

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Prueba del ácido glutámico descarboxilasa modificado
para la rápida identificación de *escherichia coli*
aisladas en urocultivos**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el
área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Iván Alexander Salinas Salcedo

ASESOR

Lic TM. William Henry Roldán Gonzáles.

CO-ASESOR

Lic TM. Javier Orlando Soto Pastrana

Lima – Perú

2012

DEDICATORIA

Mi dedicatoria a Dios por permitirme
Llegar a esta etapa de mi vida, en compañía
De mis padres que siempre me apoyaron,
Gracias a ellos, siempre confiaron en mí.

AGRADECIMIENTOS

- Al Lic. TM. William Henry Roldán Gonzáles, por su confianza, apoyo incondicional en este proyecto.
- Al Lic. TM Javier Orlando Soto Pastrana, por sus enseñanzas en este hermoso campo que es la bacteriología, su incondicional apoyo en la realización de esta investigación.
- Al Lic. TM José Aquino Minaya, por su incondicional apoyo con materiales de laboratorio para la realización de esta tesis.
- Al personal del área de microbiología del Hospital Nacional Docente San Bartolomé, mi profundo agradecimiento por ayudarme a conseguir los aislamientos para este trabajo.

INDICE

I.	Resumen	5
II.	Introducción y objetivos	7
III.	Métodos	14
IV.	Resultados	20
V.	Discusión	23
VI.	Conclusiones y recomendaciones	25
VII.	Referencias bibliográficas	27
VIII.	Anexos	33

I. RESUMEN

Objetivo: Evaluar la prueba del Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD) modificado para la rápida identificación de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos.

Métodos: Se procesó un total de 257 aislamientos bacterianos a partir de urocultivos procedentes del laboratorio de microbiología del Hospital San Bartolomé. Como controles internos, también se evaluaron aislamientos de diferentes muestras clínicas y cepas ATCC. Para obtener la sensibilidad, especificidad y la exactitud de la prueba GAD modificado, se utilizó la identificación bioquímica convencional como prueba *Gold Standard*.

Resultados: Todas las *Escherichia coli* mostraron una reacción positiva a la prueba GAD modificado, incluyendo aislados lactosa negativa, dando una sensibilidad del 100%. Otras enterobacterias, que incluyeron a *Salmonella* grupo C, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* y *Proteus vulgaris*, dieron un resultado negativo a la prueba GAD modificado, aún cuando fueron incubadas por un tiempo adicional de 24 horas, dando una especificidad del 100%. Sin embargo, la prueba GAD modificado presentó reacción positiva con aislamientos de *Shigella flexneri* (2) y *Shigella sonnei* (2).

Conclusiones: La prueba GAD modificado permite identificar a *Escherichia coli* a partir de aislamientos de urocultivos con alta sensibilidad, especificidad y exactitud, y puede ser utilizado en cualquier laboratorio por su rapidez y su bajo costo.

Palabras clave: *Escherichia coli*; GAD modificado; Glutamato Monosódico; Urocultivo.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) modified Test for rapid identification of *Escherichia coli* from urine cultures.

Methods: A total of 257 bacterial isolates from urocultures were tested. As controls, bacterial isolates from other clinical samples and ATCC strains were also tested. In order to determinate the sensibility, specificity and the exactitude of the GAD test, the conventional biochemical identification for enterobacteria were used as *Gold Standard*.

Results: All isolated strains of *Escherichia coli* were positive by the modified GAD test, even the lactose-negative *E. coli* strains, giving a sensitivity of 100%. Other enterobacteria strains were negative by the modified GAD, even when the period of incubation was 24 hours, giving a specificity of 100%. However, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains showed positive results when it was assayed on the modified GAD test.

Conclusion: The modified GAD test can identify correctly any isolate of *E. coli* from urocultures with a high sensitivity and specificity, and is suitable for carrying out in any laboratory.

Keywords: *Escherichia coli*; modified GAD test; Monosodium Glutamate; Urine culture.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El perineo es el área del cuerpo humano que se encuentra comprendido entre el ano y la región urogenital, la cual es frecuentemente colonizada por bacterias del tracto gastrointestinal. Sin embargo, estas bacterias pueden alcanzar la vejiga causando infecciones urinarias, un hecho que se reporta mayormente en mujeres (1, 2, 3).

La infección del tracto urinario (ITU) es el conjunto de procesos clínicos y patológicos que se producen en área del tracto urinario por causa de la presencia de microorganismos, generalmente bacterias (4). Las ITU no complicadas son responsables de un gasto estimado de 1 a 2 billones de dólares anuales en costos en cuidados de la salud anualmente (5). El 95% de las ITU no complicadas suelen ser producidas por alguna enterobacteria (2, 4, 5, 6, 7, 8). De todas ellas, la *Escherichia coli* es considerada como la responsable del 70% al 91% de las ITU. Sin embargo, otras bacterias gram negativas como *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp* y *Pseudomonas sp*. y bacterias gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* han sido identificadas como agentes etiológicos de ITU(4). Las ITU causadas por *Escherichia coli* pueden complicarse y generar sepsis causando un estimado de 40,000 muertes cada año en los Estados Unidos (EEUU) (5).

El diagnóstico microbiológico de la ITU se basa en el cultivo de orina, conteo de las colonias bacterianas, el examen microscópico y la sintomatología (4). Se han propuesto varios algoritmos a seguir para el diagnóstico de la ITU (9). Para identificar el microorganismo que produce la ITU, se evalúa la fermentación de lactosa y se puede realizar la prueba rápida de spot índol, que al dar positivo indica que el germen más probable es *Escherichia coli* (10). Sin embargo, para confirmar la sospecha se debe realizar la identificación una batería completa de bioquímica de la enterobacteria (7, 9, 10, 11, 12).

En los últimos años se han desarrollado métodos rápidos, sensibles y específicos para el diagnóstico de *Escherichia coli* (13). Entre ellos se tiene la detección enzimática de la β -glucuronidasa (GUD) impregnada en discos, con una eficiencia del 94% (14). Un método fluorogénico para evaluar la actividad β -glucuronidasa

usando como sustrato el Metilumbelliferil-D-Glucurónido (MUG) mostró buena especificidad con una eficiencia del 96%, sin embargo se necesita un lector especial (15). Iritani B y colaboradores desarrollaron otro método donde se utiliza la reacción en tubo IGG (indol, β -galactosidasa y β -glucoronidasa) que en 1 hora se evalúa la actividad de *Escherichia coli* sobre estos sustratos, mostrando un 95% de correcta identificación, sin embargo no era aplicable en colonias aisladas en Agar MacConkey (16). En 1989, Thaller y colaboradores diseñaron el T-mod, para la identificación presuntiva de *Enterobacteriaceae* en urocultivo, integrando fermentación de adonitol, fenilalanina desaminasa, β -glucoronidasa, mostrando una identificación del 100% para *Escherichia coli* (17). En el año 1993 se evaluó la utilidad del L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR), en forma de tiras reactivas, mostrando un 100% de negatividad para *Escherichia coli* (18, 19). Incluso en 1994, Trepeta y colaboradores agregaron Metilumbelliferil-D-Glucurónido para evaluar la actividad β -glucoronidasa en el Agar MacConkey (20). En el 2000, York y colaboradores publicaron un algoritmo para la validación de los test rápidos para *Escherichia coli*, evaluando la beta hemólisis, reacción a la lactosa, la prueba del PYR y la prueba con MUG, buscando identificar este germen en el menor tiempo y al menor costo (21).

Otra manera de confirmar la presencia de este microorganismo es mediante el uso de técnicas de PCR usando como blanco el gen *uidA* que codifica a la enzima GUD, siendo más sensible que el método fenotípico (6). Sin embargo estudios han mostrado que especies de *Shigella sp*, *Escherichia fergusonii* y *Escherichia vulneris* pueden dar resultados positivos por métodos genotípicos al GUD (22). Por otro lado, existe una enzima llamada Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD), cuya expresión se encuentra en *Escherichia coli*, siendo calificada por algunos investigadores como la más específica para este germen, aunque también suele expresarse en especies de *Shigella sp* (22, 23, 24).

Fiedler y Reiske en 1990, describieron un método rápido para la detección de la enzima GAD, usando solución hipertónica de cloruro de sodio y Tritón X-100 como agentes líticos, posibilitando la liberación de la enzima y su detección en 4 horas (13).

En nuestro medio, no se ha reportado sobre algún procedimiento similar para la identificación rápida de *Escherichia coli*. Probablemente, esto puede deberse a las limitaciones económicas para adquirir el aminoácido L-Ácido Glutámico

químicamente puro. Sin embargo, la posibilidad del uso del Glutamato monosódico, un producto alimenticio de la marca comercial (glutamato monosódico al 99%) originaría una alternativa económica para el desarrollo de la prueba GAD modificado.

Marco Teórico

Escherichia coli es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, bacilo gram negativo, en su mayoría móvil, anaerobio facultativo, normalmente inofensivo, que comprende parte de la flora normal intestinal humana y otros animales de sangre caliente (1, 7, 11, 25). Puede colonizar el tracto intestinal sin efectos adversos en el huésped o pudiendo ocasionar efectos adversos e incluso enfermedades crónicas (25).

Esta bacteria puede ser clasificado en tres grupos: Comensal, la cual coexiste con el huésped sin causar enfermedad, *Escherichia coli* patógena intestinal (diarreogénica) y la *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEC). Esta última clasificación fue propuesta en el año 2000 para aislamientos capaces de producir infección fuera del tracto intestinal, incluyendo a la *Escherichia coli* Uropatogénica (UPEC) (1, 25). Las cepas de UPEC son aisladas al menos en el 80% de todas las ITU adquiridas en la comunidad (25).

La fisiopatología de las ITU tiene inicio en la colonización del microorganismo en el introito vaginal y la región periuretral (mujeres) y en el prepucio (varones); estos microorganismos pueden alcanzar la vejiga por vía ascendente pudiendo generar la colonización vesical, adhiriéndose al epitelio, reproduciéndose y eliminándose por la orina. Sino produce lesión estamos ante una colonización asintomática, cuando el germen produce lesión en el epitelio, aparece la sintomatología, generándose infección (4, 6, 7, 11).

No todas las bacterias de la flora intestinal tienen la misma capacidad de producir ITU, sólo aquellas con una serie de factores de virulencia que le confieren la propiedad de adherirse al uroepitelio (4, 6, 7, 11, 26). En la génesis de la ITU, es casi indispensable que la bacteria posea la capacidad de adhesión, requiriendo para ello la producción de adhesinas peptídicas (4, 26). Estas adhesinas se encuentran en estructuras largas llamadas pilis o fimbrias, genéticamente determinadas, que se unen a determinados receptores del uroepitelio; las más

estudiadas son Fimbrias tipo 1 y Fimbrias tipo P. Las fimbrias P reconocen receptores formados por glicosfingolípidicos, que se encuentran en las vías urinarias altas y también en individuos con el antígeno sanguíneo P, esto hace susceptibles a estos individuos a sufrir pielonefritis aguda. La colonización con bacterias con fimbrias tipo 1, clínicamente presentan cistitis no complicadas (4, 26). Las aerobactinas son otro mecanismo de virulencia, la cual le confiere capacidad de captar hierro, existiendo una relación entre estas y las fimbrias P (4). Un prototipo de UPEC, denominada CFT073, fue aislada de un paciente con pielonefritis y luego ha sido totalmente secuenciada. Ésta y otras cepas uropatogénicas presentan una serie de factores de virulencia, tales como: el Pili (tipo I, P, S y F1C), toxinas (hemolisina [*hly*]), el factor citotóxico necrotizante [*cnf*], toxina vacuolizante [*vat*], sistemas de adquisición de hierro (enterobactina [*ent*]), aerobactina [*iuc*], etc. (25). La prevalencia de factores de virulencia varía entre diferentes cepas de UPEC. (25, 26, 27, 28).

La *Escherichia coli* coloniza el epitelio del tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida, para generar una relación de mutualismo entre el microorganismo y el hospedero. Para colonizar, la bacteria requiere el uso de la enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa para sobrevivir al pH bajo a través del paso por el estómago después de su ingestión (29, 30, 31, 32). Bajo condiciones fisiológicas, el pH del estómago humano posee un valor promedio de 2. Estudios detallados sobre la resistencia al ácido de este microorganismo expone tres sistemas (30, 31, 32, 33). La primera es un sistema represado de glucosa codificado por el gen *rpoS*. Las otras dos son inducidas por presencia de glucosa, un sistema requiere de Ácido Glutámico para su descarboxilación y está codificado por el gen *gadAB*; el otro sistema codificada por el gen *adiA*, requiere Arginina para su descarboxilación (30). La enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD) ha sido descrita en *Escherichia coli* y está codificada por dos genes virtualmente idénticos *gadA* y *gadB*, que codifican dos enzimas bioquímicamente indistinguibles (22, 23, 24, 34). También este gen ha sido reportada en gram positivos como *Listeria monocytogenes* (34). El GAD cataliza la descarboxilación irreversible de Ácido Glutámico produciendo ácido γ -aminobutírico (GABA) y dióxido de carbono (13, 35, 30, 34). Esta descarboxilación sucede en el citoplasma manteniéndolo neutro y se exporta el ácido γ -aminobutírico hacia el exterior en intercambio por otro sustrato, este proceso es

catalizado por el sistema GadC, que sirve como un antiporter al GABA (29, 30, 34, 36). Siendo este sistema el más potente para la resistencia al ácido (32, 34).

Una prueba de ello es que los cultivos que se encuentran en fase estacionaria se mantienen viables por muchas horas aún en condiciones extremas de acidez pH 2 a 3 (30, 31, 34, 36). Recientes estudios en condiciones de estrés sugiere que la adquisición de la isla genómica, (Elemento genómico transferidos horizontalmente), llamada en ingles Acid Fitness island (AFI) fue la etapa inicial para su evolución como microorganismo entérico; ahora el germen alcanza estos genes por duplicación y no por transferencia horizontal debido a que estos genes no se encuentran en otras especies relacionadas (29).

En el estudio realizado por De Biase y colaboradores (1999), en *Escherichia coli* entéricas comensales y patógenas ha identificado las estructuras GadA y GadB constituyentes del sistema GAD (36). Por ende la retención de esta enzima es importante para la sobrevivencia de esta bacteria, representando un estable detector, no correlacionando necesariamente con la presencia de marcadores de virulencia específicos (23).

La determinación fenotípica del GAD descrita por Fiedler y Reiske en 1990 y aplicada por Rice y colaboradores en 1993, y Tsoraeva y colaboradores en 2005; comprende un método rápido para la detección de esta enzima utilizando un medio hipertónico como cloruro de sodio al 9% y Tritón X-100 que sirven como agentes lisantes, posibilitando que la liberación de la enzima GAD y que la reacción se dé en un tiempo promedio de 4 horas (13, 35). Otros estudios como el realizado por Fiedler y Reiske utilizan la solución hipertónica de cloruro de sodio por tolueno para la liberación de la enzima. Sin embargo el uso de cloruro de sodio se ha establecido desde su uso en gram positivos (35, 37). En experimentos preliminares realizados por Rice y colaboradores (1993), donde se incorpora EDTA, no lograron incrementar la sensibilidad (35).

