

Método Simplificado para el Diagnóstico Presuntivo de las Enterobacterias

Por: Dr. José J. Gutiérrez Alfaro
y Bioanalista: Josefina Guariguata

Trabajo leído en las Primeras Jornadas de Microbiología realizadas en
Caracas del 20 al 24 de Junio de 1.967.

La identificación de las Enterobacterias se ha facilitado considerablemente hoy día con la ayuda de medios que permiten revelar la acción enzimática de estas bacterias sobre aminoácidos (Decarboxilación, Deaminación) sobre ciertas sustancias orgánicas (Malonato, ONPG), la acción del mecanismo de acción inhibidora de algunos tóxicos (KCN) sustancias químicas (Cetrimida) y la diferenciación del mecanismo de acción sobre los hidratos de carbono (Oxidación o fermentación).

Si esta gama de medios y la tipificación serológica es necesaria para una clasificación exacta, es desafortunadamente costosa y requiere un personal idóneo para su preparación, manejo y utilización.

Los diferentes profesionales que han recibido entrenamiento en nuestro servicio, nos han señalado los inconvenientes que ellos tienen para mantener una existencia adecuada de los medios de cultivos requeridos para una diferencia exacta, especialmente de las Enterobactereáceas, por ser éstas las más frecuentemente aisladas de casos clínicos y nos han alentado a buscar soluciones prácticas a este problema de bacteriología médica.

Analizando los magníficos trabajos sobre Enterobacterias que con gran capacidad científica y experiencia realizan en C. D. C. Edwards, Ewing y col, hemos seleccionado un grupo reducido de medios que de acuerdo con los análisis estadísticos por ellos realizados, han demostrado un índice elevado de positividad o negatividad.

En primer término, se considera la diferenciación de las bacterias aisladas de cualquier material que no sea heces.

Las colonias puras provenientes de medio de Kligler, luego de 24 horas de incubación, que hayan acidificado totalmente el medio, con producción de gas son transplantadas a los medios indicados en el cuadro N° 1, que para facilidad nemotécnica los hemos denominado I.M.R.I.N.O.

En este cuadro se incluye la motilidad que puede ser observada en el mismo medio utilizado para la detección del Indol empleando el medio SIM (la comprobación puede hacerse en gota pendiente.).

Cuando hay duda entre la diferenciación de los gérmenes Klebsiella y Aerobacter, es preferible hacer una comunicación preliminar señalando los gérmenes aislados como "Bacilos Gram negativos pertenecientes al grupo Klebsiella-Aerobacter" y enviar la bacteria aislada a un Centro de Clasificación para su estudio completo.

Cuando hay duda entre la diferenciación del A. cloacae, se puede utilizar lisina ya que todos los Aerobacter, incluyendo Hafnia, son lisina positivos y el A. cloacae es lisina negativa.

Los gérmenes sospechosos de pertenecer al género Proteus, se los transplanta a úrea-agar (Christensen) y se incuba por 2 a 4 horas. Las bacterias que presentan úrea negativa y H₂S negativo, se las pasa a los demás medios señalados en Cuadro N° 2 (regla nemotécnica: UFLAINO) y los H₂S + a los señalados en eu cuadro N° 3. (regla-nemotécnica: ULI).

La comprobación de presuntos grupos Arizona o Edwardsiella, debe ser hecha utilizando los medios aconsejables por Kauffman, Edwing y Edwards.

Aquellas bacterias que hidrolizan la úrea luego de dos a cuatro horas de incubación, serán resembradas en los medios indicados en los Cuadros N° 4 y 5 de acuerdo a su producción o no de hidrógeno sulfurado.

Todas las bacterias que acidifiquen el Kligler totalmente y además produzcan hidrógeno sulfurado, se transplantarán a los medios señalados en el Cuadro N° 4 (regla nemotécnica Fe II).

Hemos incluido fenilalanina en el Cuadro N° 4 porque la experiencia nos ha enseñado que muchos de los que se inician en la especialidad de la bacteriología, se les hace difícil pescar colonias puras a partir del medio de aislamiento y por ello los Kligler, glucosa y lactosa positivos con producción de H₂S, son debidos a una mezcla de gérmenes fermentadores de la lactosa con productores de H₂S generalmente Proteus.

