratos. Los 19 sustratos desecados se distribuyen en forma automática en los discos que se dejan caer en los pocillos de los tubos, que son inoculados a posteriori con una suspensión de caldo del microorganismo. Los tubos inoculados se incuban a 35° C durante 3 horas en un agitador rotatorio. La lectura fotométrica inicial, basada en la turbidez, se efectúa después de 3 horas; Las lecturas posteriores se hacen con intervalos de media hora. las lecturas se ingresan a una computadora que reporta una probabilidad de identificación, el principal inconveniente del sistema, es que utiliza reactivos no convencionales que no se pueden comparar con las características de los sustratos clásicos.⁶

Conforme los avances de la tecnología alcanzan a las disciplinas del laboratorio clínico, se desarrollan mejores equipos automatizados para la identificación microbiológica. Hoy en día se encuentran equipos sofisticados como se describe a continuación:

DADE MicroScan, producido por Dade Behring. Son sistemas integrales y escalables para el análisis de especímenes clínicos en o que respecta a identificación y susceptibilidad a los antimicrobianos en el laboratorio de microbiología; los sistemas Dade MicroScan cuentan con los siguientes modelos adaptables al laboratorio.

Autoscan – 4.- Instrumento lector automático realiza la lectura de los paneles en 5 segundos.

Walk AWAY 40 y 46.- Instrumento robotizado que incuba los paneles y automáticamente realiza la interpretación de los resultados bioquímicos y/o de susceptibilidad a los antimicrobianos en el laboratorio a través de su sistema lector fotométrico o fluorométrico sin ninguna intervención del usuario. Imprime automáticamente los resultados en un reporte para el médico incluyendo los datos del paciente y la muestra.

Sistema DMS.- Sistema de manejo de datos, integrado a cada uno de los instrumentos, almacena todos los datos tanto de la muestra como del paciente, permite la edición y personalización de los mismos, incluye el manejo de datos para obtener reportes de epidemiología con ayuda de multiparámetros. Periódicamente Dade MicroScan actualiza su base de datos en el software, lo que permite al sistema estar a la vanguardia tanto en taxonomía como en los parámetro de susceptibilidad a los antimicrobianos, de acuerdo a la NCCLS. Cada uno de los instrumentos es controlado por un sistema de cómputo con impresora, en el caso del Walk Away cuenta con una impresora de código de barras adicional, su versatilidad y flexibilidad permiten la validación de datos y la revisión visual de las pruebas bioquímicas y antimicrobianos si así se desea.

SENSITITRE / ACCUMED.- Producido por Instrumentation Laboratory, para identificación y susceptibilidad en MIC, cuyas características son: Uno o varios módulos para 64 paneles c/u, lectura fluorométrica, código de barras, no necesita reactivos adicionales, no precisa de control de la cámara de agua ya que calienta por aire, software específico del sistema, permite realizar MIC a microorganismos especiales como *Pneumococcus*, *Haemophilus*, *Neisserias*, bacterias anaerobias, hongos, *Streptococcus viridans* y estreptococos hemolíticos, bacterias con elevada resistencia como *Enterococcus*, *Staphylococcus* y enterobacterias no fermentadoras.

La fabricación de los paneles de sensititre se controla por la FDA. El sistema tiene una precisión del 95% con Gram negativos en 5 hs y en las ocasiones que no haya resultado el mismo panel puede ser incubado hasta 18 hs para ser nuevamente evaluado.

VITEK.- Es un sistema integral producido por BioMérieux, para la identificación bacteriana, pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y escrutinio urinario; el sistema de trabajo esta compuesto de una tarjeta, la cual tiene el tamaño de un naipe con un peso aproximado de 24 g, esta tarjeta esta compuesta de 30 - 45 pocillos los cuales contienen los sustratos para la identificación microbiana o los antimicrobianos para las pruebas de susceptibilidad.

Descripción. Los componentes del sistema VITEK son:

- Un módulo preparador, que consta de una cámara de vacío para el llenado automático y simultáneo de 10 tarjetas en 2 min y de un sellador que permite sellarlas en forma hermética.
- Un módulo incubador / lector que efectúa simultáneamente la incubación y la lectura por tiempos de cada tarjeta en forma automática (sin intervención manual).
- Una computadora (procesador) que controla todas las operaciones que realiza, memoriza los valores de las lecturas, los procesa e interpreta los resultados.
- Una terminal que permite dialogar con el sistema, personalizar los resultados y editar en cualquier momento resultados preliminares.
- Una impresora edita automáticamente los resultados a medida que se encuentran disponibles.
- Programas (biobases): personaliza la entrada de datos demográficos de resultados y el informe del paciente, así como la capacidad de almacenamiento de dichos datos para su consulta o impresión en cualquier momento, logrando el mejor archivo de datos por paciente y por hospital.
- Un Data - track realiza consultas e informes estadísticos, un control de calidad de las tarjetas VITEK por medio de cepas ATCC tanto de las pruebas bioquímicas como de las pruebas de susceptibilidad.

Cada tarjeta se inocula con la suspensión bacteriana, ajustada con el nefelómetro de Mc Farland, de esta suspensión se toma un volumen determinado

para preparar una dilución en otro tubo y realizar la inoculación de las tarjetas, las tarjetas son selladas y colocadas en el incubador-lector y a partir de este momento cada hora se registran y reportan resultados a la base de datos y en cuanto tiene una conclusión el resultado pasa automáticamente al registro del paciente.⁷

3.5 BACILOS GRAM NEGATIVOS

Las bacterias son microorganismos unicelulares con estructura celular procariota, son células de tamaño variable cuyo límite inferior está en las 0.2 μm y el superior en las 50 μm ; sus dimensiones medias oscilan entre 0.5 y 1 μm , con sistemas muy diversificados en su modo de obtener energía y alimento, se reproducen por fisión binaria, están presentes en casi todos los ambientes, carecen de una estructura nuclear definida, su genoma está constituido por un sólo cromosoma que consta de una única molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenario, desprovista de membrana nuclear envolvente.

Es frecuente la aparición de una o varias moléculas de ADN mucho menores que el cromosoma e independientes del mismo (plásmidos y transposones). Suelen ser prescindibles y se encargan de codificar funciones bacterianas en ocasiones muy especiales; Su citoplasma es muy rico en ribosomas (que son de mayor tamaño que los de las células eucariotas) y muy pobre en organelos (carece de mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi, etc).

Las envolturas bacterianas son muy importantes y complejas. La mayoría de las bacterias poseen una pared que les confiere su tamaño y forma característicos y en cuya composición cabe destacar la presencia de ácido murámico, elemento exclusivo de los procariotas, por debajo de esta envoltura aparece la membrana citoplasmática, muy similar a la de los eucariotas.

Aunque existen miles de especies de bacterias diferentes, los organismos individuales presentan una de las tres formas generales siguientes:

- elipsoidal o esférica
- cilíndrica o en forma de bastón
- espiral o helicoidal.

Las bacterias esféricas o elipsoidales se denominan cocos; muchas bacterias con esta forma presentan modelos de agrupación que derivan de los diversos planos de división celular.

Las células bacterianas cilíndricas se denominan bacilos o bastones y presentan otros modelos de agrupación, así tenemos: Bacilos en cadena, bacilos en tetras chinas o empalizadas, bacilos sin distribución especial.

Las bacterias helicoidales se presentan en general como células individuales, independientes; pero las células de las distintas especies presentan notables diferencias de longitud, número y amplitud de las espiras y rigidez de la pared.

Las bacterias se clasifican según sus características tintoriales en Gram negativas y Gram positivas, Las bacterias que asumen en el cristal violeta son consideradas como Gram positivas y las que no lo retienen se tiñen con safranina se les considera Gram negativas.

Dentro de los bacilos Gram negativos de importancia clínica se pueden mencionar:

FAMILIA	GÉNEROS	ALGUNAS ESPECIES
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. agglomerans</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>
	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
	<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi</i> , <i>S. enteritidis</i>
	<i>Shigella</i>	<i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. flexneri</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i>
	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i>
	<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>V. cholerae</i> , <i>V. Parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>
	<i>Aeromonas</i>	
	<i>Plesiomonas</i>	<i>A. hydrophila</i>
	<i>Campylobacter</i> <i>Helicobacter</i>	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. fetus</i> <i>H. pylori</i> <i>H. cinaedi</i>
Bacilos Gram negativos no fermentadores: Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. lawfi</i> , <i>A. baumannii</i>
	<i>Sterotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>
	<i>Moraxella</i> <i>Flavobacterium</i>	<i>M. catharralis</i>
Haemophilus y relacionados	<i>Haemophilus</i>	<i>H. influenzae</i> , <i>H. parahemolyticus</i>
	<i>Actinobacillus</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i> .
	<i>Pasterella</i>	<i>P. multocida</i>
Bacilos poco usuales	<i>Bordetella</i> <i>Brucella</i>	<i>B. pertussis</i> , <i>B. abortus</i>
	<i>Francisella</i>	<i>F. tularensis</i>
Legionella y otros		<i>L. pneumophila</i>

FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

- Es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos de importancia clínica
- Hay 27 géneros y 102 especies
- 95% de aislamientos son de importancia clínica y pertenecen a 25 especies.
- Son ubicuos y la mayoría forman parte de la flora del tracto gastrointestinal
- Son patógenos primarios: *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*
- Son oportunistas: *E coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, etc.

Características:

Son Bacilos Gram negativos, móviles, con flagelos, no esporulados, se diferencian por sus características fenotípicas, la propiedad para crecer en medios selectivos y la resistencia a ciertos químicos y antibióticos.

Factores de virulencia:

Endotoxinas, cápsula, variación antigénica, producción de exotoxinas, expresión de factores de adherencia, supervivencia y multiplicación en la célula, secuestro de factores de crecimiento, resistencia a los factores del suero, resistencia a los antibióticos.

FAMILIA VIBRIONACEA

Género: *Vibrio*

Especies: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*

Bacilos Gram negativos, crecen en medios alcalinos, flagelados, aerobio o anaerobio

Factores de virulencia: enterotoxina del cólera: termoestable y termolábil, citotoxina, flagelo, adhesinas.

Otros géneros: *Aeromonas* y *Plesiomonas*

Microorganismos en forma de coma, con flagelo y microaerofílicos.

A. hydrophila, *A. caviae*, *A. sobria*, *P. shigelloides*.

Géneros *Campylobacter* y *Helicobacter* *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*

BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES

Géneros: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sterotrophomonas*, *Moraxella*.

Especies: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *S. maltophilia*,

Características: Ubicuos, tienen flagelos, no son fermentadores, aerobios obligados, capsulados, algunos poseen pigmentos, se encuentran en el suelo, materia orgánica en descomposición, la vegetación y el agua.

La colonización de estos microorganismos en población sana es de 6%, en pacientes hospitalizados de 36% y en pacientes inmunosuprimidos es de 68%.

Factores de virulencia:

Pili, cápsula, endotoxina, exotoxina A, exoenzima S, elastasa y otras proteasas, fosfolipasa C.

FAMILIA PASTEURACEAE

Género: *Haemophilus*

Especies: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. ducreyi*, *H. Haemolyticus*

Características: Bacilos Gram negativos pequeños, parásitos obligados con requerimientos especiales para vivir.

Factores de virulencia:

Cápsula (ribosa, ribitol y fosfato), lípido A, Proteasa para IgA 1.

Otros géneros: *Actinobacillus* y *Pasteurella*

OTROS BACILOS GRAM NEGATIVOS SIN FILIACIÓN DEFINIDA

Géneros: *Bordetella*, *Francisella* y *Brucella*

Bordetella: cocobacilos Gram negativos pequeños. *B. pertusis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*

Francisella Sobrevive intracelularmente (facultativo)

Brucella, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*.

OTROS BACILOS MENOS FRECUENTES

Familia: *Legionellaceae*

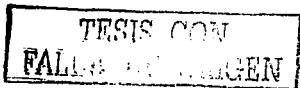
Género: *Legionella*, *Tatlockia*, *Fluoribacter*

Especies: *L. Pneumophila*

Patógeno intracelular facultativo, puede vivir en ambientes húmedos y temperaturas altas, evita la fusión del fagolisosoma.

NOCARDIA Y ACTINOMICETOS RELACIONADOS

Características: Coloración inusual al Gram, se encuentran en el suelo, los vegetales en descomposición y los sistemas de ventilación, son filamentosos (similar a las hifas de los hongos), tienen un amplio rango de infecciones desde colonización: *Streptomyces*, neumonitis alérgica, micetoma (*Actinomadura*, *Streptomyces*, *Nocardia*), enfermedad pulmonar (*Nocardia*) e infecciones sistémicas (*Nocardia*), *Nocardiasis*: Enfermedad broncopulmonar, diseminación en piel o SNC, micetoma.



4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pruebas bioquímicas convencionales se utilizan para la identificación de microorganismos; se requiere de un estricto control de calidad en su operación, tiempo, dinero y esfuerzo para obtener resultados confiables.

A el laboratorio microbiológico le conviene operar con menores costos, obtención de resultados más rápidamente y optimizar el espacio físico del área de trabajo, como lo hacen hoy en día los equipos automatizados en microbiología, con elevado grado de sensibilidad y especificidad pero a un costo mayor y no accesible para pacientes de bajos recursos.

