

Vigilancia epidemiológica por medio de la biotipificación.

Propuesta basada en un estudio de aislamientos de la tribu *Klebsiellae*.

Federico Díaz G., M. D.¹ y Alvaro Uribe P., M. D.²

EXTRACTO

Se presentan los resultados de la clasificación en especies y biotipos, con el sistema MICRO-ID, de 361 aislamientos presuntamente identificados por métodos bioquímicos tradicionales como de la tribu *Klebsiellae*. Se halló que la identificación presuntiva había sido acertada en 96.5% de los casos; predominaron las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*; cada especie estuvo conformada por varios biotipos pero unos pocos constituían la mayoría de los aislamientos. Se hace énfasis en que es posible la vigilancia epidemiológica fundamentada en la biotipificación y en la viabilidad de ésta en el laboratorio hospitalario recurriendo a alguno de los estuches miniaturizados y estandarizados de reacciones bioquímicas.

INTRODUCCION

La tribu *Klebsiellae*, de la familia Enterobacteriaceae, comprende varios géneros, a saber: ***Klebsiella***, ***Enterobacter***, ***Serratia*** y ***Hafnia***; cada género a su vez, excepto ***Hafnia***, abarca varias especies¹. Los microorganismos de esta tribu son habitantes normales del intestino humano o animal así como del ambiente; algunos de ellos, por ejemplo ***Klebsiella pneumoniae***, han sido reconocidos tradicionalmente como agentes de enfermedad humana. En años recientes varias especies se han destacado como productoras de infecciones oportunistas².

En el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín, se identifican los aislamientos de enterobacterias con base en series bien conocidas de reacciones bioquímicas (triple azúcar hierro, lisina hierro agar, citrato de Simmons, agar úrea, medio de Sim, producción de indol, etc.). Los aislamientos de la tribu *Klebsiellae* se designan como ***Klebsiella*** cuando son inmóviles, ***Enterobacter*** en caso contrario y ***Serratia marcescens*** si la colonia exhibe el pigmento rojo púrpura clásicamente descrito. Este procedimiento brinda información útil para el manejo rutinario de los pacientes pero no hace aportes al aspecto epidemiológico de las infecciones hospitalarias.

La identificación de los aislamientos de la tribu *Klebsiellae* y de las enterobacterias en general hasta el nivel de especie es muy importante desde el punto de vista epidemiológico. En efecto, si se ignora la especie no es posible mantener una vigilancia apropiada de brotes en una institución; para este propósito es indispensable emplear, además, algún método de tipificación de los aislamientos.

Hay diversos sistemas de tipificación bacteriana como los que dependen de la susceptibilidad a los bacteriófagos o a las bacteriocinas, de la determinación en la composición antigénica, de las exigencias nutricionales, o del comportamiento frente a una batería de reacciones bioquímicas^{3,6}; todos cumplen el mismo propósito: definir la identidad o diversidad de los aislamientos de una especie dada.

La tipificación que se basa en reacciones bioquímicas (biotipificación) es el sistema más al alcance de los laboratorios corrientes; se recurre para ella al empleo de alguno de los estuches estandarizados y miniaturizados hoy disponibles para muchas bacterias; salvo por su alto costo tienen la ventaja de poner reactivos idénticos al alcance de todos los laboratorios, así como manuales de identificación que se basan en el análisis de innumerables cepas por medio del computador; "...los perfiles numéricos con que se identifican las bacterias en varios de los estuches miniaturizados de reacciones bioquímicas son biotipos que se pueden usar provechosamente para

1. Profesor Titular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Salud, Universidad de Antioquia, Medellín.

2. Director del Laboratorio de Bacteriología, Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín.

valorar la incidencia de cada uno en los aislamientos de una especie dada...¹⁸

En este estudio se empleó el sistema llamado MICRO-ID (General Diagnostic, Morris Plains, New Jersey) con el objetivo de definir para propósitos de vigilancia epidemiológica las especies y biotipos de los aislamientos de la tribu *Klebsiellae* hechos durante un período de 6 meses en el Hospital Universitario.