LAS REGLAS NEMOTECNICAS SIGNIFICAN LO SIGUIENTE:

CUADRO Nº 1 - I M R Ino	Indol, M R V P, Ramnosa e Inositol
CUADRO Nº 2 - U F I A Ino	Urea, Fenilalanina, Indol, Arabinosa e Inositol
CUADRO Nº 3 - U L I	Urea, Lisina e Indol
CUADRO Nº 4 - Fe Li	Fenilalanina e Lisina

CUADRO 1
FERMENTADORES DE GLUCOSA Y LACTOSA CON PRODUCCION
DE GAS VARIABLE

	Indol	%	Rojo de metilo	de %	Voges Proskauer	%	Ramonosa 1-2 días	%	Inositol 1-2 días ácido	%	Gas	%	Motilidad	%
<i>Echerichia coli</i>	+	99	+	99,9	-	100	-	78	-	96,4	-	100	+	70
<i>Aerobacter aerogenes</i>	-	100	-	100	+	100	+	98,7	+	100	+	100	+	97,3
<i>Aerobacter Cloacae</i>	-	99,5	-	97	+	99,5	+	92	-	78,1	-	95,5	+	94,5
<i>Aerobacter 37°C</i>	-	100	+	75	+	30,9	-	100	+	97	-	98,5	+	97 *
<i>liquefaciens 22°C</i>			+	33,3	+	79,4							+	100
<i>Hafnia 37°C</i>	-	100	+	54	+	65	+	93	-	100			+	93
<i>alvei 22°C</i>			-	99	+	99								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	94	-	86	+	91,1	+	99,3	+	97,9	+	91,9	-	100

* de estos el 17,7% es + luego de 8-14 días de incubación.

CUADRO 2

**GLUCOSA FERMENTADA CON PRODUCCION DE GAS VARIABLE
LACTOSA NO FERMENTADA
UREA: Negativa**

		Urea % 1-2 días	Fenilalanina %	Indol	% Arabinosa	Inositol % acido	%
Subgrupo A	—	100	+ 97	+ 99,8	—	99,3
Providencia							
Subgrupo B	—	100	+ 97	+ 99,1	+	100
Serratia	—ó(+d)	(1)	— 94,9 (2)	— 100	— 99,5	+	70,2
Hafnia alvei	—	97 (3)	— 100	— 100	+ 96	—	100
Aerobacter liquefacienz	—	95,6	— 98,5	— 100	+ 92,6	+	97

(1) el 43, 2% es + tardiamente

(2) el 5, 9% es + débil

(3) de estos un 3% son + débil en 1-2 dias.

CUADRO 3

**GLUCOSA FERMENTADA CON PRODUCCION DE GAS VARIABLE
LACTOSA : Negativa.
H₂S : Positivo.**

	Urea	%	Lisina	%	Indol	%
Arizona	—	100	+ 100	—	—	98
Citrobacter	+	69,4	— 100	—	—	93,3
Edwarsiella tarda	—	100	+ 100	+	+	100

CUADRO 4

**FERMENTADORES DE GLUCOSA Y LACTOSA
H₂S : Positivo**

	Fenilalanina	%	Lisina	%
Arizona	—	100	+	100
Citrobacter	—	100	—	100

CUADRO 5

GLUCOSA: + CON PRODUCCION DE GAS VARIABLE
LACTOSA: —
H₂S : negativo.
UREA : positivo.

	Urea	%	Inositol	%	Indosol	%
<i>Proteus rettgeri</i>	+	100	+	98	+	100
<i>Proteus morgani</i>	+	100	—	100	+	100

CUADRO 6

GLUCOSA + CON PRODUCCION DE GAS
LACTOSA : Negativo.
H₂S : Positivo.
UREA : Positivo.

	Urea	%	Indol	%
<i>Proteus mirabilis</i>	+	95	—	99,1
<i>Proteus vulgaris</i>	+	97,5	+	97,5

C O P R O C U L T I V O S

Del Kligler o TSI se pasan las colonias a un medio para detección de úreasa según Christensen, el cual se incuba de dos a cuatro horas, transcurrido este tiempo los urea positivos se descartan.