Es necesario comparar la confiabilidad diagnóstica entre un microsistema de identificación manual y las pruebas bioquímicas convencionales, esperando que la confiabilidad del micrométodo sea mayor o igual al 80% para que el laboratorio pueda sustituir un método por el otro y así ofrecer un servicio de calidad a menor costo y que genere menos contaminantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.- HIPÓTESIS

Si se somete a experimentación la disminución del volumen de reactivo, a nivel de microlitros, como una modificación de las pruebas bioquímicas convencionales para la identificación de bacilos Gram-negativos, manteniendo constantes el resto de las variables y se obtiene una confiabilidad diagnóstica mayor o igual al 80%. Entonces se contará con una alternativa de identificación bacteriana en el laboratorio, que dé resultados confiables, satisfactorios y a un bajo costo

6.- OBJETIVOS

1. Comparar la confiabilidad diagnóstica para la identificación bacteriana entre un microsistema de identificación manual y las pruebas bioquímicas convencionales.
2. Cuantificar la confiabilidad del microsistema de identificación para averiguar si es posible sustituir el método convencional.
3. Diseñar un microsistema de identificación con menores cantidades de reactivo, lo que representa una disminución de costos y un beneficio ecológico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 TIPO DE ESTUDIO:

La investigación realizada en este trabajo fue de tipo comparativo, longitudinal y prospectivo.

7.2 POBLACIÓN.

1. Se utilizaron cepas bacterianas bacilares Gram negativas con registro ATCC.

Las cepas bacterianas fueron consideradas en función de los siguientes criterios:

7.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Las cepas utilizadas deben contar con registro ATCC.
2. Las cepas deberán ser bacterias bacilares Gram negativas.

7.2.1 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Cepas no viables
2. Cepas sin registro ATCC
3. Bacterias que no son bacilos Gram negativos

7.3 VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE: La sensibilidad y especificidad (confiabilidad diagnóstica)

VARIABLES INDEPENDIENTES

1. La cantidad de medio o sustrato para que la bacteria sea inoculada
2. Temperatura
3. pH
4. Atmósfera

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.4 RECURSOS

7.4.1 MATERIAL DE VIDRIO

Descripción	Especificación	Cantidad
Tubos de ensaye	18 x 150 mm	50
Tubos de ensaye	15 x 100 mm	300
Cajas Petri	15 cm.	50
Pipetas graduadas	5 mL.	20
Pipetas graduadas	10 mL.	20
Pipetas graduadas	1 mL.	5
Matraces Erlenmeyer	250 mL.	10
Matraces Erlenmeyer	1000 mL.	2
Vasos de precipitados	250 mL.	10

7.4.2 EQUIPO MAYOR

Descripción	Especificación	Cantidad
Incubadora	Mapsa Mod. EC334	1
Olla express	Prosan 2016 cap.21 L.	1
Microscopio óptico	Zeiss Mod. 452904. 5, 10, 40 y 100x	1
Balanza granataria	Desego. 600g	1
Pipeta semiautomática	Transferpette 20 – 1000 µL.	1
Pipeta semiautomática	Transferpette 100 µL.	1
Placas de microelisa	NUNC. estériles c/tapa en empaque ind. de 96 pozos c/u y 200 µL c/p	15
Termómetro de inmersión parcial	-10 a 260° C. Brannah	1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.4.3 EQUIPO MENOR

Descripción	Especificación	Cantidad
Mechero	Bunsen	3
Mechero	Fisher	2
Asas bacteriológicas	-	5
Tripie	-	2
Tela de alambre c/ asbesto	-	2
Tiras reactivas indicadoras de pH	0 - 14	1 caja
Algodón	-	1 paquete
Gasa	-	1 rollo
Papel estraza	-	1 rollo
Frascos goteros	ámbar de 10 mL	10

7.4.4 MATERIAL BIOLÓGICO

CEPAS BACTERIANAS ATCC

1. *Escherichia coli* ATCC 2536
2. *Escherichia coli* ATCC 11229
3. *Salmonella typhi* ATCC 6539
4. *Shigella flexneri* ATCC 12662
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2561
6. *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966
7. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (cepa que no participó en el estudio)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.4.5 MEDIOS DE CULTIVO

Descripción	Especificación	Cantidad
Medio LIA	Bioxon	1 frasco
Medio MIO	Bioxon	1 frasco
Agar Citrato de Simmons	Bioxon	1 frasco
Agar TSI	Bioxon	1 frasco
Medio SIM	Bioxon	1 frasco
Caldo urea	Merck	1 frasco
Agar fenilalanina desaminasa	Merck	1 frasco
Caldo KCN	Merck	1 frasco
Caldo RMVP	Bioxon	1 frasco
Medio O/F Hugh-Leifson	Bioxon	1 frasco
Caldo base rojo de fenol	Bioxon	1 frasco
Agar EMB	Merck	1 frasco
Agar Mc Conkey	Merck	1 frasco
Agar Sangre	Bioxon	1 frasco
Agar Sal y Manitol	Bioxon	1 frasco
Agar Soya tripticasa	Bioxon	1 frasco
Caldo Muller Hinton	Bioxon	1 frasco

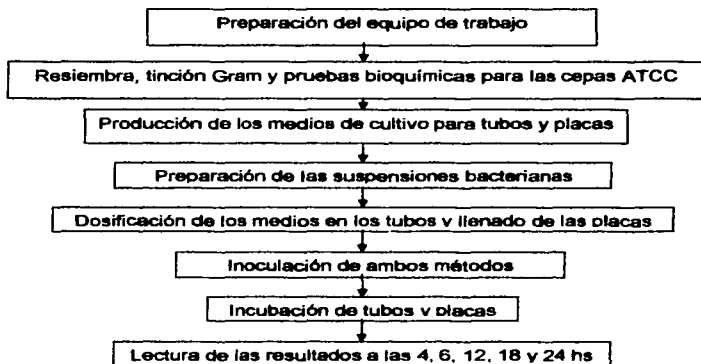
7.4.6 REACTIVOS

Reactivo	Especificación	Cantidad
KOH	solución al 40 %	1 frasco gotero
α -naftol	solución al 5 %	1 frasco gotero
FeCl ₃	solución al 10%	1 frasco gotero
Indicador rojo de metilo	solución al 0.02 %	1 frasco gotero
Reactivo de Kovacs	Merck	1 frasco
Agua	destilada	50 L
FeSO ₄	cristales Merck	1 frasco
KCN	cristales Merck	1 frasco
Glucosa	Merck grado reactivo	1 frasco
Sorbitol	Merck grado reactivo	1 frasco
Manitol	Merck grado reactivo	1 frasco
Lactosa	Merck grado reactivo	1 frasco
Sacarosa	Merck grado reactivo	1 frasco
Arabinosa	Merck grado reactivo	1 frasco

7.5 METODOLOGÍA

La parte experimental de este estudio se realizó de la siguiente manera:

DIAGRAMA DE FLUJO



1. Preparación del equipo de trabajo.

- Verificación de las temperaturas reportadas por la incubadora las cuales deben de encontrarse en el rango de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.
- Esterilización del material de vidrio que requiera este tratamiento, como cajas Petri, matraces y pipetas con calor húmedo en la olla expresa a 121°C y 15 lb durante 15 min.
- El material termolábil como las puntas de plástico para las pipetas semiautomáticas se esterilizó bajo las condiciones especiales de vapor húmedo a 10 lb durante 15 min.³
- Sanitización del área de trabajo con una solución de fenol al 10%.
- Eliminación de la corriente de aire que pudiese contaminar el proceso.
- Creación de un sistema ambiental de semi-esterilización encendiendo los mecheros Fisher durante 10 min.

2. Tratamiento de rutina para las cepas ATCC.

- Aislamiento de cepas en agar Mc Conkey, EMB y agar sangre. Las características de las colonias aisladas de cada cepa deben coincidir con las reportadas en la literatura.
- Tinción de Gram, misma que debe satisfacer las especificaciones tintoriales de cada cepa.

- Identificación bioquímica de rutina para cada especie bacteriana.
- Resiembra en agar soya tripticasa.

3. Preparación de los medios de cultivo del método convencional.

- Los medios de cultivo: Caldo RMVP, Caldo KCN se prepararon pesando las cantidades necesarias en la balanza granataria y procediendo conforme a las indicaciones que refiere el fabricante; disolviendo el medio, hirviendo 1 min, dosificando en tubos y esterilizando bajo condiciones normales.
- Para los medios que evaluaron la fermentación de los carbohidratos se preparó la base rojo de fenol y se le adicionó un 1% de cada carbohidrato (sorbitol, manitol, lactosa, sacarosa arabinosa, glucosa) para posteriormente esterilizarse a 121° C y 10 lb durante 10 min, a fin de evitar la caramelización de los carbohidratos.
- El caldo urea se preparó y esterilizó a 121° C y 10 lb durante 10 min.
- Los medios de cultivo sólidos LIA, MIO, SIM, Citrato de Simmons, TSI y fenilalanina desaminasa, se prepararon procediendo conforme a las indicaciones que refiere el fabricante, pesando las cantidades necesarias en la balanza granataria, disolviendo, hirviendo 1 min, dosificar y esterilizar bajo condiciones normales, para después dejar solidificar en forma inclinada los medios que requerían la formación de un pico de flauta.

4. Preparación de las cepas.

- Resiembra de las cepas en tubos inclinados por estría cruzada en agar soya tripticasa.
- Incubación durante 24 hs a 37° C.
- Para cada cepa, se tomaron dos asadas del crecimiento bacteriano y suspenderlo en 3 mL de caldo Muller Hinton estéril.
- Incubación hasta alcanzar una turbidez equiparable con la que se observa en el tubo 5 del nefelómetro de Mc Farland (aprox. 2 hs). (Este proceso se consideró para la inoculación de los medios líquidos con suspensión bacteriana).

5. Preparación de los medios de cultivo en las microplacas.

- Las placas de ELISA se llenaron una por una conforme se requería su utilización, bajo especiales cuidados para garantizar la esterilidad requerida por el experimento.
- Los medios de cultivo se prepararon previamente bajo las mismas condiciones que el método convencional en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con una torunda de gasa y algodón.
- El llenado de los pozos se realizó, adicionando 90 µL de medio con el uso de una pipeta semiautomática de volumen variable y con puntas de plástico esterilizadas como se describe con anterioridad, quedando la placa lista para inocular de la siguiente manera:

Cuadro 1. Posición de los medios líquidos en la placa de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN
B	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN
C	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN
D	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN
E	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN
F	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN
G	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN
H	urea	RM	VP	ara	glu	lac	man	sac	sor	xil	s/KCN	c/KCN

Donde:

Urea = Caldo urea

RM = Rojo de metilo

VP = Vogues Proskauer

Ara = Caldo RF + arabinosa

Glu = Caldo RF + glucosa

Lac = Caldo RF + lactosa

Man = Caldo RF + manitol

Sac = Caldo RF + sacarosa

Sor = Caldo RF + sorbitol

Xil = Caldo RF + xilosa

s/KCN = Caldo sin KCN

c/KCN = Caldo con KCN

Cuadro 2. Posición de los medios sólidos en la placa de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7*	8*	9	10*	11*	12
A	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I
B	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I
C	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I
D	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I
E	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I
F	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I
G	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I
H	OF s/s	OF c/s	MIO	CIT	LIA	Øala	Øala	Øala	SIM	SIM	SIM	TS I

Donde:

OF s/s = Oxidación - Fermentación sin sello

OF c/s = Oxidación - Fermentación con sello

Øalan = Agar fenilalanina desaminasa

SIM = Medio SIM

MIO = Medio movilidad indol ornitina

CIT = Citrato de Simmons

LIA = Medio LIA

TS I = Medio TSI

Nota. (*) Medios reservados para la lectura de los metabolitos que requieren reactivos adicionales.

6. Inoculación de las cepas.

- La inoculación en los medios del método convencional se realizó como lo realiza tradicional el laboratorio de microbiología.

- El método a prueba contiene dos tipos de inoculación:

a) En medio líquido.- En cada pozo se adicionaron 10 µL de la suspensión bacteriana ajustada su turbidez a 0.5 del nefelómetro de Mc Farland (anexo B, Pág. IX).

b) En medio sólido.- La inoculación de los medios sólidos se realizó por medio de picadura con el asa bacteriológica recta, tomando con la punta una asada de un aislamiento de 24 hs

- La inoculación de las cepas en las placas, tanto para sólidos como para líquidos fue de la siguiente forma.

Cuadro 3. Posición de la inoculación de las cepas en las microplacas.

A	SIN INÓCULO (CONTROL NEGATIVO)
B	<i>Escherichia coli</i> ATCC 2536
C	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229
D	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539
E	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12662
F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2561
G	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966
H	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538

7.- Incubación.

Una vez inoculada una placa y los tubos correspondientes del método estándar, se sometieron a incubarse bajo las mismas condiciones ambos métodos a 37°C durante 24 hs.

8.- Lectura de resultados.

- Cada pozo y cada tubo fue leído en forma visual a las 4, 6, 12, 18 y 24 hs, excepto las pruebas que requieren reactivos adicionales, las cuales sólo se leen a las 12, 18 y 24 hs.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.- DISEÑO ESTADÍSTICO

8.1 PARÁMETROS DE CONFIABILIDAD.

Los parámetros estadísticos considerados son:

Sensibilidad.- Es la capacidad para detectar un estado anormal (verdaderos positivos) mediante una determinada prueba.¹⁷

Especificidad.- Es la capacidad de obtener resultados normales en pruebas negativas (verdaderos negativos) mediante una determinada prueba.¹⁷

Valor predictivo positivo (VPP).- Es la probabilidad de que una prueba sea positiva.

Valor predictivo negativo (VPN).- Es la probabilidad de que una prueba sea negativa.

Índice de falsos positivos (IFP).- Es la probabilidad de que el resultado positivo sea erróneo.

Índice de falsos negativo (IFN).- Es la probabilidad de que el resultado negativo sea erróneo.