MATERIALES Y METODOS

Descripción del sistema: El MICRO-ID consta de 15 reacciones bioquímicas, a saber: fermentación de sorbitol, inositol, adonitol y arabinosa; hidrólisis de esculina, úrea y o-nitrofenil-beta D galactopiranosido; oxidación del malonato de sodio; descarboxilación de la lisina y la ornitina; desaminación de la fenilalanina; formación de indol y ácido sulfhídrico; reducción de los nitratos y producción de acetoina. Los resultados obtenidos con cada cepa forman un código numérico que se compara con el de cepas conocidas, incluidas en un manual especialmente diseñado que da información sobre tres puntos, a saber: a) la identificación más probable del microorganismo; b) la similitud del cultivo desconocido con el cultivo típico; c) el grado de separación entre la opción más probable y otras posibles. Con esta información se establecen 11 categorías⁹ cuya seguridad diagnóstica disminuye de la primera a la undécima, así:

I. Identificación excelente; separación excelente. Todas las pruebas concuerdan con la primera opción.

II. Identificación excelente; separación excelente. Las reacciones atípicas son menores.

III. Identificación extremadamente buena; separación excelente.

IV. Identificación muy buena; separación buena. Todas las pruebas concuerdan con la primera opción.

V. Identificación buena; separación buena. Las reacciones atípicas son menores.

VI. Identificación buena; separación suficiente. Las reacciones atípicas son menores a moderadas.

VII. Identificación aceptable; separación buena.

VIII. Diagnóstico razonable; muy buena separación; bioquímicamente atípico.

IX. Buena concordancia con una especie; separación aceptable.

X. Más de una opción es una identificación posible.

XI. La primera opción es altamente atípica y no separable.

Cepas estudiadas: Entre marzo y octubre de 1982, en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario San Vicente de Paúl, se hicieron 361 aislamientos, presuntamente identificados como de la tribu *Klebsiellae*, provenientes de muy diversos especímenes y servicios hospitalarios y que se sometieron al proceso de MICRO-ID, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para definir sus especies y biotipos.

RESULTADOS

Categorías: En esta serie estuvieron representadas 8 de las categorías posibles (Cuadro 1); 80.3% de las cepas pertenecieron a las 4 primeras. Hubo 4 cepas en que sólo se logró llegar a la identificación de género.

Especies: Excluyendo 20 casos de la categoría X donde es posible más de una opción, en el Cuadro 2 se presentan las especies de los restantes 341 aislamientos. Se destacan el predominio de *Klebsiella pneumoniae* y de *Enterobacter cloacae*; la presencia de *Klebsiella oxytoca* y de *Klebsiella ozaenae* y la infrecuencia de *Serratia marcescens*; 12 cepas (3.5%) pertenecieron a géneros de otras tribus.

Cuadro 1
Categorías* de 361 Aislamientos Presuntamente Identificados como *Klebsiella* o *Enterobacter*. Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, marzo-octubre, 1982.

Categoría	Aislamientos	Porcentaje
I a IV	290	80.3
V, VII, VIII, X	67	18.6
Diagnóstico de género solamente	4	1.1
Total	361	100.0

* Según el Manual MICRO-ID

Cuadro 2
Especies de 341^a Aislamientos Presuntamente Identificados como *Klebsiella* o *Enterobacter*. Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, marzo-octubre, 1982

Especie	Aislamientos	Porcentaje
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	225	66.0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	29	8.5
<i>Klebsiella ozaenae</i>	6	1.7
<i>Enterobacter cloacae</i>	47	13.8
<i>Enterobacter</i> ^b (otras especies)	9	2.6
<i>Serratia marcescens</i>	10	2.9
<i>Serratia</i> ^c (otras especies)	2	0.6
<i>Hafnia alvei</i>	1	0.3
Aislamientos no pertenecientes a la tribu <i>Klebsiellae</i> ^d	12	3.5
Total	341	100.0

a. Se excluyeron 20 aislamientos de la categoría X porque en ellos eran posibles 2 opciones.

b. *E. agglomerans*, *E. aerogenes*

c. *S. rubidea*, *S. liquefaciens*

d. *E. coli*, *C. freundii*, *C. diversus*, *S. sonnei*.