La presencia fenotípica de la enzima GAD ha sido reportada en *Escherichia coli*, con un rango de especificidad que oscilan de 95% a 99% (13, 22, 35). En un estudio realizado por Grant y colaboradores (2001), se encontró estos genes en cepas de *Escherichia coli* patogénicas y en fenotipos atípicos. La expresión genética del GAD está relacionado en el trabajo original de Rice y colaboradores (1993) donde el ensayo fenotípico de esta enzima demostró un 95% de especificidad para *Escherichia coli* (23). No obstante en el estudio realizado por McDaniels y

colaboradores (1996); usando ambos métodos (genotípico y fenotípico) detectó la enzima en 96.8% de un grupo de aislados de esta bacteria y el gen *gadAB* en todas, incluyendo los grupos patogénicos relacionados al consumo de carne (22, 23).

Además, en el estudio realizado por McDaniels y colaboradores (1996) se encontró que otras bacterias tales como *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter intermedius*, *Flavobacterium spp*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella arizonae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae* dieron un resultado negativo a la prueba genotípica y fenotípica del GAD (22). Cabe recalcar que especies de *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp*, *Pseudomonas sp* así como *Staphylococcus saprophyticus* pueden ser causantes de ITU, sin embargo, estos microorganismos no reaccionan a la prueba del GAD en muestras de orina, dando una especificidad del 100%.

En Cuba, un estudio preliminar de aplicación de este método para la identificación de *Escherichia coli* en muestras de orina en el Hospital Pediátrico “Juan Manuel Marquez”, realizado por Tsoraeva, arrojó resultados de 97.14% de sensibilidad y 100% de especificidad diagnóstica, Otro estudio realizado también por Tsoraeva en muestras clínicas incluyendo Urocultivo, Coprocultivo, exudados oticos, exudados vaginales y muestras uretrales, demostró una sensibilidad de 100% y una especificidad de 82.82%, debido a la presencia de *Shigella sp* en coprocultivo (13).

Teniendo en cuenta la elevada frecuencia de aislamientos de *Escherichia coli* en muestras de orina, es recomendable la aplicación de la prueba de GAD, para la identificación rápida de este microorganismo y debido a las limitación de algunos laboratorios clínicos de acceso a ciertos reactivos como Tritón X-100 y el Ácido Glutámico químicamente puro, siendo el objetivo de este trabajo proponer como alternativa reemplazar estos compuestos por una sal de EDTA como agente lítico y Glutamato monosódico comercial como sustrato, demostrando su utilidad en urocultivo comparándolo con la identificación bioquímica tradicional.

II. MÉTODOS

2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Descriptivo y de corte transversal

2.2 DISEÑO

Estudio Observacional

2.3 POBLACIÓN

Todos los aislamientos urocultivos, emitidas al laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Docente San Bartolomé HONADOMANI, durante el periodo comprendido desde Febrero 2011 – Junio 2011.

2.4 MUESTRA

Para el presente estudio se realizó un muestreo probabilístico por conveniencia, tomándose sólo las colonias que crecieron en el Agar MacConkey a la vez sean clasificadas como enterobacterias. Se obtuvo un tamaño muestral (n) por medio de la formula general, considerando la prevalencia de *Escherichia coli* entre las Enterobacterias aisladas en urocultivo de 82.0% (p=0.82), esto se obtuvo al observar la frecuencia de aislamiento de este germen en el software hospitalario WHONET™ del Hospital Nacional Docente San Bartolomé, durante el año 2010.

Para esto se empleó un nivel de confianza de 95%, siendo la significancia de $\alpha = 0.05$ y el $Z = 1.96$. La prevalencia hipotética estimada es 82.0% (p = 0.82).

$$n_c = \frac{Z^2 \cdot p (1-p)}{\alpha^2} \rightarrow n = \frac{(1,96)^2 \cdot 0,82 (1-0,82)}{(0,05)^2} = 226$$

2.5 VARIABLES

- **Variable Independiente:** Identificación de *Escherichia coli*.
- **Variable Dependiente:** Prueba del Ácido Glutámico Descarboxilasa modificada.

2.6 MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se realizó dos técnicas para la identificación microbiana de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos, la identificación microbiana convencional por medios diferenciales (Estándar) y la prueba de GAD modificado.

Para esto, se realizaron los permisos y las coordinaciones respectivas con el Departamento de Patología Clínica del Hospital Nacional Docente de la Madre - Niño (HONADOMANI) San Bartolomé, para poder tener acceso a las placas de aislamiento primario, donde se hacía una siembra en crioviales con Agar TSA para ser transportadas al Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” y realizar las pruebas que a continuación se describe:

Identificación Microbiana Convencional

Se realizó según la metodología descrita para el aislamiento de microorganismos en muestras de orina, según el Manual de Microbiología Médica de Koneman, y en concordancia con otras bibliografías (1, 7, 12). Se usó el medio de aislamiento primario Agar MacConkey, donde se realizó la lectura de las placas, con las colonias sospechosas de *Escherichia coli* y otras enterobacterias. (1, 7, 10, 11). Luego se procedió a hacer un resembrado en los medios diferenciales para la identificación de enterobacterias, los que comprendieron al Agar Citrato de Simons, Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Agar Motilidad Orinitina Indol (MIO), Agar Úrea de Christensen, Caldo glucosado para prueba Rojo de Metilo y Voges-Proskauer. Incubándolos a 37°C por 18 a 24 horas (7, 12).

Usando la tabla de identificación de enterobacterias descrita por Koneman (7). Se procedió a la identificación bacteriana por estos medios diferenciales, identificando a nivel de género y especie.

Prueba de Ácido Glutámico Descarboxilasa Modificado

La prueba del Ácido Glutámico Descarboxilasa modificado consistió en reemplazar el Ácido L-glutámico químicamente puro y el detergente Tritón X-100 por el Glutamato Monosódico comercial y EDTA 0.001M, de acuerdo a lo establecido por Bergström et al (1979) el EDTA quela los iones calcio, desestabilizando la membrana externa bacteriana, facilitando la liberación del contenido citoplasmático (38).

Por lo tanto el reactivo GAD modificado consistió en 0.1g de Glutamato Monosódico comercial, 0.005g de verde de bromocresol (Albis), 9g de NaCl (Merck), 37mg de Na₂EDTA (Merck) todos ellos disueltos en 100mL de H₂O destilada, con un pH final de 3.4 (ajustado con HCl 1N).

Se realizó un subcultivo en agar MacConkey, luego de una incubación de 24 horas a 37°C, se realizó la prueba del GAD modificado. Para ello, se tomó una asada de la colonia y se suspendió en 0.5mL de solución salina 0.85%, llevándola al patrón de turbidez equivalente al tubo número 1 de la escala de McFarland. De esta suspensión se agregó 0.2mL del reactivo de GAD modificado y luego se incubó a 37°C, donde se realizó lecturas previas por cada hora, por un máximo de 4 horas. La prueba fue considerada positiva cuando el color del medio (amarillo) cambio de color, (azul o violeta) (13).

Controles Negativo y Positivo para la Prueba de Ácido Glutámico Descarboxilasa Modificado

Se utilizaron cepas ATCC para los controles positivos y negativos de la prueba, corriendo un control positivo, control negativo y una prueba blanco en cada ejecución de la prueba, que se realizó en el Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión”. Las cepas ATCC fueron donadas por el laboratorio de HONADOMANI San Bartolomé. Siendo consideradas como controles positivos la cepa *Escherichia coli* ATCC[®] 25923 y la cepa *Escherichia coli* ATCC[®] 35218. Y como controles negativos las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 700603.