El cálculo de estos parámetros utiliza la siguiente tabla de contingencia:

MICROMÉTODO	MÉTODO ESTANDAR		
	positivo	negativo	TOTAL
positivo	A	B	A + B
negativo	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	A + B + C + D

Donde:

A = Verdadero positivo

B = Falso negativo

C = Falso positivo

D = Verdadero negativo

Las fórmulas estadísticas aplicadas son:

Parámetro	Fórmula
Sensibilidad	$Sen = A / (A+C)$
Especificidad	$Esp = D / (B+D)$
Valor predictivo positivo	$VPP = A / (A+B)$
Valor predictivo negativo	$VPN = D / (C+D)$
Índice de falsos positivos	$IFP = B / (A+B)$
Índice de falsos negativos	$IFN = C / (C+D)$

8.2 INTERVALOS DE CONFIANZA

Se pueden calcular los intervalos de confianza correspondientes por las siguientes expresiones:

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{A}{A+C} \pm Z_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{(A/C_0)(C/C_0)}{C_0}}$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{D}{B+D} \pm Z_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{(D/C_1)(B/C_1)}{C_1}}$$

Donde $Z_{1-\alpha/2}$ es 1.960 (de tablas) para una confianza $(1-\alpha)$ de 95%.¹⁸

8.3 TEOREMA DE BAYES

La probabilidad de encontrar una cepa correctamente identificada si se obtiene un resultado positivo en una prueba $P(E/+)$ está dada por:

$$P(E/+) = \frac{P(+/E) \cdot P(E)}{P(+/E) \cdot P(E) + P(+/E^c) \cdot P(E^c)}$$

Donde:

$P(+/E)$ = Probabilidad de obtener una identificación correcta cuando realmente lo es.

$P(E)$ = Probabilidad de la identificación sea correcta

$P(+/E^c)$ = Probabilidad de tener una identificación incorrecta

$P(E^c)$ = Probabilidad de que la identificación sea incorrecta

8.4 ÍNDICE KAPPA DE COHEN

Para evaluar la concordancia entre los resultados que reportan ambos métodos se utiliza Kappa de Cohen, basada en la comparación de la concordancia observada en un conjunto de datos con respecto a la que podría ocurrir por simple azar.¹⁸

Si se denota la concordancia observada como Co y la esperada por azar como Ca , la K de Cohen es:¹⁸

$$K = \frac{Co - Ca}{1 - Ca}$$

Para lo cual utiliza la siguiente tabla de contingencias, que es útil para poder comparar los resultados aportados por el microsistema de identificación manual con los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales.

CONCORDANCIA ENTRE DOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN				
RESULTADOS DE LA PRUEBA	MÉTODO ESTANDAR			TOTAL
	E	E ^c		
	+			r ₀
-			r ₁	
TOTAL	c ₀	c ₁	n	

Quando K es cero indica que la concordancia observada coincide con la que ocurriría por simple azar, los valores positivos señalan mayor concordancia que la esperada por azar, siendo uno (1) el valor asignado a la concordancia perfecta.

A la hora de interpretar el valor de K es útil disponer de una escala como la siguiente:²⁰

Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.00	sin concordancia
0.00 - 0.20	insignificante
0.21 - 0.40	discreta
0.41 - 0.60	moderada
0.61 - 0.80	sustancial
0.81 - 1.00	casi perfecta

Si K tomara un valor negativo señalaría discordancia, llegando hasta menos de uno (-1) para señalar la discordancia total entre los dos métodos diagnósticos correspondientes. El calculo de K en la tabla de 2 x 2 es:¹⁸

$$K = \frac{N(a + d) - R}{N^2 - R}$$

Para calcular el intervalo de confianza para la concordancia es necesario estimar la desviación estándar correspondiente, que es el error estándar de K o la raíz cuadrada de la varianza de estimación

$$S^2_k = \frac{R(N+R/N) - U(r_0 + c_0) - t(r_1 + c_1)}{R^2 + N^2 (N^2 - 2R)}$$

Donde

U = r₀ c₀

t = r₁ c₁

R = u + t

Para una confianza del 95%, el intervalo de confianza para K está dado por:

$$K \pm (1.960) (S_k)$$

Cuando los límites son amplios y el cero queda incluido en el intervalo se puede pensar que no existe elevada concordancia entre los dos métodos, por el contrario si el cero no está incluido en el intervalo existe alta concordancia entre los métodos.

Una técnica alternativa al cálculo de los intervalos de confianza es la prueba del grado de concordancia.

8.5 PRUEBA PARA GRADO DE CONCORDANCIA

Este estimador es útil para saber si los resultados muestran una diferencia significativa con respecto a la concordancia que se esperaría por azar, o bien si sólo se tiene una concordancia similar a la que ocurriría de manera aleatoria.¹⁸

Para realizar la prueba se tiene el estimador de Kappa de Cohen y la varianza de estimación conforme a lo que se señala anteriormente, y se calcula CO, que se compara con la distribución de χ^2 con un grado de libertad y el nivel de α correspondiente.¹⁸

$$CO = \frac{K^2}{S^2(K)}$$

Así cuando CO es significativamente mayor que 3.84 para $\alpha = 0.05$, señala que la concordancia o la discordancia, según fue el signo de K se aleja significativamente de cero, lo cual indica que el acuerdo o el desacuerdo entre los dos métodos es mayor que lo que se esperaría por azar y se puede afirmar, con una probabilidad $\alpha = 0.05$, que existe una concordancia real entre ambos métodos.

9.- RESULTADOS

9.1 CONFIABILIDAD DIAGNÓSTICA DEL MICROMÉTODO

9.1.1 Confiabilidad diagnóstica del micrométodo en forma general.

Tabla No.1.-RESULTADOS GENERALES DE LIQUIDOS Y SÓLIDOS

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24 vs 24	0.644	0.823	0.783	0.730	0.244	0.270	0.950	0.935	57.5 - 71.2	77.2 - 87.3	0.471	198.1
18 vs 18	0.728	0.720	0.702	0.745	0.298	0.255	0.929	0.936	67.5 - 78.0	66.9 - 77.0	0.447	256.0
18 vs 24	0.682	0.802	0.74	0.749	0.255	0.251	0.949	0.942	62.9 - 73.3	76.1 - 84.3	0.487	329.4
12 vs 24	0.701	0.852	0.812	0.757	0.188	0.243	0.970	0.955	65.0 - 75.1	81.4 - 88.9	0.556	380.2
6 vs 24	0.605	0.865	0.814	0.692	0.186	0.308	0.961	0.925	55.2 - 65.8	82.8 - 90.1	0.472	338.6
4 vs 24	0.491	0.899	0.83	0.638	0.171	0.362	0.957	0.889	43.7 - 54.4	66.6 - 93.1	0.39	314.2

Tabla general de valores de confiabilidad diagnóstica del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X)

9.1.2 Confiabilidad diagnóstica según el estado físico del medio

Tabla No.2.- RESULTADOS GENERALES DE MEDIOS LIQUIDOS

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24 vs 24	0.805	0.836	0.824	0.820	0.176	0.160	0.978	0.978	73.6 - 87.3	77.6 - 90.0	0.643	169
18 vs 18	0.786	0.867	0.733	0.897	0.267	0.103	0.979	0.965	69.7 - 87.3	81.7 - 91.6	0.640	169
18 vs 24	0.873	0.875	0.88	0.804	0.22	0.195	0.971	0.963	58.0 - 78.3	82.3 - 92.6	0.581	150
12 vs 24	0.824	0.899	0.77	0.85	0.11	0.149	0.969	0.965	75.0 - 89.0	84.9 - 94.9	0.72	192
6 vs 24	0.810	0.823	0.81	0.82	0.18	0.176	0.975	0.976	74.0 - 88.0	75.95 - 88.7	0.636	167
4 vs 24	0.704	0.856	0.73	0.743	0.169	0.256	0.972	0.953	62.6 - 78.2	79.6 - 91.5	0.56	151

Tabla de confiabilidad diagnóstica los medios líquidos del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Comparación de confiabilidad diagnóstica entre un microsistema manual de identificación bacteriana y las pruebas bioquímicas convencionales.

Tabla No.3.-RESULTADOS GENERALES DE MEDIOS SÓLIDOS.

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24 vs 24	0.875	0.788	0.754	0.716	0.248	0.284	0.945	0.931	61.0 - 73.9	73.2 - 84.3	0.484	191.5
18 vs 18	0.702	0.727	0.688	0.741	0.313	0.259	0.923	0.930	63.6 - 78.7	66.8 - 78.6	0.429	174.9
18 vs 24	0.822	0.821	0.763	0.702	0.238	0.298	0.946	0.923	55.4 - 69.0	76.9 - 87.2	0.446	188.0
12 vs 24	0.633	0.864	0.661	0.837	0.319	0.163	0.963	0.968	54.9 - 71.6	82.4 - 90.4	0.507	207.3
6 vs 24	0.475	0.892	0.615	0.630	0.185	0.370	0.950	0.880	40.6 - 54.4	84.9 - 93.4	0.368	181.5
4 vs 24	0.353	0.926	0.626	0.589	0.172	0.411	0.945	0.836	28.7 - 41.8	89.0 - 96.2	0.279	169.8

Tabla de confiabilidad diagnóstica los medios sólidos del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

9.1.3 Confiabilidad diagnóstica del micrométodo por cada prueba bioquímica.

9.1.3.1 Medios líquidos

Tabla No.4.-CALDO UREA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
18vs18	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
18Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
12Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
6Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
4Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de urea del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.5.-ROJO DE METILO (RM-VP)

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.550	0.750	0.917	0.250	0.083	0.750	0.949	0.737	0.332 - 0.77	0.326 - 1.2	0.167	7.20
18vs18	0.875	1.000	1.000	0.941	0.000	0.059	1.000	0.998	0.846 - 1.10	1.000 - 1.0	0.903	21.88
18Vs24	0.350	1.000	1.000	0.235	0.000	0.765	1.000	0.610	0.141 - 0.56	1.000 - 1.0	0.15	12.99
12Vs24	0.4	1.000	1.000	0.250	0.000	0.750	1.000	0.667	0.185 - 0.61	1.000 - 1.0	0.18	13.20
6Vs24	0.4	1.000	1.000	0.250	0.000	0.750	1.000	0.667	0.185 - 0.61	1.000 - 1.0	0.18	13.20
4Vs24	0.3	1.000	1.000	0.222	0.000	0.778	1.000	0.550	0.099 - 0.50	1.000 - 1.0	0.13	12.80

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de Metilo del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.6.-VOGUES PROSKAUER

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
18vs18	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
18Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
12Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
6Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	1.00 - 1.00	0.000	0.000
4Vs24	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	100 - 100	0.000	0.000

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba Vogues -Proskauer del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.7.-CALDO ROJO DE FENOL + ARABINOSA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.813	0.875	0.929	0.700	0.071	0.300	0.990	0.972	0.62 - 1.00	0.64 - 1.10	0.647	16.03
18vs18	0.867	0.917	0.889	0.733	0.111	0.267	0.984	0.954	0.40 - 0.93	0.76 - 1.07	0.583	14.93
18Vs24	0.583	1.000	1.000	0.533	0.000	0.467	1.000	0.893	0.31 - 0.80	1.00 - 1.00	0.462	15.60
12Vs24	0.688	1.000	1.000	0.615	0.000	0.385	1.000	0.948	0.46 - 0.91	1.00 - 1.00	0.595	17.06
6Vs24	0.775	1.000	1.000	0.800	0.000	0.200	1.000	0.992	0.71 - 1.03	1.00 - 1.00	0.824	20.40
4Vs24	0.825	0.875	0.909	0.538	0.091	0.462	0.973	0.895	0.38 - 0.86	0.64 - 1.10	0.432	12.42

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de fenol con arabinosa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.8.-CALDO ROJO DE FENOL + LACTOSA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	1.000	0.813	0.727	1.000	0.273	0.000	0.982	1.000	1.00 - 1.00	0.62 - 1.00	0.74	19.09
18vs18	1.000	0.875	0.800	1.000	0.200	0.000	0.992	1.000	1.00 - 1.00	0.71 - 1.03	0.82	20.40
18Vs24	1.000	0.875	0.800	1.000	0.200	0.000	0.992	1.000	1.00 - 1.00	0.71 - 1.03	0.82	20.40
12Vs24	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.00 - 1.00	1.00 - 1.00	1.00	24.00
6Vs24	1.000	0.938	0.889	1.000	0.111	0.000	0.998	1.000	1.00 - 1.00	0.61 - 1.05	0.91	22.00
4Vs24	1.000	0.938	0.889	1.000	0.111	0.000	0.998	1.000	1.00 - 1.00	0.61 - 1.05	0.91	22.00

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de fenol con lactosa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Comparación de confiabilidad diagnóstica entre un microsistema manual de identificación bacteriana y las pruebas bioquímicas convencionales.