Los urea negativos son transplantados a los medios adecuados (Cuadro N° 7).

Si se desea un resultado presuntivo, los urea negativos con producción de H₂S pueden aglutinarse con el antisuero polivalente para Salmone-llas y los H₂S negativos con antisuero polivalente para Shigellas.— Siempre toda identificación bioquímica debe comprobarse con la serologica y viceversa.

CUADRO Nº 7

	Salmonella (mayoría)	S. para- typhio A	S. typhi	Arizona	Edwar- siella	Citro- bacler	Shigella	Provi- dencia
Producción de Gas de Glucosa	+	+	-	+	+	+	-	D
Salicina	-	-	-	D	-	D	-	-
Lisina decarboxilasa	+	-	+	+	+	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+	+	-	+
Urea	-	-	-	-	-	D	-	-
H ₂ S	+	-	+ D	+	+	+	-	-
Indol	-	-	-	-	+	-	D	+
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato (Simmon's)	+	+	-	+	-	+	-	+
Malonato	-	-	-	+	-	D	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	+

Con el objeto de simplificar aún más el sistema propuesto hemos ensayado la utilización de papeles impregnados en reactivos que permiten realizar en poco tiempo las reacciones siguientes:

Investigación de la	CITOCROMOXIDASA
Investigación de la	UREASA
Deaminación de la	FENILALANINA
Decarboxilación de la	LISINA

Ya Beijerinck (19) en su auxanograma, utilizó sustancias químicas para diferenciación de los microorganismos.

En 1949, Snyder (20) presentó un método nuevo simplificado para diferenciación bacteriana mediante la utilización de papeles humedecidos en diversos reactivos y luego desecados. Tres reacciones son posibles observar:

- 1) Zona de difusión alrededor del papel
- 2) Cambio de color en el mismo
- 3) Reacciones que pueden ocurrir en el papel por agentes químicos

Soto en el mismo año 49 (21) llamó la atención sobre la economía y valor práctico de los discos de papel con carbohidratos para estudio de fermentación.

Knox (22), utilizó cinta de papel humedecida con manitol y sacarosa cubierta con una laminilla para apreciar la producción de gas en pruebas pantallas para las Salmonellas.

La utilización de papeles impregnados con diferentes sustancias, ha sido preconizado por diferentes autores Maxter, Bowen, etc.

Recientemente ha sido lanzadas al mercado, cintas de papel de aproximadamente 83 mm. x 6 mm., que según los fabricantes (1) están impregnados con reactivos estables y normalizados para producir una reacción coloreada en presencia de los organismos que posean las respectivas enzimas, para actuar sobre el correspondiente sustrato.

Estas Cintas presentan las siguientes ventajas:

- 1) — Son estables.
- 2) — Dan reacciones rápidas, entre 30 segundos y 6 horas.
- 3) — No se requiere la preparación de medios de cultivos especiales.

Requisitos Técnicos:

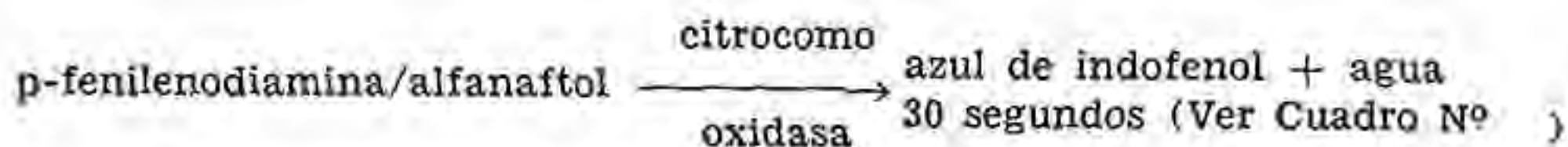
Para la utilización de estas pruebas presuntivas es necesario:

- 1) — Cultivos puros.
- 2) — De no más de 48 horas.
- 3) — Las colonias seleccionadas para la prueba deben de ser de 3 milímetros de diámetro.
- 4) — Si se ha utilizado medio líquido, tomar para la prueba un asa del sedimento después de haber botado el sobrenadante.
- 5) — No utilizar medios intensamente coloreados como el Levine.
- 6) — La prueba de Oxidasa (Pseudomona y Neisseria) y Fenilalanina-deaminasa (Proteus - Providencia) por su rapidez y sencillez, deben ser utilizadas previamente como orientación.

