

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Evaluación de la segunda versión del programa Entero ID, para la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* con importancia clínica .

Informe de Tesis

Presentado por:

Angela Lissette Chew Soza

Para optar al título de:

Químico Biólogo

Guatemala, octubre del 2003

D. L.
06
T(2205)

**HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Carlos Enrique Serrano	Vocal IV
Br. Claudia Lucía Roca Berreondo	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

AL PADRE CREADOR DEL UNIVERSO

A MIS PADRES Como agradecimiento a sus esfuerzos, cariño y apoyo constante

A MI ESPOSO Por ser fuente inagotable de amor y comprensión

A MIS HERMANOS Olga y Rony por su ejemplo y apoyo

A MIS SOBRINOS Ivonne Aurora y Carlos Alejandro

A LAS FAMILIAS López Bernard, López López y en especial a la familia López Ríos, por su cariño especial.

A MIS AMIGOS Neto, Simón, Pascual, Casiano y Claudia, por su apoyo incondicional.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS como una pequeña retribución de lo mucho que me ha dado.

A MIS CATEDRÁTICOS Y MAESTROS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer la valiosa colaboración de las siguientes personas:

A mi Asesor, Lic. Martín Gil, por compartir esta inquietud y dedicar parte de su tiempo en desarrollarla.

A mis revisoras, Licda Karin Herrera y Licda Maria del Carmen Bran, por sus valiosos aportes para este estudio.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por proporcionar las cepas utilizadas en el presente estudio.

A la Directora de la Escuela de Química Biológica, Licda. Alba Marina de García por su invaluable colaboración.

A la compañía Alfredo Herbruger Jr. & Cia Ltda. en especial a la Licda. Linneth de Noguera, por su apoyo y comprensión.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
IV. Justificación.....	22
V. Objetivos	23
VI. Hipótesis.....	24
VII. Materiales y Métodos.....	25
VIII. Resultados	31
IX. Discusión de Resultados	34
X. Conclusiones	35
XI. Recomendaciones	36
XII. Referencias Bibliográficas.....	37
XIII. Anexos.....	41

I. RESUMEN

Debido a la gran variedad de microorganismos existentes, la identificación actual de las enterobacterias requiere de mucha correlación clínica y por lo tanto, de experiencia adquirida. Adicionalmente debido al flujo de trabajo es necesario que el proceso de identificación se realice en una forma ágil. Una herramienta de gran utilidad para todas las ramas de la ciencia lo constituye el uso de la computadora. El uso de sistemas computarizados para la identificación microbiológica permite que la generación de resultados sea más rápida, eficiente, ordenada y reproducible.

Partiendo de lo anterior en el año de 1995 se creó un programa computarizado llamado Entero ID , por estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, el cual tenía como objetivo el identificar enterobacterias de importancia clínica. En el año 2000 se realizó una nueva versión del programa Entero ID, denominado Entero ID2.0. En esta nueva versión se modificó el algoritmo de identificación, permitiendo que el proceso de identificación sea más rápido y con menos generación de errores, adicionalmente esta versión se realizó en ambiente Windows lo cual permite que el programa sea más fácil de utilizar por el usuario. Otra modificación realizada al programa Entero ID2.0 fue la corrección y actualización de las bases de datos de las imágenes bioquímicas de las bacterias.

Esta herramienta se basa en la utilización de una batería de pruebas bioquímicas, que incluye Agar Triple Azúcar hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Movilidad-Indol-Urea (MIU), Citrato, Ornitina, Lisina, Arginina y Malonato. La imagen obtenida es introducida en el programa, el cual por medio de un algoritmo matemático, le asigna un código, este es luego comparado

automáticamente con los códigos correspondientes a cada enterobacteria de importancia clínica, al encontrar una coincidencia el programa la reporta.

En el presente trabajo se evaluó la efectividad de identificación de esta nueva versión del programa (Entero ID 2.0) , utilizando un estudio tipo ciego y baterías bioquímicas, para la identificación de 100 cepas de enterobacterias con importancia clínica, todas ellas escogidas a conveniencia, con un set de repetición y cuya identidad fue previamente confirmada por otro sistema (Vitek o API).

La versión Entero ID 2.0, identificó el 100%, mientras que la primera versión solamente identificó un 94%. El análisis de los resultados se realizó a través de una prueba de ji-cuadrada de homogeneidad, en la cual se encontró que no existía ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los dos programas. Sin embargo, la diferencia del 6% observada entre el porcentaje de identificación de Entero ID 2.0 (100%) y el porcentaje de identificación de Entero ID (94%), puede atribuirse a las mejoras realizadas en la base de datos de la segunda versión.

II. INTRODUCCIÓN

Debido a la gran variedad de microorganismos existentes, la identificación actual de las enterobacterias requiere de mucha correlación clínica y por lo tanto, de experiencia adquirida. Además, el gran flujo de trabajo hace necesario que esta identificación se realice en forma más rápida y efectiva.

Una herramienta de gran utilidad para todas las ramas de la ciencia lo constituye el uso de la computadora y métodos informáticos para el procesamiento de datos y la agilización de la presentación de los mismos. Una de las ventajas que ofrecen los sistemas informáticos es que pueden ser comprendidos o pueden estar diseñados para diferentes niveles de preparación académica y supervisado por un profesional especializado en la materia. Los pocos programas para la identificación de microorganismos que existen en el mercado tienen la desventaja de no estar al alcance económico de todos los laboratorios clínicos del país, y en algunos casos, para su funcionamiento requieren de un equipo muy sofisticado. El programa EnteroID, fue creado en el año de 1995, por estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, para solventar dicha deficiencia, sin embargo en el año 2000, fue creada una nueva versión del sistema de identificación denominada Entero ID 2.0 , esta se encuentra escrita en un lenguaje de programación diferente al utilizado para la primera versión, lo cual nos permite un funcionamiento más rápido y una mejor utilización de la memoria, además una mayor flexibilidad y accesibilidad para el usuario. Se ha optimizado el sistema de identificación utilizando un algoritmo más simple al de la versión anterior , esto ofrece una gran ventaja como lo es la disminución de errores y mayor rapidez de identificación. Otra de las diferencias que presenta la nueva versión a la anterior es la de poder manejar o gestionar

los resultados, lo cual se refiere a que las identificaciones pueden ser guardadas en un archivo el cual contiene información adicional sobre la muestra, para poder realizar posteriores estudios epidemiológicos.

En el presente trabajo se evaluó la efectividad de identificación de esta nueva versión del programa (Enter ID 2.0) , utilizando un estudio tipo ciego y baterías bioquímicas, para la identificación de 100 cepas de enterobacterias con importancia clínica, todas ellas escogidas a conveniencia, con un set de repetición y cuya identidad fue previamente confirmada por otro sistema (Vitek o API). El análisis de los resultados se realizó a través de una prueba de ji-cuadrada de homogeneidad.

III. ANTECEDENTES

A. Enterobacterias

Es conocido que enterobacterias es el nombre que se le da vulgarmente a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual está constituida por bacilos gram negativo que no forman esporas y son de pequeño tamaño (de 2-3 por 0.4-0.6 micrones). Pueden poseer o no flagelos peritricos. La formación o la producción de cápsulas está limitada a los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*(1).

Son especies bacterianas que habitan en el intestino grueso del hombre y animales, suelos, agua y materia en descomposición. Crecen en los medios Extracto de Carne o Peptona sin agregarle suplementos; y en Agar Maconkey. Su crecimiento es aeróbico y anaeróbico, fermenta la glucosa y otros carbohidratos y, a menudo producen gas. Son catalasa positivo, oxidasa negativo, reducen los nitratos a nitritos, poseen una estructura antigénica compleja, además de diversas toxinas; y tienen un porcentaje de 33-59% de Guanina más Citosina (2-4).

Los principales géneros de la familia *Enterobacteriaceae* son: *Shigella* , *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Cedecea*, *Koserella*, *Rahnella* y *Tatumella* (1,3).

Desde el punto de vista clínico, las enterobacterias son importantes ya que causan entre otras enfermedades: abscesos, neumonía, infecciones en las vías urinarias, intestinales y de heridas, meningitis

y septicemia (2-7). Es por ello que la identificación exacta de las especies que causan las anteriores patologías es de gran valor para escoger los agentes antimicrobianos correctos, para el pronóstico, para el reconocimiento del peligro potencial de los contactos y la investigación epidemiológica (1,8).

B. Métodos de identificación bacteriana

Clínicamente ha sido útil e importante dividir la familia *Enterobacteriaceae* en patógenos intestinales y patógenos oportunistas. Los primeros son enterobacterias que no forman parte de la microbiota del intestino grueso como *Shigella* y *Salmonella*. Los segundos sí pertenecen a la microbiota del intestino grueso, pero para llegar a ser considerados como agentes infecciosos necesitan de una alteración en la respuesta inmune del hospedero (9,10).

Los métodos de diagnóstico empleados que se basan en la fisiología bacteriana, han desarrollado en el transcurso del tiempo una gama de pruebas bioquímicas, para identificar la especie causante de la patología. Esto es posible debido a que cada especie tiene una imagen característica, la cual se encuentra plasmada en tablas estandarizadas para cada set de pruebas.

El método tradicional de la identificación bioquímica comprende un set de pruebas de las cuales las más comúnmente utilizadas son las siguientes (2,3):

1. Agar Lisina Hierro (LIA)

Este ensayo permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además de la producción

de H_2S y es más sensible que el TSI (Agar Triplice azúcar Hierro) para la detección de H_2S . Es muy utilizado para descartar *Salmonella* de aislamientos primarios.

Durante las primeras etapas de la incubación el fondo virará el indicador de pH del medio al ácido (amarillo) por la fermentación de la glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio o un viraje al alcalino (púrpura).

En la desaminación se produce un ácido carboxílico y NH_3 , se visualiza en la superficie por la aparición de un color rojo. La producción de ácido sulfhídrico a partir de tiosulfato se pone en evidencia por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro.

2. Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

Este es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la detección de la producción de H_2S . Es un medio útil para la identificación de enterobacterias (2,3).

El medio se prepara en forma de pico de flauta, esto determina 2 cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada (pico) expuesta en toda su superficie es aerobia y la porción inferior (fondo) está protegida del aire y es relativamente anaerobia.