Tabla No.9.-CALDO ROJO DE FENOL + GLUCOSA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.958	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.87 - 1.03	0.0 - 0.0	0.00	0.000
18vs18	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.00 - 1.00	0.0 - 0.0	0.00	0.000
18Vs24	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.00 - 1.00	0.0 - 0.0	0.00	0.000
12Vs24	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.00 - 1.00	0.0 - 0.0	0.00	0.000
6Vs24	0.875	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.74 - 1.00	0.0 - 0.0	0.00	0.000
4Vs24	0.833	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.68 - 0.98	0.0 - 0.0	0.00	0.000

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de fenol con glucosa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.10.-CALDO ROJO DE FENOL + MANITOL

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.900	1.000	1.000	0.400	0.000	0.600	1.000	0.923	0.49 - 0.90	1.00 - 1.00	0.44	15.36
18vs18	0.750	0.500	0.882	0.286	0.118	0.714	0.956	0.854	0.56 - 0.94	0.01 - 0.99	0.19	5.244
18Vs24	0.750	0.500	0.882	0.286	0.118	0.714	0.956	0.854	0.56 - 0.94	0.01 - 0.99	0.19	0.19
12Vs24	0.900	1.000	1.000	0.667	0.000	0.333	1.000	0.992	0.78 - 1.03	1.00 - 1.00	0.75	0.750
6Vs24	0.900	1.000	1.000	0.667	0.000	0.333	1.000	0.992	0.78 - 1.03	1.00 - 1.00	0.75	0.75
4Vs24	0.667	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.47 - 0.85	0.00 - 0.00	0.00	0.000

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de fenol con manitol del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

*Comparación de confiabilidad diagnóstica entre un microsistema manual de identificación bacteriana
y las pruebas bioquímicas convencionales.*

Tabla No.11.-CALDO ROJO DE FENOL + SACAROSA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.917	0.917	0.917	0.917	0.08	0.083	0.996	0.996	0.76 - 1.07	0.76 - 1.1	0.83	20.00
18vs18	0.875	0.500	0.467	0.889	0.53	0.111	0.814	0.952	0.64 - 1.10	0.25 - 0.7	0.308	10.40
18vs24	0.833	0.583	0.667	0.778	0.33	0.222	0.907	0.944	0.62 - 1.04	0.30 - 0.9	0.42	10.67
12vs24	0.833	0.667	0.714	0.800	0.28	0.200	0.938	0.960	0.62 - 1.04	0.40 - 0.9	0.50	12.34
6Vs24	0.917	0.417	0.611	0.833	0.38	0.167	0.863	0.952	0.76 - 1.07	0.13 - 0.7	0.33	10.67
4Vs24	0.917	0.500	0.647	0.857	0.35	0.143	0.899	0.967	0.76 - 1.07	0.21 - 0.8	0.42	12.10

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de fenol con sacarosa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.12.-CALDO ROJO DE FENOL + SORBITOL

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.66	0.833	0.800	0.714	0.200	0.286	0.960	0.938	0.40 - 0.9	0.62 - 1.0	0.50	12.34
18vs18	0.50	0.750	0.667	0.800	0.333	0.400	0.870	0.833	0.21 - 0.78	0.50 - 1.0	0.250	6.40
18vs24	0.50	0.750	0.667	0.800	0.333	0.400	0.870	0.833	0.21 - 0.78	0.50 - 1.0	0.25	6.40
12vs24	0.66	0.917	0.889	0.733	0.111	0.267	0.984	0.954	0.40 - 0.93	0.76 - 1.1	0.583	14.93
6Vs24	0.83	0.833	0.833	0.833	0.167	0.167	0.980	0.980	0.62 - 1.04	0.62 - 1.0	0.67	16.00
4Vs24	0.83	0.750	0.769	0.818	0.231	0.182	0.962	0.972	0.62 - 1.04	0.50 - 1.0	0.583	14.10

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de fenol con sorbitol del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.13.-CALDO ROJO DE FENOL + XILOSA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.875	0.813	0.700	0.929	0.300	0.071	0.972	0.990	0.646 - 1.10	0.621 - 1.0	0.85	16.03
16vs18	0.875	0.938	0.875	0.938	0.125	0.063	0.998	0.998	0.646 - 1.10	0.819 - 1.1	0.81	19.50
18Vs24	0.875	0.938	0.875	0.938	0.125	0.063	0.998	0.998	0.646 - 1.10	0.819 - 1.1	0.81	19.50
12Vs24	1.000	0.875	0.800	1.000	0.200	0.000	0.992	1.000	1.0 - 1.0	0.713 - 1.0	0.82	20.40
6Vs24	1.000	0.813	0.727	1.000	0.273	0.000	0.982	1.000	1.0 - 1.0	0.621 - 1.0	0.74	19.09
4Vs24	1.000	0.813	0.727	0.929	0.273	0.000	0.982	1.000	1.0 - 1.0	0.621 - 1.0	0.74	19.09

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de Rojo de fenol con xilosa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.14.-CALDO KCN

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	1.000	0.313	0.421	1.000	0.579	0.000	0.721	1.000	1.00 - 1.00	0.085 - 0.5	0.23	13.58
18vs18	1.000	0.563	0.533	1.000	0.467	0.000	0.893	1.000	1.00 - 1.00	0.31 - 0.8	0.46	15.60
18vs24	1.000	0.563	0.533	1.000	0.467	0.000	0.893	1.000	1.00 - 1.00	0.31 - 0.8	0.46	15.60
12vs24	1.000	0.750	0.667	1.000	0.333	0.000	0.968	1.000	1.00 - 1.00	0.53 - 1.0	0.87	18.00
6Vs24	0.750	0.313	0.353	0.714	0.647	0.288	0.581	0.780	1.00 - 1.00	0.08 - 0.5	0.05	2.07
4Vs24	0.500	0.688	0.444	0.733	0.556	0.267	0.800	0.873	1.00 - 1.00	0.46 - 0.9	0.16	4.40

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de crecimiento en caldo cianuro de potasio del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Comparación de confiabilidad diagnóstica entre un microsistema manual de identificación bacteriana y las pruebas bioquímicas convencionales.

Tabla No.15.-CITRATO DE SIMMONS

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	1.00	0.550	0.308	1.000	0.692	0.000	0.816	1.000	1.000 - 1.000	0.332 - 0.768	0.289	14.03
18vs18	0.75	0.300	0.176	0.857	0.824	0.143	0.435	0.812	0.326 - 1.174	0.099 - 0.501	0.022	1.855
18vs24	0.75	0.300	0.176	0.857	0.824	0.143	0.435	0.812	0.326 - 1.174	0.099 - 0.501	0.022	1.855
12vs24	0.75	0.600	0.273	0.923	0.727	0.077	0.789	0.960	0.326 - 1.174	0.385 - 0.815	0.206	7.989
6vs24	0.75	0.900	0.600	0.947	0.400	0.053	0.984	0.993	0.326 - 1.174	0.769 - 1.031	0.591	14.45
4vs24	0.50	0.900	0.500	0.900	0.500	0.100	0.968	0.982	0.010 - 0.990	0.769 - 1.031	0.400	9.600

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba citrato de Simmons del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.16.-INDOL EN SIM

Lectura MPvsM	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.844	0.75	0.871	0.706	0.129	0.706	0.978	0.969	0.718 - 1.0	0.5 - 1.0	0.585	28.1
18vs18	0.875	0.83	0.700	0.833	0.300	0.833	0.933	0.968	0.743 - 1.0	0.4 - 0.8	0.500	25.6
18Vs24	0.844	0.813	0.900	0.722	0.100	0.722	0.985	0.975	0.718 - 1.0	0.6 - 1.0	0.636	30.6
12Vs24	0.875	0.71	0.750	0.850	0.250	0.850	0.958	0.977	0.743 - 1.0	0.5 - 0.9	0.583	28.8
6Vs24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4Vs24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de indol en SIM del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.17.-FENILALANINA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.000	0.83	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	0.7 - 1.0	0.000	0.000
18vs18	0.000	0.81	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	0.8 - 0.9	0.000	0.000
18Vs24	0.000	0.92	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	0.8 - 1.0	0.000	0.000
12Vs24	0.000	0.92	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.0 - 0.0	0.8 - 1.0	0.000	0.000
6Vs24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4Vs24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de fenilalanina desaminasa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.18.- FERMENTACION O/F c/s Hugh - Leifson

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	1	0	1	0	0	1	1	0	1.0 - 1.0	0.0 - 0.0	0	0
18vs18	0.88	0	1	0	0	1	1	0	0.74 - 1.00	0.0 - 0.0	0	0
18Vs24	0.83	0	1	0	0	1	1	0	0.68 - 0.98	0.0 - 0.0	0	0
12Vs24	0.79	0	1	0	0	1	1	0	0.806 - 1.0	0.0 - 0.0	0	0
6Vs24	0.73	0	1	0	0	1	1	0	0.684 - 1.0	0.0 - 0.0	0	0
4Vs24	0.71	0.45	0.964	0.5	0.138	0.5	0.962	0.923	0.629 - 9.8	0.3 - 1.0	0.385	12.8

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de fermentación en O/F con glucosa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Comparación de confiabilidad diagnóstica entre un microsistema manual de identificación bacteriana y las pruebas bioquímicas convencionales.

Tabla No.19.-OXIDACIÓN O/F s/s Hugh - Leifson

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.92	0.00	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.80 - 1.0	0 - 0	0.000	0.000
18vs18	0.92	0.00	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.80 - 1.0	0 - 0	0.000	0.000
18Vs24	0.92	0.00	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.80 - 1.0	0 - 0	0.000	0.000
12Vs24	0.92	0.00	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.80 - 1.0	0 - 0	0.000	0.000
6Vs24	0.73	0.00	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.68 - 1.0	0 - 0	0.000	0.000
4vs24	0.79	0.63	0.864	0.500	0.136	0.500	0.962	0.923	0.62 - 1.0	0.3 - 1.0	0.385	12.60

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de oxidación en O/F con glucosa del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.20.-ORNITINA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.33	0.83	0.667	0.556	0.333	0.444	0.848	0.778	0.067 - 0.6	0.6 - 1.0	0.167	5.33
18vs18	0.56	0.63	0.750	0.417	0.250	0.583	0.863	0.750	0.319 - 0.8	0.3 - 1.0	0.167	4.50
18Vs24	0.56	0.625	0.750	0.417	0.250	0.583	0.863	0.750	0.319 - 0.8	0.3 - 1.0	0.167	4.50
12Vs24	0.50	0.750	0.800	0.429	0.200	0.571	0.894	0.759	0.255 - 0.7	0.4 - 1.1	0.211	6.51
6Vs24	0.31	0.750	0.714	0.353	0.286	0.647	0.760	0.581	0.085 - 0.5	0.4 - 1.1	0.049	2.06
4Vs24	0.19	0.78	0.750	0.350	0.250	0.650	0.763	0.536	0.004 - 0.4	0.6 - 1.1	0.045	3.30

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba ornitina en medio MIO del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.21.-MOVILIDAD EN SIM

LECTURA MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.80	0.63	0.914	0.385	0.086	0.615	0.977	0.927	0.676 - 0.9	0.3 - 1.0	0.3	17.93
18vs18	0.86	0.36	0.875	0.375	0.125	0.625	0.970	0.932	0.773 - 1.0	0.0 - 0.7	0.3	12.00
18Vs24	0.88	0.375	0.875	0.375	0.125	0.625	0.970	0.932	0.773 - 1.0	0.0 - 0.7	0.250	12.000
12Vs24	0.83	0.375	0.888	0.300	0.132	0.700	0.960	0.885	0.707 - 0.9	0.0 - 0.7	0.182	8.893
6Vs24	0.50	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.359 - 0.6	0.0 - 0.0	0.000	0.00
4Vs24	0.55	0.375	0.815	0.143	0.185	0.857	0.85	0.521	0.396 - 0.7	0.0 - 0.7	-0.04	-3.352

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba Movilidad en SIM del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.22.-SACAROSA EN TSI

LECTURA MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	1.00	0.750	0.667	1.00	0.333	0.000	0.97	1.000	1.00 - 1.0	0.53 - 0.96	0.67	16.000
18vs18	0.88	0.750	0.636	0.92	0.364	0.077	0.95	0.966	0.64 - 1.1	0.53 - 0.96	0.57	14.685
18Vs24	0.88	0.750	0.636	0.92	0.364	0.077	0.95	0.966	0.64 - 1.1	0.53 - 0.96	0.57	14.685
12Vs24	0.88	0.81	0.700	0.93	0.300	0.071	0.97	0.990	0.64 - 1.1	0.62 - 1.00	0.65	16.029
6Vs24	0.63	0.81	0.625	0.81	0.375	0.166	0.94	0.951	0.29 - 1.0	0.62 - 1.00	0.44	10.500
4Vs24	0.63	0.94	0.833	0.83	0.167	0.167	0.99	0.974	0.29 - 1.0	0.61 - 1.06	0.60	15.000

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba fermentación de sacarosa en medio TSI del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.23.-GLUCOSA EN TSI

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.75	1.00	1.00	0.44	0.00	0.56	1.00	0.95	0.56 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	16.00
18vs18	0.70	1.00	1.00	0.40	0.00	0.60	1.00	0.92	0.50 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	15.36
18Vs24	0.70	1.00	1.00	0.40	0.00	0.60	1.00	0.92	0.50 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	15.36
12Vs24	0.65	1.00	1.00	0.36	0.00	0.64	1.00	0.89	0.44 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	14.84
6Vs24	0.65	1.00	1.00	0.36	0.00	0.64	1.00	0.89	0.44 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	14.84
4Vs24	0.50	1.00	1.00	0.29	0.00	0.71	1.00	0.77	0.28 - 0.7	1.0 - 1.0	0.02	13.71

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de fermentación de la glucosa en medio TSI del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.24.-LACTOSA EN TSI

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E+)	P(E-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.75	1.00	1.00	0.44	0.00	0.56	1.00	0.95	0.56 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	16.0
18vs18	0.70	1.00	1.00	0.40	0.00	0.60	1.00	0.92	0.50 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	15.3
18Vs24	0.70	1.00	1.00	0.40	0.00	0.60	1.00	0.92	0.50 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	15.3
12Vs24	0.65	1.00	1.00	0.36	0.00	0.64	1.00	0.89	0.44 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	14.8
6Vs24	0.65	1.00	1.00	0.36	0.00	0.64	1.00	0.89	0.44 - 0.9	1.0 - 1.0	0.03	14.8
4Vs24	0.50	1.00	1.00	0.29	0.00	0.71	1.00	0.77	0.28 - 0.7	1.0 - 1.0	0.02	13.7

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de fermentación de la lactosa en medio TSI del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.25.-ÁCIDO SULFÍDRICO EN TSI