Biotipos: No hubo homogeneidad en el comportamiento bioquímico de las diversas especies; los aislamientos de *Kleb-*

Cuadro 3
Porcentaje de Aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca*
Constituido por los Biotipos Predominantes. Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín,
marzo-octubre, 1982

Especie	Biotipos	Aislamientos	Porcentaje		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	60777-60677	208	92.4		
	60377-60773				
	60277-60577				
	60775				
	otros 12 bio- tipos				
Total	225	100.0			
<i>Enterobacter cloacae</i>	61231-61271	28	59.6		
	61235-41271				
	61371				
	otros 14 bio- tipos				
	Total			47	100.0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	62677-62777	26	89.6		
	62077-62477				
	otros 3 bio- tipos				
	Total			3	10.4
	Total			29	100.0

siella oxytoca exhibieron 7 biotipos y los de ***Klebsiella pneumoniae*** y ***Enterobacter cloacae*** 19 biotipos cada uno. Sin embargo, ciertos biotipos predominaron en cada una de las especies como muestra el Cuadro 3 donde se aprecia que de los biotipos de ***Klebsiella pneumoniae*** constituyeron 92.4% de sus aislamientos; 5 de los de ***Enterobacter cloacae*** formaron 59.6% de las cepas de esta especie y 4 de los 7 de ***Klebsiella oxytoca*** 89.6% de las cepas clasificadas como de esta especie.

DISCUSION

Los métodos miniaturizados, estandarizados y con identificación de especie basada en análisis por computador ofrecen ventajas sobre los tradicionales de llevar a efecto las pruebas bioquímicas. Aunque no se pueden recomendar sin reservas, dado su alto costo, son de innegable utilidad para definir las especies y biotipos de los aislamientos con propósitos epidemiológicos. Esta información es fundamental para las labores de un Comité de Infecciones pues permite sospechar precozmente la ocurrencia de brotes al aislar especies o biotipos no habituales en la institución o notar un incremento, por encima de lo corriente, en la frecuencia de alguno (s) de ellos. Se logra asimismo, mediante la definición de los biotipos, puntualizar en estos brotes los reservorios, las fuentes de infección y las vías de diseminación de los microorganismos.

El MICRO-ID se ha empleado previamente para propósitos de biotipificación¹⁰. En efecto, Edberg y colaboradores¹¹ hallaron

que es rápido y confiable para definir los biotipos de ***Haemophilus influenzae***, algunos de los cuales se encontraron como predominantes en casos de bacteremia, meningitis y conjuntivitis.

Dados el costo de los sistemas de tipificación y la posibilidad que haya ciclos en la diseminación de especies o biotipos en un hospital, se puede proponer el muestreo periódico de las cepas y la restricción del procedimiento a las de un determinado género, especie o tribu, para que el Comité de Infecciones pueda evaluar, en un marco de austeridad, la utilidad que tiene la tipificación. Por ejemplo, introducir la biotipificación sólo para los aislamientos de ***Escherichia coli*** hechos de pacientes hospitalizados, en un mismo día de cada semana, o una semana dada de cada mes; con base en la experiencia obtenida el Comité decidirá la conducta a seguir en el futuro.

Cabe anotar que el Instituto Nacional de Salud de Colombia brinda asesoría en la tipificación de cepas por sistemas que no están al alcance del laboratorio hospitalario común; por ejemplo, de las cepas de ***Salmonella enteritidis*** por medio de serotipificación, o de las de ***Pseudomonas aeruginosa*** por bacteriocinotipificación.

Cuando un laboratorio hospitalario practica las pruebas de sensibilidad de las bacterias por métodos estandarizados y cuantitativos (concentración inhibitoria mínima), la información que se acumula a través del tiempo sobre patrones de

resistencia es también de utilidad epidemiológica. En efecto, el aumento de la frecuencia de un patrón de resistencia descubierto previamente puede indicar un brote y el hallazgo de un patrón completamente nuevo sugiere que una cepa (tipo) antes desconocido en la institución ha entrado en ella.

En los aislamientos de esta serie, 96.5% se habían identificado correctamente como de la tribu *Klebsiellae* por los procedimientos bioquímicos tradicionales. En otros términos, la serie bioquímica usual sigue siendo confiable en bacteriología de rutina, además de económica; por ello, a juicio de los autores, la introducción de los sistemas de tipificación se ha de enmarcar en las necesidades de la vigilancia epidemiológica, particularmente si los recursos son limitados. Es oportuno recordar, sin embargo, que la información así lograda tiene también relevancia clínica y terapéutica. La primera porque algunas especies (*Klebsiella ozaenae* y *Klebsiella rhinoscleromatis*) se asocian con cuadros peculiares y porque conocer la especie posibilita la distinción entre una recaída y una reinfección en infecciones del tracto urinario¹². La segunda porque la información sobre los patrones de sensibilidad de las especies prevalentes en cada hospital capacita a los clínicos para conducir más racionalmente la terapia, en el caso individual, si se dispone del dato de la especie pero no de la prueba de sensibilidad.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Saúl Franco y Germán González por sus valiosas sugerencias en la preparación de este manuscrito; a los proveedores del MICRO-ID.

SUMMARY

Results are presented on biotyping of 341 isolates of the tribe *Klebsiellae*. Predominant species were *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae*; each species comprised multiple biotypes, of which only a few were frequently encountered. The feasibility of epidemiological surveillance based on biotyping by means of miniaturized kits of biochemical reactions is emphasized.

REFERENCIAS

1. Skerman, V.B.D., McGowan, V. y Sneath, P.H.A. ed. **Approved lists of bacterial names**. American Society for Microbiology. Washington, 420 pp., 1980.
2. Grieco, M.D. ed. **Infections in the abnormal host**, Yorke, 1035 pp., 1980.
3. Sidberry, H.D. y Sadoff, J.C.: Pyocin sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* and its feasibility as an epidemiological tool. **Infect Immun** 15: 628-637, 1977.
4. Blair, J.E. y Williams, R.E.O.: Phage-typing of staphylococci. **Bull WHO** 24: 771-784, 1961.
5. Shrinivas, N.: Aeruginocine typing of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Pathol** 27: 92-96, 1974.
6. Díaz, F. y Neter, E.: *Pseudomonas aeruginosa*: serogroups and antibody response in patients with neoplastic diseases. **Am J Med Sci** 259: 340-345, 1970.
7. Díaz, F., Álvarez, L., Ortega, M., Uribe, A. y Ochoa, B.: Infección de superficies quemadas. II Epidemiología de la colonización por *Pseudomonas aeruginosa*. **Ant Med** 23: 397-412, 1973.
8. Balows, A e Isenberg, H.D. ed. **Biotyping in the clinical microbiology laboratory**. Thomas, Springfield, 116 pp. 1978.
9. Microbiological Identification System, New Jersey, General Diagnostics, 1979.
10. Edberg, S.C., Melton, E. y Singer, J.M.: Rapid biochemical characterization of *Haemophilus* species by using the MICRO-ID. **J Clin Microbiol** 11: 22-26, 1980.
11. Welch, D.F., Ahlin, P.A. y Matsen, J.M.: Differentiation of *Haemophilus* spp. in respiratory isolate cultures by an indole spot test. **J Clin Microbiol** 15: 216-219, 1982.
12. Kory, M. y Waife, S.O. ed. **Kidney and urinary tract infections**. Lilly, Indianapolis, 1971.