Investigación de la Citocromooxidasa (PathoTec):

Está basada en la oxidación y conjugación mediante la citocromooxidasa de la Dimetil p-fenilenodiamina con el alfa-naftol con producción de azul de indofenol según el esquema siguiente:

(1) — Fabricado por la Warner Chilcott, General Diagnostic Division, con los nombres de PathoTec CO, U, LD y P.— Agradecemos a sus representantes en Venezuela haber-nos suplido estas cintas para su ensayo.



Está reacción es positiva en:

Pseudomona, *Neisseria*, *Aeromonas*, *Vibrios*, *Alcaligenes*, *Flavobacterias*, *Mima polymorpha* variedad oxidans.— Esta prueba es muy útil en la diferenciación de las *Pseudomonas* no pigmentadas (Oxidasa Positiva) de las *Enterobacterias* (Oxidasa Negativa).

Técnica:

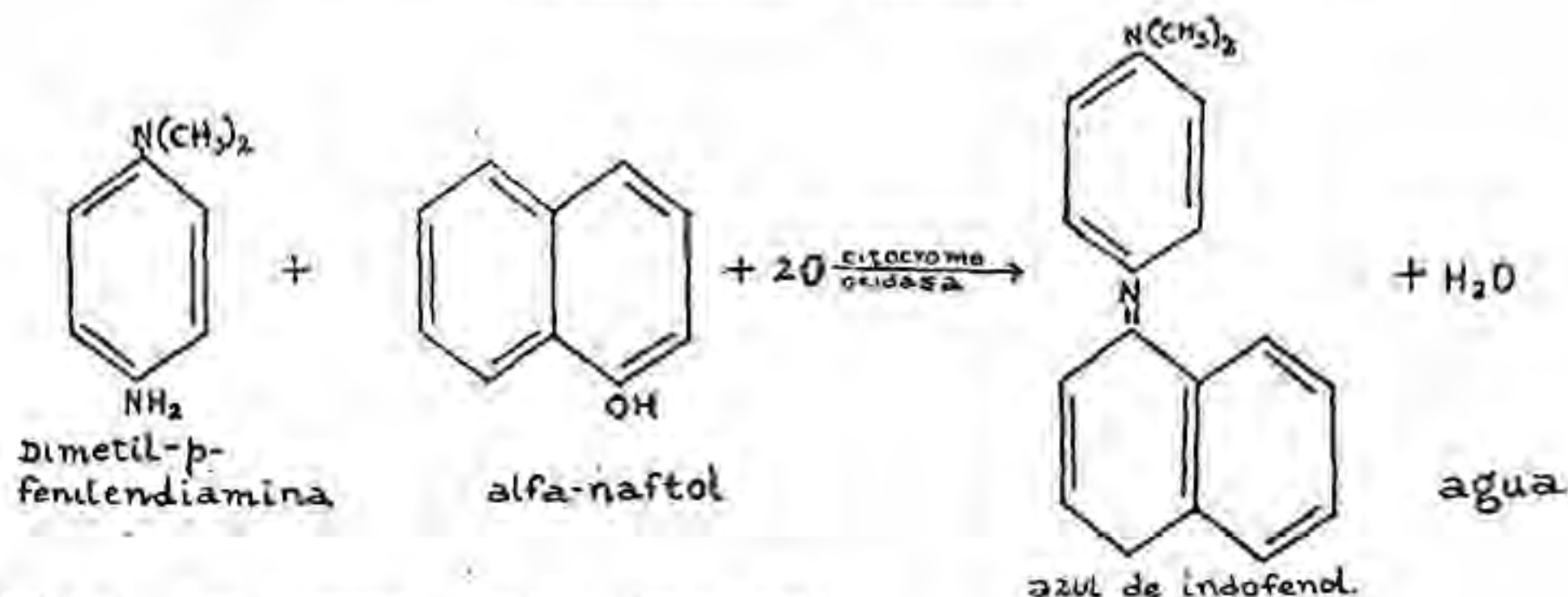
Las cintas de PathoTec CO, tienen dos bandas oscuras hacia uno de los extremos de un centímetro de largo separadas entre si por un espacio libre de un centímetro.