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.50	1.00	1.00	0.91	0.00	0.09	1.00	0.99	0.01 - 1.0	1.0 - 1.0	0.63	17.45
18vs18	0.50	1.00	1.00	0.91	0.00	0.09	1.00	0.99	0.01 - 1.0	1.0 - 1.0	0.63	17.45
18Vs24	0.50	1.00	1.00	0.91	0.00	0.09	1.00	0.99	0.01 - 1.0	1.0 - 1.0	0.63	17.45
12Vs24	0.50	1.00	1.00	0.91	0.00	0.09	1.00	0.99	0.01 - 1.0	1.0 - 1.0	0.63	17.45
6Vs24	0.25	1.00	1.00	0.87	0.00	0.13	1.00	0.98	-0.17 - 0.7	1.0 - 1.0	0.36	14.61
4Vs24	0.00	1.00	0.00	0.83	0.00	0.17	0.00	0.97	0.00 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.00

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de producción de H₂S en medio TSI del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.26.-GAS EN TSI

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.38	0.75	0.75	0.38	0.25	0.63	0.82	0.84	0.14 - 0.8	0.45 - 1.05	0.10	3.75
18vs18	0.42	0.67	0.56	0.53	0.44	0.47	0.75	0.73	0.14 - 0.7	0.40 - 0.93	0.08	2.13
18Vs24	0.44	0.75	0.78	0.40	0.22	0.60	0.86	0.70	0.19 - 0.7	0.45 - 1.05	0.15	5.20
12Vs24	0.25	0.88	0.80	0.37	0.20	0.63	0.84	0.60	0.04 - 0.5	0.85 - 1.10	0.09	5.43
6Vs24	0.13	1.00	1.00	0.36	0.00	0.64	1.00	0.55	0.04 - 0.3	1.00 - 1.00	0.09	12.55
4Vs24	0.00	1.00	0.00	0.33	0.00	0.67	0.00	0.43	0.00 - 0.0	1.00 - 1.00	0.00	0.00

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de producción de gas en medio TSI del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.27.-ÁCIDO SULFÍHIDRICO EN SIM

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.50	0.88	0.67	0.78	0.33	0.22	0.95	0.94	0.15 - 0.8	0.71 - 1.04	0.40	10.00
18vs18	0.75	0.90	0.60	0.95	0.40	0.05	0.98	0.99	0.33 - 1.2	0.77 - 1.03	0.59	14.45
18Vs24	0.38	0.88	0.60	0.74	0.40	0.26	0.92	0.91	0.04 - 0.7	0.71 - 1.04	0.28	7.33
12Vs24	0.38	1.00	1.00	0.76	0.00	0.24	1.00	0.95	0.04 - 0.7	1.00 - 1.00	0.44	15.43
6Vs24	0.00	1.00	0.00	0.67	0.00	0.33	0.00	0.86	0.00 - 0.0	1.00 - 1.00	0.00	0.00
4Vs24	0.00	1.00	0.00	0.67	0.00	0.33	0.00	0.86	0.00 - 0.0	1.00 - 1.00	0.00	0.00

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de producción de H₂S en medio SIM del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.29.-LISINA EN LIA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.08	0.17	0.09	0.15	0.91	0.85	0.03	0.05	-0.07 - 0.2	-0.04 - 0.38	-0.75	-18.13
18vs18	0.08	0.17	0.09	0.15	0.91	0.85	0.03	0.05	-0.07 - 0.2	-0.04 - 0.38	-0.75	-18.13
18Vs24	0.08	0.17	0.09	0.15	0.91	0.85	0.03	0.05	-0.07 - 0.2	-0.04 - 0.38	-0.75	-18.13
12Vs24	0.00	0.33	0.00	0.25	1.00	0.75	0.00	0.12	0.00 - 0.0	0.07 - 0.60	-0.67	-18.00
6Vs24	0.00	0.50	0.00	0.33	1.00	0.67	0.00	0.25	0.00 - 0.0	0.22 - 0.78	-0.50	-16.00
4Vs24	0.00	0.67	0.00	0.40	1.00	0.60	0.00	0.40	0.00 - 0.0	0.40 - 0.93	-0.33	-14.40

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de la descarboxilación de la lisina en medio LIA del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.28.-ÁCIDO SULFÍDRICO EN LIA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.50	0.88	0.87	0.78	0.33	0.22	0.95	0.94	0.01 - 1.0	1.0 - 1.0	0.40	10.00
18vs18	0.75	0.90	0.80	0.95	0.40	0.05	0.98	0.99	0.01 - 1.0	1.0 - 1.0	0.59	14.45
18Vs24	0.50	1.00	1.00	0.91	0.00	0.09	1.00	0.99	0.01 - 1.0	1.0 - 1.0	0.63	17.45
12Vs24	0.25	1.00	1.00	0.87	0.00	0.13	1.00	0.98	0.17 - 0.7	1.0 - 1.0	0.36	14.61
6Vs24	0.00	1.00	0.00	0.83	0.00	0.17	0.00	0.97	0.00 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.00
4Vs24	0.00	1.00	0.00	0.83	0.00	0.17	0.00	0.97	0.00 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.00

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de producción de H₂S en medio LIA del método en placa de Elisa en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.31.-INDOL EN MIO

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.836	0.75	0.871	0.706	0.129	0.706	0.978	0.969	0.718 - 1.0	0.5 - 1.0	0.585	28.1
18vs18	0.826	0.63	0.700	0.833	0.300	0.833	0.933	0.968	0.743 - 1.0	0.4 - 0.8	0.500	25.80
18Vs24	0.824	0.80	0.900	0.722	0.100	0.722	0.985	0.975	0.718 - 1.0	0.6 - 1.0	0.638	30.8
12Vs24	0.815	0.71	0.750	0.850	0.250	0.850	0.958	0.977	0.743 - 1.0	0.5 - 0.9	0.583	28.60
6Vs24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4Vs24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de producción de indol en medio MIO del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Comparación de confiabilidad diagnóstica entre un microsistema manual de identificación bacteriana y las pruebas bioquímicas convencionales.

Tabla No.30.-GAS EN LIA

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.00	1.00	0.00	0.87	0.00	0.33	0.0	0.86	0.0 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.0
18vs18	0.00	1.00	0.00	0.87	0.00	0.33	0.0	0.86	0.0 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.0
18Vs24	0.00	1.00	0.00	0.87	0.00	0.33	0.0	0.86	0.0 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.0
12Vs24	0.00	1.00	0.00	0.87	0.00	0.33	0.0	0.86	0.0 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.0
6Vs24	0.00	1.00	0.00	0.87	0.00	0.33	0.0	0.86	0.0 - 0.0	1.0 - 1.0	0.00	0.0
4Vs24	0.38	0.94	0.75	0.75	0.25	0.25	0.96	0.93	0.04 - 0.7	0.82 - 1.06	0.36	10.50

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de producción de gas en medio LIA del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

Tabla No.32.-MOVILIDAD EN MIO

Lectura MPvsMT	SEN	ESP	VPP	VPN	IFP	IFN	P(E/+)	P(E/-)	Límites de sensibilidad	Límites de especificidad	K	CO
24vs24	0.80	0.63	0.914	0.385	0.086	0.615	0.977	0.927	0.67 - 0.9	0.3 - 1.0	0.3	17.93
18vs18	0.81	0.38	0.875	0.375	0.125	0.625	0.970	0.932	0.77 - 1.0	0.0 - 0.7	0.3	12.00
18Vs24	0.81	0.375	0.875	0.375	0.125	0.625	0.970	0.932	0.77 - 1.0	0.0 - 0.7	0.250	12.000
12Vs24	0.80	0.375	0.868	0.300	0.132	0.700	0.960	0.885	0.70 - 0.9	0.0 - 0.7	0.182	8.893
6Vs24	0.50	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.35 - 0.6	0.0 - 0.0	0.000	0.00
4Vs24	0.55	0.375	0.815	0.143	0.185	0.857	0.85	0.521	0.39 - 0.7	0.0 - 0.7	-0.045	-3.352

Tabla de confiabilidad diagnóstica para la prueba de movilidad en medio MIO del método en placa de ELISA en relación con el método convencional en tubo. (Significado de las siglas se encuentra en el anexo C Pág. X).

10.-ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo realizó la comparación de la confiabilidad diagnóstica entre el método de identificación en placa y el método bioquímico convencional en tubo.

Las comparaciones se realizaron en las siguientes categorías:

- Método en forma general
- Estado físico del medio
- Prueba bioquímica individual

En las anteriores categorías de comparación se realizaron en total 672 determinaciones de cada método, 264 en medios líquidos y 408 en medios sólidos.

Las tablas que se presentan precedentemente muestran los valores de la confiabilidad diagnóstica que tiene el micrométodo comparado con los valores del método convencional en tubo que se asumen como 100% sensibles y 100 % específicas, ya que su confiabilidad ha sido comprobada desde siempre.

Como foco de interés de este trabajo, también se encuentran contemplados los rubros del beneficio económico que representa para el laboratorio de microbiología y el impacto ecológico obtenido al disminuir los volúmenes de contaminantes que son desechados.

10.1 Confiabilidad diagnóstica del micrométodo.

10.1.1 Confiabilidad diagnóstica general del micrométodo.

En este apartado se consideran tanto las pruebas líquidas como las sólidas, destacando que el método estándar reportó 328 resultados positivos y 344 resultados negativos, datos que se consideran con sensibilidad y especificidad del 100% y sirven para comparar el método en placa.

De las 672 pruebas realizadas sólo se identificaron correctamente por el método a prueba 516 pruebas, de las cuales 238 fueron positivas y 278 negativas a las 24 hs de incubación, siendo 66 pruebas identificadas como falsos positivos y 90 como falsos negativos, este último dato es considerado como alto y es responsable de que el método tenga una capacidad de detectar resultados positivos no aceptada.

La concordancia entre los métodos es moderada, según lo indica el índice Kappa y es una concordancia muy alejada de lo se esperaría por simple azar.

Los resultados de confiabilidad diagnóstica general del micrométodo se encuentran ilustrados en la tabla No. 1, donde se pone de manifiesto que el método en forma general sólo reporta confiabilidad diagnóstica aceptable ($\geq 80\%$) en tanto a la identificación correcta de pruebas negativas se refiere, excepto en la comparación de las 18 hs donde el comportamiento de las pruebas no indica que se puede sustituir una el micrométodo por el método convencional.

Un dato importante, es que los resultados que se comparan con los correspondientes a las 24 hs del método estándar, son similares a los que aporta el método a prueba desde las primeras 4 hs de incubación. Lo que indica que la capacidad de detectar resultados negativos es buena en un corto lapso de tiempo, confiabilidad que se encuentra en un intervalo de confianza que le permite al analista confiar en que el resultado negativo que reporta, realmente lo es.

Pero no se debe olvidar que se requiere que el método no sólo debe ser específico sino también sensible.

10.1.2 Confiabilidad diagnóstica según el estado físico del medio.

A diferencia de la categoría anterior, la separación de las pruebas en función del estado físico del medio aporta resultados más alentadores. Las pruebas líquidas del método en placa son de especificidad y sensibilidad superior al 80% a las 24 hs de incubación de la placa con buenos valores predictivos tanto positivos como negativos e índices de falsos muy bajos, con intervalos de confianza seguros y con un grado de concordancia que se considera como sustancial.

La sensibilidad de estos de estos medios a las 18 hs, no alcanza el 80% considerado, debido a que los índices de falsos positivos se incrementan, elementos que se corrigen conforme avanza la cinética de las reacciones bioquímicas.

Aun más interesante, es que el método a prueba tiene la confiabilidad diagnóstica deseada desde las 6 hs de la incubación, misma que mantiene hasta las doce horas con parámetros estadísticos satisfactorios.

Los medios líquidos en la microplaca pueden sustituir a los que se realizan en tubo dando una confiabilidad aceptable con bajo costo y poco desecho de contaminantes.

Por otra parte, los medios sólidos en su conjunto no pueden ser considerados como candidatos a sustituir al método estándar, dado que los datos que reporta la tabla No.3, no satisfacen la confiabilidad diagnóstica esperada, aun cuando el grado de concordancia es moderado, a las 24 hs de incubar la placa de sólidos no es posible considerar que se tiene una alternativa diagnóstica.

Desde la 4 hs hasta las 18 hs de incubación hay una especificidad aceptable, pero se recuerda que también debe tener sensibilidad aceptable, misma que dista de serlo.

Desde la 4 hs hasta las 18 hs de incubación hay una especificidad aceptable, pero se recuerda que también debe tener sensibilidad aceptable, misma que dista de serlo.

Si se tienen cepas bacterianas a identificar cuyos resultados tiendan a ser negativos, el utilizar este micrométodo puede ser útil dado que los intervalos de confianza se cierran hacia la seguridad, pero el detectar pruebas negativas únicamente no tiene significancia estadística.

10.1.3 Confiabilidad diagnóstica por cada prueba bioquímica.

10.1.3.1 Prueba de urea

La tabla No. 4 muestra que el método a prueba tiene una excelente capacidad para identificar correctamente pruebas con resultado negativo (especificidad), pero cuenta con la característica especial de que la sensibilidad se encuentra indeterminada, dado que los bacilos Gram negativos utilizados en la experimentación son ureasa negativos y a la hora de dividir el valor de verdaderos positivos entre el total de pruebas positivas se obtenía una indeterminación, pero esto no significa que el método sea incapaz de detectar un resultado positivo, por lo que se puede sugerir que en estudios posteriores se incluyan especies bacterianas que puedan arrojar resultados positivos.

La especificidad de esta prueba es asegurada al 100%, pero el grado de concordancia entre los dos métodos es catalogado como insignificante.

El patrón de resultados a las 24 hs se reproduce fielmente a todas las horas de lectura que se evalúan en este trabajo experimental.

10.1.3.2 Prueba de Rojo de metilo

El método de identificación en placa demuestra que puede sustituir al método en tubo, cuando se quiere diferenciar entre bacilos Gram negativos que en el medio de cultivo son capaces de mantener la acidez tras la adición del reactivo adicional a las 18 hs de incubación, ya que sus parámetros de confiabilidad diagnóstica son superiores al 80% y a un grado de concordancia con respecto al método estándar de casi perfecto y con muy poca probabilidad de encontrar un resultado falso.