2.7 PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Procesamiento y Presentación de Datos:

Los datos recolectados fueron llenados en tablas de frecuencia. Considerando el aislamiento e identificación convencional como la prueba de oro y la técnica del GAD modificado como la prueba a evaluar.

Se presentó los datos sobre la distribución de los microorganismos identificados y su respectivo resultado con la prueba del GAD modificado en tablas. A la vez se realizó un gráfica de pie sobre la distribución con respecto al tiempo de reacción que mostraron los aislamientos pertenecientes a *Escherichia coli* con la prueba del GAD modificado.

Se elaboró otra tabla, donde se especifique la frecuencia en que las cepas identificadas dieron reacción con la prueba y serán presentadas en frecuencias absolutas y relativas (%). Considerando también el resultado que mostraron los aislamientos no *Escherichia coli*, tomados como control de la prueba. El formato de cada una de las mencionadas se detalla en la siguiente sección.

Para estimar la validez y seguridad de la prueba de GAD modificado, los datos se presentaron en una tabla tetracórica, para estimar los índices de Sensibilidad, Especificidad y Exactitud diagnóstica. El formato se detalla en la siguiente sección de este documento.

Estadística descriptiva:

Se realizó una distribución de los aislamientos de urocultivo, de los gérmenes Gram negativos ingresados al estudio, mediante frecuencias en tablas. Ver tabla 1.

De los resultados obtenidos mediante la aplicación de la prueba de GAD modificado, se obtuvo frecuencias de distintos aislamientos que dieron positivas a esta prueba, tomando como referencia la identificación convencional por medios diferenciales, representándose en una tabla de frecuencias (40). Ver tabla 2.

En una gráfica de barras, se distribuyó los aislamientos de *Escherichia coli* que dieron reactivo a la prueba de GAD modificado, distribuyéndose por el tiempo de incubación para dar un resultado positivo a la prueba. (Ver anexos gráfica 1).

Estimación Índice de Sensibilidad, Especificidad Y Exactitud

Con los resultados obtenidos de la prueba de GAD modificado se construyó una tabla tetracórica, donde se evaluó los índices de sensibilidad (S), especificidad (E) y exactitud (Ex) (40). La prueba de referencia fue la identificación bioquímica convencional con los Medios mencionados con anterioridad.

A continuación se presenta la tabla 5 (Ver anexo N°13), donde se realizó el cálculo de los índices mencionados.

Sensibilidad (S): La sensibilidad indicará la proporción del total de *Escherichia coli* que el test es capaz de detectar. (41, 40). Está definida por la proporción dada por:

$$S = \frac{A}{A + C}$$

Especificidad (E): La especificidad indicará la proporción de otras enterobacterias confirmadas como tales por el resultado negativo del test GAD modificado. (41, 40).

$$E = \frac{D}{B + D}$$

Exactitud (Ex): Es la probabilidad que un nuevo test de un verdadero resultado cuando el paciente está sano o enfermo (13).

$$Ex = \frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN}$$

III. RESULTADOS

Se procesaron en total 257 aislamientos de urocultivos con un conteo mayor a 100,000 UFC/mL. Distribuyéndose de la siguiente manera: 231 (90%) correspondieron a *Escherichia coli*, 15 (6%) a *Klebsiella pneumoniae*, 7 (3%) a *Proteus mirabilis*, 2 (1%) a *Klebsiella oxytoca* y 2 (1%) a *Citrobacter freundii*.

De las 231 de *Escherichia coli* ensayadas absolutamente todas dieron reacción positiva a esta prueba rápida, sin importar su característica metabólica frente a la lactosa, se procesaron 188 (81.3%) de *Escherichia coli* lactosa positivo y 43 (18.7%) lactosa negativa. Ningún otro microorganismo aislado de urocultivo que fuese diferente de *Escherichia coli* fue detectada la actividad de esta enzima (Tabla 1).

Tabla 1. Detección de la enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa mediante la prueba del GAD modificado en las enterobacterias incluidas en el estudio.

Microorganismo	Total de Aislamientos	% de positivas
<i>Escherichia coli</i>	231	100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	0%
<i>Proteus mirabilis</i>	7	0%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0%
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0%
TOTAL	257	100%

Con la finalidad de determinar el tiempo mínimo que la prueba GAD modificado requiere para observar un resultado positivo, se realizó la distribución del tiempo reacción positiva, por el viraje evidente del indicador verde bromocresol, durante la revisión en intervalos de una hora de incubación. De esta manera, se observó que 187 (81%) de *Escherichia coli* reaccionaron en 1 hora de incubación, 35 (15%) reaccionaron en 2 horas de

incubación, 7 (3%) reaccionaron a las 3 horas y 2 (1%) reaccionaron a las 4 horas de incubación. Ninguna cepa de *Escherichia coli* necesitó 24 horas de incubación para mostrar reacción positiva a la prueba. En la gráfica N°1 (ver anexo N°12) se muestra la distribución con respecto al tiempo de las reacciones positivas a la prueba del GAD modificado.

Los cepas control, de *Escherichia coli* (ATCC® 25923 y ATCC® 35218) dieron un resultado positivo, mientras que las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 y la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 consideradas como controles negativos no mostraron reacción, incluso cuando se aumentó el tiempo de incubación a 24 horas.

Además, se utilizaron otras enterobacterias aisladas de diferentes muestras clínicas, obtenidas del laboratorio de microbiología HONADOMANI San Bartolomé. De ellas, solo 2 aislamientos de *Shigella flexneri* y 2 aislamientos de *Shigella sonnei* dieron positivo a la prueba GAD modificado, mientras que las demás enterobacterias, no *Escherichia coli*, mostraron actividad nula frente a la enzima. Los resultados obtenidos así como la cantidad de aislamientos se ilustran en la tabla 3 (Ver anexo N°9).

Comparando los resultados de la prueba del GAD modificado con la identificación bioquímica convencional como prueba *Gold Standard*, se observó una Sensibilidad de 100% , una Especificidad de 100%, y una Exactitud de 100% (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de la cantidad de resultados a la prueba GAD modificado con la cantidad de resultados emitidos por identificación convencional con medios diferenciales

RESULTADO DE GAD MODIFICADO	IDENTIFICACIÓN CONVENCIONAL POR USO DE MEDIOS DIFERENCIALES		TOTAL
	<i>Escherichia coli</i>	Otra Enterobacteria	
Positivo	231	0	231
Negativo	0	26	26
TOTAL	231	26	257

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos concuerdan con los datos reportados por Tsoraeva (13), Rice (35) y McDaniels (22) en que la *Escherichia coli* es una enterobacteria gram negativa que presenta actividad para la enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa; en dichos estudios también se menciona que especies de *Shigella* pueden presentar actividad de la enzima del GAD, demostrándose incluso la presencia del gen *gadAB*. No hay estudios previos donde se haya evaluado la actividad de esta enzima frente a su sal conjugada, el Glutamato monosódico comercial, este posee un 99.0% de pureza según la descripción del producto. El fundamento bioquímico de esta, se postula que el sodio es fácilmente disociado en medio acuoso. Dejando que la enzima actúe sobre la molécula disociada (42).

Todas las *Escherichia coli* (n=231) aisladas en urocultivos dieron positivo a la reacción del GAD modificado, incluyendo las cepas ATCC usadas como control positivo. Sin importar su característica fenotípica como el metabolismo de lactosa, aislamientos lactosa positivo y lactosa negativo mostraron reacción a la prueba GAD modificado. Así también, en el estudio realizado por McDaniels (1996) que encontró actividad de la enzima en aislamientos de *Escherichia coli* enteropatógenas y enterohemorrágicas, así como también en aislamientos ambientales (22).

Con respecto al establecimiento del tiempo de incubación se observó que la incubación de 2 horas permitió la identificación de 222 (96%) aislados de *Escherichia coli*. Los protocolos de estudios anteriores proponen un tiempo de incubación máximo de 4 horas. Tsoraeva (2005) reportó que el 95% de las reacciones positivas se dieron a la hora de incubación y el total de reacciones a las dos horas (13). En este trabajo, a pesar de aumentar el inóculo bacteriano al equivalente al tubo número 1 de McFarland, no se pudo reducir el tiempo de incubación dentro de la primera hora, pudiéndose deber a muchos factores, partiendo desde la variación de la actividad enzimática frente al Glutamato monosódico comercial hasta la efectividad lítica de los agentes usados como el Tritón X-100 y el EDTA usado en este estudio.

Al igual que en el estudio de McDaniels (1996) donde se evaluó la presencia fenotípica del GAD frente a diferentes bacterias gram negativas, en este

estudio también se evaluó la actividad frente al Glutamato monosódico, encontrándose ninguna reacción positiva, excepto por dos aislamientos de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*, tal como se reporta en estudios anteriores (22, 35).

Usando la prueba del GAD modificado, con Glutamato monosódico y EDTA, se obtuvo una sensibilidad de 100%, una especificidad de 100% y una exactitud de 100%, porcentaje similar a los presentados por Tsoraeva que obtuvo una sensibilidad de 100%, una especificidad de 82.8% y una exactitud de 92% (13). En este trabajo se obtuvo estos porcentajes altos debido a que se consideró solo los aislamientos de urocultivo mientras en el estudio de Tsoraeva se consideró muestras clínicas de coprocultivo, por lo que se manifestó la reacción positiva de especies de *Shigella*, afectando la especificidad. Estudio realizado por McDaniels reporta una sensibilidad de 96.87% para la prueba fenotípica del GAD, debido a dos aislamientos no mostraron actividad de esta enzima (22). Así también tenemos el estudio de Rice que demostró una especificidad de 95% en aislamientos clínicos y ambientales (35). A esto se debe recalcar que en la metodología usada en los estudios mencionados usan como sustrato el L-Ácido glutámico. Este hallazgo es uno de los primeros reportes donde se usó al Glutamatomonosódico comercial como sustrato de la enzima GAD.

La presencia de *Shigella* en urocultivo, en el caso de darse en infantes, en especial niñas, su característica macroscópica de las colonias son fácilmente diferenciables de *Escherichia coli*. Dada la cuenta elevada de aislamientos de *Escherichia coli* se recomienda la aplicación de esta prueba rápida de GAD modificado para la identificación de este microorganismo, teniendo en cuenta los altos valores de sensibilidad (100%), especificidad (100%) y exactitud (100%) obtenidos en este estudio, siendo semejantes al reportado anteriormente por otros estudios que se usó como sustrato al L-Ácido Glutámico y como agente lítico al Tritón X-100 (22, 35). Sin embargo, se discute la pureza del Glutamato monosódico comercial, debido a que, es usado para el consumo alimenticio.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- El presente estudio constituye un trabajo inédito, no se ha encontrado similar trabajo publicado en la literatura, donde se evidenció la actividad de la enzima GAD sobre la sal sódica del L-Ácido Glutámico, es decir el Glutamatomonosódico comercial.
- La prueba del GAD modificado obtuvo resultados semejantes a la prueba descrita por Tsoraeva et al (2005), reemplazando el substrato L-Ácido Glutámico y el agente lisante Tritón X-100, por el Glutamato monosódico comercial y EDTA disódico, respectivamente, minorando gastos de manera significativa.
- La prueba del GAD modificado, al igual que la prueba descrita por Tsoraeva et al (2005), resulta ser específica para aislamientos de *Escherichia coli*, lo que acorta el tiempo de identificación de esta bacteria a un mínimo de 1 hora y un máximo de 4 horas.
- Debido a su alta sensibilidad (100%), alta especificidad (100%) y su alta exactitud (100%) para la identificación de *Escherichia coli*, el uso de esta prueba es recomendable para su uso rutinario en el laboratorio clínico, en el área de urocultivo.
- La factibilidad económica y utilidad de la prueba permite su aplicación en los laboratorios de microbiología en nuestro medio.

6.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar un mayor cantidad de aislamientos de enterobacterias, incluyendo a la *Escherichia coli* para validar la prueba GAD modificado
- Realizar un estudio del GAD modificado junto con la prueba GAD original para realizar una comparación directa.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hawkey PM. Identification of Enterobacteriaceae. En: Gillespie SH, Hawkey PM editores. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2da ed. England; 2005. p. 341 – 366.
2. Hooton TM, Scholes D, Stapleton AE, Roberts PL, Winter C, Gupta K, Samadpour M, Stamm WE. A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. N Engl J Med. 2000; 343: 992 – 997.
3. Manges AR, Tabor H, Tellis P, Vincent C, Tellier PP. Endemic and epidemic lineages of Escherichia coli that cause urinary tract infections. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 1575-1583.
4. Brenes F. Generalidades de la ITUs. En: Brenes F. Manual de Evaluación Diagnóstica y Terapéutica de las Infecciones del Tracto Urinario (ITUs). Madrid: Sociedad Española de Medicina Rural y Generalista. 2003. p. 12 – 25.
5. Vicent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois C, Dutil L, Galanakis C, et al. Food Reservoir of Escherichia coli Causing Urinary Tract Infections. Emerg Infect Dis. 2010; 16: 88 – 95.
6. Chromek M, Brauner A. Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. J Mol Med. 2007; 86: 37-47
7. Koneman, E. W. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W. C. Winn. Diagnostico Microbiológico. 5ta ed. Lippincott. Philadelphia; 1997.
8. Tay M, Lee J, Wee I, Oh H. Evaluation of Intensive Care Unit-acquired Urinary Tract Infection in Singapore. Annl Acad of Med. 2010; 39: 460 – 465.

9. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk M. The Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107:361-367.
10. Carey R, Schuster M, McGowan K. *Medical Microbiology For The New Curriculum A Case-Based Approach.* Canada: JohnWiley & Sons Inc; 2008.
11. Murray, P. R, Rosenthal K. S, Pfaüer M. A: Enterobacteriaceae. En: Murray et al. *Microbiología Médica.* 5ta ed. Madrid: Elsevier; 2007. p. 323 – 338.
12. Rojas N, Chávez E, García F. *Bacteriología Diagnóstica.* Costa Rica; 2008. p. 99 – 112.
13. Tsoraeva A. Muñoz JL. Aplicación de la prueba rápida de Glutamato descarboxilasa para la confirmación de *Escherichia coli* aisladas a partir de muestras clínicas. *Rev Cubana Med. Trop;* 2005; 57.
14. Hansen W, Yourassowsky E. Detection of β -Glucuronidase in Lactose Fermenting Members of the Family Enterobacteriaceae and Its Presence in Bacterial Urine Cultures. *J Clin Microbiol.* 1984; 20: 1177 – 1179.
15. Feng P, Hartman P. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 43: 1320-1329.
16. Iritani B, Inzana TJ. Evaluation of a rapid tube assay for presumptive identification of *Escherichia coli* from veterinary specimens. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 564-566.
17. Thaller MC, Berlutti F, Dainelli B, Pezzi R. New plate medium for screening and presumptive identification of gram-negative urinary tract pathogens. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 791-793.

- 18.** Chagla AH, Borczyk AA, Aldom JE, Dalla Rosa S, Cole DD. Evaluation of the L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide hydrolysis test for the differentiation of members of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 1946-1948.
- 19.** Inoue K, Miki K, Tamura K, Sakazaki R. Evaluation of L-pyrrolidonyl peptidase paper strip test for differentiation of members of the family Enterobacteriaceae, particularly *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1811-1812.
- 20.** Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1984; 19: 172-174.
- 21.** York MK, Baron EJ, Clarridge JE, Thomson RB, Weinstein MP. Multilaboratory validation of rapid spot tests for identification of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3394-3398.
- 22.** Mc Daniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for Glutamate Decarboxylase and β -D-Glucuronidase. *Appl and Environ Microb.* 1996; 62: 3350 – 3354.
- 23.** Grant M, Weagant S, Feng P. Glutamate Decarboxylase Genes as a Prescreening Marker for Detection of Pathogenic *Escherichia coli* Groups. *Appl and Environ Microbiol.* 2001; 67: 3110 – 3114.
- 24.** Smith K, Kassam T, Singh B, and Elliot J. *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J Bacteriol.* 1992; 174: 5820 – 5826.
- 25.** Lloyd A, Henderson T, Vigil P, Mobley H. Genomic Islands of Uropathogenic *Escherichia coli* contribute to Virulence. *J Bacteriol.* 2009; 191: 3469- 3481.

26. Johnson J. Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. Clin Microb Rev. 1991; 4: 80 – 128.
27. Lloyd A, Rasko D, Mobley H. Defining Genomic Islands and Uropathogen-specific Genes in Uropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2007; 189: 3432- 3446.
28. Siegfried L, Kmetová M, Puzova H, Molokacova M, Filka J. Virulence-associated factors in *Escherichia coli* strains isolated from children with urinary tract infections. J Med Microbiol. 1994; 41: 127 – 132.
29. Bergholz TM, Tarr CL, Christensen LM, Betting DJ, Whittam TS. Recent gene conversions between duplicated glutamate decarboxylase genes (*gadA* and *gadB*) in pathogenic *Escherichia coli*. Mol Biol Evol. 2007; 24: 2323-2333.
30. Castanie M, Penfound T, Smith D, Elliott J, Foster J. Control of Acid Resistance in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1999; 181: 3525 – 3535.
31. Hersh B, Farooq F, Barstad D, Blankenhorn D, Slonczewski J. A. Glutamate-Dependent Acid Resistance Gene in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1996; 178:3978 – 3981.
32. Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL, Foster JW. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1995; 177: 4097 - 4104.
33. Lin J, Smith M, Chapin K, Baik H, Bennet G, Foster J. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 1996; 62: 3094 – 3100.
34. Capitani G, De Biase D, Aurizi C, Gut H, Bossa F, Grütter MG. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. 2003; EMBO J. 22: 4027 - 4037.

- 35.** Rice EW, Johnson CH, Dunnigan ME, Reasoner DJ. Rapid glutamate decarboxylase assay of detection of *Escherichia coli*. Appl And Envirom Microb. 1993; 59: 4347 – 4349.
- 36.** De Biase D, Tramonti A, Bossa F, Visca P. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. Mol Microbiol. 1999; 32: 1198-1211.
- 37.** Jilly BJ, Schreckenberger PC, LeBeau LJ. Rapid glutamic acid decarboxylase test for identification of *Bacteroides* and *Clostridium* spp. J Clin Microbiol. 1984; 19: 592-593.
- 38.** Bergström S, Normark S. β -lactam Resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of the ampC-mediated chromosomal β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 1979; 16: 427-433.
- 39.** Freier PA, Graves MH, Kocks FE. A rapid glutamic decarboxylase test for identification of bacteria. Ann Clin Lab Sci. 1976; 6:537 – 539.
- 40.** Duane M, Ilstrup. Statistical methods in microbiology. Clin Microbiol Revie. 1990; 3: 219 – 226.
- 41.** Daniel W. Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed.México. 2002.
- 42.** Wingrove A. Química Orgánica. 1ra ed. México. 1989.

I. ANEXOS

ANEXO 1. REACCIÓN DE LA PRUEBA GAD MODIFICADO

0.5mL de Solución Salina más 0.2mL de Reactivo GAD modificado.
(Solución blanco)



ANEXO 2. REACCIÓN DE LA PRUEBA GAD MODIFICADO DE UN AISLAMIENTO DE *Escherichia coli*

0.5mL Suspensión de *Escherichia coli* más 0.2mL de reactivo GAD modificado



Después de una hora de incubación a 37°C. Nótese el viraje del medio hacia azul (pH alcalino)



**ANEXO 3. REACCIÓN DE LA PRUEBA GAD MODIFICADO DE UN
AISLAMIENTO DE *Proteus mirabilis***

0.5mL Suspensión de *Proteus mirabilis* más 0.2mL de reactivo GAD modificado.

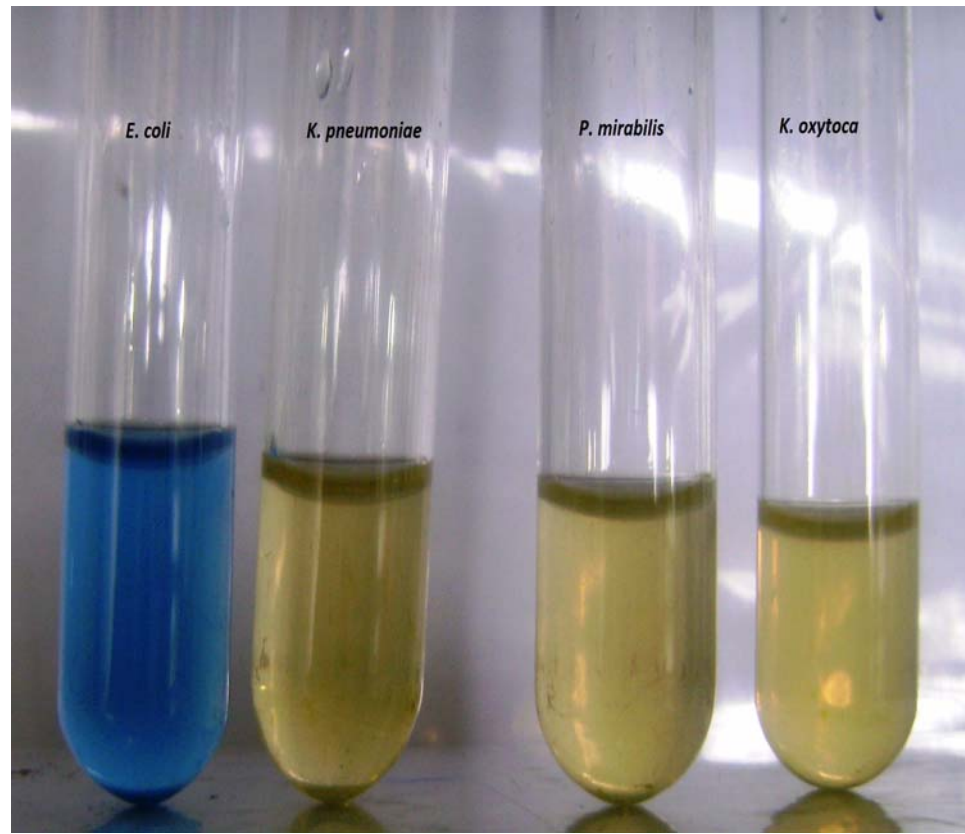


Incluso después de 24 horas de incubación a 37°C. Observe que el medio no alcanza el viraje hacia azul



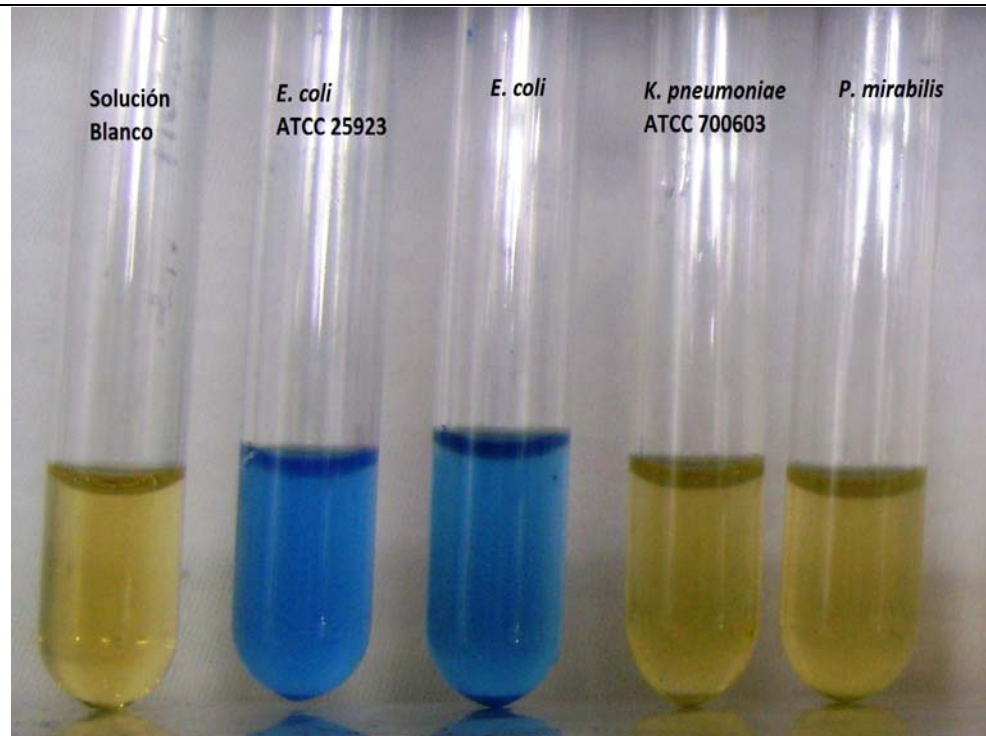
ANEXO 4. REACCIÓN DE LA PRUEBA GAD MODIFICADO EN AISLAMIENTOS DE UROCULTIVO.

Resultado después de una incubación de 2 horas. Nótese la diferencia de color entre el aislamiento de *Escherichia coli* y la demás enterobacterias más frecuentes en urocultivo.



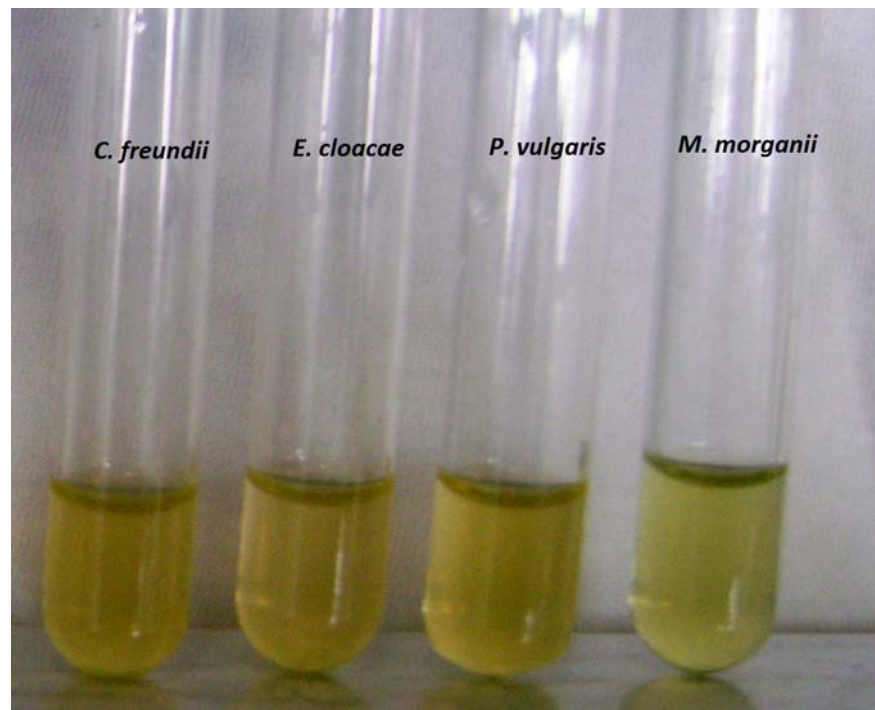
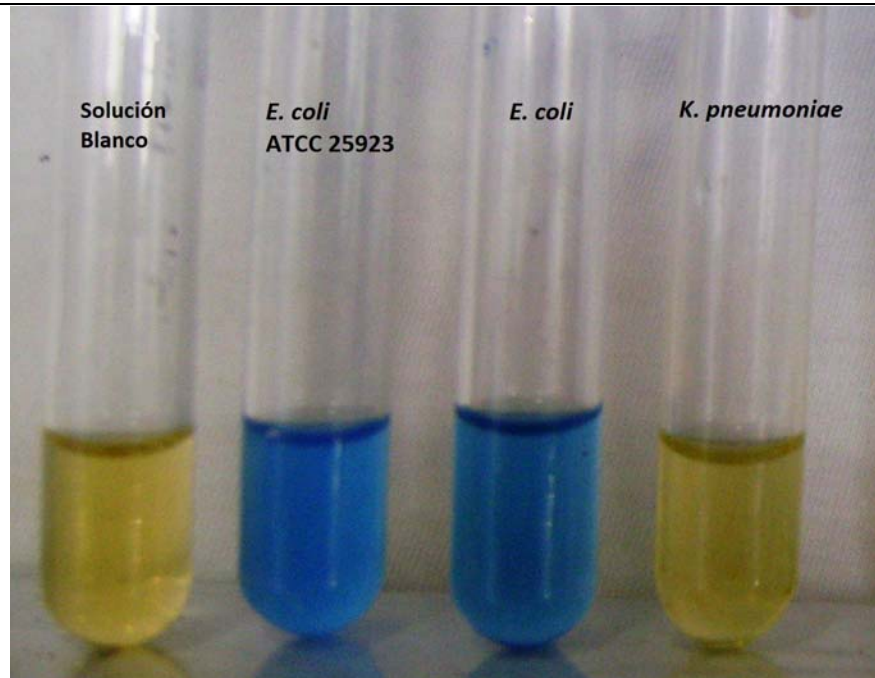
ANEXO 5. REACCIÓN A LA PRUEBA GAD MODIFICADO DE SOLUCIÓN BLANCO, CONTROL POSITIVO, MUESTRA POSITIVA, CONTROL NEGATIVO, MUESTRA NEGATIVO.

Resultado después de una incubación de 2 horas.



ANEXO 6. RESULTADOS OBTENIDOS EN OTRAS ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE DIFERENTES MUESTRAS CLÍNICAS NO UROCULTIVO.

Resultado después de una incubación de 2 horas.



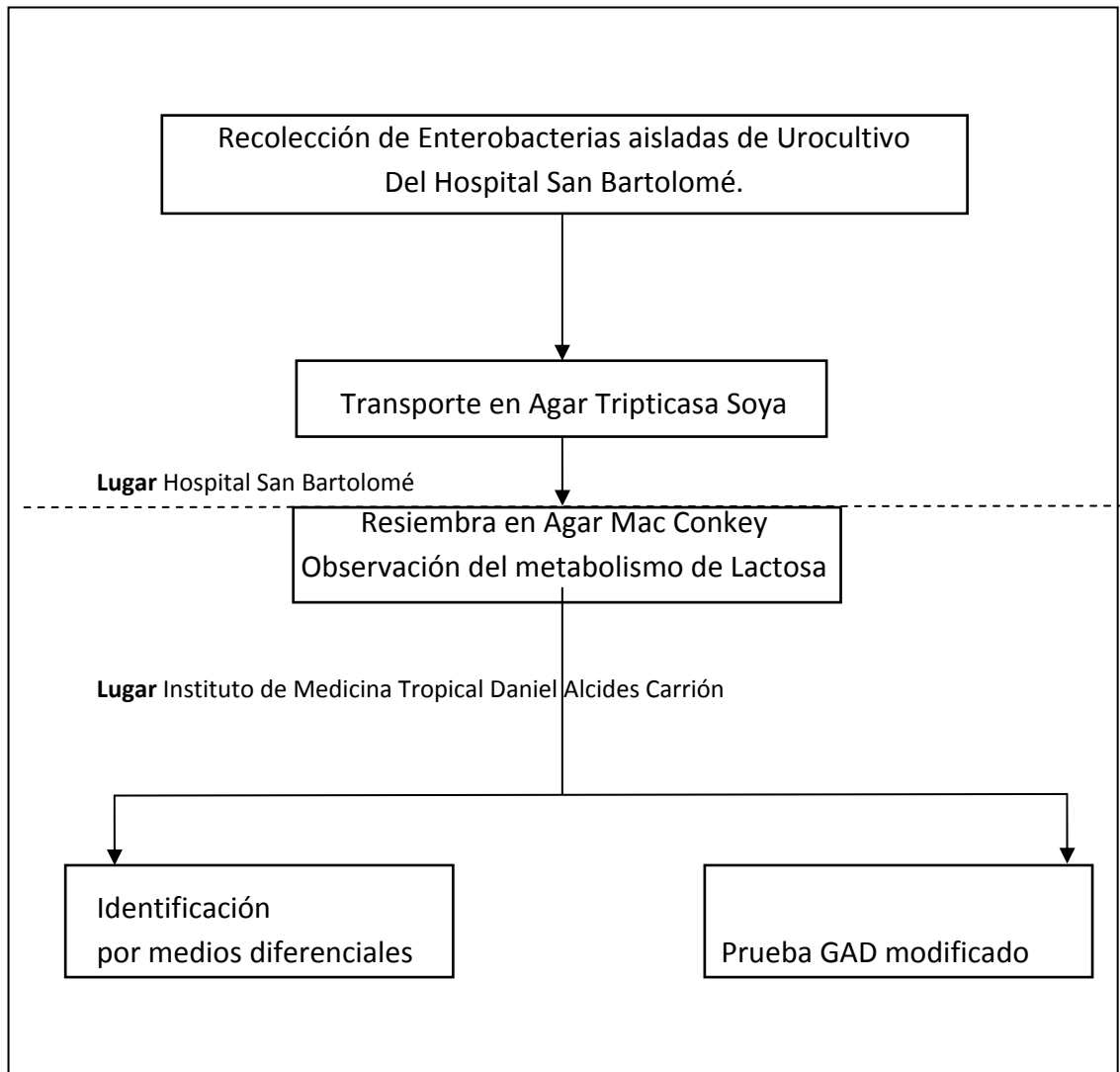
ANEXO 7. PREPARACIÓN DE REACTIVO GAD MODIFICADO

- Pesar las siguientes cantidades

Reactivo	Cantidad (g)
Glutamato monosódico comercial	0.1
Verde de Bromocresol	0.005
NaCl	9.0
EDTA disódico	0.037

- Disolver los componentes en 100mL de agua destilada.
- Ajustar a un pH de 3.4.
- Esterilizar por filtración. Guardar en un frasco ámbar.
- Mantener el reactivo en refrigeración (4 – 6 °C).

ANEXO 8. DIAGRAMA DE FLUJO

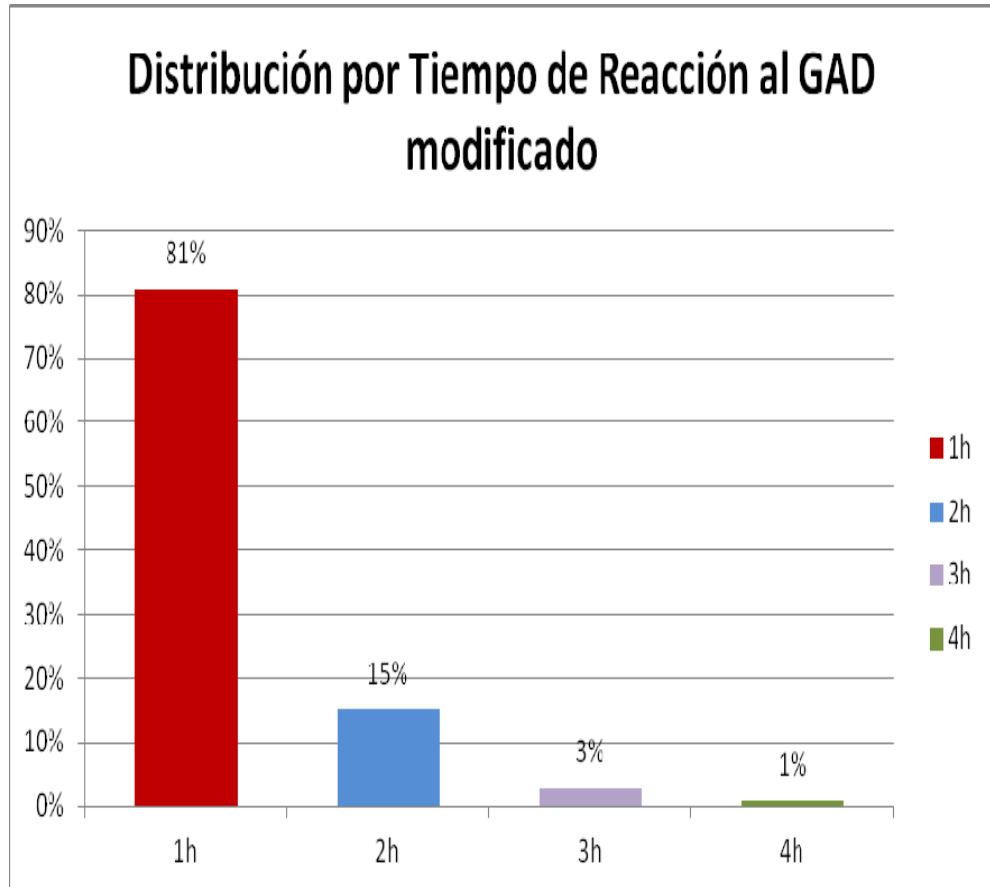


ANEXO 9. TABLA 3

TABLA 3. RESULTADOS OBTENIDOS DE OTRAS ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE DIFERENTES MUESTRAS CLÍNICAS NO UROCULTIVO PARA LA DETECCIÓN DE LA ENZIMA ÁCIDO GLUTÁMICO DESCARBOXILASA MEDIANTE EL GAD MODIFICADO.

Aislamientos en muestras clínicas diferentes de urocultivo	Cantidad	Nº Aislamientos positivos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	0
<i>Proteus mirabilis</i>	9	0
<i>Salmonella enteritidis</i> serotipo C	3	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0
<i>Shigella flexneri</i>	2	2
<i>Shigella sonnei</i>	2	2
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0
<i>Morganella morganii</i>	1	0

ANEXO 12. GRÁFICA 1. DISTRIBUCIÓN DE REACCIONES POSITIVAS A LA PRUEBA DEL GAD MODIFICADO



ANEXO 13. TABLA TETRACÓRICA

RESULTADO DE GAD MODIFICADO	IDENTIFICACIÓN CONVENCIONAL		BIOQUÍMICA	TOTAL
	Escherichia coli	Otra Bacteria	Gram negativa	
Positivo	A	B		A + B
Negativo	C	D		C + D
TOTAL	A + C	B + D		TOTAL DE PRUEBAS