La porción inclinada del tubo que está expuesta al oxígeno atmosférico tiende a tornarse alcalina (roja por el rojo fenol) por la utilización aerobia de las peptonas.

En el fondo del tubo, donde no hay oxígeno, la degradación protéica es mínima y se pueden detectar pequeñas cantidades de ácido por la aparición de un color amarillo (indicador :rojo fenol). En ausencia de fermentación de carbohidratos, no se formarán ácidos y por la producción de aminos en el pico, todo el medio quedará rojo. Esto se da en organismos no fermentadores.

El medio está diseñado de tal forma que la glucosa se encuentra en una proporción 10 veces menor que la lactosa y la sacarosa. Si el TSI es inoculado con una bacteria fermentadora de glucosa pero no de lactosa ni de sacarosa, la cantidad de ácido producida por fermentación a partir de la glucosa será baja porque la concentración de glucosa es baja. Al principio se producirá viraje del indicador al amarillo en el tubo, pero al continuar la incubación, el pico del tubo retornará al rojo por la degradación aerobia de las peptonas antes descrita (2,3).

Si el microorganismo fermenta la lactosa y/o la sacarosa, como las concentraciones de estos azúcares es 10 veces mayor, se producirá mayor cantidad de ácido que no puede ser revirado por la producción de aminos en la superficie por metabolismo aerobio.

La producción de H_2S a partir de tiosulfato se pone en evidencia por precipitar el Fe^{+2} del sulfato ferroso. Como esta reacción se da sólo en medio ácido, la formación de un color negro en el fondo del tubo se lee como fermentación de algunos de los azúcares del medio. Además puede observarse la producción de gas, como burbujas en el fondo del tubo (2,3).

3. Azufre Indol Movilidad (SIM)

El indol es un subproducto de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. La presencia de indol en un medio de cultivo que contiene triptófano puede ser demostrada por la adición del reactivo de Kovacs. Si el indol está presente se combina con el reactivo para producir un color rojo brillante. Este es un agar semisólido que puede ser utilizado para demostrar la movilidad. Los organismos móviles migran a través del agar a lo largo del inóculo, mientras que los microorganismos no móviles crecerán solo en la línea de inoculación. El SIM es un medio de alta sensibilidad para la detección de ácido sulfhídrico, presumiblemente debido a su consistencia semisólida, ausencia de hidratos de carbono que inhiban la formación del mismo y, al uso de hierro peptonado como indicador. Este medio tiene como fuente de azufre el tiosulfato de sodio y como indicador de ácido sulfhídrico el hierro peptonado. Una reacción positiva de ácido sulfhídrico, se hace evidente por la presencia de un precipitado de color negro. (2,3).

4. Producción de Indol

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos (2,3).

La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reaccionan con el grupo aldehído del p- dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovacs y Ehrlich . El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptófano (2,3).

5. Citrato

La utilización de citrato de sodio como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. Esta prueba se realiza inoculando el microorganismo en un medio de cultivo con citrato, y se hace evidente mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento del pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7.6. El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría acompañado o no de un viraje del indicador azul, debido a la presencia de productos alcalinos (2,3).

6. Descarboxilación de Lisina , Ornitina y Arginina

La descarboxilación de aminoácidos es llevada a cabo por descarboxilasas formándose aminas y CO₂. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. Los aminoácidos ensayados habitualmente para la identificación de aminoácidos son la lisina, la ornitina y la arginina (2,3).

7. Utilización del Malonato

El malonato es un ácido orgánico que algunas bacterias pueden utilizar como fuente de carbono y energía. La prueba entonces, tiene como finalidad determinar si la bacteria puede utilizar el malonato. Cuando la prueba es positiva el microorganismo acumula sub productos alcalinos por lo que el indicador de pH del medio cambia de verde a azul.

8. Producción de Ureasa

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa, tienen la capacidad de hidrolizar urea con liberación de amoniaco, de acuerdo a la siguiente reacción general:



El amonio reacciona en solución para formar carbonato de amonio, resultando en la alcalinización e incremento en el pH del medio (2,3).

Esta es una característica importante para la identificación de especies, es muy importante hacer la diferencia entre caldo Urea de Stuart y el Agar Urea de Christensen. El primero está fuertemente estabilizado con sales de fosfato a un pH de 6.8, el organismo en estudio debe producir cantidades relativamente grandes de amoníaco, a fin de superar el sistema estabilizador y elevar el pH del medio lo suficiente como para provocar el viraje del indicador por encima del pH 8.0. El caldo Stuart, es por lo tanto virtualmente selectivo para especies del género *Proteus*.

El agar urea de Christensen, posee un sistema estabilizador de pH más débil y contiene además peptonas y glucosa. Este medio promueve el crecimiento de muchas especies bacterianas que no se pueden desarrollar en el caldo Stuart, y la menor capacidad del buffer permite detectar producciones más escasas de amoníaco. Por ende, el agar urea de Christensen facilita la investigación de la presencia de muchos microorganismos productores de ureasa, tales como *Klebsiella*, muchas de las especies de *Enterobacter*, *Yersinia*, *Cryptococcus*, y *Brucella*.

Con muchas de estas especies se detecta primero una reacción positiva de ureasa por cambio de color de rosa a rojo en la parte inclinada del agar. Es el pico el que inicialmente vira al color rojo debido a la reacción alcalina resultante de la degradación de pequeñas cantidades de urea, se intensifica a causa de las aminas formadas por descarboxilación oxidativa de las proteínas del medio (2,3).

Además de las pruebas bioquímicas mencionadas, existen otras como las pruebas serológicas, que se basan en la tipificación antigénica de las bacterias. Otro tipo lo constituyen las pruebas de identificación a través de la utilización de Biología Molecular, que se caracterizan por el empleo o manipulación del material genético de las bacterias (2,3).

Históricamente, la identificación bacteriana en un principio, era realizada por medio de la observación directa de los microorganismos tomando en cuenta su forma y movilidad. Posteriormente, con el advenimiento de los medios basados en agar por Robert Koch y la introducción de un sistema de coloración por Gram, pudo identificarse a los microorganismos de acuerdo a su afinidad tintorial, morfología y características macroscópicas de colonia. Sin embargo la identificación no puede realizarse si no existe una previa clasificación de los mismos (11,13). Posteriormente fueron diseñados métodos de identificación basados en las características metabólicas, estos métodos son llamados clásicos o convencionales. Debido a la falta de reproducibilidad y a los largos períodos de incubación de estos métodos, fueron creados otros métodos que minimizaban la cantidad de substrato utilizado y el tiempo, siempre basándose en los principios de los métodos convencionales, a los que se les denominó métodos de primera generación. Sin embargo, los anteriores aún consumían mucho tiempo, por lo que fueron creados métodos más sofisticados de identificación, que incluyen métodos computarizados y más automatizados que sus predecesores, éstos se han llamado de segunda generación (11).

C. Métodos de primera generación

Los métodos de primera generación, fueron creados para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* e incluyen una serie de tubos miniaturizados que contienen sustratos individuales, tubos o placas con varios compartimientos con sustratos múltiples, tiras de papel o discos impregnados con el sustrato deshidratado. Estos métodos tienen la ventaja de ser más rápidos que los convencionales, pero aún su período de incubación es muy alto, además sus identificaciones están basadas en las tablas para enterobacterias elaboradas por Edwards & Ewing. Muchos de los sistemas comerciales de esta generación no correlacionaban entre sí ni con estas tablas (11,14).

Algunos de los sistemas de primera generación incluyen: API 20-E, Rapid NFT, Minitex, Tri-panel, Enteric-tek, Frozen Gram Negative panel, Enterotube-2 y Oxiferm (11, 12). Muchos de estos sistemas han sido mejorados para dar un mejor rendimiento. Actualmente se utilizan este tipo de sistemas para la identificación de microorganismos en cultivos sanguíneos, por ejemplo el método BACTEC, introducido en 1980 por Becton- Dickinson que han desarrollado varios modelos, así como el sistema BACTALERT desarrollado por Organon Teknika. Estos sistemas han sido utilizados con éxito para el aislamiento de diferentes cepas bacterianas (15-18).

Existen otros sistemas para el aislamiento e identificación de cultivos sanguíneos, por ejemplo el sistema Isolator (19).

Estos sistemas de primera generación no solo han sido utilizados para la identificación y aislamiento, sino que también para las pruebas de susceptibilidad antibiótica (20).

D. Métodos de segunda generación

Los métodos de segunda generación, han sido posibles por la incorporación de bases de datos generadas por computadoras muy sofisticadas, y que han sido confeccionadas para la identificación de un género en particular o de una especie. Ofrecen las ventajas de poder expandir las bases de datos, para incluir grupos de microorganismos adicionales, los períodos de incubación son cortos (menores de 18 horas), poseen pasos automatizados para la inoculación, lectura e identificación; y existe miniaturización de los contenedores de sustratos (11).

Entre los métodos de segunda generación pueden contarse: Quantum II, GN Microplate, UniScept 20E, Rapid E, Cobas-Bact ID, MicroScan y otros (11,21).

Irónicamente, existen estudios en los cuales se observa una sensibilidad ligeramente menor específicamente en el caso del Cobas-Bact ID, y el Enterotube II, en el cual la sensibilidad del primero fue del 87% y la del segundo del 90%, aunque se recomienda el uso del primero como un medio de tamizaje (22).

Existen otros métodos rápidos para la identificación de bacterias que se basan en otros principios, de esta forma existen métodos de Cromatografía de gas-líquido, los cuales dan como

resultado una gráfica que se constituye en una especie de huella dactilar del microorganismo (23). Muchas de estas pruebas han sido utilizadas primero en la industria y luego en el laboratorio microbiológico clínico, como ejemplo de estos pueden contarse métodos radiométricos, métodos microcalorimétricos, cromatográficos, fotométricos, inmunoelectroquímicos, electroforéticos, inmunológicos y de biología molecular (24-30).

E. Métodos de Identificación basados en computadoras:

Las computadoras han sido utilizadas en diversas ramas de la ciencia, y por lo tanto de la medicina (31).