Las condiciones cambian drásticamente cuando la comparación se realiza después de las 18 hs de incubación, el método deja de tener la confiabilidad que satisface los objetivos del trabajo.

A los tiempos de lectura anteriores a las 18 hs el micrométodo no detecta ninguna prueba positiva (100% específico) pero cuenta con una sensibilidad deplorable.

10.1.3.3 Prueba de Vogues Proskauer

Los resultados plasmados en la tabla No. 6, son muy similares a los obtenidos para la prueba de urea. Se trata del mismo caso, donde las cepas sometidas a la experimentación en general no tienen como producto de degradación del piruvato el acetilmetilcarbinol que se oxida en alcali (VP negativas). Es evidente que a toda hora el método detecta verdaderos negativos con una seguridad del 100%, pero por el motivo antes mencionado, no se puede determinar la sensibilidad del mismo.

10.1.3.4 Prueba de Caldo Rojo de fenol + arabinosa

La tabla No. 7 muestra que se cuenta con otra prueba que si es leída a las 24 hs de incubación se tienen datos de confiabilidad diagnóstica superiores al 80% y parámetros de estadísticos confiables, pero con un intervalo de confianza muy abierto (62 - 100%), lo que se puede considerar riesgoso a la hora de la toma de decisiones en tanto a los datos bioquímicos del bacilo que fermenta o no este carbohidrato. La concordancia de esta prueba es sustancial con respecto al resultado del método estándar ya que su índice Kappa es mayor a 0.6.

Los resultados de las lecturas a las 18 hs y anteriores no cuentan con la significancia estadística esperada, debido a que los índices de falsos negativos son altos. Esto habla de pruebas positivas identificadas incorrectamente como negativas. Es un retraso de la producción de ácido a partir de la fermentación de la arabinosa que se presenta hasta alcanzar la incubación de 24 hs.

10.1.3.5 Prueba de Caldo Rojo de fenol + lactosa

Una de la pruebas que se consideran totalmente sustituibles del método en placa, es la fermentación de la lactosa, ya que todos los valores de sensibilidad y especificidad son superiores al 80% como se espera en los objetivos, con los índices tanto positivos como negativos lo suficientemente bajos, Límites de confianza satisfactorios y grados de concordancia que van de lo sustancial hasta lo casi perfecto. Esto se torna aún más relevante cuando se considera lo importante que es diferenciar especies fermentadoras y no fermentadoras de la lactosa. También es muy importante que la sustitución de un método por el otro, puede ocurrir desde las primeras 4 horas de la incubación con la misma confiabilidad diagnóstica que tiene el método en tubo convencional, lo que es una ventaja cuando urge un diagnóstico por parte de el laboratorio.

10.1.3.6 Prueba de Caldo Rojo de fenol + glucosa

Contrario a lo que se presentó en las pruebas de urea y Vogues Proskauer, en la tabla No. 9 se encuentran los parámetros que corresponden a la fermentación de la glucosa, sustrato que es utilizado por todas las cepas utilizadas para producir especies que acidifican el medio tras degradar la glucosa en su metabolismo. Por ello la prueba resultado ser 100% sensible, pero con una especificidad indeterminable dado que no había forma

de que al menos una cepa fuera de fermentación negativa, lo que no indica que el método en placa sea incapaz de detectar pruebas negativas.

La confiabilidad para detectar pruebas positivas es muy buena ya que es al 100% desde las cuatro horas de incubación, lo que orienta a afirmar que el trabajo tiene éxito, pues uno de sus objetivos es evaluar la confiabilidad desea un tiempo menor al manejado comúnmente en el laboratorio de microbiología; nuevamente se puede sugerir que en estudios posteriores se incluyan bacilos no fermentadores de la glucosa a fin de comprobar la especificidad del método en placa.

10.1.3.7 Prueba de Caldo Rojo de fenol + manitol

En esta prueba la sensibilidad y la especificidad deseadas se alcanzan sólo a las 24 hs de incubación, esto se debe a que las cepas bacterianas utilizadas presentan retraso en la fermentación de este carbohidrato.

10.1.3.8 Prueba de Caldo Rojo de fenol + sacarosa

La fermentación de la sacarosa en el método en placa es de sensibilidad mayor al 80% es todas las horas de incubación evaluadas, lo valores predictivos positivos concuerdan con la sensibilidad, aun que los Límites de confianza son muy abiertos (se debe recordar que los intervalos de confianza con tamaños de muestra menores a 30 no pueden ser totalmente confiables) estos datos tienen un amplia gamma de valores de concordancia desde lo discreto hasta lo sustancial y es gracias a que muchas pruebas negativas eran reportadas como negativas.

La especificidad con valor aceptable se obtiene hasta las 24 hs, completando así junto con la sensibilidad la única hora de incubación que puede sustituir al método convencional.

10.1.3.9 Prueba de Caldo Rojo de fenol + sorbitol

Esta prueba presenta resultados curiosos que requieren de un análisis especial, si se revisa la tabla No. 12 se observa que a las seis horas se tienen resultados confiables y equiparables con los que se obtienen a las 24 hs del método convencional, pero si continua la incubación los parámetros de la confiabilidad diagnóstica disminuyen, en el caso de la especificidad se tiene el valor deseado a las 6 y 12 hs de incubación, las pruebas negativas que en el método en tubo lo son, después de la 12 hs cambian convirtiéndose en falsos positivos, dato que lo confirma el índice de falsos positivos. En el caso de la sensibilidad en las primeras horas de incubación hay verdaderos positivos que tras este resultado sólo se puede interpretar que el medio llevo a una confusión en el analista, las pruebas leídas como positivas en realidad eran negativas.

10.1.3.10 Prueba de Caldo Rojo de fenol + xilosa

En el método en placa es totalmente equiparable con el método de identificación en tubo para evaluar la fermentación de la xilosa, la gran mayoría de las pruebas fueron

identificados correctamente con buenos valores predictivos, bajos índices de falsos, intervalos aceptables y concordancia desde sustancial hasta casi perfecta, como en otras pruebas ya reportadas, se puede confiar en el resultado desde las primeras 4 hs de incubación tal como lo sugieren los métodos automatizados de identificación bacteriana y susceptibilidad a antibióticos.

10.1.3.11 Prueba de Caldo Cianuro de potasio

Esta prueba resultó ser muy complicada para manejar y para interpretar óptimamente su resultado. La capacidad para detectar pruebas positivas resulta ser 100% sensible a partir de las 12 hs, pero la mayoría de las cepas no tienen la capacidad de crecer en este medio, salvo *Aeromonas hydrophila*, esta última fue la que con muy pocas pruebas le confiere la sensibilidad al método. Por otra parte la especificidad o capacidad para detectar pruebas negativas no cumple con los objetivos, dado que en un medio transparente y con muy poco medio de cultivo el detectar la diferencia de turbidez entre el medio sin KCN y el que si lo contiene es complicado, lo que oriento a interpretar la mayoría de las pruebas como falsos positivos.

10.1.3.12 Prueba de Citrato de Simmons

Para evaluar la capacidad de las cepas de aprovechar el citrato como única fuente de carbono, el método en placa reporta que hay una sensibilidad del 100% a las 24 hs de incubación, es decir las pruebas positivas sólo las puede reportar hasta este tiempo de incubación. Pero no así la capacidad de detectar negativos ya que si se observa bien a las 6 y 12 hs hay especificidad confiable, pero las pruebas que inicialmente eran negativas viran de color interpretándose como positivas. Los resultados de sensibilidad no son alentadores debido a que los parámetros de confiabilidad tampoco lo son, basta con observar el índice Kappa que califica desde insignificante hasta moderada la concordancia con el método convencional.

10.1.3.13 Medio SIM

Al evaluar la producción del indol, la microplaca tiene la confiabilidad diagnóstica de las bioquímicas convencionales a las 18 hs, condiciones que para sensibilidad sólo desde las 12 hs y mantiene hasta las 24 hs, la especificidad se ve inicialmente perfecta dado que hay pruebas positivas, pero conforme avanza la reacción las pruebas dan falsos positivos, pero posteriormente se revierte el resultado, no hay que olvidar que las pruebas que requieren reactivos adicionales se realizaron en diferentes pozos, para comprobar la cinética de la reacción, motivo que pudo conllevar a que algún pozo no fuera inoculado.

La prueba de la movilidad tuvo buena sensibilidad partir de las 12 hs pero no con muy buen nivel de concordancia, la especificidad no aporta los valores que se esperarían.

La producción de H₂S en este medio solo reporta datos satisfactorios si la bacteria no lo produce, pero si la bacteria la capacidad de producir el H₂S el micrométodo reporta sensibilidad no aceptable.

10.1.3.14 Prueba Fenilalanina desaminasa.

El micrométodo es 100% específico evaluando la desaminación de fenilalanina, tiene 0% de índices de falsos negativos e intervalos de confianza aceptables; pero la capacidad para detectar pruebas positivas se encuentra indeterminada, debido a que entre las cepas de la comparación no se encontró con ninguna bacteria fenilalanina positiva, como lo hubiera sido alguna especie del género *Proteus*.

10.1.3.15 Prueba Oxidación – Fermentación.

Los procesos metabólicos de la utilización de la glucosa en el medio de Hugh –Leifson para el método a prueba reportaron buena capacidad para detectar pruebas positivas, dado que todas las cepas eran fermentadoras y no optan por la vía oxidativa, por lo que se encuentra indeterminada la especificidad del método al igual que la prueba de fermentación de glucosa en caldo base Rojo de fenol.

10.1.3.16 Medio MIO

La prueba de la omitina no tuvo significancia en este trabajo, dado que sólo tuvo una especificidad >80% a las 24 hs, pero con un índice de falsos positivos de valor no tan despreciable, lo más destacado es que el índice Kappa esta en el rango de insignificante. Probablemente estos resultados se debieron a que la omitina se evalúa dentro del medio MIO y es de color oscuro lo que no permitía claramente su observación.

Los resultados de movilidad en este medio fueron similares a los obtenidos en el medio SIM con sensibilidad partir de las 12 hs pero con bajo nivel de concordancia entre los dos métodos, la capacidad de detectar pruebas negativas no aporta los resultados que alienten la posibilidad de sustituir al método convencional para evaluar la movilidad de los microorganismos.

En la microplaca la actividad de la triptofanasa (producción de indol) tiene la confiabilidad diagnóstica deseada a las 18 hs, condiciones que para sensibilidad sólo desde las 12 hs y mantiene hasta las 24 hs. La especificidad comienza bien dado que hay pruebas positivas, pero dan falsos positivos posteriormente.

10.1.3.17 Medio Triple azúcar hierro (TSI).

El medio TSI es una medio multiprueba, que evalúa la fermentación de los azúcares sacarosa, lactosa y glucosa, como también la producción de gas y ácido sulfhídrico.

En el método en placa, la identificación de la fermentación de la glucosa es 100% específica, pero su sensibilidad no cumple con las expectativas del proyecto, pero sus parámetros de confiabilidad nos invitan a no creer totalmente en los resultados que aporta; por otra parte los resultados de fermentación de la sacarosa y lactosa son muy similares e inclusive coinciden en que su resultado a las 12 hs de incubación son

equiparables con el método convencional, para ambos metabolitos la concordancia con el método de referencia es sustancial con intervalos de confianza abiertos, tanto se puede obtener una sensibilidad o especificidad que cumpla con los objetivos como obtener un resultado que no los cumpla.

La interpretación de los resultados de la fermentación de los carbohidratos es muy difícil de realizar en la placa de ELISA, el método en tubo requiere que se genere un pico de flauta en el tubo, lo que no es posible de lograr en los pozos de la placa de ELISA, lo que se realizó en este trabajo es considerar el menisco formado en la superficie del medio, esto permitió diferenciar la fermentación de la glucosa, pero la apreciación de la fermentación de la sacarosa y la glucosa prácticamente fue igual.

La producción del ácido sulfhídrico es por el contrario es muy fácil de detectar son puntos de color negro que aparecen en el medio de cultivo alrededor de la picadura de inoculación, pero aún así la capacidad para detectar pruebas positivas no fue lo esperado ya que se queda en el rango del 50% de tener una identificación correcta.

La producción de gas, sólo es de especificidad aceptable en las primeras horas de incubación cuando la mayoría de las pruebas son negativas pero posteriormente los resultados cambian y pierden la significancia estadística que tenía en un principio.

10.1.3.18 Medio Agar hierro lisina (LIA).

Este es otro medio de análisis multiprueba, que evalúa la descarboxilación de la lisina y la producción de ácido sulfhídrico y gas.

La descarboxilación de la lisina no aporta ningún resultado de interés, la mayoría de las pruebas fueron identificadas incorrectamente, los intervalos de confianza no tienen lógica y el índice de concordancia adopta valores negativos, lo que indica que no hay ningún tipo de acuerdo entre los dos acontecimientos.

Por otra parte la producción de ácido sulfhídrico es lo suficientemente específica a cualquier tiempo observado como para cambiar un método por otro, pero no ocurre así con la sensibilidad la cual experimenta su valor máximo del 75% a las 18 hs, lo que no es suficiente.

La producción de gas en este método, muestra en la tabla No.29, que no tiene la capacidad de detectar pruebas positivas, pero si se trata de identificar pruebas como verdaderas negativas, el método puede aportar resultados oportunos y seguros, pero esta bien discutido en este trabajo que no basta un sólo parámetro, sino los dos.

Una vez analizados los resultados que aportó este trabajo, conviene compararlos con trabajos relacionados realizados con anterioridad.