- 1) — Extraer con pinza flameada una tira reactiva del vial que la contiene.
- 2) — Colocarla en su caja de Petri.
- 3) — Con una asa de platino tomar una colonia a probar y frotarla durante varios-segundos sobre una de las bandas teñidas del papel.

Si la reacción es positiva, una coloración azul se presenta en 30 segundos. Un testigo positivo se practica en la otra superficie reactiva.

Puede utilizarse la zona reactiva del extremo para control y la otra para la reacción.

PATHOTEC-CO (investigación de citocromo-oxidasa) Pseudomonas ó Neisserias.



NOTA: use siempre control POSITIVO

RESULTADOS:

Positivos para:

Pseudomonas

Neisserias

y según Ewing y Johnson:

Aeromonas, *Alcaligenes*, *Vibrios*

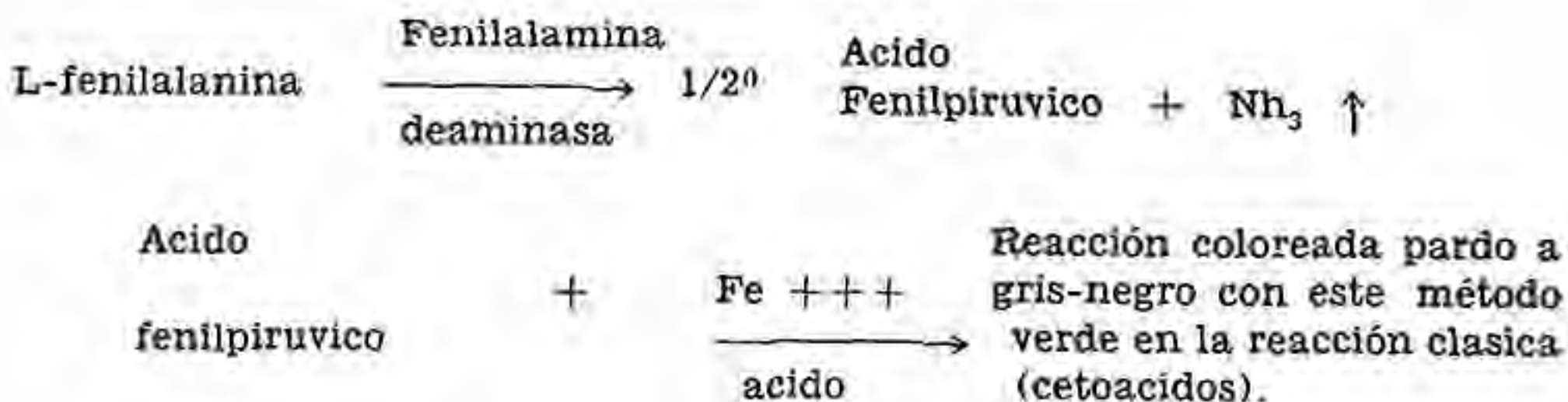
y algunas especies de *Flavobacterias*.

Esta prueba es valiosa para la diferenciación de *Pseudomonas* no pigmentadas (+) de *Enterobacteriaceas* (—), *Neisserias* (+) y *Mimeae* (—) exceptuando *Mima polymorpha* var. oxidans (+).

Un número de identificación puede escribirse en el lado libre de la tira. Una vez terminada la prueba, esterilizar las placas de Petri con las tiras reactivas.

Investigación Fenilalamina Deaminasa (PathoTec PD):

Esta reacción se investiga de acuerdo al siguiente esquema.



Esta reacción es positiva solamente con los grupos Proteus y Providencia.—Ver cuadro N°.