Constituyen una herramienta de mucho valor, tanto para el médico en los hospitales a fin de establecer medidas epidemiológicas y conectarse con el resto del mundo por correos electrónicos, como para el personal del laboratorio, en la identificación de microorganismos, establecimiento de patologías varias, manejo ordenado de pacientes e informe de los resultados. Además, de presentar ventajas, como la minimización de costos y de tiempo (32,33). Lo anteriormente expuesto puede resumirse en el término automatización, que significa, la realización de un proceso por máquinas sin intervención humana (34).

La identificación de microorganismos por computadora, se hace por medio de una matriz contenida dentro de una base de datos (35). Una base de datos es definida como, una tabla de filas y

columnas, en la que cada fila está relacionada con la otra porque todas ellas contienen el mismo tipo de información, establecida en un orden determinado (36,37).

Es necesario a este nivel, realizar una diferenciación entre los programas operados con bases de datos y los programas de inteligencia artificial. La inteligencia artificial está definida como la propiedad de una máquina, dispositivo o artificio que le permite responder ante una situación como se supone que lo haría una persona inteligente. Debe tener capacidad de aprender y mejorar su rendimiento como resultado de la experiencia cuando se aplica repetidamente a la resolución de problemas (34).

Actualmente, se hacen esfuerzos por realizar un programa que llene las características delimitadas en la definición de inteligencia artificial (IA). No obstante lo anterior, existen en la actualidad muchos programas en medicina específicamente, que se acercan a la misma, entre ellos MYCIN, EMYCIN, NEOMYCIN, cuya función es ayudar al diagnóstico de enfermedades, a través de preguntas básicas, a partir de las cuales el programa puede tomar decisiones acerca del diagnóstico, tratamiento y pronóstico del paciente. Este tipo de programas no son disponibles comercialmente, y han sido desarrollados en hospitales estadounidenses grandes (38).

Con respecto al laboratorio y los sistemas de inteligencia artificial, pocos son los intentos realizados para obtener un sistema eficiente, y hasta principios de los 90 no se había reportado nada en concreto. Existía un proyecto denominado LINC en los años 60, pero su finalidad no fue

alcanzada. Actualmente programas como CLINILAB y otros, pretenden por medio de IA, agilizar los procesos de ingreso de pacientes y presentación de los resultados, así como brindar una guía al médico sobre el significado de las pruebas diagnósticas (39).

En microbiología, el primer intento de IA, fue el ya mencionado MYCIN, que se utilizó para recomendar una terapia antibiótica adecuada al microorganismo causal. Actualmente se encuentra en desarrollo un sistema denominado HELP, el cual básicamente tiene como objetivos, el control de los cultivos realizados a un paciente, la identificación del microorganismo causal de la infección y su posible terapia antibiótica así como un reporte de los resultados disponibles de una manera clara y rápida al médico. Se pretende que este programa se encuentre interconectado con los diferentes departamentos de un hospital, para que en cualquier momento pueda ser consultada la información contenida en el mismo (40).

Dependiendo del grado de automatización que presenten los sistemas de bases de datos, los programas pueden ser de dos maneras, una en la cual el usuario solamente debe inocular, incubar e insertar en el dispositivo de lectura que proporcionará la información del microorganismo aislado, un ejemplo lo constituye el programa "Colymorph"(41). La otra forma que es más sencilla, utiliza las tablas de diagnóstico, las cuales son guardadas en la memoria de la computadora, y los resultados de las pruebas son ingresados por el usuario en la misma, y al realizar las comparaciones internas con la tabla de diagnóstico, se obtiene el resultado (13,42-44).

Existen otros sistemas más complejos, en los cuales se le asigna a cada prueba, una probabilidad de una respuesta positiva, con estas probabilidades, se crean tablas de diagnóstico las que se guardan en la memoria. La computadora calcula éstas probabilidades para cada bacteria y le asigna un código, así al momento de ingresar datos, la computadora busca solamente el código de la bacteria, que corresponda a los datos introducidos (13,42-46).

Existen otros sistemas que conjugan diversas vías de identificación, como por ejemplo el "Sistema Wider" el cual fue desarrollado en Madrid, que funciona combinando un sistema computarizado de identificación y un asistente de imagen. Este sistema está adaptado para funcionar con paneles de microdilución comerciales tales como "MicroScan", luego de ser digitalizada la imagen, el sistema automáticamente genera el nombre de la bacteria y el perfil de susceptibilidad antibiótica (47).

Ya se han revisado los principios de estos métodos diagnósticos y su importancia, sin embargo existe una visión al futuro, que pretende mejorarlos y hacerlos disponibles comercialmente, que ha sido una de las grandes desventajas que presentan éstos, además de que necesitan un espacio muy grande, tanto en memoria como en disco. Este problema puede suplirse mediante el uso de computadores sofisticados en los laboratorios, no muy grandes, así como el hecho de la comercialización de los CD-ROMs. Otra de las visiones hacia el futuro, es que no solo se haga comercial el programa sino que las pruebas también, a manera de que cualquier persona que quiera

realizar una prueba microbiológica pueda hacerlo, algo similar a las pruebas de embarazo que se encuentran disponibles en las farmacias (48).

En Guatemala hasta el año de 1995, no se había documentado ningún intento de realizar algún programa de identificación de microorganismos, ni por bases de datos, mucho menos por IA. En ese año se creó un programa, denominado Enteroid, por estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Durante la evaluación de este programa se obtuvieron los siguientes resultados, de las diez cepas analizadas el 57% fueron identificadas solas, es decir sin ningún entrecruzamiento con otro género y/o especie; el 43% identificó a la bacteria más otra u otras que tenían una imagen similar, sin embargo, el programa proporciona un medio para diferenciar entre estos entrecruzamientos. Del 43% anterior el 65% fue con bacterias del mismo y de diferente género, el 35% fue con bacterias del mismo género, no encontrándose ningún caso en el cual se entrecruzara con otro género distinto. De los entrecruzamientos 24 (55.81%) eran entre la bacteria y otra; 9 (20.93%) fueron entrecruzamientos entre la bacteria y otras 2; 1 (2.32%) entre la bacteria y otras 4; 9 (20.93%) entre la bacteria y otras 5. Cabe destacar que estos últimos eran del género *Salmonella* y *Shigella* en las cuales no pueden diferenciarse por medios bioquímicos, entre especies del mismo género, sino con la utilización de antisueros (49).

En el año 2001, fue creada una nueva versión del sistema de identificación denominada Enteroid 2.0, la cual se encuentra escrita en un lenguaje de programación diferente al utilizado para

la primera versión, lo cual nos permite un funcionamiento más rápido y una mejor identificación, debido a las modificaciones en el aparato de identificación.

IV. JUSTIFICACION

Los pocos programas para la identificación de microorganismos que existen en el mercado tienen la desventaja de no estar al alcance económico de todos los laboratorios clínicos del país, y en algunos casos, para su funcionamiento requieren de un equipo muy sofisticado. Además, generalmente no satisfacen las necesidades técnicas en Guatemala por haber sido diseñados para los requerimientos de países desarrollados. De lo anterior, surge la necesidad de utilizar programas de computadora para la identificación de enterobacterias, el cual supla las necesidades de identificación rápida, disminuya el porcentaje de error en una identificación, esté al alcance económico de la mayoría de laboratorios clínicos y utilice los recursos disponibles en el país, como son los métodos tradicionales de identificación bioquímica y serológica. El programa Enteroid, fue creado en el año de 1995, por estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, para solventar el problema antes expuesto. Este programa tuvo un buen desempeño durante su evaluación en esa oportunidad. Sin embargo se ha desarrollado en el año 2000, una nueva versión del programa, Enteroid 2.0, la cual difiere en cuanto a aspectos de programación, por estar desarrollada para trabajarse en ambiente Windows el cual es ampliamente accesible actualmente. Además de ser más rápida por la forma en la cual maneja la memoria de la computadora, y de tener más opciones administrativas. Adicionalmente el algoritmo de identificación ha sido mejorado y depurado, para poder brindar resultados mas rápidos y menor cantidad de errores, siendo por esto más eficiente. Con el fin de comprobar lo anteriormente expuesto en el presente trabajo se desarrolló una evaluación de la efectividad de identificación de esta segunda versión del programa.

V. OBJETIVOS

A. Objetivos Generales

1. Utilizar los métodos de inteligencia artificial en el laboratorio bacteriológico clínico
2. Ofrecer una alternativa accesible, confiable y eficiente para la identificación de enterobacterias
3. Evaluar la versión más reciente de un programa de computadora Entero ID 2.0 para la identificación de enterobacterias de importancia clínica en nuestro país.

B. Objetivos Específicos

1. Realizar una evaluación de control de las cepas a identificar por el programa Entero ID 2.0, con la utilización otro sistema de identificación automatizado y reconocido en el país.
2. Realizar una evaluación comparativa de la versión del programa Entero ID 2.0 contra la versión de el programa Entero ID 1.0

VI. HIPOTESIS

El sistema Entero ID 2.0 si presenta diferencia significativa en cuanto a la efectividad de identificación de las características bioquímicas de *Enterobacterias* de importancia clínica comparado con la primera versión de Entero ID.

VII. MATERIALES Y METODOS

A Universo y muestra

El universo a estudiar, se constituyó por cepas de enterobacterias, proporcionadas por el departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El estudio se limitó, a las enterobacterias de importancia clínica.

La muestra a utilizar consistió de 100 cepas de enterobacterias de importancia clínica, escogidas por conveniencia.