Los resultados obtenidos en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional aseguran que la fermentación de los carbohidratos en caldo base rojo de fenol en el soporte de las placas de microelisa, tienen la confiabilidad diagnóstica que permite sustituir al método convencional en tubo. Los resultados de esta tesis están de acuerdo con lo que anteriormente se describe, pero aporta que además de la fermentación de carbohidratos en medios líquidos, los medios de: urea, el crecimiento en KCN, Vogues -Proskauer tienen la especificidad requerida a las 24 hs y la prueba de Rojo de metilo con sensibilidad y especificidad buenas a las 18 hs de incubación.

La QFB G. Martínez en sus experimentos de pruebas bioquímicas con 1 mL de medio obtuvo que se alcanza la confiabilidad diagnóstica al 100% para las pruebas de fermentación de carbohidratos y el crecimiento en medio citrato de Simmons, a lo que esta tesis demuestra que la fermentación de los carbohidratos con sólo 100 µL, no tiene el 100% de confiabilidad pero si presenta aun la confiabilidad que es necesaria para sustituir un método por otro. La prueba del citrato si se le disminuye el volumen a 100 µL de medio, pierde el valor de confiabilidad que reporta el trabajo de la química Martínez (1 mL). Este resultado sólo mantiene una especificidad aceptable, pero con sensibilidad menor al 80%. Por otra parte la pruebas bioquímicas en medios sólidos como SIM, MIO y TSI, obtiene resultados similares a los que aquí se presentan, estas pruebas refieren que la dificultad esta representada por que son sistemas de identificación multiprueba.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12.-CONCLUSIONES

El laboratorio de análisis clínico necesita optimizar sus procesos de operación, para abatir costos y así poder poner sus servicios a pacientes de bajos recursos, como también contribuir a la disminución de la contaminación ambiental por los desechos químicos que utiliza en su operación, sin descuidar la calidad de su servicio. Por ello en este trabajo se puntualizan las siguientes conclusiones:

1. La confiabilidad diagnóstica general del microsistema manual de identificación bacteriana reportó una sensibilidad de 64.4% y una especificidad de 82.3%. Por lo que no cumplió globalmente con los objetivos.
2. La confiabilidad diagnóstica de los medios líquidos son de especificidad y sensibilidad superior al 80% a las 24 hs y constituyen una alternativa de identificación bacteriana.
3. El método en placa para medios líquidos presenta la confiabilidad diagnóstica que tiene el método en tubo desde las 6 hs y la mantiene hasta las 12 hs por lo que el laboratorio puede reportar resultados en menor tiempo y con la seguridad que lo haría con un análisis en tubo durante 24 hs.
4. Los medios sólidos considerados en este trabajo en su conjunto, no pueden ser considerados como candidatos a sustituir al método estándar, la sensibilidad y la especificidad no fueron satisfactorios.
5. A nivel de pruebas bioquímicas individuales, las pruebas que se pueden realizar en el microsistema de identificación con la confiabilidad diagnóstica requerida son: Caldo RF + arabinosa, Caldo RF + lactosa, Caldo RF + manitol, Caldo RF + sacarosa, Caldo RF + xilosa, indol a las 18 hs, sacarosa y lactosa en medio TSI a las 12 hs y H₂S en LIA, Rojo de metilo a las 18 hs y Caldo RF + sorbitol a las 6 hs.
6. Las pruebas bioquímicas que no se pueden considerar como alternativa son: la ornitina en MIO y la descarboxilación de la lisina, debido a que no cumplen con la confiabilidad necesaria.
7. Las pruebas que sólo demostraron tener sensibilidad aceptada fueron: Caldo RF + glucosa, Caldo KCN, citrato de Simmons, O/F Huhg - Leifson y la prueba de movilidad en SIM y MIO.
8. Las pruebas que sólo demostraron tener la capacidad de detectar pruebas negativas (especificidad) fueron. Urea, Vogues - Proskauer, Fenilalanina desaminasa, H₂S en TSI, en LIA y en SIM y la prueba de gas en LIA.
9. El beneficio económico y de disminución de contaminantes es de 98.2%. Lo que es indiscutiblemente ventajoso para el laboratorio microbiológico, el paciente y la ecología.

SUGERENCIAS

a) Incluir cepas de bacilos Gram negativos que tengan actividad positiva para la producción de acetoina (VP positiva), ureasa, y la desaminación de la fenilalanina, como:

- *K. pneumoniae*: VP (+), Urea (+)

- *E. aerogenes*: VP (+)

- *S. marcescens*: VP (+)

- *Y. enterocolitica*: Urea (+)

- *Proteus spp.*: Fenilalanina (+)

b) Incluir cepas de bacilos Gram negativos que tengan actividad negativa para la fermentación de la glucosa, metabolismo oxidativo de la glucosa en medio OF de Hugh Leifson.

- *P. aeruginosa* OF oxidativa

- *A. faecalis*: Glucosa (-)

c) Diseñar un sistema, donde se puedan separar los analitos de los medios multiprueba como MIO, SIM, TSI y LIA.

d) Diseñar un soporte que mantenga el mismo número de pozos con la misma capacidad, pero que sea de un material termo resistente, para poder esterilizar el soporte junto con el medio y así disminuir el riesgo de contaminar el medio a la hora de llenar la placa.

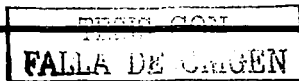
e) Probar métodos de esterilización, que permitan reutilizar las placas de ELISA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

13.- REFERENCIAS

- 1.- Castañeda GB, Fandiño L M, Alvarez LL, González VV, Botello MS y Sánchez GM. Diccionario de especialidades en análisis clínicos e imagenología. 13ª ed. México DF: PLM; 2000.
- 2.- Martínez FG. Comparación de pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias en placa y tubo. (tesis). México DF: UNAM, FES Zaragoza; 1995.
- 3.- Tequién B L. Aislamiento y caracterización de *Aeromonas* a partir de muestras de agua potable de la FES Zaragoza y otras dependencias de la UNAM. (Tesis licenciatura). México DF: UNAM, FES Zaragoza; 2000.
- 4.- Barentanger D. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility. JCM 1999; 37(5): 1415 – 1418.
- 5.- Holmes, Costas and Stever. Evaluation of biology systems identification of Gram – negative bacteria of clinical importance. JCM 1994; 32 (8): 1970 – 1975.
- 6.- RobinsonYS, Mc Carter and Tetreaud. Comparison of crystal enterial / nonfermenter system, API 20 E system and VITEK Auto Microbic system for identification of Gram – negative bacilli. JCM 1995; 38 (2): 1765 – 1768.
- 7.- Pelczar Michael J., Reid D. Roger y Chain E.C. Microbiología. 5ª ed. México DF: Mc Graw – Hill; 1992.
- 8.- Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W y Sommers H. Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1992.
- 9.- Pérez GF. Aplicación de métodos electroquímicos de análisis en el campo microbiológico. AAM (en línea) 2000; 25 (4): 1232. disponible en: <http://AAM.api/per>.
- 10.- Murray P R, Kabayashi G S, Pfaller R. Microbiología Médica .2ª ed. Madrid España: Harcourt Brace; 1997: 277ss.
- 11.- Krull UJ, Piunno PAE, Wust C, Li A, Gee A, Cohen H (1998) A fiber optic DNA sensor for rapid detection of environmental *E. coli*. En: Nikolettis DP, Krull UJ, Wang J, Mascini M (Ed), Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 66-67.
- 12.- Strachan NJC, Nicholson FJ, Ogden ID. An automated sampling system using ion mobility spectrometry for the rapid detection of bacteria. Anal. Chim. Acta 1995; 313: 63-67.

- 13.- Jepras RI, Carter J, Pearson SC, Paul FE, Wilkinson MJ. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 2696-2701.
- 14.- Watts HJ, Lowe CR, Pollard-Knight DV. Optical biosensor for Monitoring Microbial Cells. *Anal. Chem.* 1994; 66(1): 2465-2470.
- 15.- Mc Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. 2ª ed. Baltimore: Wilkins & Williams; 1980.
- 16.- Hobson NS, Tothill I, Turner. *Microbial detection.* APF 1996; 11(2): 455-477.
- 17.- Méndez S JL y col.. *Protocolo de la investigación científica.* México DF: Trillas; 1989.
- 18.- Navarro FR. *Introducción a la bioestadística. Análisis de variables binarias.* México DF: Mac Graw - Hill; 1988: 59 - 71, 100 - 104.
- 19.- Bailey S, Sydney M, Finegold y Ellen JB. *Diagnóstico Microbiológico.* 7ª ed. Buenos Aires Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1996.
- 20.- Altman DG. *Practical statistics for medical research.* New York: Chapman and Hall; 1991:60 - 63
- 21.- Marroquín S R. *Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica.* México DF: UNAM FES Zaragoza; 1995:5-6.
- 22.- Pierce L. *Microbiology lab. index.* Austin Community College (en línea) 2000;17(2):1123.disponible en: <http://www.austin.cc.tx.us/microbugs/labindex>.
- 23.- Andrews WH. Three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods. *Food Technol.* 1996; 7(1):147-151.
- 24.- Cox NA, Fung JS, Bailey PA, Hartman, and Vasavada PC. Miniaturized kits, immunoassays and DNA hybridization for recognition and identification of foodborne bacteria. *Dairy Food Sanit* 1987; 7(1): 628-631.
- 25.- Ibrahim GF. A review of immunoassays and their application to salmonellae detection in foods. *J. Food Prot.* 1986; 49:299-310.
- 26.- Kalamaki M, Proce RJ and Fung. Rapid methods for identifying seafood microbial pathogens and toxins. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiol.* 1997; 5:87-137.
- 27.- Stager CE, and Davis JR. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5:302-327.
- 28.- Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML. *The Microbial World.* New Jersey: Prentice Hall; 1986: 311-524



ANEXOS

ANEXO A

FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

A continuación se presentan los fundamentos de las pruebas bioquímicas que se utilizaron en este trabajo.

ROJO DE METILO

El rojo de metilo es un indicador de pH con un espectro entre 6.0 (amarillo) y 4.4 (rojo), el pH con el que el rojo de metilo detecta acidez es considerablemente más bajo que el pH para otros indicadores usados en medios de cultivo bacteriológicos, por ende, para producir un cambio de color el microorganismo en estudio debe producir grandes cantidades de ácido a partir de hidratos de carbono.

La prueba con rojo de metilo es una prueba cuantitativa de la producción de ácidos que requiere que los microorganismos produzcan ácidos fuertes (láctico, acético, fórmico) a partir de la fermentación de la glucosa. Dado que muchas enterobacterias producen ácidos fuertes que pueden ser detectados por medio del rojo de metilo durante las fases iniciales de la incubación, sólo los microorganismos capaces de mantener este pH bajo después de una incubación prolongada (48-72 hs), superando el sistema amortiguador de pH del medio, pueden considerarse como rojo de metilo positivos.

Interpretación

La aparición de color rojo en la superficie de un medio indica acidez suficiente para reducir el pH a 4.4 y representa una prueba positiva, algunos microorganismos producen acidez que reporta un color intermedio entre amarillo y rojo, esto no se considera prueba positiva.

VOGUES-PROSKAUER

El ácido piúvico es producto de la degradación de la glucosa y es metabolizado enzimáticamente por las bacterias, como producto de esta vía de degradación se produce acetoina (acetil - metil carbinol), en presencia de oxígeno atmosférico e hidróxido de potasio al 40%, la acetoina es convertida en diacetilo y el ó-naftol sirve como catalizador para producir un complejo de color rojo.

Interpretación

La aparición de un color rojo 15 minutos después de agregar los reactivos es una prueba positiva, indica la presencia de diacetilo, que es el producto de la oxidación de la

acetoina, la prueba no debe leerse después de una hora por que los cultivos pueden producir un color similar al cobre, lo que daría como resultado una prueba falsa positiva.

CITRATO

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple encontrado como intermediario del ciclo de Krebs. Algunas bacterias pueden obtener energía usando citrato como única fuente de carbono, característica importante en la identificación de enterobacterias. Todo medio que se emplee para detectar la utilización de citrato debe estar desprovisto de proteínas e hidratos de carbono como fuentes de carbono.

La utilización del citrato se detecta por la producción de intermediarios alcalinos, el medio incluye citrato de sodio, un anión y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio con la producción de amoníaco (NH_3), llevando a la alcalinización del medio apartir de la conversión del NH_3 en hidróxido de amonio (NH_4OH). El indicador es azul de bromotimol, que es amarillo con un pH menor de 6.0 y azul con un pH por encima de 7.6.

Interpretación

Es positiva con la aparición de color azul oscuro de 24 a 48 hs, lo que indica que el microorganismo puede utilizar el citrato como fuente de carbono. Una prueba también puede ser positiva en ausencia de color azul si hay un crecimiento de colonias visibles a lo largo de la línea de inoculación. Esto es posible porque para que el crecimiento sea visible, el microorganismo debe ingresar en la fase de crecimiento exponencial (fase log), posible sólo si ha asimilado carbono y nitrógeno. Una interpretación positiva a partir de la lectura de la línea de inoculación puede confirmarse incubando el tubo durante 24 hs más, con lo que habitualmente aparece un color azul.

UREASA

La urea es una diamida de ácido carbónico con la fórmula NH_2CONH_2 todas las amidas son fácilmente hidrolizadas con la liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea siguiendo la siguiente reacción química:



El amoníaco reacciona en solución para forma carbonato de amonio, lo que da como resultado alcalinización y aumento del pH del medio. Los microorganismos que hidrolizan urea pueden dar reacciones positivas rápidas en una o dos horas, es posible que especies menos activas en 3 días o más. El caldo de urea de Stuart y el agar urea de Christensen son los dos medios utilizados con más frecuencia en laboratorios clínicos para la detección de actividad de ureasa.

Interpretación

Caldo urea de Stuart

Un color rojo en todo el medio indica alcalinización e hidrólisis de urea.

Si el medio no cambia indica que no hubo hidrólisis.

Agar urea de Christensen.

