



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“PREVALENCIA DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE
BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS
DE ORINA DE PACIENTES AMBULATORIOS DE LOS CENTROS DE
SALUD 1, 2 Y 3 DE LA CIUDAD DE CUENCA”**

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES:

PAÚL ADRIÁN LEÓN CAJAMARCA
GABRIELA BELÉN VÁZQUEZ GUILLÉN

DIRECTORA:

DRA. LOURDES JERVES ANDRADE MSC

CUENCA, 2013



UNIVERSIDAD DE CUENCA

RESUMEN

Se analizaron un total de 274 muestras de orina de pacientes ambulatorios que acudieron a los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca durante el periodo comprendido entre mayo y junio del año 2013; con el fin de obtener al menos 100 muestras de orina positivas para *Escherichia coli*.

Se recuperaron 103 cepas de *Escherichia coli* y se continuó el estudio con la identificación de la producción de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), mediante la técnica descrita en el manual CLSI actualizado a enero del 2013.

Se realizaron las pruebas presuntivas y confirmatorias, aplicando el método convencional de difusión en agar, en placas de agar Mueller-Hinton, con un inóculo Mac Farland 0,5 y ensayando los discos de antimicrobiano.

Para la prueba presuntiva se empleó los discos de Aztreonam, Cefotaxime, Ceftazidime y Ceftriaxona; para la prueba confirmatoria se utilizaron los discos de Ceftazidime y Cefotaxime en combinación con ácido clavulánico; la producción de BLEE se determinó mediante la diferencia del diámetro de los halos según se indica en la técnica.

Los resultados mostraron que de 103 cepas de *E. coli* se recuperaron siete (6.8%) cepas productoras de BLEE y si se considera que la población con la que se trabajó fue de pacientes ambulatorios resulta muy importante la realización de los métodos de identificación de BLEE como apoyo para la correcta terapia antimicrobiana, previniendo de esta manera la diseminación de cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Palabras Clave: *Escherichia coli*, Beta Lactamasas de Espectro Extendido, BLEE, Infección del tracto urinario, Antibióticos Betalactámicos.



ABSTRACT

Analyzed a total of 274 urine samples from outpatients presenting to Health Centres 1, 2 and 3 of the city of Cuenca during the period between May and June 2013, with the purpose to get at least 100 samples positive urine with *Escherichia coli*.

Were retrieved 103 strains of *Escherichia coli* and the study was continued with the identification of the production of Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL), using the technique described in the manual updated CLSI January 2013.

Were performed presumptive and confirmatory tests, applying the conventional method of agar diffusion plates in Mueller-Hinton agar, with a 0.5 McFarland inoculum and tested antimicrobial discs.

For the presumptive test was used discs Aztreonam, Cefotaxime, Ceftazidime and Ceftriaxone, for the confirmatory test were used discs of Ceftazidime and Cefotaxime in combination with clavulanic acid. ESBL production was determined by the difference in the diameter of the halos as indicated in the technique.

The results showed that of 103 strains of *E. coli* recovered seven (6.8%) ESBL producing strains, when considering that the population which was worked was of outpatient, is very important the implementation of identification methods as ESBL for correct support of antimicrobial therapy, preventing this way the spread of strains of *E. coli* ESBL producing.

Key words: *Escherichia coli*, extended spectrum betalactamases, ESBL, urinary tract infection, beta lactam antibiotics



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. MARCO TEÓRICO	
2.1. ENTEROBACTERIAS.....	15
2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	15
2.1.2. ESTRUCTURA.....	16
2.1.3. CLASIFICACIÓN.....	17
2.1.4. FACTORES DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD.....	20
2.1.5. PATOGENIA.....	19
2.1.6. EPIDEMIOLOGÍA.....	20
2.1.7. PRINCIPALES PATÓGENOS.....	21
2.2. <i>Escherichia Coli</i>	21
2.2.1. CARACTERISTICAS GENERALES.....	21
2.2.2. DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD.....	24
2.2.3. MODALIDADES PATOGENICAS.....	25
2.2.3.1. <i>E. coli</i> ENTEROPATÓGENA.....	25
2.2.3.2. <i>E. coli</i> ENTEROAGREGATIVA.....	25
2.2.3.3. <i>E. coli</i> ENTEROAGREGATIVA DIFUSA.....	26
2.2.3.4. <i>E. coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA.....	26
2.2.3.5. <i>E. coli</i> ENTEROINVASIVA.....	26
2.2.3.6. <i>E. coli</i> ENTEROTÓXICA.....	27
2.3. RESISTENCIA BACTERIANA.....	27
2.3.1. RESISTENCIA A LOS BETALACTÁMICOS.....	28
2.4. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.....	30
2.4.1. DEFINICIÓN.....	30
2.4.2. CLASIFICACIÓN.....	31
2.4.3. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS.....	32
2.4.3.1. PENICILINAS.....	32



2.4.3.2. CEFALOSPORINAS.....	32
2.4.3.3. CARBAPENEMS.....	33
2.4.3.4. MONOBACTÁMICOS.....	33
2.4.4. INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS.....	33
2.4.4.1. ÁCIDO CLAVULÁNICO.....	34
2.4.4.2. SULBACTAM.....	34
2.4.4.3. TAZOBACTAM.....	35
2.4.5. EPIDEMIOLOGÍA.....	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. MÉTODOS.....	37
3.1.1. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO.....	37
3.1.1.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA.....	37
3.1.1.2. UNIVERSO Y MUESTRA.....	37
3.1.2. MANEJO DE DATOS.....	38
3.1.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	38
3.1.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	38
3.2. METODOLOGÍA.....	39
3.2.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	39
3.2.1.1. EXÁMEN FÍSICO.....	39
3.2.1.2. EXÁMEN QUÍMICO.....	40
3.2.1.3. EXÁMEN MICROSCÓPICO DEL SEDIMENTO URINARIO.....	41
3.2.1.4. UROCULTIVO.....	42
3.2.1.5. IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	46
3.2.1.6. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.....	50
3.2.1.7. DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE BLEE EN <i>E. coli</i>	52
3.3. MATERIALES.....	55
3.3.1. EQUIPOS Y MATERIALES.....	55
3.3.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	55
3.3.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	58
3.3.3.1. PRUEBA DE OXIDASA.....	58
3.3.3.2. CITRATO.....	59



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.3.3.3. AGAR UREA.....	61
3.3.3.4. AGAR KLIGLER.....	62
3.3.3.5. LIA.....	65
3.3.3.6. SIM.....	64
3.3.3.7. ROJO DE METILO Y VOGES PROSKAUER.....	68
3.3.4. MUESTRA DE ORINA.....	70
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
5. CONCLUSIONES.....	84
6. RECOMENDACIONES.....	85
7. BIBLIOGRAFÍA.....	86
8. ANEXOS.....	92



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Yo, PAÚL ADRIÁN LEÓN CAJAMARCA, autor de la tesis “PREVALENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES AMBULATORIOS DE LOS CENTROS DE SALUD 1, 2 Y 3 DE LA CIUDAD DE CUENCA”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 17 de Octubre del 2013

PAUL ADRIÁN LEÓN CAJAMARCA
010479591-9

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Yo, **GABRIELA BELÉN VÁZQUEZ GUILLÉN**, autora de la tesis "**PREVALENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES AMBULATORIOS DE LOS CENTROS DE SALUD 1, 2 Y 3 DE LA CIUDAD DE CUENCA**", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 17 de Octubre del 2013

GABRIELA BELÉN VÁZQUEZ GUILLÉN
010445846-8

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Yo, PAÚL ADRIÁN LEÓN CAJAMARCA, autor de la tesis "PREVALENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES AMBULATORIOS DE LOS CENTROS DE SALUD 1, 2 Y 3 DE LA CIUDAD DE CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 17 de Octubre del 2013

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Paúl León", written over a horizontal line.

PAÚL ADRIÁN LEÓN CAJAMARCA.
010479591-9

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Yo, **GABRIELA BELÉN VÁZQUEZ GUILLÉN**, autora de la tesis **“PREVALENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES AMBULATORIOS DE LOS CENTROS DE SALUD 1, 2 Y 3 DE LA CIUDAD DE CUENCA”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 17 de Octubre del 2013

GABRIELA BELÉN VÁZQUEZ GUILLÉN
010445846-8

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar el desarrollo de nuestra tesis primeramente queremos agradecer a Dios por el regalo de la vida, también a todas aquellas personas que directa o indirectamente nos dieron su apoyo incondicional.

A nuestros padres y hermanos por darnos su amor y ánimo en cada momento; han sido la base fundamental en nuestras vidas y la motivación para cumplir todas nuestras metas.

De manera especial queremos agradecer a nuestra directora de tesis Dra. Lourdes Jerves Andrade, por su amabilidad, su paciencia, sus consejos y su capacidad de orientar nuestros objetivos, muchas gracias por el tiempo invertido y por compartirnos sus conocimientos y experiencia.

Así mismo un sincero sentimiento de gratitud a la Dra. Carmen Lucía López y a las Doctoras que laboran en los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca por la ayuda desinteresada durante el desarrollo de nuestro proyecto.

A los docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca por todos los conocimientos que nos supieron transmitir de manera eficiente durante los años de formación profesional.

GABRIELA Y PAÚL



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

El trabajo se lo dedico a Dios por el regalo maravilloso que es la vida y la bendición tan grande de tener a mi familia a mi lado; ellos son la base fundamental de todo lo que soy, el apoyo en los momentos difíciles y mi refugio cada vez que los necesito.

Con mucho cariño principalmente a mis padres Manuel y Luz que sin dudarlo se sacrifican día a día por darme un futuro y me enseñaron que cada meta es únicamente el inicio del siguiente desafío.

A mis hermanos Santiago y Xavier con quienes hemos compartido tantos hermosos momentos y para quienes siempre tendré la obligación de ser un ejemplo; los quiero mucho.

Paúl

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a enfrentar las adversidades.

A mis padres Bolívar y Susana por su apoyo, consejos, comprensión, amor y por ayudarme con los recursos necesarios para poder cumplir una meta más en mi vida.

Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. A mis hermanos Pamela y Juan José por estar siempre presentes, acompañándome y brindándome su apoyo incondicional.

Gabriela



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1. Introducción

El uso indiscriminado de antibióticos provoca en las bacterias que son el blanco de ataque, diversos mecanismos de defensa que tienen como consecuencia final la resistencia a la acción antimicrobiana; uno de los principales es la producción de una enzima denominada betalactamasa que destruye el anillo betalactámico de antibióticos tales como penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemas y monobactámicos; produciendo la inactivación de los mismos.

Escherichia coli (*E. coli*) evidencia una alta sensibilidad in vitro a algunos antimicrobianos usados típicamente en el tratamiento de distintas infecciones, pero in vivo resultan ser resistentes, por lo tanto se obtiene un tratamiento poco eficaz que no genera el efecto deseado en el paciente, además de persistencia de la infección y resistencia al tratamiento actual o una posible multiresistencia por variación en el genoma bacteriano, produciendo como consecuencia complicaciones en los pacientes y exigiendo un mayor control en el diagnóstico y tratamiento de infecciones sobre todo del tracto urinario debido a que este microorganismo es el principal agente causal.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en muestras de orina de pacientes ambulatorios de los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la Ciudad de Cuenca.

Lo que se pretendió con este estudio fue realizar un monitoreo para evidenciar la producción de BLEE en cepas de *Escherichia coli* que circulan en la comunidad, debido a que se conocían datos de publicaciones anteriores en nuestra ciudad pero en cepas hospitalarias, razón por la cual se planteó como hipótesis que la prevalencia de Beta Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli* es mayor al 5% en pacientes ambulatorios que



UNIVERSIDAD DE CUENCA

acuden a distintos centros de salud de la ciudad de Cuenca por análisis de rutina.

Dados los resultados obtenidos sería importante considerar la implementación de la determinación de BLEE como prueba de rutina concomitante al estudio de sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* recuperadas en pacientes ambulatorios y hospitalizados.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2. Marco Teórico:

2.1 ENTEROBACTERIAS

2.1.1. Características Generales

Se llama de esta manera a un grupo muy diverso de bacterias que tienen como hábitat natural el intestino del hombre y de varias especies de animales.

Habitualmente colonizan las diferentes mucosas, especialmente las del tracto gastrointestinal y urinario, por lo que las infecciones suceden a partir de estas localizaciones.

Diferentes factores han contribuido al incremento de las infecciones por enterobacterias, como la casi totalidad de las bacterias gram negativas disponen en su superficie de varias fimbrias, organelas indispensables para poder adherirse a las superficies mucosas y para la colonización bacteriana. Producen toxinas, que es una característica propia de las cepas patógenas de este grupo, dentro de ellas está la hemolisina que potencia la acción de las fimbrias, una amplia variedad de citotoxinas (la toxina enteropatogénica) y de enterotoxinas causantes de los diferentes síndromes diarreicos.

Además las enterobacterias fermentan la glucosa con formación de ácido y algunas también gas. Todas son oxidasa negativas, en su gran mayoría reducen nitratos a nitritos

Todos los miembros de esta familia tienen vida libre, se les puede encontrar en aguas contaminadas, el suelo, el medio ambiente, plantas e insectos. (Romero Cabello, 2007)

2.1.2. Estructura

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas.

La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas (fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa. (Figura 1)

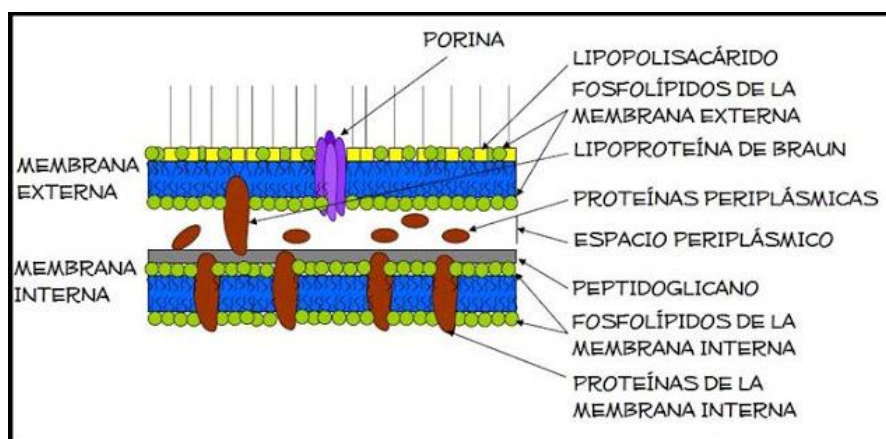


Figura1. Estructura de la pared celular de las Enterobacterias
Fuente: Infojardin.com

Entre estas proteínas hay algunas organelas complejas que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. (Puerta García & Rodríguez, 08) (Figura 2)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

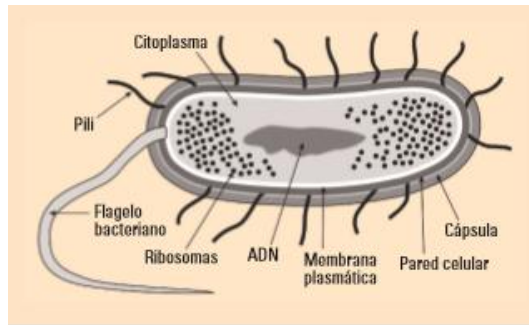


Figura 2: Estructura general de las Enterobacterias
Fuente: Treehugger.com

Las Enterobacterias poseen cuatro antígenos importantes en su estructura:

Antígeno H: es el antígeno flagelar, localizado en los flagelos, es termosensible.

Antígeno K: es el antígeno capsular, formado por oligosacáridos o proteínas, puede interferir en la aglutinación del antígeno O.

Antígeno O: es un antígeno somático, constituye la parte más externa del lipopolisacárido de la pared celular, formado por oligosacáridos, es termoestable y diverso entre miembros de la misma especie.

Antígeno F: fimbrias o pili. (Enriquez Méndez & Peralta Ortiz , 2010)

El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición. El lípido A, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce. El oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como antígeno O. Este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos. Junto con otros factores, la presencia del antígeno O media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal, siendo capaces por tanto de sobrevivir más tiempo en sangre y causando infecciones hematógenas, diseminadas y más graves. (Puerta García & Rodríguez, 08)



2.1.3. Clasificación

La familia *Enterobacteriaceae* comprende más de 200 géneros que abarcan más de 2.000 especies. Algunas de estas bacterias producen enfermedades. Existen dos tipos de clasificación:

Clasificación biológica: No es práctica en medicina	Clasificación biomédica	
Género <i>Citrobacter</i> Género <i>Enterobacter</i> Género <i>Escherichia</i> Género <i>Hafnia</i> Género <i>Klebsiella</i> Género <i>Leclercia</i> Género <i>Leminorella</i> Género <i>Morganella</i> Género <i>Obesumbacterium</i> Género <i>Proteus</i> Género <i>Providencia</i> Género <i>Salmonella</i> Género <i>Serratia</i> Género <i>Shigella</i> Género <i>Tatumella</i> Género <i>Yersinia</i> .	Enterobacterias patógenas primarias: siempre producen enfermedad en el hombre y en algunos animales. Género <i>Salmonella</i> Género <i>Shigella</i> Género <i>Yersinia</i> Género <i>Escherichia</i>	Enterobacterias patógenas secundarias: son patógenos oportunistas. Producen infecciones de heridas, infección urinaria, incluso pueden producir sepsis. Género <i>Citrobacter</i> Género <i>Enterobacter</i> Género <i>Escherichia</i> Género <i>Klebsiella</i> Género <i>Morganella</i> Género <i>Proteus</i> Género <i>Providencia</i> Género <i>Serratia</i>

Tabla 2.1: Clasificación de las enterobacterias (Enriquez Méndez & Peralta Ortiz , 2010)

Fuente: Determinación de la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en capas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de orina de pacientes de la Fundación Pablo Jaramillo

2.1.4. Factores determinantes de patogenicidad

La cápsula tiene propiedades de adhesina y es antifagocitaria.

Las fimbrias permiten la adherencia a la célula huésped e impiden el barrido por las barreras mecánicas de defensa del organismo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Algunas especies producen exoenzimas como ureasa, gelatinasa, lipasa, desoxirribonucleasa, las cuales actúan permitiendo la sobrevivencia de la bacteria dentro del órgano afectado. Debido a que el hierro es indispensable para ciertas funciones de las bacterias, estos microorganismos producen aerobactinas que permiten la captación de hierro desde el medio.

Todas las enterobacterias poseen el lipopolisacárido (LPS) de pared, el cual tiene acción de endotoxina, la cual se libera al destruirse la bacteria.

Exotoxinas: no todas las especies las producen; sólo son producidas por las patógenas obligadas y poseen efectos específicos. (Merino & Losch, s.f.)

2.1.5. Patogenia

Microbiológicamente las enterobacterias se caracterizan por no formar esporas, crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, fermentan la glucosa, no producen oxidasa, y tienen una movilidad variable. El LPS de la pared celular comprende una zona más interna que contiene la molécula del lípido A de la que depende la actividad biológica de la endotoxina, responsable de la producción del shock endotóxico característico de estas bacterias. En la parte más externa se encuentra el LPS que constituye el antígeno O, que está constituido por una serie de cadenas laterales repetidas de polisacáridos. Junto con otros factores, la presencia de antígeno O media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal. Los aislados resistentes a la acción bactericida del suero sobreviven más tiempo en sangre y por ello causan infecciones hematógenas, diseminadas y más agresivas. Existen tres tipos de antígenos de superficie que sirven para serotipar e identificar a las enterobacterias: el antígeno somático o antígeno O, el antígeno flagelar o antígeno H, y el antígeno capsular o antígeno K. (López Alvarez, s.f.)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En ciertas especies como en *E. coli*, la presencia de un determinado antígeno O, H y K determina la patogenicidad de una cepa. Así, ciertos antígenos O actúan como factores de adhesión/colonización necesarios para la producción de infección, otros actúan como factores de colonización y como toxinas. Los antígenos H son proteínas encontradas en los flagelos de estas bacterias y están ligados a la producción del síndrome hemolítico urémico y podrían ser responsables de la capacidad de progresión de las enterobacterias a través de las vías urinarias. Por último, los antígenos K son polisacáridos ácidos situados en la superficie celular. Algunos de ellos como el antígeno capsular K1 de *E. coli* se asocian con el desarrollo de meningitis neonatal, bacteriemia e infección urinaria. Otros factores de virulencia lo constituyen las fimbrias, que son prolongaciones filamentosas que permiten la adherencia de las bacterias a receptores específicos de las células mucosas y epiteliales de las vías respiratorias, digestivas y genitourinarias; tal adherencia es extraordinariamente selectiva. Así, las fimbrias del tipo I, que son muy comunes y se hallan en multitud de cepas de *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Salmonella spp.*, se unen específicamente a receptores que contienen manosa. Otro factor de virulencia que contienen las enterobacterias son los plásmidos, fragmentos de ADN extracromosómico transmisibles de bacteria a bacteria, no siempre de la misma especie, que permiten transmitir la resistencia a antibióticos (plásmidos R) o la producción de toxinas. (Ardila Medina, 2010)

2.1.6. Epidemiología

Estos microorganismos habitan en una amplia variedad de hábitats que incluye el tubo digestivo del ser humano y de otros animales como se mencionó anteriormente.

En el caso de las especies que suelen colonizar a los seres humanos pueden producirse infecciones cuando las cepas bacterianas propias de un paciente es decir las cepas endógenas, establecen infecciones en un sitio del cuerpo que por lo general es estéril.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Estos microorganismos también pueden transmitirse de un paciente a otro y esas infecciones a menudo dependen del estado de debilidad de un paciente hospitalizado y se adquieren generalmente en una casa de salud. Aunque no sea siempre el caso como: *E. coli* es la causa más frecuente de infecciones nosocomiales, también es la causa principal de infecciones urinarias en personas no hospitalizadas. Otras especies como las de *Salmonella*, las especies de *Shigella* y *Yersinia* enterocolítica, sólo habitan en el intestino cuando causan infección y se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados. Este también es el modo de transmisión de los diversos tipos de *E. coli* que causan infecciones gastrointestinales. (Forbes, 2007)

Las enterobacterias se contagian mediante transmisión oro-fecal o por transmisión hídrico-fecal: por ejemplo, a través de agua y alimentos contaminados, manos sucias, prácticas sexuales, moscas, vectores pasivos (como en el caso de la pulga y la *Yersinia pestis*, etc. (Enriquez Méndez & Peralta Ortiz , 2010)

2.1.7. Principales patógenos

Los miembros clínicamente importantes de la familia *Enterobacteriaceae* pueden considerarse en dos grupos: los patógenos oportunistas y los patógenos manifiestos donde pertenece *Salmonella thypi*, las especies de *Shigella* y también *Yersinia pestis* que son los agentes causales de la fiebre tifoidea, la disentería, y la “peste negra”, respectivamente.

Los patógenos oportunistas más frecuentes son especies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y de *Serratia*. Aunque se los considera patógenos oportunistas, estos microorganismos producen factores de virulencia importantes, como endotoxinas, que pueden mediar infecciones mortales. Sin embargo, como por lo general no producen enfermedad en los huéspedes humanos sanos, se consideran oportunistas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Aunque *E. coli* es un habitante normal del intestino, su clasificación como patógeno se encuentra entre la de patógeno manifiesto y microorganismo oportunista. Las cepas de esta especie, como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC), expresan toxinas potentes y causan infecciones gastrointestinales graves. Además, en el caso de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la infección puede producir una enfermedad sistémica potencialmente mortal. Es probable que como la causa principal de infecciones nosocomiales entre las enterobacterias *E. coli* sea más virulenta que las otras especies clasificadas como *Enterobacteriaceae* “oportunistas”

Además *Escherichia coli* sigue siendo el uropatógeno predominantemente aislado, seguido en un orden variable por *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens* y *Morganella morganii*. (Ochoa Sangrador, et al., 2005)

2.2. *Escherichia coli*

2.2.1. Características Generales

Escherichia coli es un bacilo corto gram negativo, mide aproximadamente 0.5-1µm pertenece a la familia de *Enterobacteriaceae*, es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas o pueden tener cápsulas y ser inmóviles, *E. coli* es catalasa-positivo, oxidasa negativo. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas. Típicamente, la especie es rojo metilo positiva, Voges Proskauer negativa y no crece en el medio de citrato de Simmons, produciendo indol la mayoría de las cepas.

E. coli es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extraintestinales en humanos y animales



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos, no obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas)

Es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en humanos. (Merino & Losch, s.f.)

Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente en relación a los antígenos: (Figura 3)

Antígenos somáticos (O): Son cadenas polisacáridas unidas al complejo LPS característico de las bacterias gram negativas, con 167 variantes.

Antígenos flagelares (H): Son de naturaleza proteica. Esta proteína que constituye los flagelos es llamada flagelina. Este antígeno es termolábil. El contenido de aminoácidos y el orden en que estos se encuentran en las flagelinas determina la especificidad de los diversos antígenos, presenta 75 variantes.

Antígenos capsulares (K): Son externos a los antígenos O. Algunos constituyen una verdadera cápsula visible por los que se los denomina antígenos de envoltura por comportarse como si envolvieran la bacteria. Son de naturaleza polisacáridica, con 102 variantes.

Antígeno (F) fimbrias/pilis: que desempeñan un papel en la patogenia, con 12 variantes. (Fleitas Talavera, et al., 2008)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

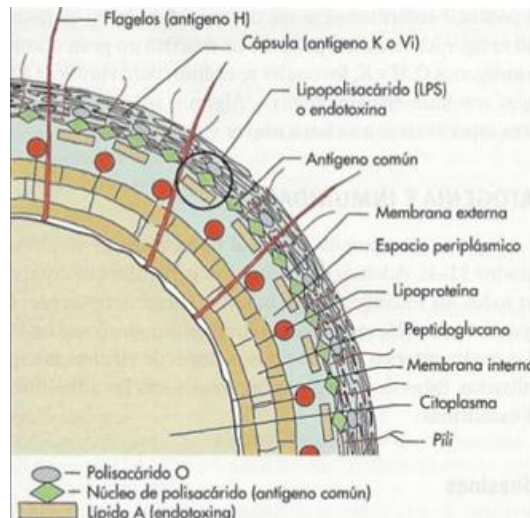


Figura 3: Antígenos de *Escherichia coli*
Fuente: Wordpress.com/Factores de Transferencia

Los antígenos se utilizan para determinar la especie y son importantes como referencia inmunológica. Además, pueden hallarse fimbrias y estructuras emparentadas.

2.2.2. Determinantes de patogenicidad

Las fimbrias: Actúan por su capacidad de adherencia.

Los antígenos O y K: Presentan propiedades antifagocitarias e inhibitoras de las sustancias bactericidas del suero y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas.

Endotoxina: Ligada al lipopolisacárido, es responsable de la acción pirógena y probablemente de las alteraciones vasculares que se producen en las infecciones generalizadas.

Exotoxinas: Producidas por algunas cepas, son responsables de la producción de diarreas y su síntesis está codificada por la presencia de plásmidos. (Enriquez Méndez & Peralta Ortíz, 2010)



2.2.3. Modalidades patogénicas

La combinación de los diferentes determinantes de patogenicidad en *E. coli* da lugar a varias modalidades patogénicas de las cuales se destacan seis:

2.2.3.1 *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP)

Es una de las principales causas de diarrea en niños menores de dos años. La principal característica histopatológica de la infección es una lesión que induce la EPEC en el intestino conocida como la lesión A/E (Adherencia/Eliminación). Las bacterias se adhieren a los enterocitos y permiten la acumulación de la actina del citoesqueleto hasta formar una estructura tipo pedestal y causar eliminación de la microvellosidades intestinales.

La diarrea se ha vinculado con varios factores entre los que están la destrucción de las microvellosidades del enterocito, la salida masiva de iones hacia la luz intestinal y la secreción de alguna enterotoxina.

Es la principal causa de diarrea en niños especialmente en países en vías de desarrollo y en viajeros, es uno de los principales agentes participantes en la diarrea infantil, con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. (Vidal, et al., 2007)

2.2.3.2. *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA)

Esta adherencia agregativa se muestra como una fuerte autoaglutinación entre las bacterias, y la característica más sobresaliente es la presentación microscópica de las bacterias como en “ladrillos apilados”, además no producen enterotoxinas.

Las cepas se adhieren a la mucosa intestinal y favorecen la secreción de moco, atrapando a las bacterias en la película mucosa; tiene efecto citopático sobre la



UNIVERSIDAD DE CUENCA

mucosa intestinal, se acortan las vellosidades, hay necrosis en las puntas vellosas, una respuesta inflamatoria leve y edema e infiltración mononuclear de la submucosa. El blanco de ataque es el íleo.

El factor enteroadherente termoestable se le ha asociado con diarrea acuosa mucoide de tipo secretor.

2.2.3.3. *Escherichia coli* enteroagregativa difusa (ECEAD)

Las bacterias se observan dispersas sobre la superficie celular con poca agregación, se la ha encontrado en niños de edades entre 1 y 5 años, con diarrea acuosa sin sangre; en el moco fecal no se detecta leucocitos.

2.2.3.4. *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

Se caracteriza por diarrea con colitis hemorrágica con vinculación al síndrome urémico hemolítico; es uno de los patógenos más frecuentes en los casos de diarrea con sangre.

El principal reservorio es el tracto gastrointestinal del ganado vacuno y la carne contaminada; la transmisión más importante es por agua, alimentos y de persona a persona; el factor de virulencia es la citotoxina con efecto citopático.

2.2.3.5. *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)

Tiene la capacidad de invadir las células del epitelio intestinal, donde posteriormente se multiplican y causan daño; afecta más a escolares, adolescentes y adultos, raramente a lactantes y su distribución es mundial; tiene predilección por la mucosa del colon.

Penetra las células epiteliales, se multiplica en forma intracelular generando una respuesta inflamatoria con la alteración de la forma epitelial, consiguiendo muerte celular y formación de úlceras microscópicas, produciendo una



UNIVERSIDAD DE CUENCA

enfermedad diarreica leve a moderadamente severa, en pocos casos se exagera el cuadro con presencia de diarrea con abundante moco y sangre.

2.2.3.6. *Escherichia coli* enterotóxica (ECET)

Causa diarrea de leve a moderada severa en lactantes, produce un síndrome similar al colón en adultos, diarrea del viajero y diarreas en cuneros; además provoca daño mediante su adhesión y producción de enterotoxinas, de éstas las termolábiles estimulan la adenilciclase que activa la proteína quinasa de AMPc como consecuencia está la salida de líquidos; y las termoestables actúan sobre la guanilciclase alterando la absorción de cloro y sodio con distensión abdominal y posteriormente diarrea acuosa y vómito. (Romero Cabello, 2007)

2.3. Resistencia Bacteriana

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico. La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra.

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción.

Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:



Inactivación del antibiótico por enzimas

La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico entre las más importantes están las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En los gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas; también hay enzimas modificantes de aminoglucósidos.

Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana

Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios).

En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico

Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo



UNIVERSIDAD DE CUENCA

cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos.

2.3.1. Resistencia a los Betalactámicos

La resistencia que desarrollan las bacterias frente a los betalactámicos representa un grave problema, pues es probablemente el grupo de antibióticos más utilizado.

Las bacterias desarrollan al menos tres mecanismos para hacerse resistentes a ellos, que son independientes entre sí pero que pueden actuar sinérgicamente: alteración de las enzimas diana, alteración de la membrana externa y producción de enzimas inactivantes (betalactamasas).

Las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs) son necesarias para que la bacteria forme su pared celular, y los antibióticos betalactámicos se fijan en estas enzimas impidiéndolo, si la bacteria modifica ésta proteína de modo que no fijen antibiótico, se hará resistente; otros mecanismos serían la hiperproducción o la adquisición de PBPs resistentes, la resistencia a betalactámicos pueden ser debidas a alteraciones de PBPs.

La modificación de la membrana externa, cuando es el único mecanismo implicado no suele ser importante, pero sí cuando se asocia a la producción de betalactamasas, siendo especialmente decisiva en los gram negativos, pues los betalactámicos entran a través de las porinas, que al modificarse o desaparecer pueden causar resistencia sobre todo en *E. coli*.

La producción de enzimas inactivantes es el mecanismo más importante de las bacterias, como la adquisición de betalactamasas (plasmídicas o cromosómicas), es la causa más frecuente de resistencias, las betalactamasas plasmídicas de gram negativos producen alto nivel de resistencia y están muy extendidas sobre todo entre las enterobacterias, algunas son de espectro



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ampliado y confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos, desde que se puso de manifiesto la importancia de las betalactamasas, se buscaron inhibidores de estas enzimas, incluyéndose en este término diferentes compuestos químicos, entre los que destacan ácido clavulánico, sulbactam, y tazobactam, sin embargo ya se han detectado una nueva clase de betalactamasas que confiere resistencia a estos inhibidores. (Daza Pérez, 2000)

2.4. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

2.4.1. Definición

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de Betalactamasas como el tazobactam y el sulbactam.

Las cepas que producen BLEE, en su mayoría enterobacterias, y en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, son resistentes a todos los antibióticos Betalactámicos con la excepción de las carbapenemas, las cefamicinas y las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas. Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, existe una serie de microorganismos que producen β -lactamasas cromosómicas que, en el caso de una hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico.

Entre las enterobacterias que producen de forma natural este tipo de Betalactamasas se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* y distintas especies del género *Kluyvera*.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Por lo general, cuando hablamos de BLEE nos referimos únicamente a las enzimas de codificación plasmídica ya que son éstas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a su elevada capacidad de diseminación. (Oliver & Cantón, 2004)

2.4.2. Clasificación

Las BLEE clásicas derivan de las Betalactamasas con actividad fundamentalmente penicilinasas e inhibibles por el ácido clavulánico, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, enzimas del grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros. Debido a mutaciones en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos. Las BLEE, por lo tanto, se engloban dentro del grupo 2be de la clasificación antes mencionada.

BLEE	β -lactamasa relacionada	País de origen	Especies en las que se detectaron inicialmente
TEM	TEM-1, TEM-2	Francia	<i>Enterobacteriaceae</i>
SHV	SHV-1/LEN	Alemania	<i>P. aeruginosa</i> /BGNNF
CTX-M	KLUA <i>Kluyvera</i>	Alemania/Argentina	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
OXA	OXA-10	Turquía / Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER		Francia	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER	Vietnam/Tailandia	<i>E. coli</i>
TLA	CME-1	Méjico	<i>E. coli</i>
GES/IBC		Guayana/Sudáfrica	<i>K. pneumoniae</i> / <i>P. aeruginosa</i>
BES	<i>Y. enterocolitica</i>	Brasil	<i>S. marcescens</i>
SFO	AmpA <i>S. fonticola</i>	Japón	<i>E. cloacae</i>

Tabla 2.2: Diferentes grupos de β -lactamasas de espectro extendido. (Oliver & Cantón, 2004)

Fuente: Rafael Cantón (Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido)

2.4.3. Antibióticos Betalactámicos

Son bactericidas de segunda elección utilizados en el tratamiento de numerosas infecciones, tienen la característica de tener escasos efectos adversos.

El mecanismo de acción consiste en unirse en forma covalente a las proteínas fijadoras de penicilinas PBP en la membrana citoplasmática que sirven para la



UNIVERSIDAD DE CUENCA

última fase de síntesis de proteoglicanos que forman la pared; se inhibe la transpeptidación, se inhibe la síntesis de peptidoglicanos y la célula muere por autolisinas (enzimas bacterianas que remodelan y rompen la pared celular). (Tripathi, 2005)

2.4.3.3. Penicilinas

Las penicilinas son empleadas profusamente en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles. La mayoría de las penicilinas son derivados del ácido 6-aminopenicilánico, difiriendo entre sí según la sustitución en la cadena lateral de su grupo amino.

No se conoce por completo el mecanismo de acción de las penicilinas, si bien su analogía a la D-alanil-D-alanina terminal, situada en la cadena lateral peptídica de la subunidad del peptidoglicano, sugiere que su carácter bactericida deriva de su intervención como inhibidor del proceso de transpeptidación durante la síntesis del mismo. De este modo, la penicilina actúa debilitando la pared bacteriana y favoreciendo la lisis osmótica de la bacteria durante el proceso de multiplicación. (Tripathi, 2005)

2.4.3.2. Cefalosporinas

Las cefalosporinas, son una clase de los antibióticos beta-lactámicos. Junto con las cefamicinas pertenecen a un subgrupo llamado los cefamos. Las cefalosporinas son similares a las penicilinas, pero más estables ante muchas β -lactamasas bacterianas y, por lo tanto, tienen un espectro de actividad más amplio. (Tripathi, 2005)

2.4.3.3. Carbapenems

Los carbapenems son un tipo de antibiótico betalactámico con amplio espectro de actividad bactericida y son sumamente resistentes a las betalactamasas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las características que diferencian a los carbapenems de las penicilinas y cefalosporinas son que en su anillo presenta un átomo de carbono en la posición 1, en sustitución del átomo de azufre que comúnmente tienen la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas, de ahí se deriva su nombre. Junto con ello, presentan una insaturación entre el carbono 2 y el carbono 3 del anillo pentamérico. Además, su espectro de actividad frente a bacterias es el más amplio de todos los antibióticos betalactámicos, los cuales incluyen bacterias gram positivas y gram negativas, pero no actúan sobre bacterias que se desarrollan intracelularmente como *Chlamydia*. (Tripathi, 2005)

2.4.3.4. Monobactámicos

Los monobactámicos son un grupo de medicamentos clasificados dentro de los antibióticos betalactámicos, muchas moléculas monobactámicas provienen de gérmenes que viven en la tierra, aunque pocos tienen actividad antibacteriana de importancia. A diferencia de otros betalactámicos, los antibióticos monobactámicos tienen solo un solo anillo betalactámico en vez de tener dos. El único monobactámico disponible en el mercado es el aztreonam, un fármaco sintético activo frente a bacterias gram negativas aeróbicas, como las enterobacterias y las especies *Yersinia*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* y *Neisseria*. (Tripathi, 2005)

2.4.4. Inhibidores de betalactamasas

Los inhibidores de las β -lactamasas para ser eficaces deben atravesar los canales porínicos y alcanzar el espacio periplásmico en los bacilos gram negativos a concentraciones adecuadas lográndose la inactivación de las β -lactamasas, hecho imprescindible para que el β -lactámico así protegido llegue a la proteína diana.

Inicialmente los inhibidores de las β -lactamasas actúan por inhibición competitiva por analogía al sustrato de la enzima, que es seguida de una



UNIVERSIDAD DE CUENCA

reacción química más lenta tras la unión al centro catalítico, que da lugar a una inactivación transitoria o permanente de la enzima (inhibición no competitiva).

Las distintas betalactamasas difieren en la afinidad por sus sustratos. Actualmente existen tres inhibidores de estas enzimas (el ácido Clavulánico, el Sulbactam y el Tazobactam) para uso clínico. (Barcelona, et al., 2008)

2.4.4.1. Ácido Clavulánico

Tiene un anillo betalactámico pero no presenta actividad antibacteriana. Inhibe una gran variedad de betalactamasas producidas tanto por bacterias gram positivas como gram negativas; es un inhibidor progresivo que se une con las betalactamasas reversiblemente al principio, pero esta unión se vuelve luego covalente.

Llamado Inhibidor “suicida”, se inactiva después de unirse a la enzima. Ingresa en las capas externas de la pared celular de las bacterias gram negativas e inhibe a las betalactamasas periplasmáticas. (Barcelona, et al., 2008)

2.4.4.2. Sulbactam

Es un inhibidor semisintético de las betalactamasas, relacionado químicamente y por su actividad con el ácido clavulánico. También es un inhibidor progresivo, muy activo y en igual cantidad es 2 a 3 veces menos potente que el ácido clavulánico para la mayoría de los tipos de enzimas, pero puede obtenerse el mismo nivel de inhibición con las concentraciones más altas.

El sulbactam no induce a las betalactamasas microsómicas, mientras que el ácido clavulánico induce algunas de éstas. (Barcelona, et al., 2008)

2.4.4.3. Tazobactam

Es un nuevo derivado de la sulfona del ácido penicilánico que tiene una actividad inhibitoria de β -lactamasas similar a la observada con el ácido clavulánico y mayor actividad que el sulbactam frente a bacterias que producen



UNIVERSIDAD DE CUENCA

cefalosporinas de origen cromosómico, β -lactamasas de amplio espectro o β -lactamasas mediadas por plásmidos, el tazobactam tiene una pequeña actividad antibacteriana. (Barcelona, et al., 2008)

2.4.5. Epidemiología

La primera BLEE (SHV-2) fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania en 1983. Desde entonces se ha publicado una gran cantidad de brotes epidémicos de enterobacterias con BLEE, sobre todo en unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuentemente involucrada.

Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas.

Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol.

Durante las décadas de los 80 y principios de los 90, la inmensa mayoría de las BLEE encontradas eran del tipo TEM o SHV, habiéndose descrito hasta la fecha más de cien variantes distintas derivadas de las β -lactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de SHV-1, lo que da idea de la gran diversificación evolutiva que han sufrido estas enzimas en un corto periodo de tiempo debido, esencialmente, a la presión selectiva de los antibióticos. (Oliver & Cantón, 2004)

En 1989 se describió un nuevo tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M, prácticamente de forma simultánea en una cepa de *E. coli* en Alemania y en una cepa de *Salmonella* en Argentina. Estas enzimas se caracterizan por



UNIVERSIDAD DE CUENCA

conferir resistencia de alto nivel a la cefuroxima, cefotaxima y cefepima, prácticamente sin incrementar las concentraciones mínimas inhibitorias de la ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas.

Estas BLEE, de naturaleza plásmidica al igual que las TEM o SHV, derivan de la β -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. También existen otras BLEE, algunas de ellas descritas en *Pseudomonas aeruginosa*, con menor importancia epidemiológica desde el punto de vista de su diseminación.

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE. Mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo Ecuador, son las CTX-M. La diseminación de este tipo de BLEE plantea ciertas dificultades para su detección, especialmente cuando se utiliza ceftazidima como único marcador.

Por otro lado, *K. pneumoniae*, la especie más frecuentemente asociada con la producción de BLEE en las décadas anteriores, actualmente está siendo desplazada de forma paulatina, aunque con menor carácter epidémico, por *E. coli*.

Cada vez más frecuente el aislamiento de enterobacterias con BLEE, especialmente *E. coli*, fuera del ámbito hospitalario, particularmente como causa de infección urinaria en pacientes de atención primaria; otro aspecto epidemiológico destacable es la creciente presencia de BLEE en enterobacterias productoras de β -lactamasas cromosómicas. (Oliver & Cantón, 2004)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MÉTODOS

3.1.1. Diseño y Tipo de Estudio

El tipo de estudio es descriptivo y diseño no experimental, de laboratorio y de corte transversal cualitativo.

3.1.1.1. Localización Geográfica

Se receptaron muestras de orina de pacientes ambulatorios que acudían a:

Centro de Salud 1 “Pumapungo”, localizado en la Avenida Huayna Capac entre Cacique Duma y Avenida 12 de Abril (frente a las ruinas de Pumapungo)

Centro de Salud 2 “San Blas” localizado en la Calle Manuel Vega entre Simón Bolívar y Gran Colombia.

Centro de Salud 3 “Tomebamba” localizado en la Avenida 12 de Abril y Solano (Junto Hospital Militar).

Los urocultivos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cuenca a cargo de la Dra. Carmen Lucía López localizado en la Avenida 12 de Abril entre Avenida Loja y Agustín Cueva.

3.1.1.2. Universo y muestra

Se recibieron muestras de orina previamente analizadas por el personal de cada Centro de Salud que cumplían con los criterios de inclusión para realizar el cultivo de orina dando un total de 274 muestras.

Debido a que el total de las muestras recibidas fueron procesadas para la realización de los urocultivos en este caso el universo coincide con la muestra.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.1.2. Manejo de Datos

3.1.2.1. Criterios de Inclusión

Se trabajó con muestras con las siguientes características:

Muestras que marcaron en la tira de orina nitritos positivo.

Muestras que en sedimento urinario presentaron bacterias mayor o igual a ++, leucocitos o pirocitos mayor a 5 por campo.

Muestras tomadas mediante la técnica del chorro medio.

Muestras que fueron transportadas y almacenadas correctamente. (Anexos; Ilustración 1)

3.1.2.2. Criterios de Exclusión

No se trabajó con muestras con las siguientes características:

Muestras con una baja o nula concentración bacteriana.

Muestras que no sean representativas para el estudio es decir cantidades menores a los 100mL.

Muestras que no cumplían con criterios de calidad para urocultivo.



3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Procesamiento de muestras

Una muestra de orina debe analizarse lo más rápido. Si esto no es posible, debe guardarse en refrigeración hasta el momento de su procesamiento.

Cuando se deja algún tiempo, se inicia la descomposición de la muestra por la presencia de bacterias: se degrada la urea, se produce amoníaco y se incrementa el pH.

El recuento bacteriano es estable hasta 24 horas a temperatura de refrigeración.

Para la realización de un urocultivo inicialmente se debe realizar:

Uroanálisis: Una muestra de orina puede ser sometida a varios análisis, entre los más importantes están:

3.2.1.1. Examen físico

Se observan las características macroscópicas de la muestra en esta se encuentra:

Aspecto: Es considerado como normal un aspecto transparente, el aspecto turbio es considerado como anormal, esto puede ser debido a presencia de leucocitos, glóbulos rojos, bacterias, cristales, etc.

Color: En condiciones normales el color de la orina va de amarillo hasta ámbar.

En el examen físico también se considera el pH y la densidad, parámetros que son medidos con cintas para orinas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

pH: El pH normal va de 5.5 - 6.5.

Densidad: Esta varía en razón directa a la cantidad de sólidos, principalmente cloruros, urea, sulfatos, la densidad normal va de 1.015 - 1.025.

3.2.1.2. Examen Químico

Contempla el estudio cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo de algunas sustancias que pueden estar presentes en una muestra de orina y que a niveles elevados es indicador de alguna patología.

Para la determinación lo más útil por su rapidez son las tiras de orina, estas son bandas de papel en las que llevan adosados al menos 10 parámetros para medir en una muestra de orina.

Generalmente estos parámetros son pH, densidad, glucosa, nitritos, proteínas, bilirrubina, cuerpos cetónicos, leucocitos, sangre y urobilinógeno. Estas tiras reactivas pueden ser utilizadas en forma totalmente manual, semiautomática y automática. (López & Escudero , s.f.)

Uso manual

El operador introduce una cinta en una muestra de orina, al cabo de unos segundos compara los colores obtenidos (cada parámetro da un color) con una carta de color que viene con el producto.

En general son dos los parámetros útiles a evaluar en la tira reactiva o examen químico de orina cuando se trata de un examen bacteriológico:



Nitritos

Una prueba de nitritos positiva indica que, bacterias pueden estar presentes en números significativos en orina. Bacilos Gram negativos tales como *E. coli* suelen más probablemente dar una prueba positiva.

Leucocito esterasa

Un resultado positivo de leucocito esterasa detecta la presencia de glóbulos blancos como células enteras o como células lisadas.

Una prueba de leucocito esterasa negativa significa que una infección es improbable y que, sin evidencia adicional de infección del tracto urinario, examen microscópico y/o cultivo de orina no se necesitan hacer para descartar una bacteriuria significativa.

3.2.1.3. Examen microscópico del sedimento urinario

El examen microscópico del sedimento urinario evidencia una infección urinaria, sin embargo, no es confirmatorio. Permite aproximación correcta en 70% de las veces, generalmente suele sugerir de una posible enfermedad renal, además que indica la clase de lesión presente. (García Cañete, 2001)

Todo el uroanálisis fue previamente realizado por el personal de los Centros de Salud: 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca.

Las muestras que cumplieron los criterios de inclusión fueron seleccionadas para la realización de urocultivos, las mismas fueron transportadas en un recipiente adecuado denominado cooler. (Anexos; Ilustración 1)



3.2.1.4. Urocultivo

Es la siembra de orina para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática (bacteriuria asintomática) en pacientes con riesgo de infección.

Siembra

La siembra debe permitir el aislamiento y el recuento cuantitativo desde 1.000 a 10.000 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC)/mL. de los uropatógenos más comunes:

Agar Sangre

En este medio la siembra se realizó por el método de estriación con el asa de orina calibrada para producir colonias aisladas y unidades formadoras de colonias contables. Se empleó un asa calibrada de orina de 0.001 mL., ésta se esterilizó por calentamiento del alambre hasta el rojo vivo en el mechero o lámpara de alcohol, se enfrió y luego se introdujo en forma vertical en la muestra de orina previamente homogenizada mediante movimientos rotatorios, observándose la formación de una marcada película en el asa sin burbujas adicionales y posteriormente se extendió sobre el centro de la superficie de la caja con agar sangre, en línea recta, sin hacer presión para evitar ruptura del medio, luego se rozó la siembra anterior haciendo nuevas estrías y finalmente se flameó el asa. (Figura 4)

Se incubaron las cajas, siempre invertidas, a 37°C durante 24 horas y en condiciones de aerobiosis; tras la incubación, en el caso de existir la presencia de *E. coli* se observaron colonias generalmente grises, brillantes y en algunas cepas hemólisis. (Anexos; Ilustración 2)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

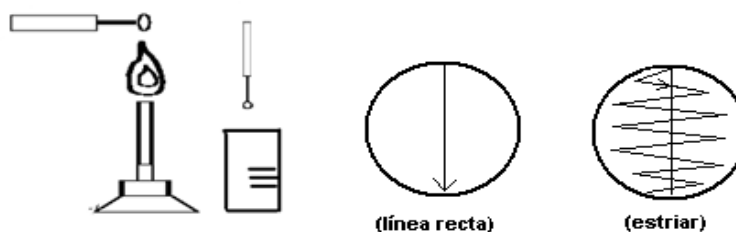


Figura 4: Siembra en Agar Sangre.

Fuente: Tesis BLEE 2010. (Enriquez Méndez & Peralta Ortíz , 2010)

Agar EMB

La siembra se realizó mediante técnica de agotamiento o estría para obtener colonias aisladas, de la siguiente manera:

Se empleó o no un asa calibrada de orina, ésta debió esterilizarse por calentamiento del alambre hasta el rojo vivo en el mechero, se enfrió el asa y luego se introdujo en la muestra de orina ya homogenizada, observándose la formación de una película en el asa y posteriormente se extendió sobre un área pequeña de la superficie de la caja con agar, en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para evitar la ruptura del agar, luego se rozó la siembra anterior y se extendió de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías, este proceso se repitió sucesivamente hasta completar cuatro estrías y finalmente se flameó el asa. (Figura 5)

Se incubaron las cajas, siempre invertidas, a 37°C durante 24 horas; tras la incubación, con la presencia de *E. coli* se observaron las colonias típicas de color violeta intenso con un brillo metálico característico o colonias atípicas. (Enriquez Méndez & Peralta Ortíz , 2010) (Anexos; Ilustración 3)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

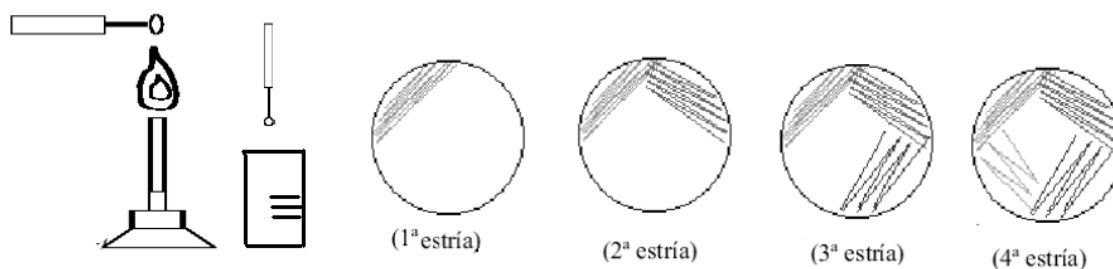


Figura 5 Siembra en Agar EMB

Fuente: Tesis BLEE 2010. (Enriquez Méndez & Peralta Ortíz , 2010)

Recuento de Colonias

El recuento de colonias se realizó en agar Sangre, debido a que en la siembra se empleó un asa calibrada. Los resultados se interpretaron en base a los siguientes criterios:

Menor a 10^2 UFC/mL: Normalmente, ésto es no significativo, posible contaminación. Es valorable si la toma de muestra se ha realizado por punción suprapúbica.

De 10^3 a 10^4 UFC/mL en ocasiones puede ser significativo; infecciones por levaduras, determinados cocos gram positivos, cultivos post-tratamiento, etc.

Mayor a 10^5 UFC/ml es significativo. (Malbran, 2001) (Anexos; Ilustración 4)

Tinción de Gram

La tinción de gram permite visualizar bacterias gram positivas y gram negativas.

Un microorganismo gram positivo debe presentar una pared celular sana. El mismo microorganismo, si sufre daño de la pared por una u otra causa, se



UNIVERSIDAD DE CUENCA

vuelve gram negativo. Esto indica la importancia de la pared para la retención o el escape del colorante.

El colorante básico entra al microorganismo, donde forma con el yodo una laca insoluble en agua. El alcohol o la acetona empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos gram positivos y forma una barrera que la laca no puede atravesar. En las células gram negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células gram positivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo de cristal violeta con yodo.

El procedimiento utilizado es el siguiente:

Preparar y fijar los frotis bacterianos.

Teñir con cristal violeta 1 minuto.

Lavar con abundante agua el exceso de colorante.

Cubrir con Solución Yódica 1 minuto.

Lavar con agua el exceso de la solución yódica.

Decolorar con alcohol-acetona durante 30 segundos.

Lavar con abundante agua para eliminar el resto de disolvente.

Teñir con Fucsina durante 1 minuto.

Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.

Secar la preparación.

Observar al microscopio con objetivo 100x, empleando aceite de inmersión.



Figura 6 Tinción de Gram

Fuente: Copyright 2004 Pearson Education, Inc Publishing as Benjamin Cummings

En el caso de que se presente bacilos gram negativos se continuó con el estudio. (Anexos; Ilustración 5)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Prueba de Oxidasa:

Para realizar esta prueba se llevó a cabo los siguientes pasos:

Con la ayuda de un asa de inoculación o mondadientes se toma del medio de cultivo de agar sangre una colonia aislada.

Aplicar la colonia sobre la zona reactiva de la tira y frotar con el asa de inoculación o mondadientes.

Esperar aproximadamente 1 minuto para comparar con la escala colorimétrica.

En el caso de gérmenes citocromo oxidasa-positivos la zona reactiva se colorea de azul a violeta azulado. (Anexos; Ilustración 6)

Para continuar con el estudio el resultado debe ser negativo debido a que las enterobacterias son oxidasa negativa. (Anexos; Ilustración 6)

Pruebas Bioquímicas

Una vez que se confirmó que el microorganismo es una enterobacteria se procedió a realizar las pruebas bioquímicas para determinar la especie, para ésto se realizó la siembra en:

Citrato

Se inoculó el tubo con agar citrato de Simmons realizando siembra por estría tomando una colonia del microorganismo aislado en estudio. Con un asa recta previamente estéril.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Urea

Se inoculó el microorganismo en estría en la superficie del agar en pico de flauta.

Kligler

La siembra se realizó por picadura en el agar y estría en la superficie inclinada.

LIA

La siembra se realizó por picadura en el agar y estría en la superficie inclinada.

SIM

Se inoculó al medio realizando siembra por picadura recta.

RMVP

Se inoculó en el caldo RMVP el microorganismo en estudio.

Las pruebas bioquímicas se debieron incubar a 37°C por 24 horas.

Luego de la incubación en el medio de SIM y en el medio de MRVP se procedió de la siguiente manera:

Prueba del Indol (SIM)

Al medio se añadió por las paredes del tubo 3 a 5 gotas del reactivo de Erlich y se observó la formación o no de un anillo de color fucsia o rojo sobre el agar. (Anexo; Ilustración 7)



Rojo de Metilo (RM)

A una porción del cultivo se le añadió unas 4 - 5 gotas de solución indicadora de Rojo de Metilo. Se agitó para homogeneizar y se observó la coloración. Esta prueba se consideró positiva si vira al rojo y negativa si permanece amarillo. (Anexo; Ilustración 8)

Voges-Proskauer

A la otra porción del cultivo se le añadió: 6 gotas del Reactivo A de Voges-Proskauer (alfa-naftol 5% en alcohol etílico absoluto), el medio adquirió un aspecto lechoso; se adicionó 2 gotas del Reactivo B de Voges Proskauer (KOH 40%) desapareció el aspecto lechoso y se agitó fuertemente.

Para la interpretación se consideró que si la prueba es positiva, antes de cinco minutos aparece un color rosado-violáceo, más o menos intenso, que se inicia en la parte superior del tubo. Si la prueba es negativa no aparece coloración alguna. (Enriquez Méndez & Peralta Ortiz , 2010)

3.2.1.5. Identificación de *Escherichia coli*.

CITRATO	UREA	KLIGLER	LIA	SIM	RMVP
Negativo	Negativo	A/A GAS: Positivo	K/K	H ₂ S Negativo MOTILIDAD Positivo/ Negativo INDOL Positivo	RM Positivo VP Negativo

Tabla 3.1: Pruebas Bioquímicas para *Escherichia coli*

Fuente: Manual Merck para identificación de Enterobacterias

Al obtener estos resultados se identifica *Escherichia coli*. (Anexos; Ilustración 9)



3.2.1.6. Pruebas de Sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad se realizaron a partir de una cepa aislada del medio de agar sangre.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo empleado para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana fue Agar Mueller Hinton.

Preparación del inóculo

Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas

De una placa de cultivo con agar no selectivo e incubada por 18 - 24 h a 37°C, se seleccionó colonias aisladas y se preparó una suspensión directa en solución salina.

La suspensión fué inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de Mc.Farland.

Inoculación de las Placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Antes de la colocación de los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial fuera absorbido.

Aplicación de los discos

Se colocó los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estuvieran a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm).

No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 5 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición.

Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

Incubación

Se incubó las placas en posición invertida de 35°C a 37°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.

Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla. Se mantuvo iluminada la parte posterior de la caja petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros



UNIVERSIDAD DE CUENCA

sobre un fondo negro. Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. (Sacsquispe, 2002)

El objetivo final de la realización de este tipo de ensayo fue poder categorizar al microorganismo como sensible, con sensibilidad intermedio o resistente al antibacteriano que ha sido ensayado.

Para poder acceder a este tipo de clasificación, por así llamarla, primero debemos saber que significan las diferentes categorías y como se establecen éstas:

Sensible

Implica que una infección debida a un microorganismo puede ser apropiadamente tratada con la dosis del antibacteriano recomendado para ese microorganismo y ese tipo de infección excepto, que existieran contraindicaciones.

Resistente

Los microorganismos resistentes no son inhibidos por las concentraciones sistémicas que se alcanzan en dosis habituales y/o caen dentro de un rango donde son comunes mecanismos de resistencia específicos, por ejemplo, la producción de betalactamasas.

Sensibilidad intermedia

Esta categoría incluye microorganismos que podrían ser inhibidos por concentraciones mayores, siempre que esas dosis puedan elevarse o que, fisiológicamente, se concentre el antibacteriano en el sitio de infección. Por otro lado esta categoría también implica la presencia de una zona denominada



UNIVERSIDAD DE CUENCA

buffer la cual debería evitar que pequeñas variaciones técnicas que sean difíciles de controlar, causen problemas en la interpretación de los resultados especialmente para drogas con estrechos márgenes farmacotóxicos.

3.2.1.7. Detección y Confirmación de BLEE en *Escherichia coli*

Las pruebas de BLEE se deben realizar como se describe en la siguiente tabla:

Prueba	Prueba Inicial	Prueba fenotípica confirmatoria
Método de ensayo	difusión en disco	difusión en disco
Medio	Agar Mueller Hinton	Agar Mueller Hinton
Concentración de Antimicrobiano	Para <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 10ug o Ceftazidima 30ug o Aztreonam 30ug o Cefotaxima 30ug o Ceftriaxona 30ug (El uso de más de un agente antimicrobiano para el cribado mejora la sensibilidad de detección de BLEE)	Ceftazidima 30 ug Ceftazidima- ácido clavulánico 30/10ug y Cefotaxima 30ug Cefotaxima-ácido clavulánico 30/10ug (Pruebas de confirmación requiere el uso de tanto cefotaxima y ceftazidima, solo y en combinación con ácido clavulánico.)
Condiciones de Incubación	35 +/- 2 ° C; ambiente	35+/-2 ° C; ambiente
Tiempo de Incubación	16-18 horas	16-18 horas



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Resultados	Para <i>E. coli</i> : Cefpodoxime ≤ 17 mm Ceftazidima ≤ 22 mm Aztreonam ≤ 27 mm Cefotaxima ≤ 27 mm Ceftriaxona ≤ 25 mm Las Zonas mencionados arriba pueden indicar producción de BLEE	Si es ≥ 5 -mm en la zona de aumento del diámetro para cualquiera de los antimicrobianos probado en combinación con ácido clavulánico frente a la zona diámetro del agente cuando se probó solo = BLEE (por ejemplo, ceftazidima zona = 16; ceftazidima-ácido clavulánico zona = 21).
-------------------	---	---

Tabla 3.2: Técnica para detección de BLEE

Fuente: Manual de CLSI, Edición Enero 2013, Número M100-S23. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013)

Procedimiento

Se partió de una muestra identificada (*Escherichia coli*).

Se realizó la siembra de un inóculo de concentración 0.5 McFarland en Agar Mueller Hinton y se colocaron los discos indicados en la tabla.

En caso de que los resultados fueran positivos según los parámetros indicados en la tabla del CLSI se procedió a la prueba confirmatoria. (Anexos; Ilustración 10)

La prueba confirmatoria consiste en colocar el disco del antimicrobiano solo y otro en combinación con ácido clavulánico según lo indica el manual CLSI actualizado a Enero del 2013.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La interpretación se explica en la tabla y según sea el resultado se expresa como BLEE positivo o negativo. (Anexos; Ilustración 11)

Antibióticos utilizados para enterobacterias en urocultivos

Antibióticos	Abreviatura	Concentración	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	CN	10ug	≥ 15	13—14	≤ 12
Nitrofurantoína	F	10ug	≥ 17	13—16	≤ 12
Norfloxacin	NOR	300ug	≥ 17	15—16	≤ 14

Tabla 3.3: Sensibilidad de los principales antibióticos usados en urocultivos
Fuente: Manual de CLSI, Edición Enero 2013, Número M100-S23. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013)

Estos fueron los antibióticos que se emplearon para la realización de las pruebas de sensibilidad en los cultivos presuntivos de BLEE para buscar una posible alternativa de tratamiento en caso de producción de Betalactamasas.



3.3. MATERIALES

3.3.1. Equipos y Materiales

Cooler para transporte de muestras

Lámparas de alcohol

Asa Calibrada

Asa Recta

Cajas Petri

Tubos Tapa rosca

Estufa a 37°C

Placas Portaobjetos

Gradillas para tubos

3.3.2. Medios de Cultivo

Agar Sangre:

El agar sangre es una combinación de un agar base (agar nutritivo) con fuente proteica (digeridos trépticos, digeridos proteicos de soja) el cual tiene un agregado de 5 % de sangre de cordero, con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales y cloruro sódico.

El agar sangre aporta muchos factores de enriquecimiento. Se usa también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos (que es un factor de virulencia), observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias se determina el tipo de hemólisis que posee:

Alfa: halos verdosos

Beta: halos incoloros

Gamma: inexistencia de halos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

El agar sangre al 5% con base de tripticasa-soya es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias, aunque no es medio de elección para anaerobios.

Con la adición de sangre, el medio es útil tanto para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis.

La aportación de caseína y peptonas de soya al agar de tripticasa-soya hace el medio muy nutritivo por el suministro de nitrógeno orgánico, particularmente aminoácidos y pépticos de cadena más larga. La presencia de estas peptonas en el medio permite el cultivo de una gran variedad de gérmenes aerobios y anaerobios que crecen rápidamente, así como los del género *Cándida*.

El cloruro sódico proporciona electrolitos esenciales, que mantienen el balance osmótico. La adición de sangre de carnero desfibrinada enriquece la base y lo hace un medio mucho más adecuado, y el agar es usado como agente solidificante. (Anexos; Ilustración 13)

El valor del pH de 6,8 es especialmente favorable para la conservación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros.

Este medio está relativamente libre de azúcares reductores, los cuales interfieren en las reacciones hemolíticas de estreptococos. (Centro Escolar "La Anunciata", 2012)

Agar EMB

El Agar EMB es un medio diferencial para la detección y el aislamiento de bacterias entéricas gram negativas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

El uso de la eosina y del azul de metileno permite la diferenciación de las colonias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras. La sacarosa está incluida en el medio para detectar a los miembros del grupo coliforme que fermentan más rápidamente la sacarosa que la lactosa. Este medio permite diferenciar al grupo *Salmonella* y otros organismos lactosa negativos de organismos coliformes.

En el Agar EMB las peptonas proveen la fuente de nitrógeno, la eosina y el azul de metileno son colorantes que se combinan para formar un precipitado a pH ácido.

Los colorantes actúan como inhibidores e indicadores. Los carbohidratos proporcionan la fuente de energía, las fosfatos actúan como buffer y el agar como agente solidificante. (MCD.com, 2012)

Agar Mueller Hinton

El agar Mueller Hinton es un medio utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en distintos microorganismos por el método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar, es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas).

La composición de este medio de cultivo garantiza, por una parte, condiciones favorables de crecimiento y por otra parte, cuenta con la ausencia, muy considerable de antagonistas de las sulfonamidas. Para mejorar de forma considerable el crecimiento de microorganismos exigentes, puede añadirse sangre al agar Mueller-Hinton.

En este medio, la infusión de carne y la peptona de caseína proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos. El almidón es agregado para



UNIVERSIDAD DE CUENCA

absorber cualquier metabolito tóxico y el agar es adicionado como agente solidificante.

Para la interpretación de resultados es necesario guiarse en las tablas de la CLSI actuales. (MCD.com, 2012)

3.3.3. Pruebas Bioquímicas

Las pruebas o ensayos bioquímicos, son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano.

Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar diferentes sistemas de trabajo (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.) que puede ser diferente aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos, por ejemplo se debe suplir con factores de crecimiento el medio de cultivo para estudiar la fermentación de distintos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente.

3.3.3.1. Prueba de Oxidasa

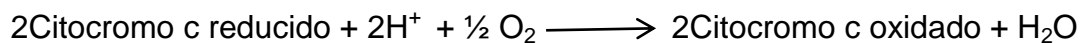
Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

La zona reactiva de una tira de ensayo contiene: dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0,1 μmol ; 1-naftol 1,0 μmol .



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La citocromooxidasa es un enzima del grupo de la porfirina férrica muy difundido en la naturaleza. Ella oxida el citocromo c reducido y entonces se transforma ella misma en la forma reducida e inactiva. Por transferencia de los electrones a oxígeno molecular la citocromooxidasa se transforma de nuevo en la forma activa. En presencia de oxígeno molecular el sistema citocromooxidasa/citocromo c puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre otras el llamado reactivo 1-naftol + dimetilparafenilendiamina con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol. (Enríquez Méndez & Peralta Ortíz , 2010)



Siembra:

Se inocular la bacteria a identificar; esta colonia no debe tener color ni haber sido inoculada en un medio con glucosa debido a que se inhibe la actividad oxidasa, siendo recomendable hacer la prueba de un medio no selectivo. (MacFaddin, 2003)

Interpretación:

Oxidasa Positiva: Coloración morada o negra dentro de 10-15 segundos indican prueba positiva.

Oxidasa Negativa: No hay un cambio en la coloración de la tira reactiva. (MacFaddin, 2003)

3.3.3.2. Citrato

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.



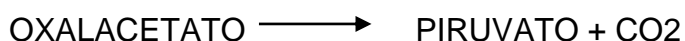
UNIVERSIDAD DE CUENCA

Generalmente los microorganismos que emplean el citrato como única fuente de carbono, utilizan sales de amonio como única fuente de nitrógeno. El metabolismo del citrato realizado, por algunas bacterias se realiza por el Ciclo de Krebs y requiere el desdoblamiento del citrato por la enzima citritasa (citrato-oxalacetato-liasa o citrato desmolasa) en presencia de magnesio o manganeso y de transportadores como citrato permeasas.

La citritasa actúa sobre el citrato produciendo ácido oxalacético y acetato; productos que son convertidos enzimáticamente a piruvato y dióxido de carbono.

Durante esta reacción el medio comienza a alcalinizarse por el CO₂ que se genera, el cual se combina con el agua y el sodio para formar carbonato un producto alcalino, este carbonato da la alcalinidad que produce el cambio de color del indicador de pH del medio de verde a azul prusia oscuro (indicador: azul de bromotimol, amarillo a pH < de 6.0 y azul a pH > de 7.6).

El medio incluye citrato como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.



pH alcalino



pH ácido





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Siembra:

Inocular el tubo con agar citrato de Simmons realizando siembra por estría tomando una colonia del microorganismo en estudio.

Incubación

Incubar a 37 °C por 24 horas.

Interpretación de Resultados:

El desarrollo de un color azul intenso en 24-48 horas indica una prueba positiva y revela que el microorganismo en estudio ha sido capaz de utilizar el citrato en el medio con la formación de productos alcalinos. La prueba también es positiva en ausencia de color azul si existe crecimiento del microorganismo a lo largo de la estría de inoculación. (MacFaddin, 2003)

3.3.3.3. Agar Urea

Medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica. Se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea, tales como *Proteus spp.*, otras enterobacterias y estafilococos.

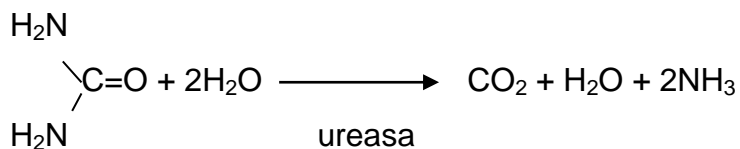
En el medio de cultivo, la tripteína y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH. El agar es el agente solidificante.

Las bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberan amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio de cultivo haciendo virar el indicador rojo de fenol del color amarillo al rojo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Es recomendado especialmente para la detección de la actividad ureásica en bacterias que hidrolizan lentamente la urea ya que la fermentación de la glucosa presente activa la enzima ureasa microbiana. (Britania Lab, s.f.)



Siembra:

Inocular el microorganismo en estría en la superficie del agar en pico de flauta.

Incubación

Incubar por 24h a 37°C.

Interpretación de Resultados

Un cambio de color del medio a Rojo fucsia indica que la urea fue hidrolizada por la ureasa del microorganismo. Ausencia de cambio de color indica reacciona negativa. (Galeón, s.f.)

3.3.3.4. Agar Kligler

El Agar Hierro de Kligler es un medio empleado para la diferenciación de cultivos puros de bacilos Gram negativos en base a su capacidad para fermentar la dextrosa y la lactosa y a la producción de sulfuro de hidrógeno.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

El extracto de levadura y las peptonas proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales, el sulfato férrico y el tiosulfato son indicadores de la producción de sulfuro de hidrógeno.

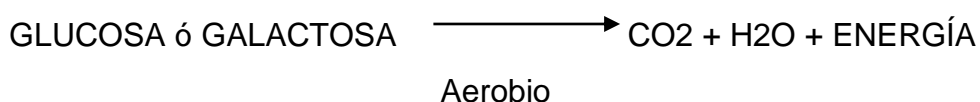
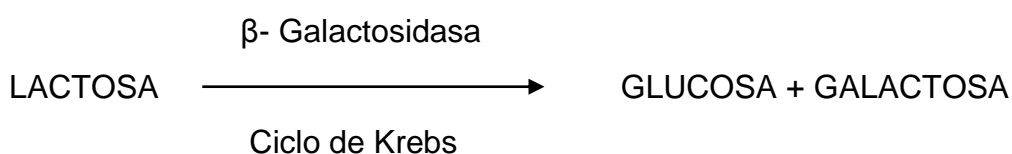
El cloruro de sodio mantiene la presión osmótica y el agar es adicionado como agente solidificante.

El medio se solidifica en forma inclinada permitiendo tener dos cámaras de crecimiento: una aeróbica, el pico de flauta y la otra anaeróbica, el fondo del tubo.

Lo que se determina es:

La fermentación de azúcares acidifica el medio lo cual se observa con el viraje del rojo de fenol a amarillo que es el indicador ácido-base incorporado. En caso de no haber fermentación, el medio vira a rojo.

La fermentación de glucosa cambia el medio a amarillo, pero debido a su baja concentración (0.1%) esto sólo se observa en el fondo del tubo, mientras que la superficie cambia a rojo. Una vez consumida la glucosa, el microorganismo comienza a metabolizar aminoácidos liberando amoníaco, lo cual alcaliniza el medio, esto ocurre en la superficie. La fermentación de lactosa cambia el medio a amarillo y dado que su concentración es mayor (1%), la formación de ácido es suficiente para mantener el color amarillo tanto en el fondo como en la superficie del tubo. (MCD.com, 2006)





GLUCOSA	}	Ácidos orgánicos
Anaerobio		Aldehídos
CO ₂ + H ₂ O		Alcoholes
		Energía.

Formación de H₂S

Como anteriormente se indicó el medio posee dos indicadores que nos ayuda a la determinación de H₂S como son: citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio. Éste proceso se efectúa en dos pasos:

La producción de sulfuro de hidrógeno se debe a la utilización del tiosulfato de sodio; debido a que el H₂S es un gas incoloro se requiere del segundo indicador que contiene el medio.

El sulfuro de hidrógeno reacciona con el citrato férrico de amonio formando sulfuro de hierro que se observan como un precipitado negro insoluble.

La formación de gas

Se observa por la presencia de burbujas, fracturas o desplazamiento del agar. (Enríquez Méndez & Peralta Ortiz , 2010)

Siembra

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, sembrar el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del medio.

Incubación

A 35-37°C durante 24 horas, en aerobiosis.



Interpretación de Resultados:

Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa. **K/A**

Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, y lactosa. **A/A**.

Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares. **K/K** En ausencia de fermentación de hidratos de carbono no se forman ácidos, y la utilización de las peptonas con la consiguiente producción de grupos básicos hace que todo el medio aparezca de color rojo.

Las bacterias que producen este tipo de reacción son conocidas como "no fermentadoras" y es una importante indicación de que no pertenece a las enterobacterias.

La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.

El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico. (Britania Lab, 2012)

3.3.3.5 LIA (Lysine Iron Agar)

El Agar de Hierro y Lisina es un medio utilizado para la diferenciación de microorganismos entéricos en base a su capacidad para desaminar o descarboxilar la lisina y de producir sulfuro de hidrógeno.

Es un medio que es útil para demostrar la producción de dos enzimas: la lisina descarboxilasa y la lisina desaminasa, además la presencia de sales de hierro permite detectar la producción de H₂S por algunos microorganismos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La descarboxilación de la lisina ocurre en ambiente anaeróbico o sea en el fondo del tubo y se pone de manifiesto por la alcalinización del medio produciendo un viraje del indicador púrpura de bromocresol.

La presencia de glucosa en los componentes del LIA determina primero una reacción de fermentación, produciendo acidificación y cambio de color del medio a amarillo y el pH favorable para la reacción de descarboxilación que ocurre después, volviendo a su color violeta original la parte del fondo del tubo.

La desaminación de la lisina tiene lugar en la parte superior del tubo produciendo ácido α cetocarbónico que al combinarse con la sal de hierro y en presencia de oxígeno forma un color violeta rojizo.

La producción de H_2S se evidencia por la presencia de un precipitado negro por utilización de las sales de hierro.

Siembra:

Inocular realizando siembra mixta con doble picadura a partir de una colonia del cultivo del microorganismo en estudio.

Incubación:

Incubar 24 horas a $37^\circ C$. (Galeón, s.f.)

Interpretación de Resultados:

Descarboxilación de la lisina:

Prueba Positiva: Pico violeta/fondo violeta

Prueba Negativa Pico violeta/fondo amarillo: existe solo fermentación de la glucosa.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Desaminación de la lisina

Pico rojizo/fondo amarillo

Producción de ácido sulfhídrico

Ennegrecimiento del medio, especialmente en el límite del pico y fondo.
(Britania Laboratorios, 2010)

3.3.3.6. SIM

Sulfide Indole Motility (SIM); se utiliza para determinar la producción de sulfuro, formación de indol y movilidad de los microorganismos entéricos.

Medio de cultivo en el cual la tripteína y la peptona aportan nutrientes para el desarrollo microbiano. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol.

En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Ehrlich o de Kovac's, para originar un compuesto de color rojo.

A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro.

El agar es el agente solidificante y a esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo en estudio. (Britania Lab, 2010)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Siembra:

Inocular al medio realizando siembra por picadura hasta la mitad del medio a partir del cultivo del microorganismo en estudio.

Incubación

Incubar 24 horas a 37° C. al finalizar este periodo añadir 5 gotas del reactivo de Erlich o Kovacs por la pared del tubo.

Interpretación de Resultados

Producción de Hidrógeno Sulfurado (H₂S)

Positivas:

Ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.

Negativas:

El medio permanece sin cambio de color.

Producción de Indol

El desarrollo de un color rojo-fucsia en la interfase reactivo-medio de cultivo, segundos después de añadir el reactivo de Erlich o Kovacs indica la presencia de indol y por lo tanto una prueba positiva.

Motilidad

Formación de nata la parte superior de medio indica viabilidad del microorganismo, desarrollo de turbidez hacia los lados de la estría de inoculación indica motilidad positiva. (MacFaddin, 2003)



3.3.3.7. Rojo de Metilo y Voges Proskauer:

Medio utilizado para la realización del ensayo de Rojo de Metilo y Voges Proskauer. Es particularmente útil para la clasificación de enterobacterias.

En el medio de cultivo, la pluripeptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable.

La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetilmetil carbinol). (Britania Lab, 2010)

La prueba Rojo de metilo es cuantitativa para la producción de ácido y requiere que los microorganismos produzcan ácidos fuertes a partir de la glucosa, de forma que el medio del pH descienda a menos de 4.4. Esta distinción puede hacerse a través del indicador rojo de metilo que presenta color amarillo por encima de un pH de 5.1 y solo presenta color rojo cuando el pH desciende a 4.4.

Voges Proskauer, Determina la capacidad de algunas bacterias para generar un producto final neutro (acetoina y 2,3 Butanodiol) a partir de la fermentación de la glucosa. Los productos neutros formados en la presencia de oxígeno atmosférico, alcalisis (Hidróxido de Potasio al 40%) y peptonas, se oxidan en diacetilo, reactante para el color producido en la reacción. El α naftol actúa como catalizador para revelar un complejo color rojo.

Siembra:

Inocular en el caldo RMVP con una colonia del cultivo del microorganismo en estudio.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Incubación:

Incubar 24-48 horas a 37° C. finalizado este periodo dividir el contenido en dos tubos al primer tubo adicionar 5 gotas del revelador Rojo de metilo, al segundo tubo adicionar los reactivos reveladores 6 gotas (0.6ml) de la solución de Alfa Naftol y 2 gotas (0.2ml) de la solución de Hidróxido de Potasio al 40%, dejar en reposo durante 10-15 minutos.

Interpretación de Resultados

Rojo de Metilo

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4 y es una prueba positiva. Cuando ocurre la formación de un color amarillo la prueba es negativa.

Voges Proskauer

Una prueba positiva está indicada por el desarrollo de un color rojo a los 15 minutos de añadido los reactivos reveladores por la presencia de acetoína. Una prueba negativa da un color cobrizo. (Galeón, s.f.)

3.3.4. Muestra de Orina

La muestra de orina es una porción significativa y representativa de la micción del paciente y debe ser útil para el análisis; es considerada óptima la de la primera micción de la mañana, ya que permite la multiplicación de las bacterias durante la noche.

Para evitar al máximo la contaminación de la orina por la flora comensal normal de la uretra se tienen que limpiar bien los genitales y permitir que la primera parte de la micción elimine, por mecanismo de arrastre, la flora uretral.

El recipiente estéril donde es preciso recoger la muestra de orina no tiene que ponerse en contacto con las piernas, vulva o ropa del paciente. El recipiente ha



UNIVERSIDAD DE CUENCA

de estar cerrado y solo se abrirá en el momento de recoger la orina, evitando que los dedos toquen los bordes del recipiente o su superficie interior.

El estudio rutinario de la orina requiere de la toma de una muestra de orina por parte del paciente que deberá depositar en un recipiente estéril para ello. En la mayoría de los casos la toma de muestra de orina puede ser realizada por el paciente en su domicilio. La cantidad de muestra de la orina requerida variará desde una mínima cantidad en el caso de una tira reactiva o de un sedimento de orina, a cantidades muy superiores en el caso de un análisis de la orina de 24 horas; el médico del paciente deberá indicarle la cantidad exacta que debe recoger para cada tipo de análisis.

La muestra debe ser recogida con las máximas condiciones de asepsia por lo que al paciente se le aconsejará una correcta higiene íntima mediante la limpieza del área genital externa con agua y jabón.

No son válidas las muestras de orina contaminadas con excrementos.

Siempre y cuando sea posible, evitar refrigerar la muestra de orina.

Recoger la muestra de orina antes de la administración de antibióticos.

Una muestra mal tomada no sólo puede resultar una recolección fallida de microorganismos, sino que también puede conducir a un diagnóstico y una terapia equivocada, si el tratamiento es indicado a un microorganismo no responsable de enfermedades. (Hospital de Nens, 2002)

Las muestras de las cuales se puede ver un sedimento con gran cantidad de bacterias, nitritos, neutrófilos o leucocitos indican una sospecha de infección bacteriana y es recomendable el análisis microbiológico.

El cultivo de la orina o urocultivo: se realiza mediante el empleo de diferentes técnicas de laboratorio; permite conocer si existe infección bacteriana, el tipo de germen implicado así como establecer los diferentes antibióticos a los cuales el germen detectado es sensible mediante lo que conocemos como pruebas de sensibilidad o antibiograma. (Muñoz, s.f.)



4. Resultados y Discusión

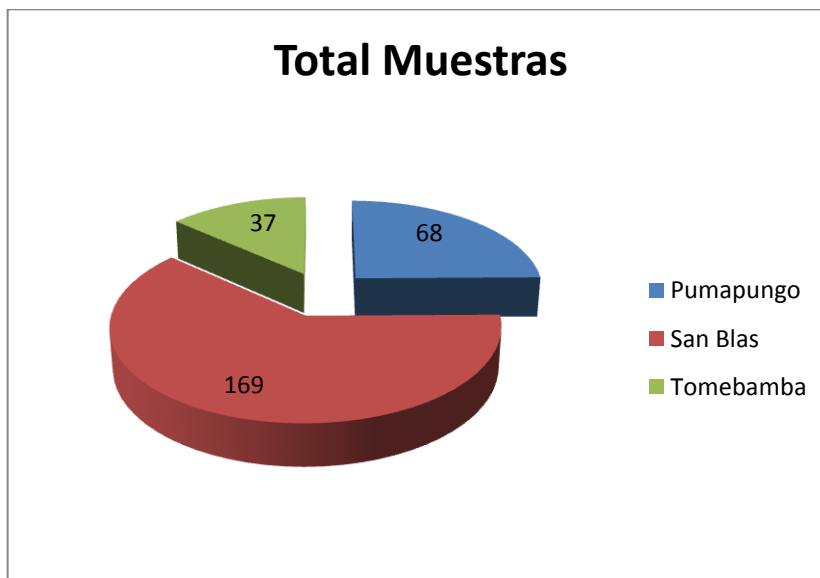
Para el presente estudio se trabajó con las muestras de los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca; entendiéndose que estas muestras pertenecían a pacientes ambulatorios que por distintas razones acudían a estas casas de salud para la realización del EMO (Elemental Microscópico de Orina).

Las muestras de cada Centro de Salud cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos.

Tabla 4.1: Distribución de las muestras analizadas en cada Centro de Salud

Centros de Salud	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	TOTAL
Pumapungo	11	12	8	4	4	11	5	13	68
San Blas	9	14	17	31	22	24	28	24	169
Tomebamba	2	2	0	6	7	12	0	8	37
	22	28	25	41	33	47	33	45	274

Gráfico 4.1: Distribución de las muestras en cada centro de salud



La distribución de muestras en cada Centro de Salud se observa desigual debido a la distinta población con la que trabajan en cada uno que depende básicamente de la zona de donde provienen los pacientes; es así que en los



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Centros de Salud 1 “Pumapungo”, Salud 2 “San Blas” y en el Centro de Salud 3 “Tomebamba” se tramitan gran cantidad de permisos sanitarios por lo que los pacientes de los que se recibieron las muestras no necesariamente tienen síntomas propios de una Infección del Tracto Urinario.

Tabla 4.2: Distribución de las muestras según género y edad.

Género	Número de Muestras	Porcentaje	Grupo Etario	Edad	Número de Muestras	Porcentaje
Femenino	240	87,59%	Niños	0 a 12años	3	1,09%
Masculino	34	12,41%	Adultos	13-65 años	260	94,89%
			Adultos Mayores	>65 años	11	4,01%
TOTAL	274	100%			274	100%

La Tabla 4.2 presenta un predominio de muestras de pacientes de género femenino (87.59%).

Según las estadísticas del Ministerio de Salud Pública del Ecuador en el año 2009 se muestra que las infecciones en vías urinarias afectan al 20% de las mujeres de entre 20 y 50 años, y sólo al 0.1% de los varones en idéntico rango de edad, pero también dejan claro que el género masculino presenta incremento considerable en la incidencia de éstas a partir de la quinta década de vida, debido a que su proceso de envejecimiento se acompaña de circunstancias que dificultan el tránsito de orina y favorecen la reproducción de microorganismos.

En un estudio realizado entre 2002 y 2003 en Colombia por un grupo de investigación de la Universidad Nacional se encontró que cerca del 6.3% del motivo de consulta en una población es infección de vías urinarias de los cuales el 84.4% correspondieron a mujeres entre los 15 y 44 años de edad, lo



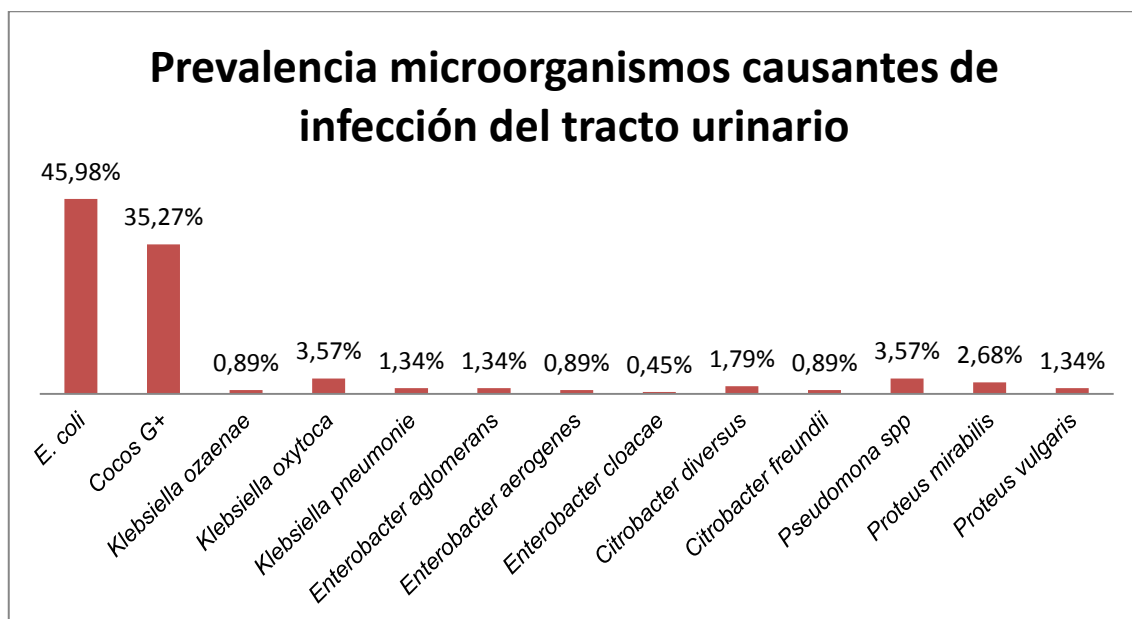
UNIVERSIDAD DE CUENCA

que la convierte en una causa considerable de morbilidad en mujeres, con repercusiones importantes en la calidad de vida si no es tratada correctamente; resultados que coinciden con los obtenidos en el presente estudio. (Reyes Baque, 2012)

Tabla 4.3: Prevalencia de microorganismos causantes de infección de tracto urinario en pacientes ambulatorios de los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca durante el periodo comprendido entre el 6 de Mayo y el 1 de Julio del 2013

Microorganismos	Número	Porcentaje
<i>E. coli</i>	103	45,98%
Cocos G+	79	35,27%
<i>Klebsiella ozaenae</i>	2	0,89%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	3,57%
<i>Klebsiella pneumonie</i>	3	1,34%
<i>Enterobacter aglomerans</i>	3	1,34%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0,89%
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,45%
<i>Citrobacter diversus</i>	4	1,79%
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0,89%
<i>Pseudomona spp</i>	8	3,57%
<i>Proteus mirabilis</i>	6	2,68%
<i>Proteus vulgaris</i>	3	1,34%
TOTAL	224	100%

Grafico 4.2: Prevalencia de microorganismos causantes de infección de tracto urinario en pacientes ambulatorios de los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca durante el periodo comprendido entre el 6 de Mayo y el 1 de Julio del 2013



Se puede observar que *Escherichia coli* es el agente causal de la mayoría de infecciones de vías urinarias (45.98%); sin embargo llama la atención la cantidad de cocos gram positivos (35.27%) que se obtuvo como resultado del urocultivo pudiendo ser causa de una fallida toma de muestra o porque la mayoría de los pacientes fueron mujeres jóvenes en donde es muy común la infección por cocos gram positivos, lo que se evidencia en el artículo “etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos” expuesto por Ochoa Sangrador en el año 2005 en la Revista Española de Quimioterapia en donde se observa una gran prevalencia de los géneros *Stafilococcus* y *Streptococcus* en infecciones del tracto urinario. (Ochoa Sangrador , et al., 2005)

Según un estudio realizado por Enríquez Johanna y Peralta Ximena en la ciudad de Cuenca en el año 2010 en una población de pacientes hospitalizados y muestras provenientes de la Fundación “Pablo Jaramillo” se tiene una prevalencia de *Escherichia coli* del 56% seguido de cocos gram positivos en una cantidad de 34%, lo que indica que no hay una variación significativa a pesar de que la población en estudio es distinta. (Enriquez Méndez & Peralta Ortíz , 2010)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

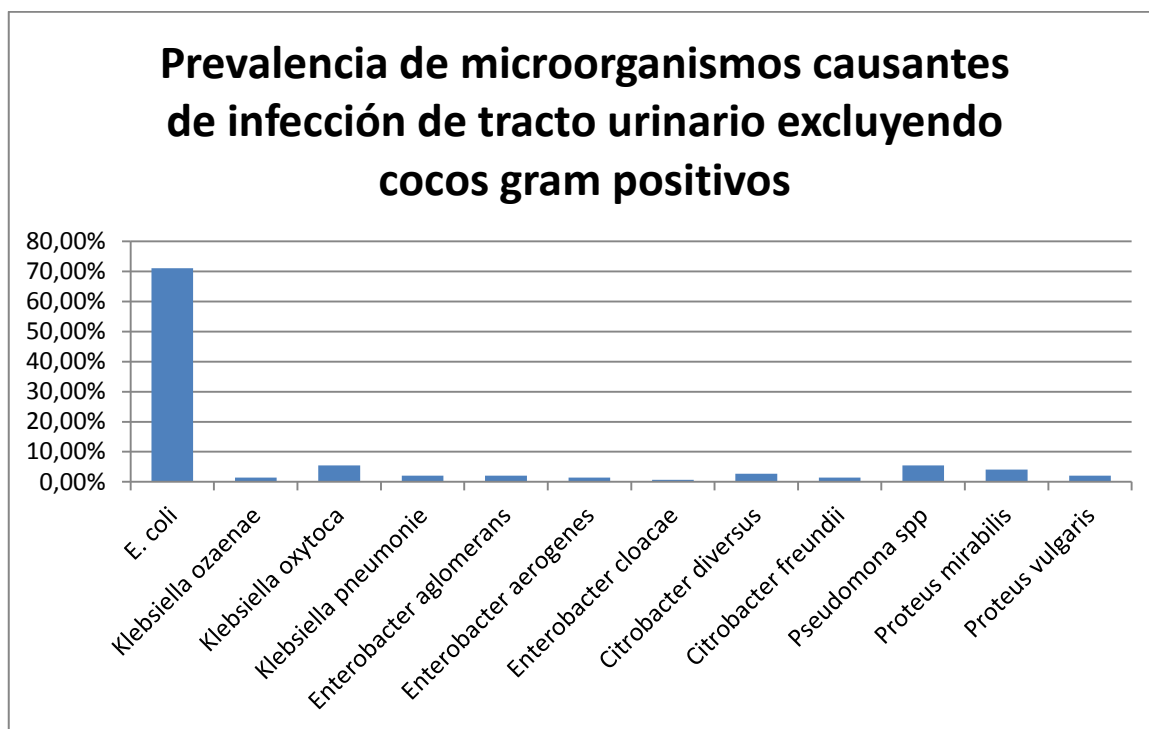
Es posible además relacionar el presente estudio con otros realizados en diferentes países, dado que la población es similar; por ejemplo un trabajo llevado a cabo en 2009-2010 por la Universidad Nacional de Colombia y la Sociedad Colombiana de Infectología donde se expone una prevalencia de *Escherichia coli* como agente causal de infecciones del tracto urinario del 88.5%. (Arias León, 2011)

Así mismo un estudio similar en Chile realizado por el Dr. Julio Brousse en el año 2009 revela que el 84.01% de infecciones del tracto urinario están dadas por *Escherichia coli* como agente causal. (Brousse , 2009)

Se puede observar como particularidad de estos estudios (Arias León, 2011) y (Brousse , 2009) que se considera el universo únicamente a enterobacterias como agentes causales de las infecciones de tracto urinario; es así que en el presente trabajo se puede descartar la prevalencia de cocos gram + como en el gráfico 4.3 teniendo una prevalencia de *Escherichia coli* muy similar a los estudios señalados anteriormente.



Grafico 4.3 Prevalencia de microorganismos causantes de infección de tracto urinario excluyendo cocos gram positivos en pacientes ambulatorios de los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca durante el periodo comprendido entre el 6 de Mayo y el 1 de Julio del 2013



Además cabe recalcar que en el estudio se consideraron negativas las muestras menores a 100.000 UFC/mL debido a que no son representativas.

Tabla 4.4: Relación *Escherichia coli* con el género y edad

Relación <i>Escherichia coli</i> con el género y edad						
Género	<i>E. coli</i>	Porcentaje	Grupo Etario	Edades	Muestras	Porcentaje
Femenino	99	96,12%	Niños	0 - 12 años	0	0,00%
Masculino	4	3,88%	Adultos	13-65 años	96	93,20%
			Adultos Mayores	>65 años	7	6,80%
TOTAL	103	100%			103	100%



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Según la Tabla 4.4 predominan las infecciones urinarias por *Escherichia coli* en personas de sexo femenino (96.12%) debido a la estructura anatómica frente a personas de sexo masculino (3.88%).

En cuanto a la edad al realizar el estudio en los Centros de Salud era de esperar que la mayor cantidad de cultivos de *Escherichia coli* fuera de personas adultas pero es muy importante el predominio de *Escherichia coli* en adultos mayores ya que de las 11 muestras que se analizaron, 7 dieron positivas (65%) resultando un factor muy importante de infección en muestras de orina.

Los factores de riesgo de ITU sintomática en el anciano son la edad, el sexo, la capacidad para realizar las actividades de la vida diaria, las enfermedades de base, la instrumentación urinaria, los problemas de vaciado es decir, cualquier obstrucción anatómica o funcional. (Enriquez Méndez & Peralta Ortiz , 2010)

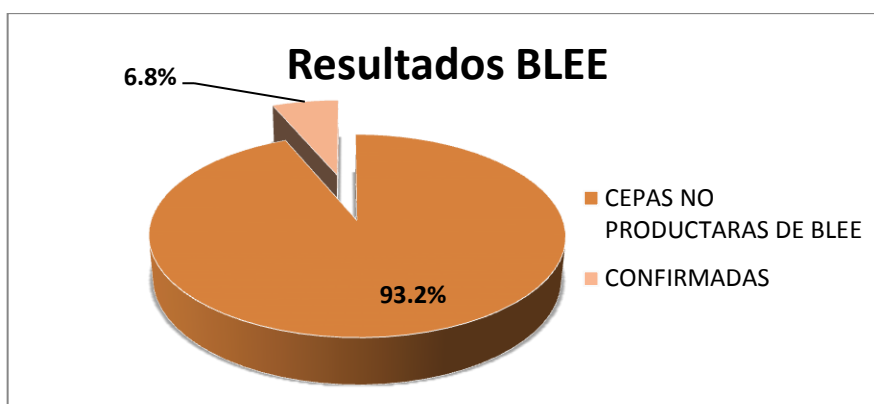
En niños no se pudo recuperar cultivos de *Escherichia coli* debido principalmente al pequeño número de muestras procesadas (solamente 3) a pesar de ser esta bacteria muy importante en infecciones de vías urinarias en especial en niñas

Tabla 4.5: Producción de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli*.

Resultados BLEE		
BLEE Negativas	96	93.2%
BLEE Positivas	7	6.8%
Total <i>E. coli</i>	103	100%



Gráfico 4.4 Resultados de producción de BLEE en cultivos de *Escherichia coli*.



El porcentaje de BLEE (6.8%) debe ser tomado en cuenta debido a las posibles complicaciones que podría generar en el tratamiento de las infecciones de vías urinarias la presencia de esta enzima y más aún si se consideran las posibles causas por las que se pudo haber generado tales como el incumplimiento en tratamientos previos.

Así mismo es importante tomar en cuenta que se trabajó con una población de pacientes ambulatorios y no en pacientes hospitalizados que es más común por lo que la producción de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) debería ser una prueba de rutina en los laboratorios y su detección resulta de vital importancia.

Si se compara el presente estudio con otro realizado por Enríquez Johanna y Ortiz Ximena en el 2010 en la ciudad de Cuenca denominado "Determinación de la Presencia de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli*" en donde se reporta un 8% de cepas productoras de BLEE, pero la población en estudio fue de pacientes hospitalizados, se puede concluir que resulta un problema en el tratamiento ya que no solamente se encuentra a nivel hospitalario sino a también ambulatorio debiendo verificarse su presencia en todos los casos y así tener una certeza del tratamiento y curación de cada paciente. (Enriquez Méndez & Peralta Ortiz , 2010)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Según Salim Mattar y Pedro Martínez investigadores de la Asociación Colombiana de Infectología en su artículo sobre la prevalencia de BLEE en América Latina establece diferencias en función de si se trata de pacientes hospitalizados o no hospitalizados variando en un rango del 5% al 73%; es así que según los investigadores las Beta Lactamasas son un problema de Salud Pública con proporciones alarmantes de prevalencia en Latinoamérica que alcanza tasas preocupantes en Colombia, Guatemala, Perú, México, Venezuela, Ecuador, Argentina, Chile, Panamá y Brasil.

En América del Norte, la prevalencia de BLEE entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* se encuentra en un rango de 5-10% (*E. coli* 7.5% y *K. pneumoniae* 12.3%); en Europa se establece una prevalencia del 5.3% de cepas productoras de BLEE en bacterias en *E. coli*. (Mattar & Pedro, 2007)

Tabla 4.6: Producción de BLEE relacionada con el género y edad

Relación BLEE con Género y Edad						
	Edades	Muestras	Porcentaje	Género	BLEE	Porcentaje
Niños	0 - 12 años	0	0,00%	Femenino	6	85,71%
Adultos	13-65 años	7	100,00%	Masculino	1	14,29%
Adultos Mayores	>65 años	0	0,00%			
TOTAL		7	100%		7	100%

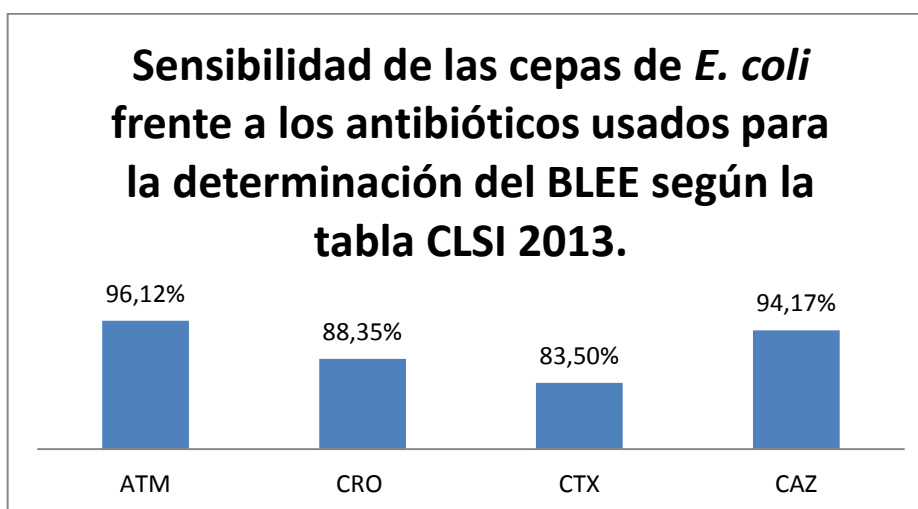
Debido a que ni la edad ni el género en el estudio resultaron homogéneos no se puede comparar acertadamente una relación clara entre la edad, el género y la producción de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE); así mismo comparando con estudios previamente realizados donde se busca BLEE se observa que no tiene relación alguna con la edad o con el género sino simplemente con la presencia de *Escherichia coli*. (Enriquez Méndez & Peralta Ortíz , 2010) (Mattar & Pedro, 2007) (Sánchez, et al., 2008)



Tabla 4.7: Sensibilidad de las cepas de *E. coli* frente a los antibióticos usados para la determinación del BLEE según la tabla CLSI 2013.

		Número de Muestras			Porcentajes		
Antibióticos	Abreviatura	S	I	R	S	I	R
Aztreonam	ATM	99	2	2	96,12%	1,94%	1,94%
Ceftriaxona	CRO	91	0	12	88,35%	0,00%	11,65%
Cefotaxime	CTX	86	5	12	83,50%	4,85%	11,65%
Ceftazidime	CAZ	97	1	5	94,17%	0,97%	4,85%
S=Sensible		I=Sensibilidad Intermedia			R=Resistente		

Gráfico 4.5: Sensibilidad de las cepas de *E. coli* frente a los antibióticos usados para la determinación del BLEE según la tabla CLSI 2013.



Se observa que el Aztreonam es el antibiótico de este grupo al que se reporta mayor sensibilidad dado que un 96,12% de las cepas de *Escherichia coli*, así mismo se registra una buena sensibilidad a Ceftazidime (94%); el antibiótico al que corresponde una menor sensibilidad resultó Cefotaxime con un 84%.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las cepas de *Escherichia coli* estudiadas presentan una mayor resistencia a Ceftriaxona y Cefotaxime.

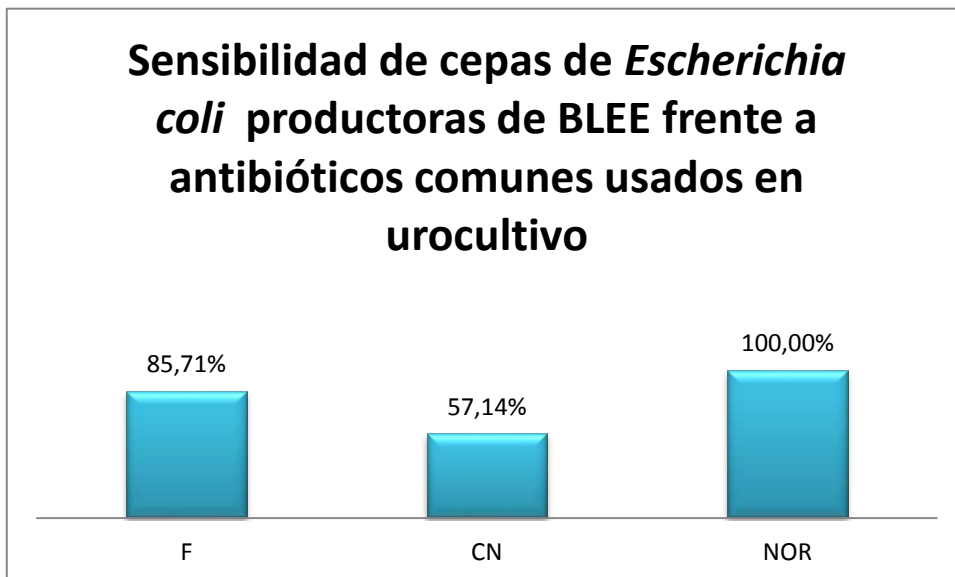
En un estudio realizado por Sánchez Liliana, Ríos Rodrigo y Mattar Salim en el año 2008 en la clínica Villavicencio en Colombia durante el periodo de estudio se detectaron 50 episodios de infecciones; donde el agente causal resultó ser *E. coli* en 29 casos aislados de diferentes pacientes. El porcentaje de resistencia de *E. coli* fue, cefotaxima (3,44%) y ceftazidima (3,44%). El método de MicroScan® ESBL plus demostró que 1 aislamiento de *E. coli* era productora de BLEE. (Sánchez, et al., 2008).

Tabla 4.8: Sensibilidad de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE frente a antibióticos comunes usados en urocultivo.

Antibiótico	Abreviatura	Número de Muestras			Porcentaje		
		S	I	R	S	I	R
Nitrofurantoína	F	6	0	1	85,71%	0,00%	14,29%
Gentamicina	CN	4	1	2	57,14%	14,29%	28,57%
Norfloxacino	NOR	7	0	0	100,00%	0,00%	0,00%
S=Sensible		I=Sensibilidad Intermedia			R=Resistente		



Gráfico 4.6: Sensibilidad de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE frente a antibióticos comunes usados en urocultivo.



Una alternativa frente a la producción de las BLEE podría ser la Norfloxacin donde estas cepas evidencian una buena sensibilidad (100% de los casos); igualmente a la Nitrofurantoína (86%) que resulta una buena alternativa al tratamiento de infecciones del tracto urinario. (Martín, 2004)

Estudios similares confirman lo expuesto se determinó la resistencia de cepas de *E. coli* con producción de urocultivos en mujeres mayores de 15 años durante el año 2003-2004 en los diferentes hospitales de Guayaquil, Cuenca y Quito; en donde se evidencia una menor resistencia de las cepas aisladas a Nitrofurantoína en un rango de 2-15%.

Una publicación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Desarrollo y la Clínica Alemana reporta en los años 2008 2009, y 2010 una sensibilidad de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE del 93 a 98% por lo que constituye una alternativa eficaz para el tratamiento de ITU. (Araos, 2008)



5. Conclusiones:

1. En el estudio realizado se analizaron un total de 274 muestras de orina de las cuales en 103 se logró aislar *Escherichia coli*; con estas muestras se continuó el estudio determinando la presencia de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE); obteniendo un total de 7 muestras con esta característica (6.8%), cifra que se puede considerar alta dada la población estudiada de pacientes ambulatorios y las consecuencias que puede generar en estos.
2. En cuanto a los microorganismos causantes de infección de tracto urinario se observa que *Escherichia coli* tiene una prevalencia muy alta en la población (45.98%); sin embargo llama la atención la cantidad de Cocos Gram Positivos (35.27%).
3. Se puede considerar a *Escherichia coli* un agente muy importante en la infección del tracto urinario de adultos mayores ya que en el presente estudio de 11 muestras de orina analizadas se pudo recuperar *Escherichia coli* en 7 de ellas (65%).
4. La sensibilidad de las cepas de *Escherichia coli* para los antibióticos usados en la identificación de BLEE fueron Aztreonam 96.12%, Ceftazidime 94.17%, Cefotaxime 83.5% y Ceftriaxone 88.35%, mientras que en las cepas BLEE positivas la sensibilidad frente a Aztreonam fue de 83.33%, Ceftazidime 75%, Cefotaxime 29.16% y Ceftriaxone 50%, observándose una considerable disminución en la sensibilidad a antimicrobianos por parte de las cepas BLEE positivas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

6. Recomendaciones

1. La identificación de BLEE debería implementarse en los laboratorios ya que mediante el presente estudio, otros en el país y en todo el mundo se observa la presencia de cepas BLEE positivas, considerando que la identificación resulta sencilla, de bajo costo y facilitaría en gran medida el tratamiento.
2. Es de suma importancia combatir las causas para que se dé la producción de BLEE, entre ellas las principales son la automedicación y la falta de cumplimiento en el tratamiento por parte de los pacientes; es así que todo el personal de salud debe orientar a los pacientes para que cada tratamiento pueda culminar de manera eficaz.
3. La producción de BLEE es característica para muchas enterobacterias es por esto que se debería ampliar su identificación en géneros como *Klebsiella* considerando que la técnica de identificación es igual que para *Escherichia coli* y que solo hay un cambio en los valores de los halos de los antimicrobianos.
4. Dado que hay diferentes tipos de BLEE el presente estudio podría continuarse mediante la identificación genotípica de los mismos, pudiendo obtener resultados para un estudio más completo.



7. Bibliografía

Alós, J. I., 2005. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. Volumen 23.

Araos, R., 2008. Facultad de Medicina, Universidad del Desarrollo. [En línea] Available at: http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones_antimicrobiana_2010/10_Araos_ITU_version_final_SOCHINF.pdf [Último acceso: 2 Octubre 2013].

Ardila Medina, . C., 2010. Avances en Periodoncia. [En línea] Available at: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1699-65852010000100004&script=sci_arttext [Último acceso: 04 Septiembre 2013].

Arias león, g., 2011. “Características clínicas y frecuencia de betalactamasas de espectro extendido en aislamientos de enterobacterias causantes de IVU de origen comunitario en pacientes adultos de siete hospitales pertenecientes a la red grebo 2009-2010”. [en línea] available at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/3826/1/05598406.2011.pdf> [último acceso: 29 julio 2013].

Barcelona, L., Marin, M. & Stamboulian, D., 2008. Scielo. [En línea] Available at: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0025-76802008000100012&script=sci_arttext [Último acceso: 5 Septiembre 2013].

Britania Lab, 2010. RM-VP Hoja Técnica. [En línea] Available at: http://www.britanialab.com/productos/338_hoja_tecnica_es.pdf [Último acceso: 15 Julilo 2013].



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Britania Lab, 2010. SIM medio. [En línea]
Available at: http://www.britanialab.com/productos/327_hoja_tecnica_es.pdf
[Último acceso: 15 Julio 2013].

Britania Lab, 2012. Kligler Hierro Agar. [En línea]
Available at:
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/kliglerhierroagar.htm>
[Último acceso: 15 Julio 2013].

Britania Lab, s.f. Christensen Medio Urea Base Hoja Técnica. [En línea]
Available at: http://www.britanialab.com/productos/292_hoja_tecnica_es.pdf
[Último acceso: 15 Julio 2013].

Britania Laboratorios, 2010. Lisina Hierro Agar. [En línea]
Available at:
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm>
[Último acceso: 15 Julio 2013].

Brousse , J., 2009. "Análisis de cepas aisladas en urocultivos y su sensibilidad antibiótica en un hospital tipo 4". [en línea]
available at: <http://www.acem.cl/remes/05%20-%20trabajo%202.pdf>.
[último acceso: 29 julio 2013].

Centro Escolar "La Anunciata", 2012. Medios de Cultivo. [En línea]
Available at:
<http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/manoslimpias/medios.pdf>
[Último acceso: 14 Julio 2013].

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing. 23(100).

Daza Pérez, R., 2000. Resistencia bacteriana a antimicrobianos su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. 22(3).

Enriquez Méndez, J. & Peralta Ortíz , X., 2010. "Determinación de la presencia de Beta Lactamasas de Espectro Extendido en cepas de Escherichia coli



UNIVERSIDAD DE CUENCA

aisladas de muestras de orina de pacientes de la Fundación "Pablo Jaramillo", Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca.

Enríquez Méndez, J. & Peralta Ortiz , X., 2010. Determinacion de la presencia de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de Escherichia coli aisladas de muestras de orina de pacientes de la fundación "Pablo Jaramillo". Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca.

Fleitas Talavera, F. M., Fretes Torales, C. C. & Guiménez Arguello, C. S., 2008. Catedra de Parasitología y Microbiología Clínica. [En línea] Available at: <http://www.slideshare.net/CesarCastorFretesTorales/ctedra-de-microbiologa-y-parasitologa-mdica-2> [Último acceso: 4 Septiembre 2013].

Forbes, B., 2007. Diagnostico Microbiológico. En: Diagnostico Microbiológico. s.l.:12° Edición ..

Galeón, D., s.f. Pruebas Bioquímicas usadas para enterobacterias. [En línea] Available at: <http://dianayjulian.galeon.com/bioquimicas.htm> [Último acceso: 15 Julio 2013].

García Cañete, P., 2001. Recomendaciones para el Diagnóstico de Infecciones Urinarias. Volumen 18.

Hospital de Nens, 2002. Recogida, Transporte y Conservación de muestras de orina y excrementos para el Estudio Microbiológico y Parasitario. [En línea] Available at: <http://www.hospitaldenens.com/es/guia-de-salud-y-enfermedades/recogida-transporte-y-conservacion-de-muestras-de-orina-y-excrementos-para-el-estudio-microbiologico-y-parasitario> [Último acceso: 19 Julio 2013].

López Alvarez, J., s.f. Escherichia coli: Mecanismos de Patogenicidad. En: Microbiología Clínica. México DF: Universidad Autónoma de México.

López, C. & Escudero , E., s.f. sisnam. [En línea] Available at:



UNIVERSIDAD DE CUENCA

<http://www.sisman.utm.edu.ec/libros/FACULTAD%20DE%20CIENCIAS%20DE%20LA%20SALUD/CARRERA%20DE%20LABORATORIO%20CL%C3%8DNI%20CO/07/uroanalis/GUIA%20DEL%20ANALISIS%20FISICO-QUIMICO%20DE%20LA%20ORINA.pdf>

[Último acceso: 13 Julio 2013].

MacFaddin, J., 2003. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. s.l.:Médica Panamericana.

Malbran, C., 2001. Manual de Procedimientos Bacteriológicos. [En línea] Available at:

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelI/Manual_procedimientos.pdf

[Último acceso: 13 Julio 2013].

Martín, L., 2004. Tratamiento de la infección urinaria por gérmenes productores de BLEE, Madrid, España: Hospital Universitario Son Dureta.

Mattar, S. & Pedro, M., 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. 11(1).

MCD.com, 2006. Agar Hierro Kligler. [En línea] Available at: http://www.mcd.com.mx/pdfs/agar_hierro_kliger.pdf

[Último acceso: 15 Julio 2013].

MCD.com, 2012. Agar Eosina Azul de Metileno. [En línea] Available at:

<http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20EOSINA%20Y%20AZUL%20DE%20METILENO.pdf>

[Último acceso: 14 Julio 2013].

MCD.com, 2012. Agar Mueller Hinton. [En línea] Available at:

<http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20MUELLER%20HINTON.pdf>

[Último acceso: 14 Julio 2013].



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Merino, L. A. & Losch, L. S., s.f. Familia Enterobacteriaceae. [En línea] Available at: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Enterobacterias.pdf>
[Último acceso: 5 Septiembre 2013].

Muñoz, C., s.f. Pruebas de Laboratorio y Análisis de Orina. [En línea] Available at: <http://www.mapfre.com/salud/es/cinformativo/analisis-orina.shtml>
[Último acceso: 19 Julio 2013].

Ocha Sangrador, C., Eiros Bouza, J., Perez Mendez, L. & Inglada Galiana, L., 2005. Etiología de las Infecciones del Tracto Urinario y Sensibilidad de los Uropatógenos a los Antimicrobianos. 18(2).

Ochoa Sangrador, C., Eiros Bouza, J. M. & Pérez M, C., 2005. Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. 18(2).

Ochoa Sangrador, C., Eiros Bouza, J. & Pérez, C., 2005. Tratamientos Antibióticos; Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. 18(2).

Oliver, A. & Cantón, R., 2004. Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido, Madrid: SEIMEC.

Puerta García, F. & Rodríguez, M., 08. Unidad de Enfermedades Infecciosas. [En línea] Available at: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicina2010.pdf
[Último acceso: 4 Septiembre 2013].

Reyes Baque, J., 2012. Prevalencia de infección urinaria en mujeres adultas, pacientes de consulta externa, de la seguridad social de jipijapa – manabi 2012.. [En línea] Available at:



UNIVERSIDAD DE CUENCA

<http://javierreyesinvestigadormanabi.blogspot.com/2012/05/prevalencia-de-infeccion-urinaria-en.html>

[Último acceso: 30 Julio 2013].

Romero Cabello, R., 2007. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. En: Microbiología y Parasitología Humana. México: Editorial Médica Panamericana.

Sacsquispe, E., 2002. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de Disco Difusión. [En línea] Available at: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf

[Último acceso: 14 Julio 2013].

Sánchez, L., Ríos, R. & Máttar, S., 2008. Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados en una clínica de Villavicencio, Colombia. 12(3).

Tripathi, 2005. Farmacología en Odontología Fundamentos. Buenos Aires - Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Vidal, J. E., Canizález Román, A., Gutiérrez Jiménez, J. & Navarro, F., 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. 49(1).

Zurita Salinas, J., 2005. Epidemiología de la resistencia bacteriana en el Ecuador, Quito, Ecuador: Uso Racional de Antibióticos.



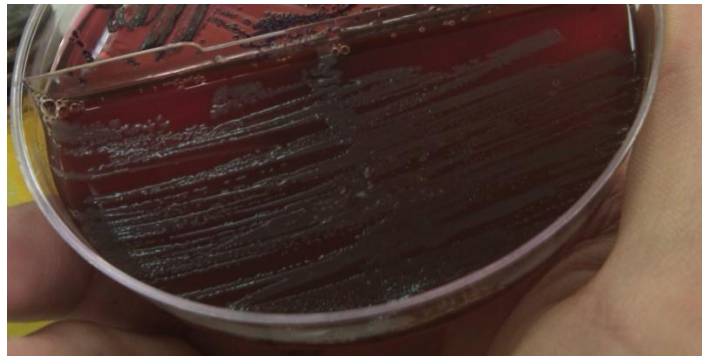
UNIVERSIDAD DE CUENCA

8.2 Ilustraciones

Ilustración 1: Recipiente usado en el transporte de muestras



Ilustración 2: Colonias de *Escherichia coli* en Agar Sangre





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ilustración 3: Colonias de *Escherichia coli* en Agar EMB

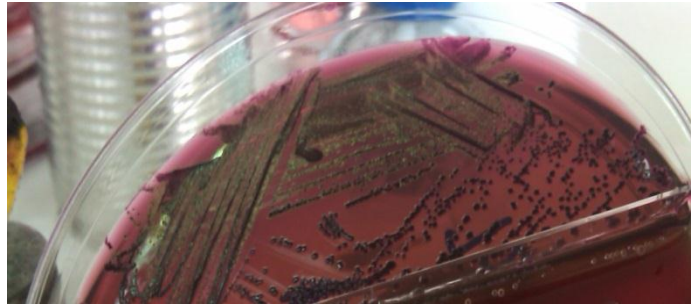
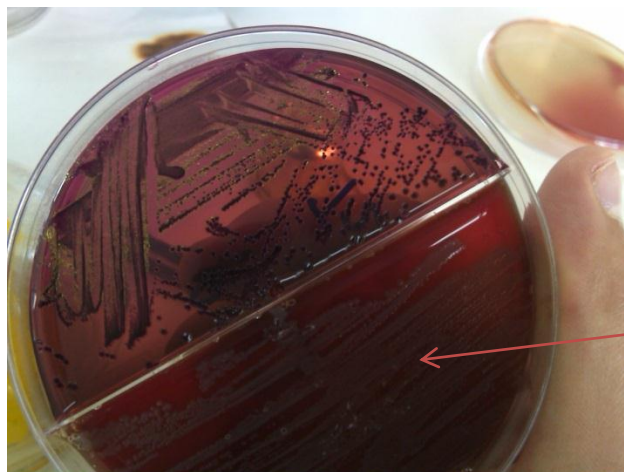


Ilustración 4: Recuento de colonias en agar sangre mayor a 10^5 UFC/ml





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ilustración 5: Bacilos Gram Negativos teñidos por Gram vistos con lente de 100X

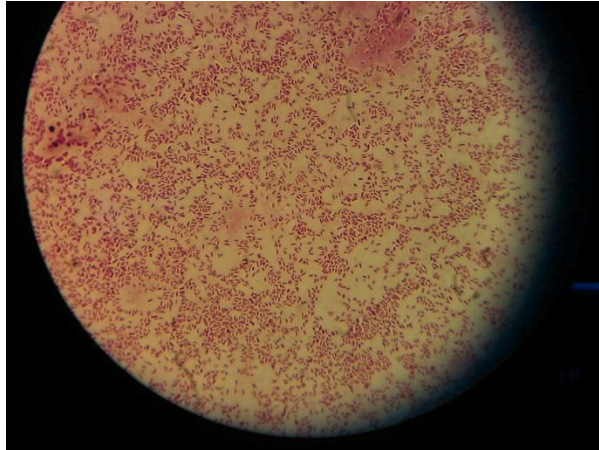


Ilustración 6: Prueba de Oxidasa Positiva (Azul) y Negativa (sin color)





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ilustración 7: Prueba de Indol Positivo (Anillo rosado) Indol Negativo (sin color)



Ilustración 8: Prueba de Rojo de Metilo Positiva (Roja) y Negativa (Amarilla)





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ilustración 9: Pruebas Bioquímicas para *Escherichia coli*



Ilustración 10: Prueba de BLEE presuntiva positiva





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ilustración 11: Prueba de BLEE confirmatoria positiva

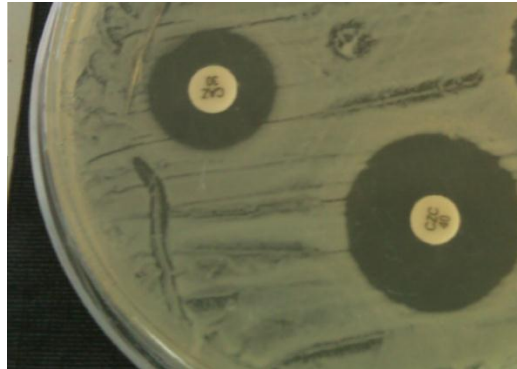


Ilustración 12: Efecto huevo prueba de BLEE positiva





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Ilustración 13: Extracción de sangre de carnero para elaborar Agar Sangre