Técnica:

- 1) — Extraer con pinza flameada una tira de vial.
- 2) — Colocarla en caja de Petri.
- 3) — Con asa de platino tomar una colonia a probar y frotarla sobre una de las bandas teñidas de la tira durante 15 segundos.
- 4) — En la otra banda de la tira reactiva hacer un control negativo, para facilitar la interpretación de la coloración.
- 5) — Una reacción positiva puede leerse en 5 a 10 minutos.
El color de la reacción es pardo a gris-negro. Una vez terminadas estas reacciones se esterilizan las placas con las cintas utilizadas.

Investigación de la Lisina Decarboxilasa:

Se utiliza el PathoTec LD: Para esta reacción se tienen preparados de antemano tubos de ensayo de 100 por 13 con tapón de goma que contienen 0,4 de solución salina isotónica previamente esterilizadas en el autoclave (Utilizamos para este fin los tubos utilizados en Vacutainer que se adaptan muy bien al largo de la cinta.).

Técnica:

- 1) — Se emulsiona una asa cargada de cultivo en 0,4 cc. de suero salino.
- 2) — Se inserta una cinta de PathoTec LD sumergiendo el terminal amarillo en el suero.
- 3) — Incubarlo de 3 a 6 horas a 37° grados en baño-Maria.
- 4) — La reacción positiva está indicada por una coloración azul de prusia. Coloraciones amarillas o verdes, deben ser consideradas negativas.

Ver Cuadro N°

Esta reacción es positiva en:

- | | |
|--|---------------|
| 1) — Arizona | 3) — Hafnia |
| 2) — E. coli atípico y
Alkalescens-Dispar | 4) — Serratia |

Estos organismos poseen Lisina decarboxilasa, pero fermentan la lactosa lentamente o no.— Con excepción del grupo Arizona, pueden ser diferenciados de las Salmonellas por no producir H₂S.

E. coli, Klebsiella y Enterobacter, aunque poseen L. D. fermentan rápidamente la lactosa, por lo cual no hay la alcalinización producida por la Cadaverina y la reacción es negativa (falsa o negativa por neutralización).

El grupo Bethesda-Ballerup confundible con Salmonellas, no produce L. D.

Investigación de la Ureasa:

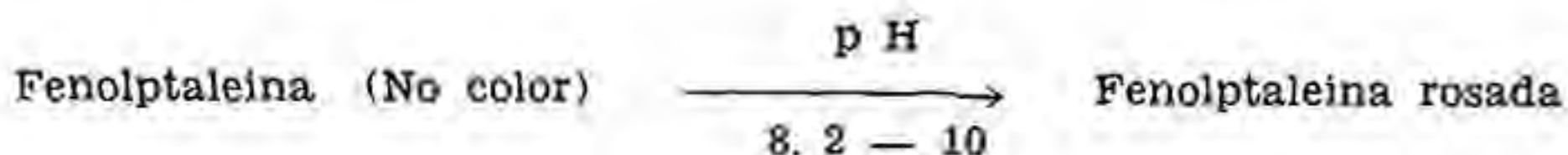
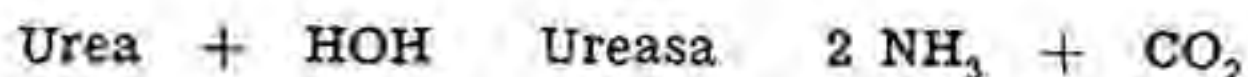
Se utiliza el PathoTec U:

Técnica:

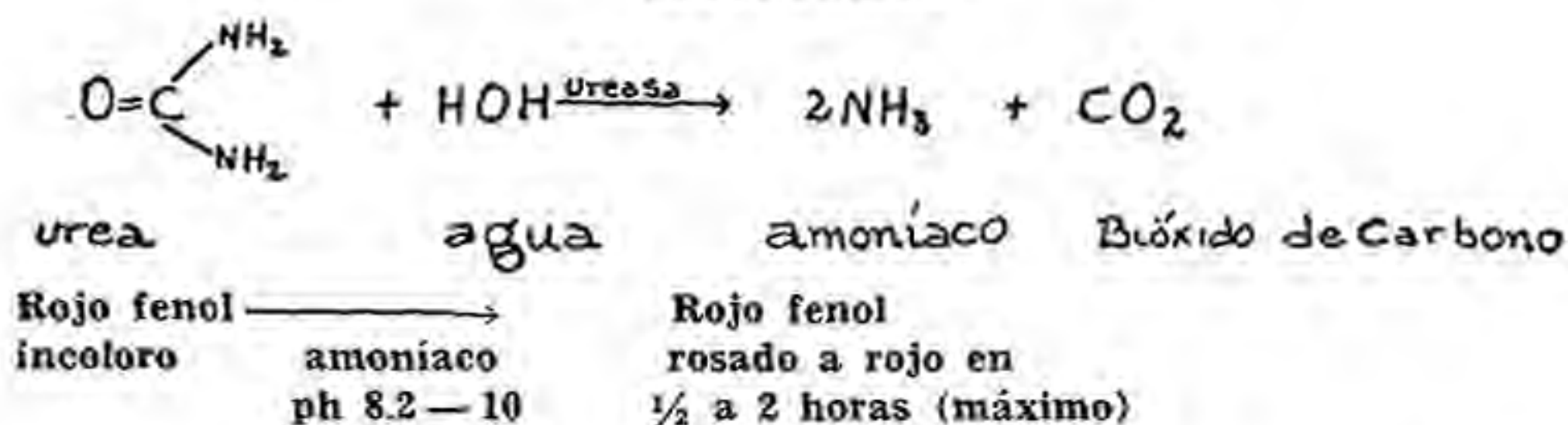
- 1) — En un tubo de 100 x 13 mm. estéril, tener previamente medido 0,2 ml.
- 2) — Emulsionar un asa cargada con la colonia por investigar (cultivos frescos.)
- 3) — Introducir hasta el fondo del tubo en contacto con la emulsión, una tira de PathoTec U. con el extremo opuesto al teñido de gris.
- 4) — Colocar en baño-maria a 37° por 2 horas. Reacciones positivas se manifiestan por coloración rosada o roja del indicador (alcalinización de la fenoltaleína).

Klebsiellas y Enterobacter pueden dar reacciones positivas tardías, por eso es preciso hacer la observación hasta límite de 2 horas.

El mecanismo de la reacción es el siguiente:



PATHOTEC-U (prueba para investigación de ureasa).
Grupo Proteus



Las Pruebas realizadas con los PathoTec coinciden con las pruebas clásicas con la excepción de la Lisina Decarboxilasa por los motivos siguientes: Teniendo en la composición del substrato lactosa, las bacterias fermentadoras de este azúcar dan con este método-falsas negativas, debido a que la producción del ácido láctico neutraliza la acción alcalinizante de la Cadaverina y por lo tanto el azul de bromotimol no vira al azul que indica la positividad de la reacción. Esto sucede con E. coli, Klebsiella y Aerobacter.

Esta discordancia hay que tenerla presente para la correcta interpretación de la reacción. Este artificio ideado por los fabricantes es muy útil para eliminar, cuando se investiga Salmonellas, otros germenés como los citados anteriormente, que solo tienen interés en casos especiales.

Johnson, Kunz, Barron y Ewing (18) recientemente han publicado un sistema de diferenciación bioquímica de las Enterobacteriaceae teniendo como carácter fundamental la Lisina - Hierro - Agar y cinco grupos bioquímicos diferenciales.

En nuestro medio hemos confrontado problemas con las lecturas sobre todo de las deaminaciones en Lisina-Hierro-Agar y que atribuimos hasta ahora, a posibles alteraciones del medio durante el transporte y almacenamiento. Sabemos en que algunas partes del interior existe el mismo problema.

RESUMEN

Alentados por el personal de Médicos y Bioanalistas que hacen pasantías por nuestro Servicio, analizando los magníficos trabajos científicos y estadísticos que en el C. D. C. realizan Edwards, Ewing y colaboradores, hemos elaborado y puesto en práctica con muy buenos resultados, el Sistema de Clasificación para las Enterobacterias, motivo de la presente comunicación.

Para las muestras-otros-que heces se emplean ocho medios diferenciales utilizados así a partir del Kligler:

- 1— Fermentadores de Glucosa y Lactosa con gas variable +/+
 Indol, MVRP, Ramnosa, Inositol, Movilidad
- 2— Glucosa fermentada con Gas variable: +/-
 Urea, Fenilalanina, Indol, Arabinosa, Inositol

- 3— Glucosa fermentada con gas variable y H₂S: +/—H₂S
 Urea, Lisina, Indol
- 4— Fermentadores de Glucosa y Lactosa con H₂S: +/+H₂S
 Fenilalanina y Lisina.

Para facilitar su memorización y facilitar el trabajo estos grupos se han identificado respectivamente con las siglas siguientes:

I M R Ino
 U F I A Ino
 U L I
 Feli

Para los coprocultivos hay que agregar tres medios: Salicina, Citrato y Malonato según se indica en el Cuadro N° 7.

Con el objeto de simplificar más aún y hacerlo assequible a los pequeños Lab. se indica el procedimiento a seguir utilizando cintas de papel reactivo para la Urea, Fenilalanina y Lisina decarboxilasa.

Nuestro deseo estará cumplido si el sistema hoy presentado contribuye a permitir la identificación de este importante grupo de bacterias en los más pequeños Laboratorios y en las zonas más aisladas de nuestro país.

Sabremos agradecer muy sinceramente los comentarios favorables o adversos de los colegas Bacteriólogos al utilizarlo en sus investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.—Biochemical Test in Diagnostic Bacteriology with new PathoTec test papers. 1964
- 2.—C. Rosso, N. Ricardino—Observations on Microbiological Research Methods. Nouvi Annali D'Igiene e Microbiologia.—XVI. N° 5, septiembre-octubre 1.965.
- 3.—Johnson, Jane G., Kunz Lawrence J., Barron Winfred y W. H. Ewing.—Biochemical Differentiation of the Enterobacteriaceae with the aid of Lysine Iron Agar.—Applied Microbiology, Vol. 14, N° 2, pág. 212-217.
- 4.—W. E. Ewing.—The Biochemical Reactions of Members of the Genus Salmonella.—C.D.C. Lecture on Enterobacteriaceae, Diciembre 1966
- 5.—W. H. Ewing, 1.966—Differential Reactions of Enterobacteriaceae.—C.D.C. Lectures.
- 6.—P. R. Edwards y Mary A. Fife.—Lysine Iron Agar in the Detection of Arizona Cultures.—C.D.C. Publications, 1.961.
- 7.—Rudolph Hugh y Einar Leifson.—The Taxonomix Significance of Fermentative Versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by various Gram Negative Bacteria.—Journal of Bacteriology, Vol. 66, pág. 24-26.
- 8.—Leon Le Minor.—Le diagnostic de Laboratoire des Enterobacteries, 2da. Edition.
- 9.—Edwards, P. R. y Ewing W. H. Identification of Enterobacteriaceae, Burgess Publishing Co. 1.962.
- 10.—Kauffman F.—Munksgaard.—Enterobacteriaceae.
- 11.—W. H. Ewing, I. Suassuna and I. R. Suassuna.—The Genus Proteus. C. D.C. 1.960.
- 12.—W. H. Ewing.—Differentiation of Members of the Genera Salmonella Arizona and Citrobacter by Biochemical Methods.—C.D.C. 1965.
- 13.—W. H. Ewing, B. R. Davis and R. W. Reairs, C.D.C. Laboratory Manual 1959.
- 14.—P. R. Edwards y W. H. Ewing.—Isolation and Grouping of Salmonella and Shigella cultures, 1.962.
- 15.—W. H. Ewing, Lecture outline Series.—1.966.
- 16.—W. H. Ewing y P. R. Edwards.—The Principal Divisions and groups of Enterobacteriaceae and their differentiation.—1962
- 17.—The Biochemical reaction of Arizona arizonae.—U. S. Public health Service.—1.965.
- 18.—J. G. Johnson, Lawrence Kunz, Barron y Ewing.—Applied Microbiology, Vol. 14, N° 2, 1.966.
- 19.—Beijerinck, M. W.—Arch. Neelanderlaisses. 23:367, 1.880.
- 20.—Snyder, M. L.—Science.
- 21.—Soto, O. B.—Puerto Rico J. Pub. Health, 25:96, 1949.
- 22.—Knox, R. J.—Path. and Bact. 61: 343, 1.949.