Hidrolizadores rápidos de urea (especies de *Proteus*): color rojo en todo el medio

Hidrolizadores lentos de urea (especies de *Klebsiella*): color rojo en un principio sólo en el pico de flauta, que de forma gradual se extiende a todo el tubo.

No hidrólisis de urea: el medio conserva su color amarillo original

FENILALANINA DESAMINASA

La fenilalanina es un aminoácido que por desaminación produce un cetoácido, el ácido fenilpirúvico, la prueba de la fenilalanina desaminasa depende de la detección del ácido fenilpirúvico.

El agar se inclina en un tubo formando un pico de flauta. No pueden usarse extractos de carne o hidrolizados de proteínas debido a su contenido variable de fenilalanina, el extracto de levadura sirve como fuente de carbono y nitrógeno.

De la familia de las enterobacterias, sólo miembros de los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* poseen la enzima necesaria para esta desaminación

Interpretación:

La determinación de la presencia del ácido fenilpirúvico se puede realizar con la adición de cualquiera de los siguientes reactivos adicionales:

a) Solución acuosa de cloruro férrico

La prueba es positiva si aparece un color verde visible al agregar cloruro férrico al 10 %, la aparición inmediata de un intenso color verde indica la presencia de ácido fenilpirúvico y una prueba positiva, si no se presenta cambio la prueba es negativa.

b) Solución semisaturada de sulfato férrico amoniacal.

La formación de un color rojo en el pico de flauta indica una prueba positiva, si no se presenta cambio la prueba es negativa.

INDOL

El indol es un benzilpirrol y es uno de los productos de degradación del triptófano. Las bacterias que producen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La prueba de indol se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído, esta es la sustancia química activa en los

reactivos de Kovac y Ehrlich, debe usarse un medio rico en triptófano. En la práctica, se emplean medios combinados como sulfuro, indol, motilidad (SIM). Motilidad, indol, ornitina (MIO) o indol nitrate.

Las pruebas rápidas, en las que se usan tiras de papel filtro impregnado con reactivo de Kovac, son útiles para evaluar bacterias que son rápidas productoras de indol.

La producción del indol es una característica importante en la identificación bacteriana y resulta particularmente útil para separar *Escherichia coli* (+) de los miembros del grupo *Klebsiella - Enterobacter - Hafnia* (-).

Interpretación

Un anillo rojo en la superficie del medio, indica una prueba positiva. Si no se produce cambio en la superficie del medio la prueba es negativa.

DESCARBOXILASAS.

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas sustrato-específicas capaces de reaccionar con la porción carboxilo (COOH) del aminoácido formando aminas de reacción alcalina, esta reacción conocida como descarboxilación, forma dióxido de carbono como producto secundario. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido. Lisina, ornitina y arginina, son los tres aminoácidos evaluados de rutina en la identificación de enterobacterias. Los productos amino específicos son los siguientes:

lisina	→	cadaverina
ornitina	→	putresina
arginina	→	citrulina

La conversión de arginina en citrulina es una reacción de dihidrolasa más que de descarboxilasa, en la cual un grupo amino es removido de la arginina como primer paso. Luego la citrulina es convertida en ornitina, la que es descarboxilada para formar putresina.

El medio de Moeller es la base que se emplea con más frecuencia para determinar la capacidad de descarboxilación de las enterobacterias. El aminoácido a evaluar se agrega a la base antes de la inoculación con el microorganismo en estudio, de manera paralela debe disponerse un tubo control que consiste sólo en la base sin el aminoácido, ambos tubos se incuban de forma anaerobia cubriéndolos con aceite mineral, durante los estadios iniciales de incubación, los dos tubos se vuelven amarillos debido a la fermentación de la escasa glucosa contenida. Si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas alcalinas y el medio revierte su color púrpura original.

Interpretación

La aparición de color amarillo en el tubo de control indica que el microorganismo es viable y que el pH del medio ha disminuido en forma suficiente como para activar la

descarboxilación. La reaparición de un color azul – púrpura en el tubo que contiene el aminoácido indica una prueba positiva debido a la liberación de aminas por la reacción de descarboxilación.

AGAR – HIERRO – TRIPLE AZÚCAR (TSI)

Los microorganismos no fermentadores de glucosa por lo común se detectan por las reacciones que producen al crecer en agar KIA o TSI. Una reacción de pico de flauta alcalino / profundidad alcalina (sin cambio) en cualquiera de estos medios indica la presencia de producción de ácido y la incapacidad del microorganismo de fermentar la glucosa y otros carbohidratos presentes. Esta reacción sola, es suficiente para excluir a un microorganismo de la familia de las enterobacterias.

Son importantes algunas observaciones para el estudio de las fórmulas del TSI. La incorporación de cuatro derivados proteícos, extracto de carne, extracto de levadura, peptona y proteosa

La 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. Se inocula estriando la superficie y picando hasta profundidad, se incuba de 35°C de 18 a 24 hs.

Interpretación

K = alcalino

A = ácido

a) Pico de flauta alcalino / profundidad alcalina (K/K)

Ausencia de fermentación de carbohidratos. Característica de no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*.

b) Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (K/A)

Glucosa fermentada; lactosa (o sacarosa en TSI) no fermentada. Característica de no fermentadoras de lactosa.

c) Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (negra) (K/A / H₂S)

Glucosa fermentada, lactosa no fermentada; producción de H₂S. Característico de especies de *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter* y algunas de *Proteus*.

d) Pico de flauta ácida / profundidad ácida (A/A)

Glucosa y lactosa fermentadas, característico de coliformes.

Sin la fermentación de carbohidratos no se forman ácidos y la producción de aminas en el pico de flauta junto con los buffer alcalinos producen un color rojo en todo el medio

PRUEBA DE LA OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN (O/F + carbohidratos Hugh-Leifson)

Determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de una bacteria sobre un hidrato de carbono.

Algunas bacterias sólo metabolizan un hidrato de carbono (producción de ácido y a veces también gas) en condiciones aeróbicas, es decir por un proceso de oxidación; otras también lo hacen en anaerobiosis, o sea por fermentación.

Se prepara un medio base al que se le agrega una solución del azúcar elegido (glucosa, lactosa, sacarosa o maltosa) esterilizada por filtración. El medio se distribuye en tubos de ensayo. Se inocula la bacteria problema con asa aguja. Luego, a uno de los tubos se le agregan 2 mL de aceite mineral o parafina fundida estéril para excluir el oxígeno. Se incuba por 48 hs. La producción de ácido se manifiesta por un cambio de color, por tener el medio base un indicador de pH; la producción de gas se deduce por la aparición de burbujas o fraccionamiento del medio.

Interpretación

Cambio de color en ambos tubos: oxidación y fermentación.

Cambio de color sólo en tubo no sellado: oxidación.

PRUEBA DE CALDO BASE ROJO DE FENOL + CARBOHIDRATOS

Esta prueba es utilizada para determinar la habilidad del microorganismo para fermentar carbohidratos (azúcares). La fermentación es un proceso metabólico, donde el aceptor final de electrones es una molécula orgánica, el medio tiene una fermentación simple, se adiciona a un medio peptonado e indicador de pH Rojo de fenol, un pequeño tubo (campana de Durham) se agrega al medio en forma invertida para evaluar la producción de gas.

El indicador rojo de fenol tomará amarillo cerca de un pH de 6.8 y será rojo cerca de un pH de 7.4, si el microorganismo metaboliza los carbohidratos con la subsiguiente producción de ácido y disminución de pH. Si el microorganismo no fermenta el carbohidrato, el pH se mantiene neutral. Si el microorganismo no fermenta los carbohidratos pero utiliza las peptonas, la acumulación de aminas puede modificar el pH.

Interpretación

-Ácido: (amarillo) producción de ácido produce un cambio de color desde rojo hasta amarillo, indicando que el microorganismo puede metabolizar el azúcar en el tubo.

Ácido, Gas: (Amarillo y burbujas de gas) La fermentación del carbohidrato es indicado por el color amarillo del medio. Aire atrapado en la campana de durham indica la producción de gas.

-Negativo: La fermentación negativa puede indicar dos caminos:

1. Sin cambio. Significa que el microorganismo no utiliza el azúcar en el tubo.
2. El color cambia a un tono oscuro (rojo rosáceo) Este color en el medio significa la alcalinización por la producción de productos metabólicos por la degradación de las peptonas.

MEDIO SIM (REDUCCIÓN DE AZUFRE, PRODUCCIÓN DE INDOL Y MOVILIDAD)

I. Reducción de sulfuro

Esta prueba es utilizada para la identificación de algunas bacterias capaces de reducir el sulfuro, esto es particularmente importante en la diferenciación de capas de microorganismos entericos.

Principio: Ácido sulfhídrico, H_2S , Puede ser producido por putrefacción o por respiración anaeróbica, el medio contiene cistina, un aminoácido que contiene azufre y tiosulfato de sodio hierro peptonizado o sulfato ferroso. El H_2S puede reaccionar con el hierro o con el sulfato ferroso, formando un precipitado negro. Si se presenta la formación del precipitado negro, el microorganismo es positivo a la producción de H_2S , si no se presenta este precipitado la prueba es negativa

II. Producción de indol

La prueba de indol es usada para identificar bacterias capaces de producir el indol usando la enzima triptofanasa. Esta es una prueba componente del IMVIC para la diferenciación de enterobacterias.

Principio. La enzima triptofanasa puede convertir el triptofano a indol, amoniaco y ácido pirúvico. El metabolito indol es identificado en esta prueba, cuando el reactivo de Kovac que contiene ácido clorhídrico, dimetilaminobenzaldehído y alcohol amílico forma un anillo color rojo para indicar una prueba positiva o no formarlo indicando que el indol no esta presente.

III Movilidad

Esta prueba se realiza en medios sólidos o semi-sólidos para evaluar la movilidad del microorganismo por medio de la picadura del medio durante la inoculación.

Si el microorganismo posee movilidad, se observa una difusión del crecimiento bacteriano desde al área de aplicación, si se presenta esta difusión la prueba es positiva, de lo contrario es considerada negativa.

CRECIMIENTO EN KCN

El medio caldo cianuro de potasio evalúa la capacidad del microorganismo para crecer en un medio que contiene moléculas activas que podrían limitar su crecimiento como lo es el cianuro de potasio, el KCN inhibe la cadena de transporte de electrones uniéndose a los citocromos impidiendo el crecimiento microbiano. Sin embargo, para algunas bacterias no es limitado su respiración por el cianuro y pueden desarrollarse. Las bacterias se inoculan en caldo de peptona, fosfatos y NaCl que contiene cianuro potásico. Las bacterias son inoculadas en el medio que contiene al cianuro y también en un tubo que no lo contiene, este último tubo sirve de referencia como control negativo.

Interpretación

-Turbidez en ambos tubos indica una prueba positiva y significa que el microorganismo es capaz de crecer en medio con KCN

-La turbidez exclusiva en el tubo de referencia indica que el microorganismo es susceptible a la inhibición de su crecimiento por el KCN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO B

Nefelómetro de Mc Farland

El Nefelómetro de Mc Farland es una serie de diluciones de cloruro de bario en una solución ácida de ácido sulfúrico, se utiliza para realizar comparaciones de turbidez, según lo explica la siguiente tabla.²¹

tubo	BaCl ₂ al 1 %(mL)	H ₂ SO ₄ al 1%(mL)	No. de bacterias/mL
1	0.1	9.9	3.0 x 10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0 x 10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0 x 10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2 x 10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5 x 10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8 x 10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1 x 10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4 x 10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7 x 10 ⁹
10	1.0	9.0	3.0 x 10 ⁹

NOTA: La turbidez que reporta el tubo No. 5 de este nefelómetro, fue la referencia utilizada en esta tesis para controlar la concentración bacteriana que inoculaba en los medios líquidos.

TESIS CON
FALSA ORIGEN

ANEXO C

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

µL	microlitros
µm	micrómetros
ha	horas
cm	centímetros
mm	milímetros
mL	mililitros
°C	grados centígrados
lb	libras de presión
min	minutos
≥	mayor que
ATCC	Association type certain collection
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
FDA	Food and drugs administration
UFC	unidades formadoras de colonias
RMVP	medio Rojo de metilo - Vogues Proskauer
RF	indicador Rojo de fenol
LIA	medio Lisina iron agar (agar lisina hierro)
MIO	medio Movilidad indol ornitina
TSI	medio Triple sugar iron (triple azúcar hierro)
KCN	medio Caldo cianuro de potasio
ONPG	medio Orto nitro fenil -β-D-galactoparanósido
SIM	medio Movilidad indol sulfuro
Sac	caldo RF + sacarosa
Sor	caldo RF + sorbitol
Ara	caldo RF + arabinosa
Xii	caldo RF + xilosa
Glu	caldo RF + glucosa
Lac	caldo RF + lactosa
c/KCN	medio Caldo con KCN
s/KCN	medio Caldo sin KCN
OF s/s	medio Oxidación - Fermentación sin sello
OF c/s	medio Oxidación - Fermentación con sello
CIT	medio Citrato de Simmons
Alan	medio fenilalanina desaminasa
EMB	agar eosina azul de metileno
MIC	concentración mínima inhibitoria
ADN	ácido desoxirribonucleico
SNC	sistema nervioso central

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mod	modelo
c/u	cada uno
c/p	cada pozo
VPP	valor predictivo positivo.
VPN	valor predictivo negativo
IFP	índice de falsos positivos
IFN	índice de falsos negativos
P(+/E)	probabilidad de obtener una identificación correcta realmente.
P (E)	probabilidad de la identificación sea correcta
P (+ / E ^c)	probabilidad de tener una identificación incorrecta
P (E ^c)	probabilidad de que la identificación sea incorrecta
Co	concordancia observada la como
Ca	concordancia esperada por azar
K	índice Kappa
CO	grado de concordancia
MP	método en placa
MT	método en tubo
MP vs MT	comparación del método en placa con el método tradicional

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN