

"ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS TÉCNICAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR AZUL DE BROMOTIMOL Y DE MACCONKEY-SORBITOL PARA LA DETECCIÓN DE *E. COLI* SEROTIPO O157:H7". F. RIVAS¹; J. FLORES¹; G. SUAREZ¹; M. PUCI¹;

M. HEREDIA¹: CENTRO DE INVESTIGACIONES REGIONALES "DR. HIDEYO NOGUCHI". UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATAN. CALLE 59 #490 X AV. ITZAES. C.P. 97000.

INTRODUCCION

En 1982 fue descrito el serotipo O157:H7 de *Escherichia coli*, no reconocido anteriormente como patógeno, hasta ese año en que se vio involucrado en brotes de colitis hemorrágica en E.U.A. y que dio pie a la formación del grupo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que son cepas productoras de citotoxinas conocidas como Verotoxinas (VT) o toxinas tipo-Shiga (SLT).

A partir de 1983, estas cepas han sido implicadas en casos de colitis hemorrágica que se caracteriza por producir dolor abdominal severo, seguido de diarrea sanguinolenta pero sin leucocitos, pudiendo haber presencia o ausencia de fiebre, y del síndrome urémico hemolítico (SUH), el cual consiste en anemia hemolítica microangiopática con trombocitopenia y fallo renal agudo (1,3).

También puede ser adquirida al ingerir productos derivados de carne de res mal cocida y leche no pasteurizada, tal como ocurrió en 1986, cuando se aisló *E. coli* O157:H7 en la materia fecal de becerros de una lechería en Canadá, asociados a dos casos de síndrome urémico hemolítico. En 1987, Borczyk y col. reportaron que el ganado bovino es un reservorio primario de *E. coli* O157:H7 el cual está asociado con enfermedades en los humanos (1).

El objetivo de este estudio fue evaluar el método de inhibición del crecimiento por azul de bromotimol como una prueba presuntiva para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 y compararla con el aislamiento en agar de MacConkey-sorbitol.

MATERIAL Y METODOS

Se estudió un total de 1,261 cepas de *Escherichia coli* aisladas de 417 lechones de 1 a 10 días de nacidos y que presentaron diarrea.

PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *E. COLI* O157:H7 POR AZUL DE BROMOTIMOL

Se preparó una suspensión del organismo en 5 ml de solución salina (0.85%) estéril, ajustando la concentración al tubo número 1 del Nefelómetro de McFarland (aproximadamente 3×10^8 UFC por ml). De esta suspensión se transfirió 0.01 ml a otro tubo con 10 ml de solución salina estéril. Después de mezclar con el "Vórtex", se transfirió 0.01 ml de esta solución a un tubo con 2.5 ml de caldo triptosa-glucosa con 0.1 % de azul de bromotimol (ABT) y a un tubo con 2.5 ml de caldo triptosa-glucosa sin azul de bromotimol, representando aproximadamente 1.2×10^5 UFC por ml. Estos tubos fueron incubados a 44°C durante toda la noche (5).

El crecimiento fue observado por un cambio en la coloración del caldo ABT de azul a naranja lo cual es indicativo de que la prueba resultó negativa (no hubo inhibición del crecimiento). Si no hay cambio de color significa que hubo inhibición del crecimiento (prueba positiva).

En los tubos sin azul de bromotimol se observó la presencia o ausencia de turbidez como confirmación del crecimiento. Los tubos que no mostraron crecimiento se incubaron a la misma temperatura otras 24 horas, y por último se reincubaron a 37°C por 24 hrs. más.

AISLAMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN AGAR DE MACCONKEY-SORBITOL

Las cepas se sembraron al mismo tiempo en agar de MacConkey-sorbitol (Oxoid) y se incubaron a 37°C por 24 horas. *Escherichia coli* serotipo O157:H7 tiene la característica de no fermentar el sorbitol y por lo tanto produce colonias incoloras (prueba positiva) (2).

PRUEBA DE REFERENCIA

A todas las cepas se les realizó tipificación serológica con Bacto *E. coli* O, antisuero O157 y Bacto *E. coli* H antisuero H7 (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan, USA).

RESULTADOS: Se procesaron 1,261 cepas de *E. coli* aisladas de 417 cerdos de 1 a 10 días de nacidos, con diarrea, utilizando las dos pruebas antes mencionadas, y como referencia se utilizó la aglutinación con antiseros O157 y H7.

Se detectaron 274 (21.7%) cepas positivas a la prueba de inhibición del crecimiento por azul de bromotimol. En cuanto al aislamiento en agar de MacConkey-sorbitol, 42 (3.3%) cepas fueron positivas.

Veinticuatro (1.9%) cepas fueron positivas a la aglutinación serológica.

Se realizó el análisis nosológico entre ambas pruebas y la de referencia, encontrando una sensibilidad de 91.6% con una especificidad de 79.6% para la inhibición del crecimiento por azul de bromotimol, y una sensibilidad de 16.7% con una especificidad de 96.9% para el aislamiento en agar de MacConkey-sorbitol.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos muestran una sensibilidad del 91.6% del método de inhibición del crecimiento por azul de bromotimol al compararlo con la aglutinación serológica (22 positivas de 24), y una especificidad de un 13.7%, debido al alto número de falsos positivos a que da lugar esta prueba.

Estos resultados concuerdan en parte con lo reportado por Gubash et al. (5) ya que en su estudio habla de una sensibilidad del 98% pero nos menciona una especificidad del 99%, lo cual no fue observado por nosotros.

En lo que respecta al aislamiento en agar de MacConkey-sorbitol se aprecia una sensibilidad de solamente 16.7% (4 positivos de 24), pero la especificidad aumenta a 96.9%.

Aquí encontramos una cierta similitud con un estudio reportado por Kleanthous et al. (2) en el cual reportan una especificidad de sólo 48% debido a la presencia de otros organismos no fermentadores de sorbitol diferentes de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, esta especificidad aumenta a 100% cuando este método es usado junto con la aglutinación serológica con antiseros O157 y H7, ya que quedan descartados los falsos positivos. Con respecto a la sensibilidad, este estudio reporta un valor de 58% el cual también aumenta a 100%, siempre y cuando se use junto con la aglutinación serológica con antiseros O157 y H7.

Cabe aclarar que los trabajos previos acerca de estos métodos fueron realizados en cepas de *E. coli* O157:H7 o por lo menos O157, todas conocidas, mientras que el nuestro fue realizado en población abierta de *E. coli*, ya que en este trabajo utilizamos todas las cepas de *E. coli* provenientes de lechones con diarrea.

La presencia de esta bacteria se ha detectado en carne de vacunos, potros, becerros, corderos y humanos tanto infantes como adultos, e incluso en hortalizas (1,4).

No encontramos trabajos similares en cerdos con diarrea para que pudiéramos discutir nuestros resultados, pero creemos que es importante, desde el punto de vista de Salud Pública, haber detectado la presencia de estas cepas en los cerdos, ya que pudieran estar actuando como reservorios que en algún momento llegarían a infectar al humano, sobre todo al que tiene una convivencia estrecha con estos animales.

Debido a todo lo anterior y considerando que en nuestro medio, dadas las características socioeconómicas y culturales, la población, sobre todo la rural, tiene un contacto muy estrecho con sus animales, quedando expuesto de esta manera al contagio con un microorganismo patógeno importante como *E. coli* O157:H7, del cual apenas empezamos a conocer su epidemiología regional.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Holland, R. (1982) Clin. Microbiol. Rev. 3:345-375.
- 2.- Kleanthous, H., Fry, N., Smith, H., Gross, R., Rowe, B. (1988) Epidem. Inf. 1988; 101:327-335.
- 3.- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgeson, S.D. (1983) J.A.M.A. 308:681-685.
- 4.- Vázquez, C., Quiñones, E., Zepeda, H., Ortega, M., León, M. (1995) Memorias. XXVI Congreso Nal. Microbiol.
- 5.- Gubash, S.M., Anand, C., Stokman, M. (1988) J. Clin. Microbiol. 26(11):2248-2249.