B. Recursos humanos

1. **Tesista:** Angela Lissette Chew Sosa
2. **Asesor:** Licenciado Martín Gil
3. **Asesoramiento y Colaboración de:**

Juan Francisco López Bernard

C. Recursos físicos

1. Equipo

- a. Computadora personal.
- b. Lenguaje de Programación Visual Fox Pro 5.0
- c. 5 disquetes de doble densidad y lado 3.5 pulgadas.
- d. Impresora

2. Cristalería

- a. 900 tubos de vidrio con tapa de rosca.
- b. 4 frascos color ámbar de 1 onza con gotero.
- c. 5 erlenmeyer de 500 mililitros

3. Reactivos

- a. Medio TSI (Tres azúcares, hierro)
- b. Medio LIA (Lisina, hierro, arginina)
- c. Medio SIM
- d. Medio Citrato de Simmons
- e. Medio urea de Christensen.
- f. Medio Ornitina
- g. Medio Lisina
- h. Medio Arginina
- i. Medio de Malonato
- j. Reactivo de Kovacks

4. Biológicos

- a. 100 Cepas de enterobacterias, escogidas a conveniencia, provenientes del cepario de el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

D. Metodología

1. Se elaboró un código para cada bacteria, basado en sus características bioquímicas, con una respuesta binaria, es decir utilizando solamente 0 y 1 en un principio, cada 4 características, se procedió a conformar un número binario, que posteriormente fue transformado a hexadecimal, quedando así formada una parte del código, esta operación se repitió tantas veces como características o variantes bioquímicas poseía la bacteria, para su identificación. Utilizando estos códigos, se procedió a crear una base de datos, que sería a su vez utilizada por el programa para llevar a cabo la identificación. Dicha base de datos se comparó contra la base de datos de la primera versión del programa Entero ID, a fin de actualizarla.
2. El programa fue elaborado, utilizando como lenguaje de programación, Visual Fox Pro 5.0, de Microsoft®, se utilizó un tipo de programación conocida como “programación por objetos”, en la cual cada proceso que realiza el programa se toma como un objeto, por lo cual se puede nombrar y relacionar con otros procesos a la vez. Otra característica de este tipo de programación es que las propiedades, es decir tipos de letra, tamaño de ventana, etc, pueden ser asignadas por grupos de objetos, ahorrándose tiempo de programación.
3. Se revisó el algoritmo de identificación, es decir el procedimiento matemático para identificar, ya que en la primera versión, al ser esta realizada en el lenguaje Clipper y utilizar como sistema operativo DOS, las instrucciones y los procedimientos eran distintos, por lo que se utilizó un nuevo algoritmo similar al de la primera versión,

pero que supuestamente debe trabajar mas rápido, ya que consume menos tiempo de utilización del procesador principal, además de consumir menos memoria y menos líneas de programación, lo cual se traduce como menos tiempo de identificación.

4. Tomando en cuenta las características de la primera versión, se trato de hacerlo más “amigable” o “user friendly” , aprovechando las capacidades de la interfaz gráfica de Windows.
5. Una vez terminada la programación y depurada, es decir libre de errores técnicos, se procedió a crear el instalador, o sea el programa que permite instalarlo en cualquier computadora, pero previene que sea copiado a otra computadora diferente.
6. Luego de crear el instalador, se realizó la instalación de prueba.
7. Para realizar el estudio, se inocularon 100 bacterias bioquímicas, con 100 cepas proporcionadas por el departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Para tener absoluta seguridad de la identidad de las cepas, las mismas se identificaron a través de un sistema automatizado (VITEK o API), estos sistemas, generalmente proporcionan una identificación con un 99% de seguridad. Las bacterias utilizadas constaban de las siguientes pruebas, TSI, LIA, MIU, Citrato, Descarboxilacion de Ornitina, Lisina, Arginina y utilización del Malonato.
8. Los datos fueron entonces ingresados a los dos programas para su identificación.
9. El proceso de ingreso e identificación en el programa es sencillo, comienza con la pantalla principal (ver figura 5 en anexos), se escoge la opción de “Identificación”,

aparece entonces la ventana Identificación (ver figura 6 en anexos), en esta pantalla aparecen las características bioquímicas a utilizar para la identificación, seguidas de un espacio. En los espacios correspondientes, debe ingresarse la información de cada bacteria, de la siguiente forma, todo resultado positivo se ingresa como "1", los negativos como "0", en el caso de TSI y LIA, la presencia de acidez se ingresa como "1" y la alcalinidad como "0", en el caso de que el microorganismo produzca coloración roja en el LIA, esta se ingresa como "R"o "r". Al finalizar el ingreso de los parámetros, se selecciona la opción "identificar", el programa con la información ingresada, utiliza el algoritmo de identificación y compara los resultados obtenidos con la base de datos, si existe información que coincida con la ingresada, el programa despliega la bacteria, en la ventana identificación (ver figura 6 en anexos), algunas veces existe mas de una coincidencia, entre bacterias del mismo género pero diferente especie, o bacterias de géneros diferentes, pero con imágenes bioquímicas iguales, a lo cual el programa despliega información para su diferenciación final.

10. Al tener la identificación, el programa ofrece la opción de guardar la misma, para lo cual se escoge la opción "Guardar" (ver figura 7 en anexos). Esta permite ingresar información adicional de la muestra. Para el caso de "entrecruzamientos", o sea más de una bacteria con la misma imagen bioquímica, esta ventana cuenta con un cuadro de selección, que es un espacio con múltiples opciones, en donde aparecen las bacterias entrecruzadas, para que el usuario escoja el resultado final a sus análisis de diferenciación. En el caso de una identificación total, sin "entrecruzamientos", el

cuadro solo cuenta con una bacteria. Cuando la información se ha completado y no existen correcciones, debe seleccionarse la opción "Guardar", esta opción almacena la información en una base de datos especial para el almacenaje de muestras, y que sirve para confeccionar un reporte general de identificaciones, utilizando la opción "Reporte", en la ventana principal (ver figura 5 en anexos). La información de la muestra puede ser impresa como un informe de laboratorio, utilizando la opción "Imprimir".

E. Diseño estadístico

La validación del programa se realizó mediante un estudio tipo ciego, con 100 cepas escogidas por conveniencia, y proporcionadas por una persona, sin que se conozca el orden ni de qué cepa se analiza.

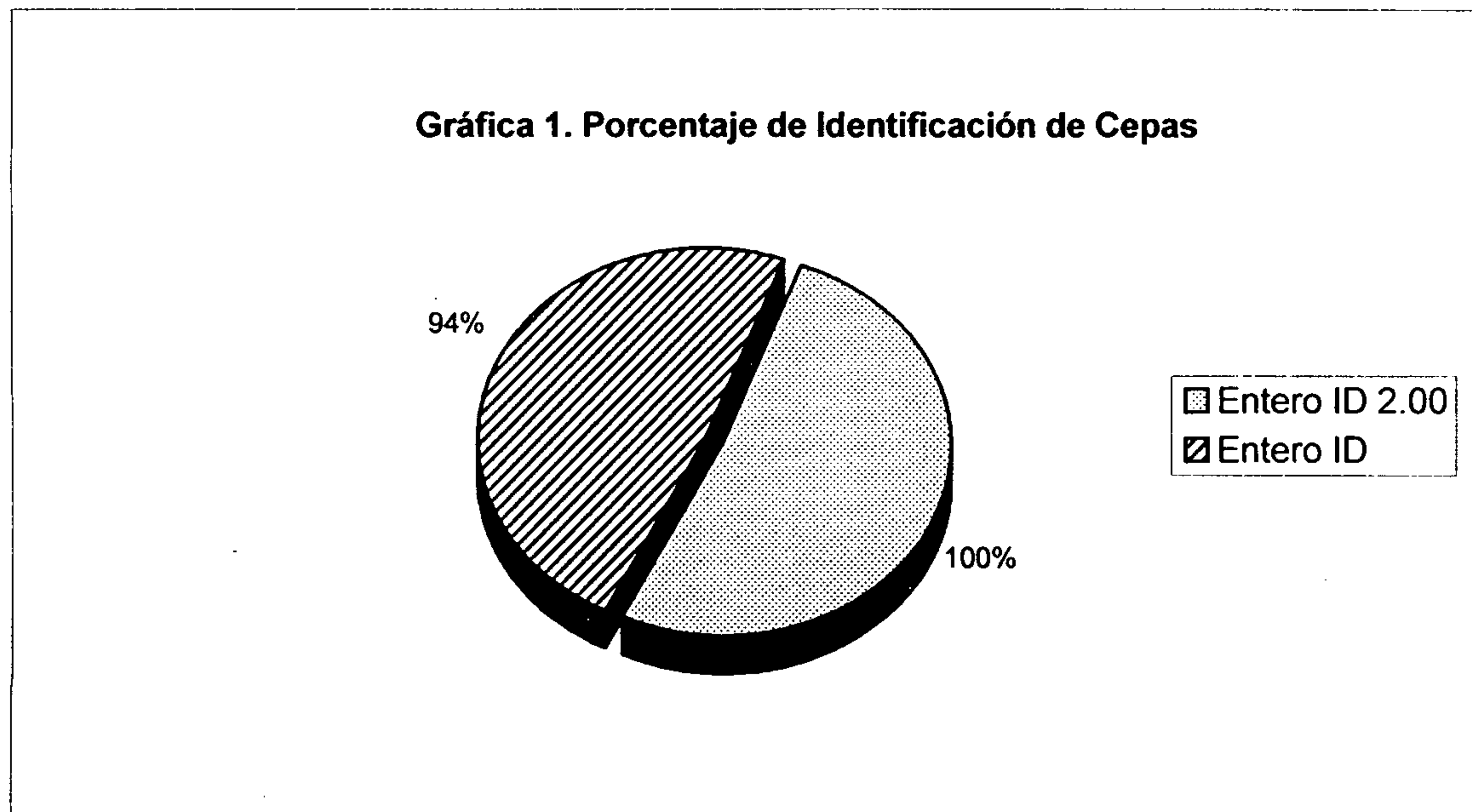
El modelo estadístico, fueron 100 cepas de enterobacterias con un set de repetición. El análisis de los resultados se realizó a través de una prueba de χ^2 -cuadrada de Homogeneidad.

VIII. RESULTADOS

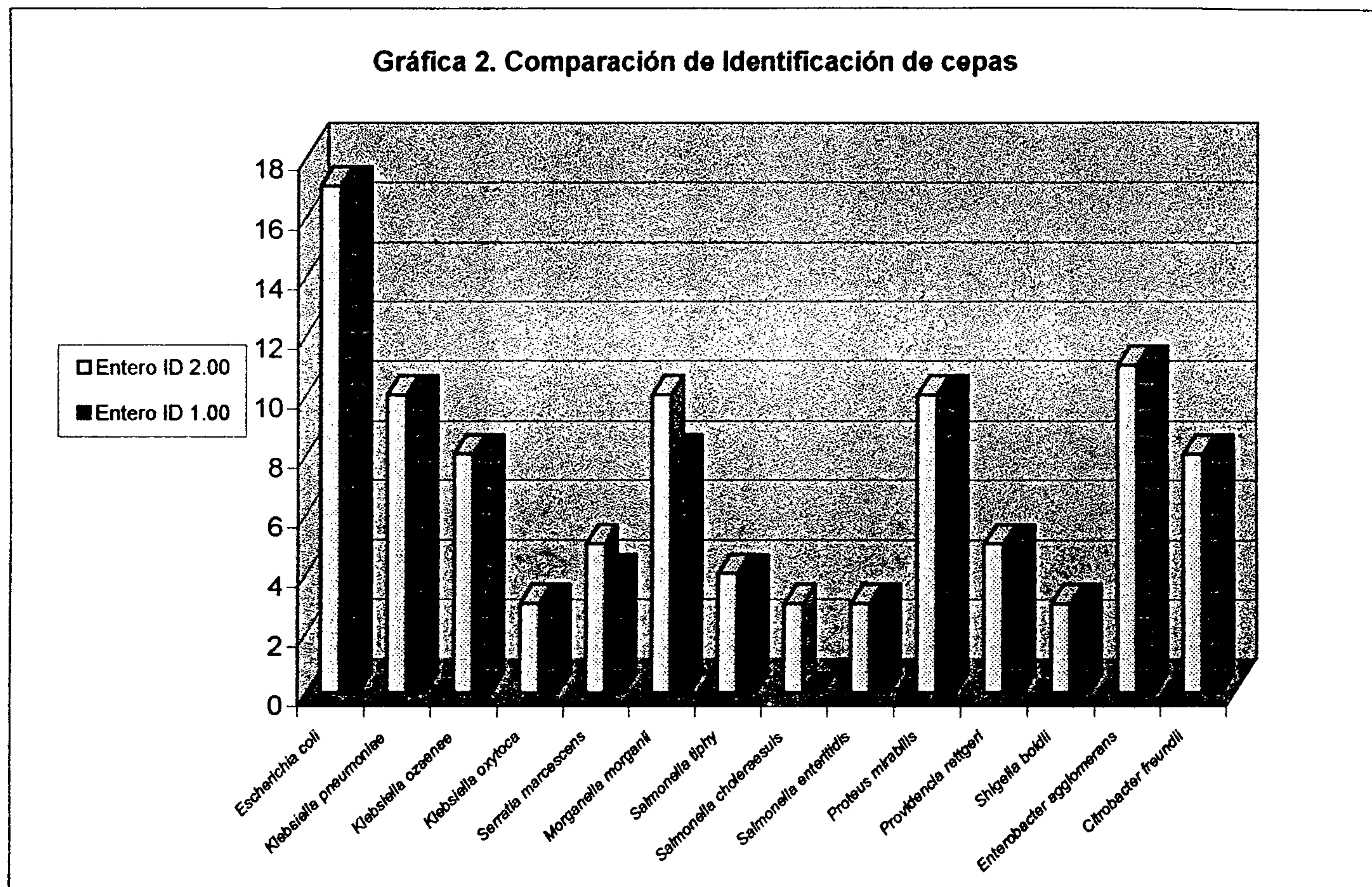
Para el análisis se utilizaron cien cepas, que se identificaron previamente por un método aprobado de identificación (Vitek o API), por lo cual existía seguridad en cuanto a su identidad. Después de obtener los resultados de las baterías bioquímicas, fueron ingresados a cada una de las versiones del programa Entero ID, los resultados obtenidos pueden visualizarse en la Tabla 1.

TABLA 1. Número de Aciertos Entero ID 2.0 vrs Entero ID

Genero y especie	No. De Cepas	No de Aciertos Entero ID 2.0	No. Aciertos Entero ID
<i>Escherichia coli</i>	17	17	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	10	10
<i>Klebsiella ozaenae</i>	8	8	8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	3	3
<i>Serratia marcescens</i>	5	5	4
<i>Morganella morganii</i>	10	10	8
<i>Salmonella typhi</i>	4	4	4
<i>Salmonella choleraesuis</i>	3	3	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	3	3	3
<i>Proteus mirabilis</i>	10	10	10
<i>Providencia rettgeri</i>	5	5	5
<i>Shigella boydii</i>	3	3	3
<i>Enterobacter agglomerans</i>	11	11	11
<i>Citrobacter freundii</i>	8	8	8
TOTAL	100	100	94



El programa Entero ID 2.0 identificó un 100% de las cepas ingresadas, tomándose como acierto el hecho de que la bacteria se encuentre presente aún existan entrecruzamientos con otros géneros y especies, en la identificación; mientras que el sistema Entero ID1.0 identificó solamente el 94% de las cepas ingresadas (ver Gráfica 1).



En la Gráfica 2 se ilustran las diferencias en la identificación por cepas, obtenidas con cada uno de los programas, Entero ID y Entero ID 2.0.

Puede observarse que estas diferencias son mayores en los casos de, *Morganella morganii*, en la cual de 10 cepas la primera versión de Entero ID solamente identificó 8 y Entero ID 2.0 identificó 10 cepas. *Serratia marcescens* y *Salmonella choleraesuis*, en la que de un total de 3 cepas la primera versión de Entero ID no identificó ninguna, mientras que la versión Entero ID 2.0 identificó las 3 cepas.

La prueba de ji cuadrada dio como resultado $7.98 \cdot 10^{-6}$ lo cual implica que no existe diferencia significativa entre los dos grupos.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la comparación entre los dos programas, indican que el programa Entero ID identificó un 94% de las cepas investigadas, mientras que con el programa Entero ID 2.0 se identificaron el 100% de las mismas. Existe una diferencia entre los dos porcentajes de un 6%, el cual de acuerdo al valor obtenido en la prueba de ji cuadrada no es estadísticamente significativo, puede decirse entonces que la hipótesis de trabajo se rechaza, o sea que la efectividad de identificación en ambos programas es estadísticamente igual. Sin embargo es de importancia hacer notar que la diferencia entre los porcentajes de identificación entre ambos programas, se debe a que la base de datos para el programa Entero ID V.2.0 fue revisada, para incluir variantes y géneros que no se incluyeron en la primera versión del mismo; este hecho se refleja en los resultados ya que algunas variantes en las reacciones bioquímicas del género *Serratia*, no fueron contempladas, por lo que no se obtuvo ningún resultado con la primera versión.

Así mismo, *Salmonella choleraesuis*, no fue identificada apropiadamente, debido a que no se encontraban las imágenes bioquímicas dentro de la base de datos del primer programa.

Puede decirse entonces que aunque no exista diferencia estadísticamente significativa entre los dos programas, si existe una diferencia en cuanto a efectividad, ya que las bases de datos de la segunda versión del programa Entero ID, fueron mejoradas, lo cual se refleja en el estudio.

X. CONCLUSIONES

- A. De acuerdo al análisis de ji cuadrada no existe diferencia estadísticamente significativa en el desempeño de las dos versiones del programa Entero ID.
- B. Existe una diferencia a favor de la segunda versión, lo cual se debe a una mejora en las bases de datos del mismo.
- C. El programa Entero ID. V. 2.0 constituye una herramienta de gran utilidad, ya que está comprobado que es efectivo en la identificación, además de ser económico, ya que no necesita equipo sofisticado y utiliza las pruebas que convencionalmente se usan en el laboratorio.
- D. El programa reduce el tiempo que se toma en la investigación, ya que presenta una solución de manera rápida, y en los casos en que se presenten entrecruzamientos proporciona información sobre pruebas adicionales para llegar a una identificación conclusiva.

XI. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda, realizar un estudio incluyendo una mayor cantidad de cepas, así como cepas ATCC, para evaluar si existen diferencias entre ambas versiones.

- B. Sería recomendable, hacer un estudio del programa en el campo, es decir utilizando cepas provenientes de pacientes, en un laboratorio institucional o privado, para compararlo con los métodos que se utilizan actualmente, así como para evaluar la factibilidad de su uso en instituciones privadas o públicas, como una herramienta de identificación.

- C. Es recomendable estandarizar la preparación e inoculación de las baterías, para eliminar errores técnicos en la identificación.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sonnenwirth AC. Bacilos Entéricos y Bacteroides. p. 529-551. (En Davis BD, et al, comps. Tratado de Microbiología. 3 ed. Bragulat JC, trad. Barcelona: Salvat Editores SA, 1984. XXII+1097 p.)
2. Zwadyk P. Enterobacteriaceae: Características Generales. p. 673-683. (En Joklik WK, Willett HP, Amos B, comps. Zinsser Microbiología. 13 ed. La Habana: Científico Técnica, Vol. 2, 1983. 1413 p.)
3. Farmer JJ, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*. p. 360-383. (En Balows A, et al, comps. Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. USA: ASM, 1991. XI+1364 p.)
4. Jawetz E, et al. Microbiología Médica. 12 ed. México: El Manual Moderno SA de CV, 1987. 636 p. (p. 238-252)
5. Rais-Bahrami K. , Short BL. *Citrobacter* sepsis and Severe new born respiratory failure supported with extra corporeal membrane oxygenation. J Perinatol. 2000; 20: 265-266
6. Siu LK, Lu PL, Hsueh PR, et al. Bacteremia due to extended- spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric oncology ward: Clinical features and identification of diferent plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. J Clin Microbiol. 37:4020-4027.
7. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13:534-546.
8. Yang CH, Wang CK. *Edwardsiella tarda* bacteremia complicated by acute pancreatitis and pyomyoma. J Infect. 1999; 37:3366-3368.
9. Zwadyk P. Enterobacteriaceae Oportunistas. p. 684-694. (En Joklik WK, Willett HP, Amos B, comps. Zinsser Microbiología. 13 ed. La Habana: Científico Técnica, Vol. 2, 1983. 1413 p.)
10. Lai YC, Yang SL, Peng HL, et al. Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2000; 68: 7149-7151.
11. D'amato RF, Botone EJ, Amsterdam D. Substrate Profile Systems for the Identification of Bacteria and Yeasts by Rapid and Automated Approaches. p. 128-137. (En Balows A, et al, comps. Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. USA:AMS, 1991. XI+1364 p.)

12. Widmich Z, Keppa M, Wojtyczka R, et al. Comparative evaluation of bacteria identification from the *Acinetobacter* genus using a commercially available API 20EN system, PCR and RFLP techniques. *Med Dosw Microbiol.* 2000; 52: 262-273.
13. Austin B, Priest F. *Taxonomía Bacteriana Moderna*. Villareal WE, trad. México: Limusa, 1992. 165 p. (p. 107-120).
14. Gini GA. *Manual de Procedimientos para la Identificación de las Bacterias con Importancia Clínica*. Guatemala: Merck CA SA, 1993. (p. 39-77).
15. Ryan PD, Murray FS. Evolution of Automated Blood Culture Systems. *CMNEEJ.* 1993; 14:105-108.
16. McGowan JE, et al. Settling Growth Value Thresholds for Bactec Vials: An Approach to Continuous Quality Improvement. *CMNEEJ* 1993;14:108-112.
17. Le Roux E, Lastovica AJ, Penner IL. *Campylobacter upsaliensis* Isolated from Blood Cultures of Pediatric Patients. *J. Clin. Microbiol.* 1989;27:657-659.
18. Waites KB, Brookings Es, Moser SA, et al. Direct bacterial identification from positive Bact/Alert blood cultures using Microscan overnight and rapid panels. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;32:21-26.
19. Kiehn TE. Isolators Versus Broth for Blood Cultures. *CMNEEJ* 1988;10:53-55.
20. Washington JA. Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing: Technical and Clinical Considerations. *CMNEEJ* 1993;15:153-156.
21. O'Hara CM, Miller JM. Evaluation of the MicroScan Rapid neg ID3 panel for identification of *Enterobacteriaceae* and some common gram-negative non fermenters. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3577-3580.
22. Holmes B. Comparative Evaluation of the Roche Cobas IDA and Enterotube II Systems for Identifying Members of the Family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol* 1989;27:1027-1029.
23. Alexander H. Gas-Liquid Chromatography as an Aid in Identification of Glucose-nonfermenting Gram-negative Bacilli. *CMNEEJ* 1987;9:25-28.
24. Caballeira AO, Garcia LL. *Métodos Rápidos de Análisis Microbiológico de los Alimentos*. Ibérica;1990;12:581-585.

25. Brooks JL, Mirhabibowahiby B, Kroll GR. Sensitive Enzyme-amplified Electrical Immunoassay for Protein A bearing *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56: 3278-3284.
26. Kempf VA, Trebesius K, Autenrith IB. Fluorescent in situ hibridation allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 830-838.
27. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotid array. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 781-788.
28. Pritchett LC, Konkel M'C, Gay JM et al. Identification of DT 104 and U 302 phagotypes among *Salmonella enterica* seotype *typhimurium* isolates by PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3484-8.
29. Bennasar A, Cabrer B, Lalucat J. Rapid identification of *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. virchow* isolates by polymerase chain reaction PCR based phingering methods. *Int Microbiol.* 2000; 3: 31-38.
30. Turenne CY, Witwicky E, Hoban DJ et al. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single- strand conformation polimorphysms analysis of the 1GS rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 513-520.
31. Barbera A et al. Un sistema de farmacovigilancia computarizada: su aplicación en asistencia, información y enseñanza. *Bul. of Sanit Panam.* 1980; 89:124-129
32. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Segas en la evaluación de la tecnología médica. 1993; 114:551.
33. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Empleo de Microcomputadoras en los hospitales. 1993; 114:553.
34. Vaquero A, Joyanes L. Informática, glosario de términos y siglas. México: McGraw Hill, 1985. 125p.(p.14-15)
35. Lapage SP et al. Identification of Bacteria by Computer: general aspects & perspectives. *J. Gen Microbiol.* 1973, 77:273-290
36. Jones E. Aplique el dBase III plus. Yañez LH, trad. México: Osborne/McGraw Hill, 1988. XIV+483p (p.1-7)
37. Pérez JA. Computación Básica. 2ed. Guatemala: Editorial Kumar, 1993. 183p (p. 37-72)

38. Clanceg WJ, Shortliffe EH. Readings in Medical Artificial Intelligence. USA:Ed. Addison Wesley Pub. Co. 1984. 525p (p.98-129)
39. Lincoln TL. An Historical perspective on Clinical Laboratory Information Systems. p.267-276 (In Blum BI, Duncan K, eds. A History of Medical Informatics. USA :Addison-Wesley Pub. Co. 1990. 220p)
40. Scott RE. Application of Artificial Intelligence in Clinical Microbiology. CMNEEJ; 1991, 13:25-28
41. Matthews JS et al. Rapid, Inexpensive Identification of Frequently Occurring Gram-Negative Bacilli. CMNEEJ; 1986, 8:185-186.
42. Wilcox WR et al. Identification of Bacteria by Computer: Identification of Reference Strains. J Gen Microbiol. 1973; 77:291-315.
43. Wilcox WR et al. Identification of Bacteria by Computer: Theory & programming. J Gen Microbiol, 1973; 77:317-330.
44. Dybowski W, Franklin DA. Conditional Probability & the Identification of Bacteria: A Pilot Study. J. Gen Microbiol, 1968; 54:215-229
45. Bueshing WJ, Rhodeen DL, Essaias AO et al. Evaluation of modified Micro-ID system for identification of *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 1979; 10:454-458.
46. Piccolomini R, Di Girolamo A, Cantamo G et al. Entero system 18-R description and comparative evaluation with conventional methods for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 1991; 29:2300-2304.
47. Canton R, Perez-Vazquez M, Oliver A et al. Evaluation of the Wider system, a new computer-assisted image-processing device for bacterial identification and susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2000; 38:1339-1346.
48. Zabransky RJ. Over-the-Counter Microbiology. CMNEEJ. 1987; 9:189-196
49. Lopez JF. et al. Programa computarizado para la deteccion de enterobacterias con importancia clinica. Informe final, Facultad de Ciencias Quimicas y Farmacia, USAC, Noviembre 1995.

XIII. ANEXOS



Figura 1. Reacciones en TSI (Three Sugar Iron)

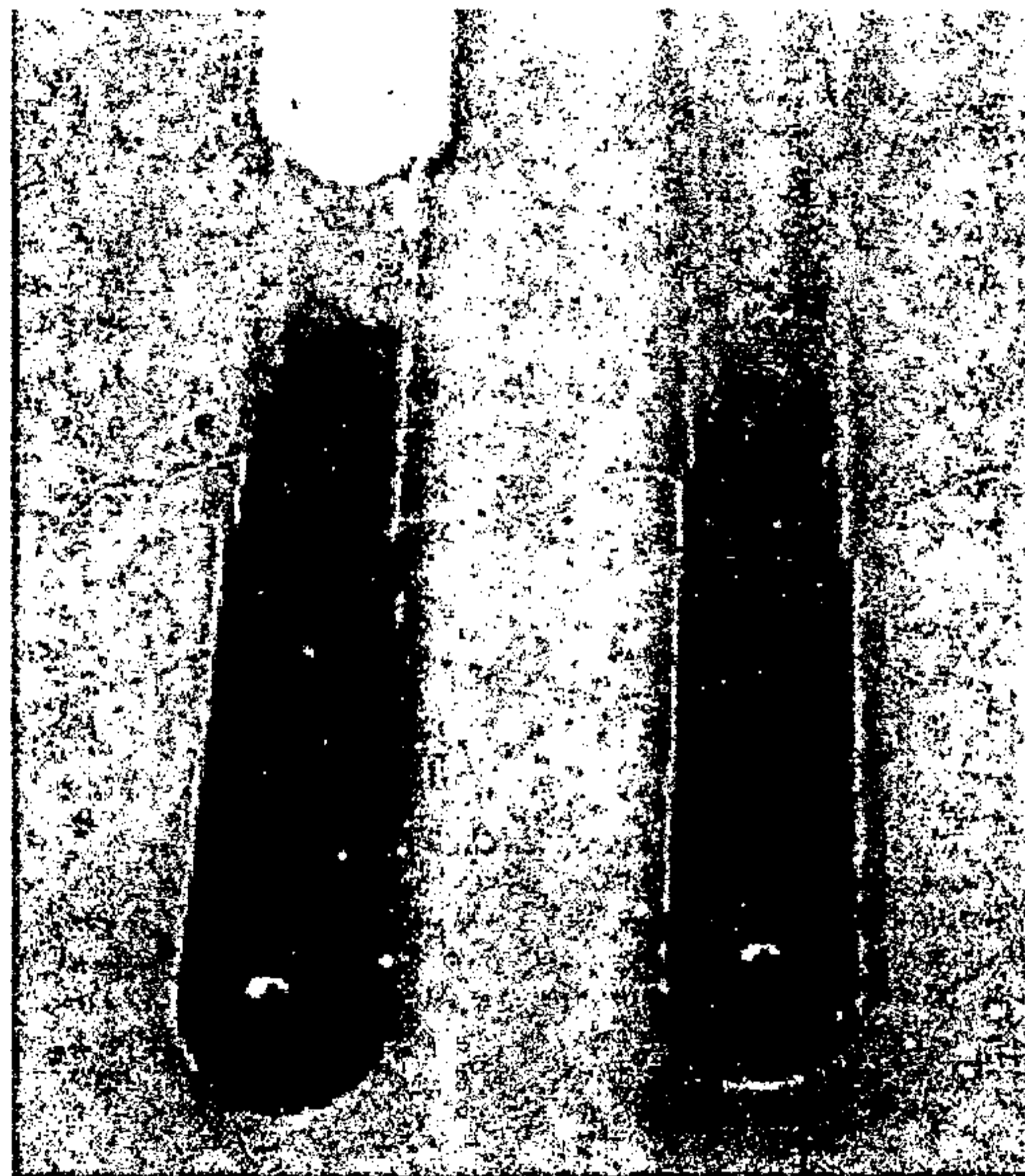


Figura 2. Reacción en Agar Citrato Simmons.

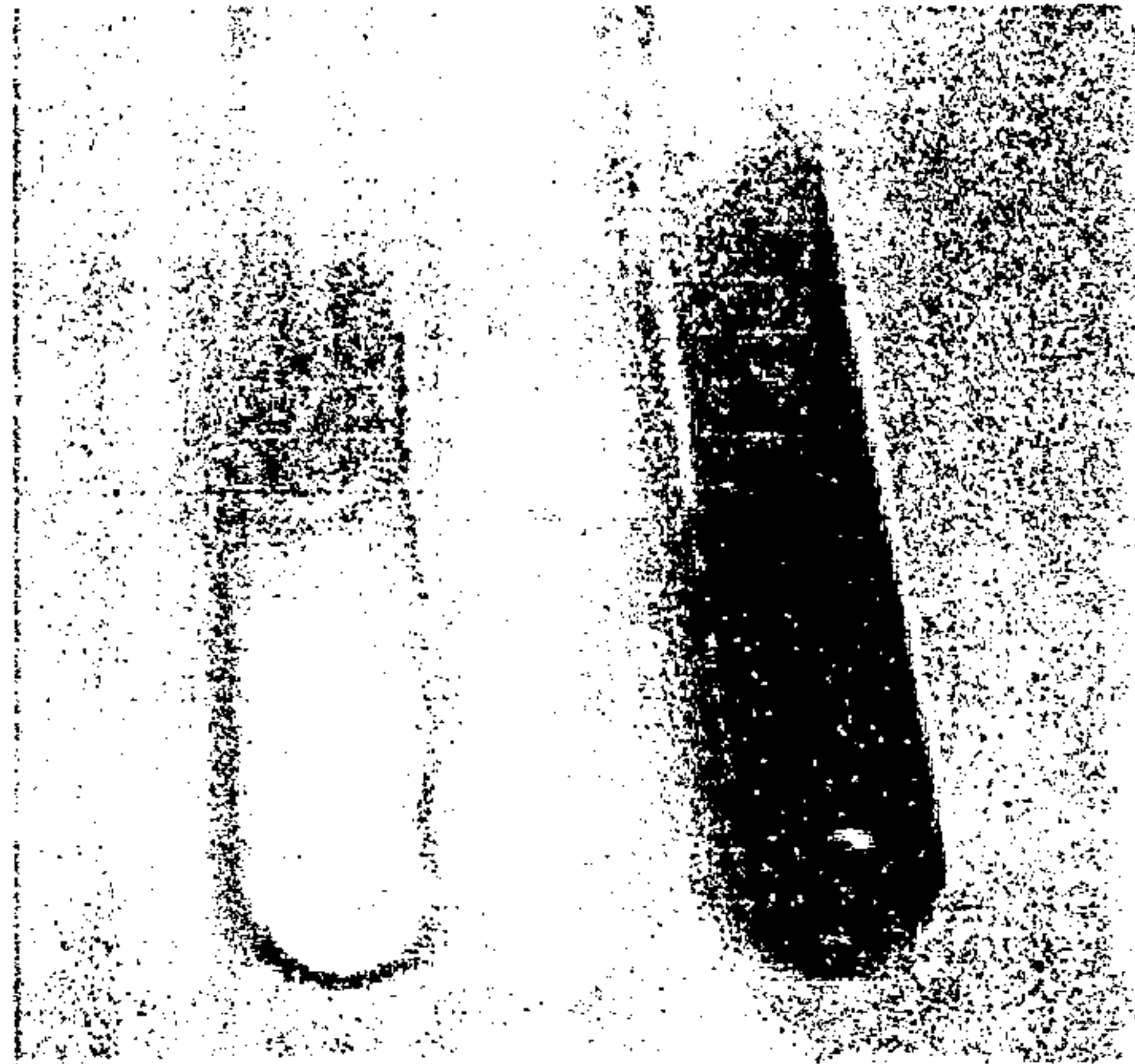


Figura 3. Reacción en Agar Urea de Christensen.



Figura 4. Presencia de H₂S en TSI

Para toda lectura en la batería, se toma como criterio de reporte en el programa ENTERO ID 2.0 el siguiente

POSITIVO	1
NEGATIVO	0

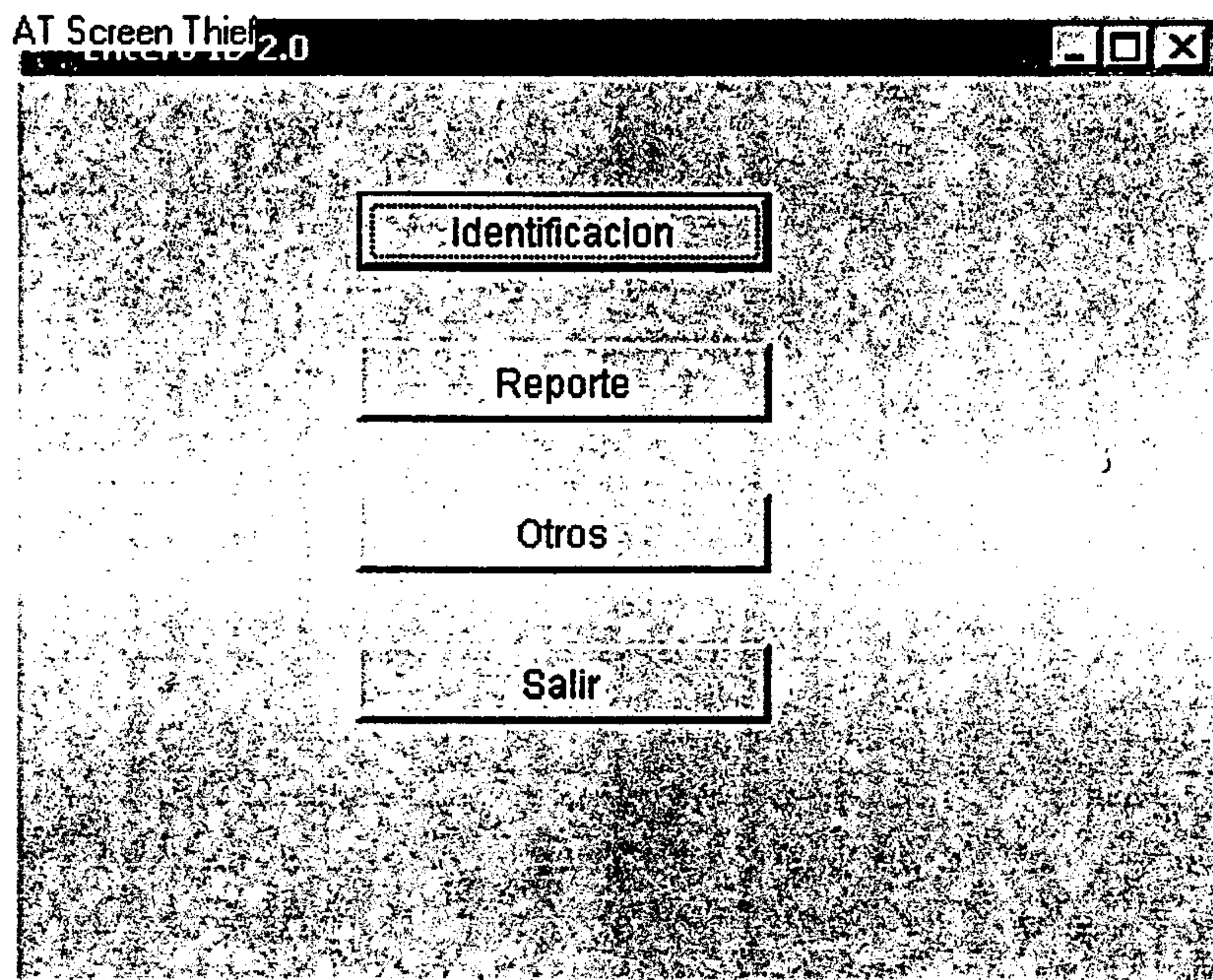


Figura 5. Menú principal del Programa Entero ID V.2.0

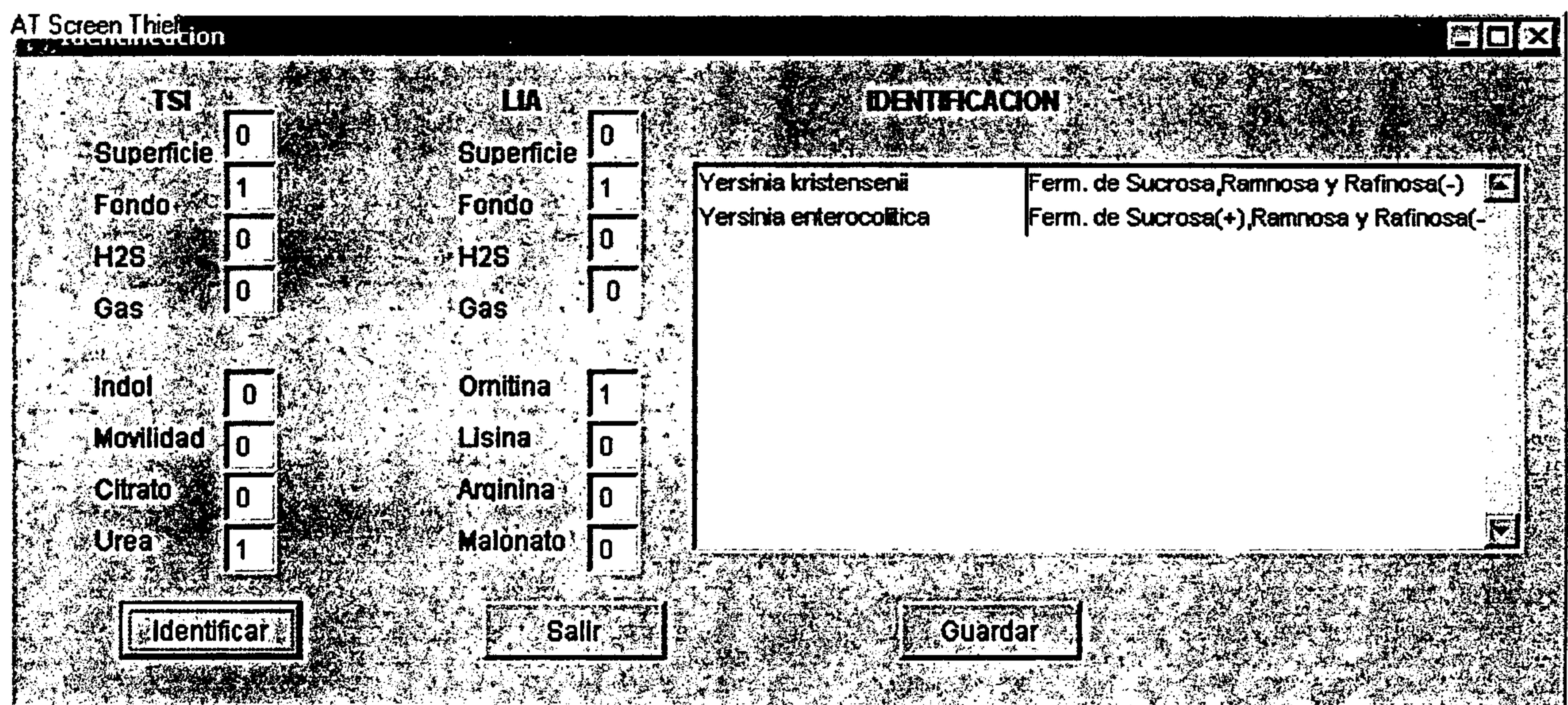


Figura 6. Pantalla de Identificación.

AT Screen Thief

Identificación

Número de Muestra

Nombre del Paciente

Procedencia

Por Favor escoga su identificación

- ▼
-
-

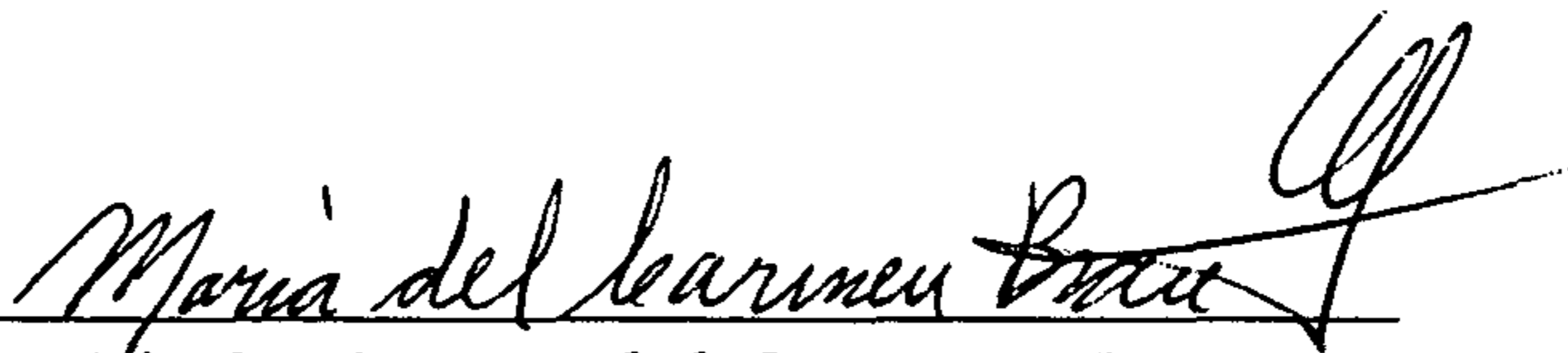
Figura 7. Grabado de muestras y generación de Reporte.



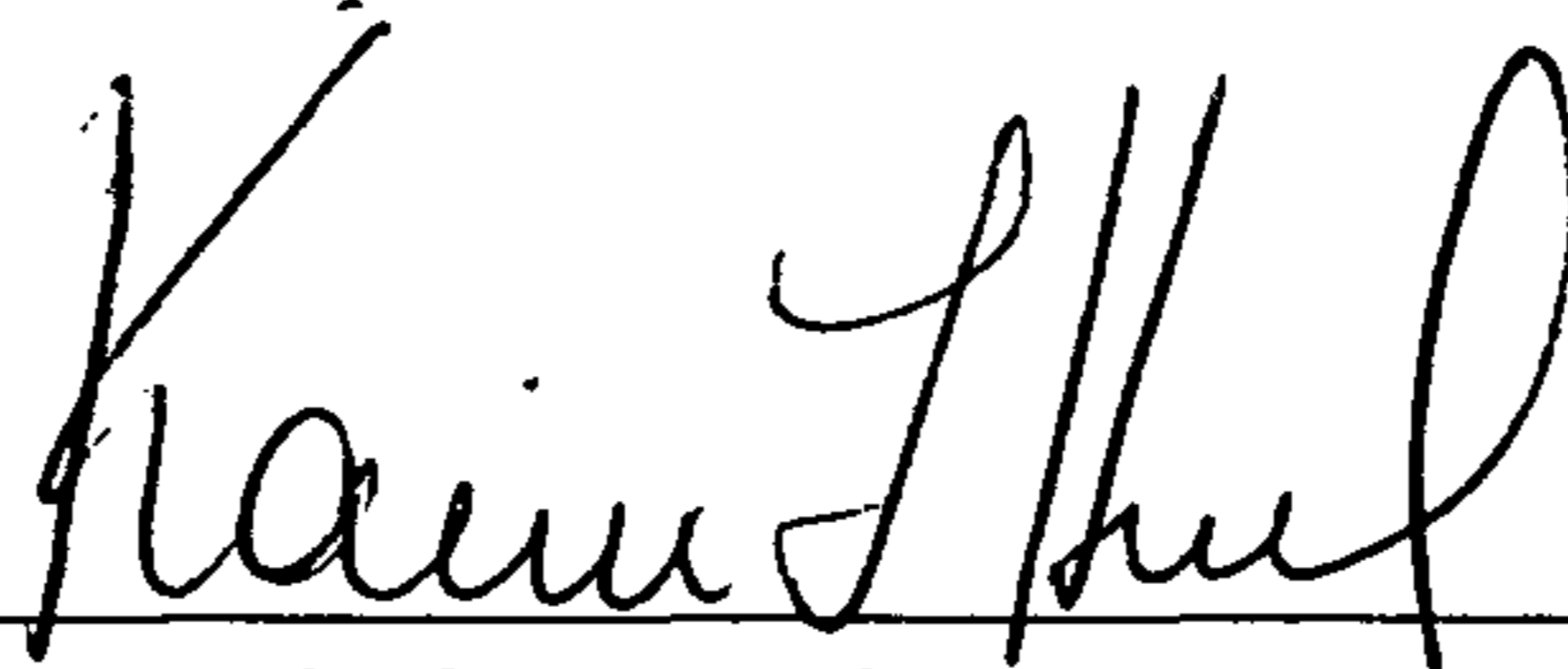
Angela Lissette Chew Sosa
Autor



Lic. Martin Gil
Asesor



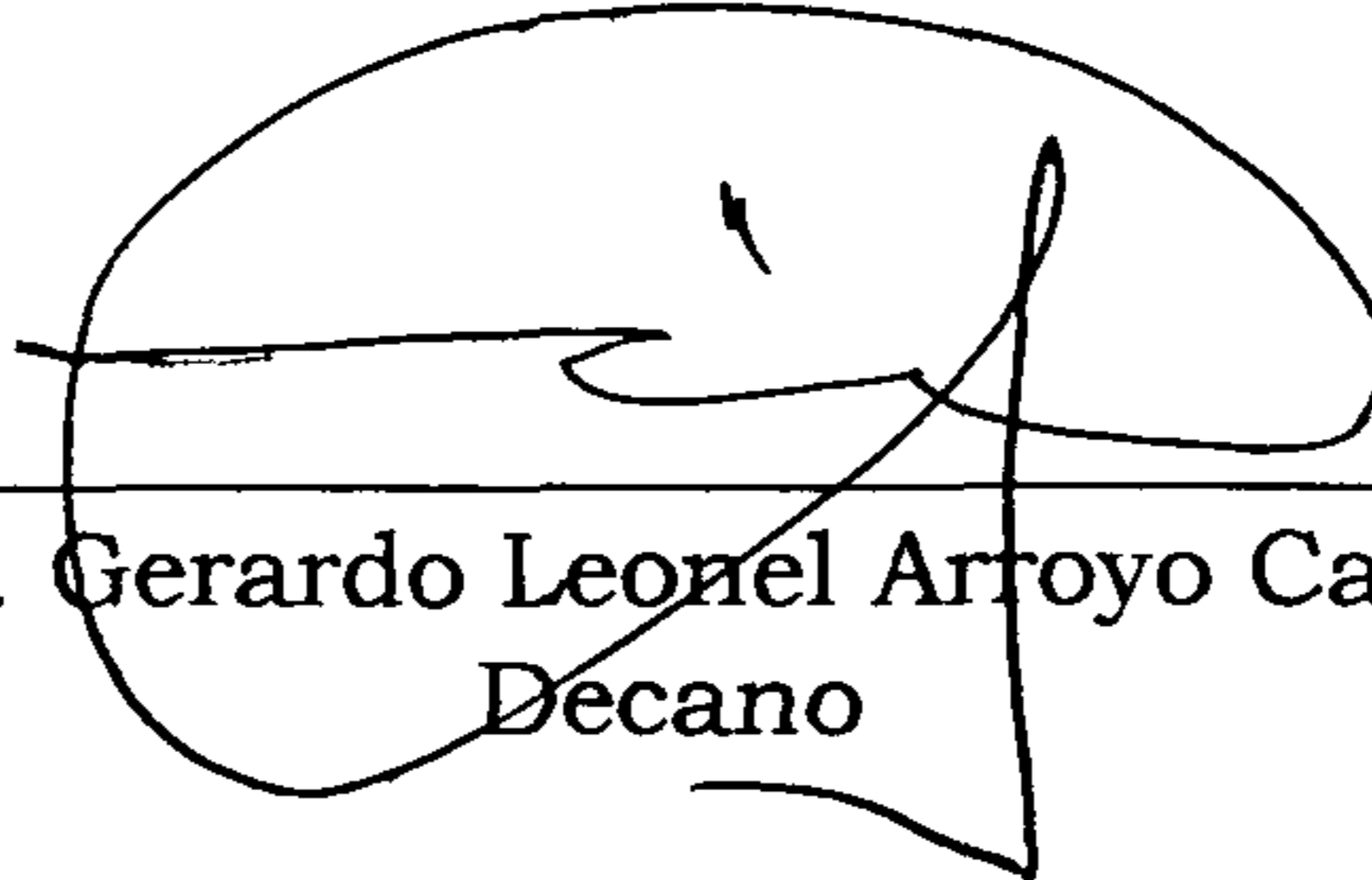
Licda. Maria del Carmen Bran
Revisora



Licda. Karin Herrera
Revisora



Licda. Alba Marina Valdés de García
Directora



M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano