



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

“Prevalencia de Enterobacterias Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital José Carrasco Artega”

Tesis previa a la obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico

AUTORES:

Johanna Marisol Cajas Bravo
Johanna Gabriela Cobos Argudo

DIRECTORA:

Dra. María De Lourdes Jerves Andrade. Msc

CUENCA - ECUADOR

2014 - 2015



RESUMEN

En el presente estudio se procesaron 144 muestras de orina positivas para infecciones del tracto urinario (ITU) de pacientes ambulatorios y hospitalizados procedentes del Hospital José Carrasco Arteaga ubicado en la Ciudad de Cuenca.

El tipo de estudio fue descriptivo no experimental, de laboratorio y de corte transversal. Se procesaron 144 muestras positivas para Infecciones del Tracto Urinario (ITU); de las cuales 58 muestras trabajadas correspondieron a la familia *Enterobacteriaceae*, estando en mayor porcentaje *Escherichia coli* (43%), este estudio se enfocó en la Producción de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), que correspondieron a 18 cepas de las 58 recuperadas de *E. coli*.

Se llevaron a cabo pruebas presuntivas y confirmatorias, según el método descrito en el Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014.

Con las Enterobacterias BLEE positiva se realizaron pruebas de sensibilidad con otros antibióticos: Nitrofurantoína, Ampicilina, Gentamicina, Amoxicilina más Ácido Clavulánico, Ciprofloxacina y Norfloxacina; que sirvan como alternativa para una correcta terapia antimicrobiana y garantizar de esta manera un tratamiento efectivo in vivo para pacientes que participaron voluntariamente en la investigación.

Palabras claves: *Enterobacteriaceae*, Infección del tracto urinario, Betalactamasas de Espectro Extendido, BLEE.



ABSTRACT

In the present study were processed 144 urine samples positive for urinary tract infections (UTI) of ambulatory and hospitalized patients from the Hospital José Carrasco Arteaga located in the city of Cuenca.

The type of study was descriptive non-experimental, laboratory and sectional. Samples were processed 144 positive for urinary tract infections (UTI); of which 58 worked samples corresponded to the *Enterobacteriaceae* family, still at a greater rate *Escherichia coli* (43 %), this study focused on the Production of Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), which corresponded to 18 of the 58 strains recovered from *E. coli*.

Tests were carried out presumptive and confirmatory, according to the method described in the Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014.

With the Enterobacteriaceae ESBL positive tests were performed with other antibiotics sensitivity: Nitrofurantoin, Ampicillin, Gentamicin, Ampicillin plus Clavulanic Acid, Ciprofloxacin and Norfloxacin; as an alternative to a correct antimicrobial therapy and, in doing so, to ensure an effective treatment in vivo for patients who voluntarily participated in the investigation.

Key Words: Enterobacteriaceae, urinary tract infection, extended-spectrum beta-lactamases, ESBL.

**ÍNDICE**

RESUMEN	2
AGRADECIMIENTO	8
DEDICATORIA	13
AGRADECIMIENTO	14
DEDICATORIA	15
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1. ENTEROBACTERIAS.....	13
2.1.1. Características Generales	13
2.1.2. Estructura Antigénica.....	14
2.1.3. Patogenia	14
2.1.4. Factores determinantes de Patogenicidad.....	15
2.1.5. Epidemiología.....	15
2.1.6. Clasificación	16
2.1.6.1. Enterobacterias oportunistas	16
2.1.6.2. Enterobacterias patógenas:.....	17
2.2. <i>Escherichia coli</i>	17
2.2.1. Características Generales	17
2.2.1.1. Infecciones urinarias.....	17
2.2.1.2. Infecciones intestinales.....	18
2.2.1.3. Infección respiratoria	19
2.2.1.4. Bacteriemia	19
2.2.1.5. Meningitis neonatal.....	19
2.2.1.6. Infecciones intraabdominales	19
2.2.1.7. Otras infecciones.....	19
2.3. <i>Klebsiella</i>	20
2.3.1. Características Generales	20
2.3.1.1. Infecciones por <i>Klebsiella (K. pneumoniae)</i>	21
2.3.1.2. Infecciones por <i>K. rhinoscleromatis</i> (rinoscleroma).....	21
2.3.1.3 Infecciones por <i>K. ozaenae</i> (ocena)	21
2.4. <i>Enterobacter</i>	21
2.4.1. Características Generales	21



2.5. *Serratia* 22

 2.5.1. Características Generales 22

2.6. *Citrobacter* 23

 2.6.1. Características Generales 23

2.7. *Proteus, Morganella, Providencia* 23

 2.7.1. Características Generales 24

2.8. *Hafnia Alvei*..... 24

 2.8.1. Características Generales 24

2.9. INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO 25

 2.9.1. Epidemiología 26

 2.9.2. Agentes etiológicos..... 26

 2.9.3. Resistencia bacteriana..... 27

 2.9.4. Mecanismos de resistencia..... 27

2.10. B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)..... 28

 2.10.1. Definición..... 28

 2.10.2. Clasificación de las B-Lactamasas de Espectro Extendido 28

 2.10.3. Antibióticos Betalactámicos 29

 2.10.3.1. Penicilinas 30

 2.10.3.2. Cefalosporinas..... 30

 2.10.3.3. Carbapenémicos 30

 2.10.3.4. Monobactámicos 31

 2.10.4. Inhibidores de betalactamasa 31

 2.10.4.1. Ácido clavulánico 31

 2.10.4.2. Sulbactam 31

 2.10.4.3. Tazobactam..... 32

 2.10.5. Epidemiología 32

3. MATERIALES Y MÉTODOS 35

 3.1. MÉTODOS..... 35

 3.1.1. Diseño y Tipo de Estudio 35

 3.1.1.1. Localización Geográfica 35

 3.1.1.2. Universo y muestra..... 35

 3.1.2. Manejo de Datos..... 35

 3.1.2.1. Criterios de Inclusión 35



3.1.2.2. Criterios de Exclusión	36
3.2. METODOLOGÍA	36
3.2.1. Procesamiento de muestras	36
3.2.1.1. Muestra de Orina	36
3.2.1.2. Recolección de la muestra	37
3.2.1.3. Examen físico	38
3.2.1.4. Examen Químico	38
3.2.1.5. Examen microscópico del sedimento urinario	40
3.2.1.6. Urocultivo	40
3.2.1.7. Recuento de Colonias	44
3.2.1.8. Tinción de Gram	45
3.2.1.9. Pruebas de Sensibilidad	52
3.3. MATERIALES Y EQUIPOS.....	59
3.3.1 MATERIALES.....	59
3.3.2. REACTIVOS.....	59
3.3.3. EQUIPOS	59
3.3.4. MEDIOS DE CULTIVO	60
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
5. CONCLUSIONES	74
6. RECOMENDACIONES	75
7. BIBLIOGRAFÍA	76
8. ANEXOS.....	81
ANEXO 1	82
Consentimiento informado.....	82
ANEXO 2	83
INFORMACIÓN AL PACIENTE	83
ANEXO 3.....	85
FLUJOGRAMA DE TRABAJO.....	85
ANEXO 4	86
Tinción de Gram.....	86
Prueba de Oxidasa	86
Pruebas bioquímicas.....	87
ANEXO 5	89



ILUSTRACIONES.....	89
ILUSTRACIÓN 1. Sangre de cordero para el medio agar sangre.....	89
ILUSTRACIÓN 2. Medios agar Sangre, Brolacin, EMB, Manitol.....	89
ILUSTRACIÓN 3. Recuento de colonias en Agar Sangre.....	90
ILUSTRACIÓN 4. Colonias de Enterobacterias en Agar EMB.....	90
ILUSTRACIÓN 5: Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Enterobacterias.....	91
ILUSTRACIÓN 6: Prueba presuntiva para BLEE.....	91
ILUSTRACIÓN 7: Prueba confirmatoria y prueba de sensibilidad con antibióticos de apoyo para una terapia antimicrobiana.....	92



Universidad de Cuenca
Cláusula de Derecho de Autor

Johanna Marisol Cajas Bravo, autora de la tesis "*Prevalencia de Enterobacterias Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital José Carrasco Artega*", 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 Farmacéutico*. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 08 de junio de 2015

Johanna Marisol Cajas Bravo

C.I: 0105703631



Universidad de Cuenca
Cláusula de Derecho de Autor

Johanna Gabriela Cobos Argudo, autora de la tesis *“Prevalencia de Enterobacterias Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital José Carrasco Artega”*, 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 Farmacéutico*. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 08 de junio de 2015

Johanna Gabriela Cobos Argudo

C.I: 0105882336



Universidad de Cuenca
Cláusula de Propiedad Intelectual

Johanna Marisol Cajas Bravo, autora de la tesis "*Prevalencia de Enterobacterias Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital José Carrasco Artega*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de junio de 2015

Johanna Marisol Cajas Bravo

C.I: 0105703631



Universidad de Cuenca
Cláusula de Propiedad Intelectual

Johanna Gabriela Cobos Argudo, autora de la tesis *“Prevalencia de Enterobacterias Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) provenientes de urocultivos de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital José Carrasco Artega”*, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de junio de 2015

Johanna Gabriela Cobos Argudo

C.I: 0105882336



AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Les doy gracias a mis padres Manuel y Rebeca por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

Quiero agradecer de una manera muy especial a la Dra. Lourdes Jerves por haber aceptado ser la directora de Tesis y a la Dra. Carmen Lucía López porque sin su ayuda no hubiese podido finalizar este estudio. Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

JOHANNA CAJAS



DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada principalmente a Dios ya que Él me regalo la vida y me permite hoy estar aquí.

Con mucho cariño a mis Padres Manuel y Rebeca, por ser los pilares más importantes en mi formación profesional y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanas Fernanda y Ma. José por apoyarme siempre aún en los peores momentos.

A mis abuelitos paternos y maternos ya que ellos siempre estuvieron con sus oraciones y sus mejores deseos para mí.

A mis suegros Nancy y José que me ayudaron a seguir adelante con mis estudios.

A mi esposo Aldo que a pesar de las malas noches siempre estuvo ahí con una palabra de aliento para seguir adelante.

Y especialmente a mi Hijo Martín esta tesis va dedicada a ti ya que tu eres mi pilar y mi inspiración más grande en mi vida y todo el esfuerzo es para ti.

JOHANNA CAJAS



AGRADECIMIENTO

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el camino correcto, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a enfrentar las adversidades por más difíciles que estas fueran, sin perder la dignidad ni rendirme en el intento.

Quiero agradecer de una manera muy especial a la Dra. Lourdes Jerves por haber aceptado ser la directora de Tesis; quien con sus conocimientos y experiencias apporto de una manera importante a la culminación del presente estudio.

A la Dra. Carmen Lucia López quien aceptó ser mi accesora en la parte práctica del tema realizado, siempre brindando su apoyo de forma importante para conseguir la finalización de esta tesis.

A mis amigos (as) de una manera especial a Diana y Luis Carlos que han sido amigos incondicionales que siempre han estado ahí cuando yo lo he necesitado compartiendo conmigo gratos e inolvidables momentos.

Finalmente a Johanna quien supo entenderme y tenerme paciencia durante todo este tiempo que estuvimos desarrollando el tema de Tesis demostrándome que podemos ser grandes amigas y compañeras de trabajo a la vez.

GABRIELA COBOS



DEDICATORIA

Este trabajo realizado quiero dedicarlo principalmente a Dios quien con su infinita bondad me ha llenado de bendiciones y salud para culminar con éxitos un ciclo más en mi vida profesional.

A mis padres Nicanor y Sonia que siempre me brindaron su cariño y comprensión porque sin su apoyo no hubiese podido concluir esta etapa tan importante para mí; por cada uno de sus consejos y palabras de aliento que día a día me enseñaron a ser una mejor persona y no darme por vencida por los obstáculos que se me presenten en el camino; sino luchar hasta el final para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos Geovanny y Diego quienes estuvieron siempre al pendiente de lo que yo pudiese necesitar durante toda mi formación académica, demostrándome que puedo contar con ellos en situaciones buenas y malas que se me pudieran presentar en algún momento de mi vida.

A todo el resto de mi familia; que de una u otra manera siempre me han ayudado económica y moralmente cuando yo lo he necesitado, esperando de mí que siga creciendo como persona y profesionalmente.

GABRIELA COBOS



1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha producido un aumento incesante de los diferentes tipos de microorganismos resistentes a ciertos medicamentos; por lo que es necesario considerar medidas urgentes y coordinadas a nivel local, nacional e internacional para lograr un tratamiento adecuado de los pacientes actuales y conservar la potencia de los antimicrobianos para las generaciones futuras.

Los antibióticos han sido considerados tradicionalmente como los compuestos producidos de forma natural por microorganismos o derivados semisintéticos de los mismos, con actividad inhibitoria o bactericida específica frente a las bacterias.

En la actualidad, se utiliza con frecuencia el término antibiótico en un sentido más amplio, incluyendo también a algunos antimicrobianos sintéticos con esta actividad.

Los factores que contribuyen a este fenómeno son múltiples debido a que las personas se auto-medican provocando así una resistencia antibiótica, haciéndose multirresistentes lo que resulta alarmante y conduce a infecciones que pueden ser intratables. Una terapia correcta puede controlar progresivamente la resistencia bacteriana y con ello en un futuro se podría aspirar a la erradicación de cepas emergentes productoras de BLEE.

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEE en los diferentes cultivos de orina procedentes de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital José Carrasco Arteaga.



2. MARCO TEÓRICO

2.1. ENTEROBACTERIAS

2.1.1. Características Generales

Familia heterogénea y amplia de bacilos gramnegativos que residen en el colon del hombre sin causar enfermedad, aunque son responsables de un número considerable de infecciones en pacientes con inmunidad conservada como en inmunodeprimidos ya que en el paciente hospitalizado las Enterobacterias colonizan el tubo digestivo, la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel mientras que en el ambiente hospitalario pueden aislarse del agua, catéteres, sondas, sueros, antisépticos, equipos de respiración mecánica. Las Enterobacterias son las responsables de una tercera parte de los aislamientos en las bacteriemias, dos tercios de los aislamientos en gastroenteritis, y tres cuartas partes de los aislamientos en infecciones del tracto urinario. (Ocaña, Rocchi , & Gasparotto, 2007)

Estos tipos de bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos que en la mayoría de los casos esta mediada por plásmidos o ser cromosómica. La mayor parte de Enterobacterias presentan plásmidos, que son unidades de ADN extracromosómico que pueden autorreplicarse y transportar su propia estructura de replicación, los **plásmidos R** tienen un papel importante en la resistencia antibiótica de las Enterobacterias. Sin embargo especies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* indol-positivo, *Providencia* o *Serratia* poseen un gen cromosómico que codifica una Betalactamasa de Amplio Espectro, inducida por la presencia de ciertos betalactámicos. (García, 2003)

Durante los últimos años se ha identificado un porcentaje cada vez mayor de *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* que se han hecho resistentes a cefalosporinas de tercera generación por el desarrollo de betalactamasas de espectro ampliado. A nivel extrahospitalario estas bacterias también presentan resistencia a las quinolonas; pues está relacionado con su uso indiscriminado. (Cartagena , Centellas, & Saavedra , 2009)

El principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en Enterobacterias es el enzimático, debido a la producción de betalactamasas, aunque se debe considerar que en algunos casos la resistencia obedece a la asociación de distintos mecanismos. (García, 2003)

2.1.2. Estructura Antigénica

- ✚ **Antígeno O (somático):** forma parte de un Lipopolisacárido (LPS) que se encuentra ubicado en la pared celular, consta de las siguientes fracciones:
 - ✓ **Región uno:** oligosacárido que contiene al Antígeno O.
 - ✓ **Región dos:** polisacárido central constante para un género determinado.
 - ✓ **Región tres:** dado por el lípido A, que constituye la endotoxina. (Ruiz & Moreno Guillén, 2005)
- ✚ **Antígeno K (capsular):** está presente únicamente en bacterias capsuladas como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.
- ✚ **Antígeno Vi:** polisacárido que rodea a la bacteria sin llegar a ser una cápsula, es característico de ciertas especies de *Salmonella*.
- ✚ **Antígeno H:** proteico y flagelar, presente sólo en las especies móviles.
- ✚ **Antígeno F (fimbrial):** está presente en las fimbrias y son de naturaleza proteica. (Romero Cabello, 2007)

2.1.3. Patogenia

Por ser bacterias no esporuladas con crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis, son anaerobios facultativos; reducen los nitratos a nitritos; pueden fermentar la glucosa con o sin formación de gas; muestran negatividad a la prueba de la

oxidasa; son móviles o no, dependiendo de la presencia o no de flagelos peritricos. Presentan una membrana interna (citoplasmática), cubierta de peptidoglicano que la rodea, y una compleja membrana externa que contiene LPS y porinas (canales para la penetración de antibióticos y nutrientes). (Signorini , y otros, 2008)

2.1.4. Factores determinantes de Patogenicidad

- ✚ **Cápsula:** antifagocitaria con propiedades de adhesina.
- ✚ **Adhesinas:** presente en fimbrias, se asocian con uropatogenicidad de *E.coli* y enteropatogenicidad para diferentes géneros de Enterobacterias.
- ✚ **Fimbrias:** facilita la adherencia a la célula huésped e impiden el barrido por las barreras mecánicas de defensa del organismo.
- ✚ **Exoenzimas:** ciertas especies la producen como ureasa, gelatinasa, lipasa, desoxirribonucleasa, permiten la existencia de la bacteria dentro del órgano afectado.
- ✚ **Plásmidos:** ayudan a la transferencia de algunos factores de patogenicidad y genes que otorguen resistencia a otras bacterias.
- ✚ **Aerobactinas:** favorecen la captación de hierro desde el medio, debido a que el hierro es indispensable para ciertas funciones de las bacterias.
- ✚ **Endotoxina:** las enterobacterias poseen el LPS de pared, el cual se libera al destruirse la bacteria.
- ✚ **Exotoxinas:** son producidas por las patógenas obligadas y poseen efectos específicos. (García Martos, Fernandez del Barrio, & Paredes Salino, 1997)

2.1.5. Epidemiología

Todos los individuos hospitalizados o inmunodeprimidos (incluyendo los pacientes alcohólicos y diabéticos), en especial en los pacientes que reciben tratamiento antibiótico, presentan colonización por Enterobacterias, así como también en el tubo digestivo, en la orofaringe, aparato genitourinario y piel. El porcentaje de aislados resistentes a múltiples antimicrobianos, incluidos aquellos que producen betalactamasas de espectro extendido (BLEE), ha aumentado de manera

ininterrumpida, es así que todos los aislados son ahora resistentes a varias clases importantes de antimicrobianos. (Ardila Medina , 2010)

Existen diferentes factores que han contribuido al incremento de las infecciones por Enterobacterias en pacientes hospitalizados:

- edad
- gravedad del paciente
- duración de la hospitalización
- estancia en la Unidad de Cuidado Intensivo (UCI).

Las Enterobacterias también se adquieren por transmisión oro-fecal o por transmisión hídrico-fecal: por ejemplo, a través de agua y alimentos contaminados, manos sucias, prácticas sexuales, moscas, vectores pasivos. (Sandrea-Toledo, Paz-Montes, Piña-Reyes, & Perozo-Mena, 2007)

La bacteriemia por Enterobacterias puede dar lugar a leucocitosis como leucopenia, que siempre cursa con trombocitopenia. Los estudios realizados de hemoquímica traducirán afectación en cada órgano disfuncional, como aumento de bilirrubina sérica y de enzimas hepáticas, trastornos hidroelectrolíticos y del equilibrio ácido/ base.

En aquellos pacientes que se sospecha de infección bacteriémica por bacilos gram negativos se debería realizar de una manera inmediata hemocultivos, el aislamiento de estas bacterias en muestras válidas (sangre, esputo, orina) suele ser suficiente para hacer el diagnóstico etiológico. (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010)

2.1.6. Clasificación

La familia *Enterobacteriaceae* comprende más de 200 géneros que abarcan más de 2.000 especies.

2.1.6.1. Enterobacterias oportunistas: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*.



Forman parte de la flora normal del intestino del hombre, aunque la mayor parte de la flora gastrointestinal está constituida por bacterias anaerobias. Este tipo de Enterobacterias producen patología cuando en el huésped aparecen factores predisponentes locales (heridas, quemaduras, sondajes, catéteres, etc), generales (disminución de las defensas inespecíficas o de la respuesta inmune) o enfermedades de base como la diabetes, hemopatías, etc.

Pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos, especialmente los que reciben terapia antimicrobiana, al ser colonizados por Enterobacterias pueden presentar infección urinaria, infecciones de heridas quirúrgicas y traumáticas, infecciones respiratorias y sepsis. (Cartagena , Centellas, & Saavedra , 2009)

2.1.6.2. Enterobacterias patógenas: Géneros *Escherichia coli*.

2.2. *Escherichia coli*

2.2.1. Características Generales

Causa infecciones oportunistas, sin embargo ciertas cepas poseen capacidad patógena primaria, pudiendo causar infecciones en personas previamente sanas.

E. coli es reductora de nitratos, catalasa positiva, oxidasa negativa, y en su mayoría fermentan la glucosa, bacilo gram negativo, mide 0.5 - 1µm, anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas o pueden tener cápsulas y ser inmóviles. Existen centenares de serotipos, pero sólo algunos serotipos O tienen capacidad enteropatógena e invasora. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

2.2.1.1. Infecciones urinarias

Las infecciones urinarias por *E. coli* están causadas en su mayor parte por cepas de determinados serotipos llamados uropatógenos. Las manifestaciones clínicas de la cistitis son polaquiuria, disuria y febrícula. En la pielonefritis aparece fiebre



alta, dolor lumbar y afectación del estado general. (García-Hernández, y otros, 2011)

2.2.1.2. Infecciones intestinales

Las infecciones causadas por este microorganismo pueden ser debidas a variedades distintas de esta bacteria, con mecanismos de acción diferentes:

- ***E. coli* enterotoxigénico:** presentan ciertas toxinas secretoras y el inóculo de microorganismos debe ser lo suficientemente alto como para resistir el pH ácido del estómago. Generalmente aparece diarrea líquida, sin moco ni sangre, es la causa principal de diarrea del viajero.
- ***E. coli* enteropatógeno:** determinados serotipos, producen diarreas con heces líquidas con moco sin sangre en lactantes y niños pequeños.
- ***E. coli* enteroinvasora:** actúa invadiendo las células del epitelio intestinal. Causa diarrea aguda, produce lesiones ulceradas en el colon.
- ***E. coli* enterohemorrágico:** produce toxinas citotóxicas (verotoxina). El cuadro se identifica por la presencia de dolor abdominal intenso y diarrea con sangre. El serotipo más habitual es O157:H7. Se han descrito brotes por consumo de hamburguesas poco cocinadas.
- ***E. coli* enteroagregativa:** se adhiere a los enterocitos con una biocapa conformada por las bacterias agregadas y moco que tendría un efecto citotóxico en la mucosa intestinal. Esta produce una o más citotoxina/enterotoxina, y tiene el factor fimbria 1 de adherencia agregativa.
- ***E. coli* enteroadherente:** produce la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) dentro de la célula y diseminación a células sanas



adyacentes. (García Martos, Fernandez del Barrio, & Paredes Salino, 1997)

2.2.1.3. Infección respiratoria: considerada oportunista en pacientes debilitados con diabetes, alcoholismo, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) o inmunodeprimidos, durante su estancia en el hospital. Clínicamente existe una bronconeumonía de lóbulos inferiores, acompañada de empiema y bacteriemia. Tiene una mortalidad superior al 50%.

2.2.1.4. Bacteriemia: las adquiridas en la comunidad son por infecciones complicadas del tracto urinario y en menor proporción por infecciones del tracto biliar. Las de adquisición nosocomial están relacionadas con material protésico, catéteres endovenosos o tubos endotraqueales.

2.2.1.5. Meningitis neonatal: en el primer mes de vida las meningitis bacterianas son causadas por *E. coli* o por *Streptococcus agalactiae*. La presencia del antígeno capsular K1 es el factor de virulencia en este caso.

2.2.1.6. Infecciones intraabdominales: *E. coli* se aísla generalmente en pacientes con apendicitis, diverticulitis perforadas, abscesos subfrénicos, formando parte de una infección polimicrobiana (especialmente anaerobios). Es una de las causas más frecuentes de infecciones de la vía biliar (colecistitis, colangitis) e incluso abscesos hepáticos múltiples por colonización ascendente.

2.2.1.7. Otras infecciones: *E. coli* participa en algunas infecciones mixtas de úlceras tórpidas, úlceras de pie diabético, úlceras de decúbito y celulitis. (Mandell , Bennett , & Dollin, 2006)

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

- ✓ **Antígenos somáticos (O):** son cadenas polisacáridas unidas al complejo LPS determinante de las bacterias gram negativas, con 167 variantes.



- ✓ **Antígenos flagelares (H):** son de naturaleza proteica, termolábil, presenta 75 variantes. Esta proteína es llamada flagelina, el contenido de aminoácidos y el orden en que estos se encuentran en las mismas permiten determinar la especificidad de los diversos antígenos.
- ✓ **Antígenos capsulares (K):** externos a los antígenos O. Son de naturaleza polisacáridica, con 102 variantes. Constituyen una verdadera cápsula visible por los que se los denomina antígenos de envoltura por comportarse como si envolvieran la bacteria.
- ✓ **Antígeno (F) fimbrias/pilis:** desempeñan un papel primordial en la patogenia, con 12 variantes.

Los determinantes de la patogenicidad son:

- ❖ **Fimbrias:** pueden actuar por capacidad de adherencia.
- ❖ **Antígenos O y K:** presentan propiedades antifagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero, estas son responsables de la virulencia de las cepas invasivas.
- ❖ **Endotoxina:** ligada al lipopolisacárido, responsable de la acción pirógena.
- ❖ **Exotoxinas:** responsables de la producción de diarreas y su síntesis está codificada por la presencia de plásmidos. (Medina Asensio, 2000)

2.3. *Klebsiella*

2.3.1. Características Generales

Son inmóviles y disponen de una gruesa cápsula de aspecto mucoide. Este tipo de bacterias son las responsables del 14% de las infecciones intrahospitalarias, originando sobre todo bacteriemias, infecciones urinarias y neumonías.

El antígeno capsular K evita la fagocitosis de la bacteria por parte de los macrófagos y retrasa el paso de los leucocitos al área infectada. (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010)

2.3.1.1. Infecciones por *Klebsiella (K. pneumoniae)*

- **Neumonía:** los varones alcohólicos de más de 40 años o con enfermedades de base: EPOC, diabetes. Tiene un curso agudo y grave con alteraciones destructivas graves del pulmón son los más afectados. La principal manifestación clínica que presentan es esputo en “**gelatina de grosella**” esto es debido a la inflamación necrotizante y a la naturaleza hemorrágica del proceso. (García Martos, Fernandez del Barrio, & Paredes Salino, 1997)
- **Infección urinaria:** presente principalmente en pacientes diabéticos o tratados con antibioterapia.
- **Otros:** peritonitis, otitis media crónica, mastoiditis crónica y meningitis.

2.3.1.2. Infecciones por *K. rhinoscleromatis* (rinoscleroma): Se produce una inflamación granulomatosa crónica de la mucosa nasal, senos paranasales, faringe, laringe y oído medio.

2.3.1.3 Infecciones por *K. ozaenae* (ocena): ocasiona una rinitis crónica atrófica que actúa como infección oportunista. (Ardila Medina , 2010)

2.4. *Enterobacter*

2.4.1. Características Generales

Son bacterias gram negativas oportunistas, móviles que tienen la capacidad de colonizar a pacientes hospitalizados, provocan infecciones de cualquier localización, incluso en pacientes tratados con antibióticos de amplio espectro, especialmente cefalosporinas.

Existen 5 especies:

- *E. cloacae*
- *E. aerogenes*
- *E. agglomerans*
- *E. sakazakii*
- *E. gergoviae*

En los últimos años se ha producido un incremento en la resistencia de las diferentes cepas de *Enterobacter*, sobre todo a los antibióticos betalactámicos, debido a la activación de una betalactamasa cromosómica que tiene la capacidad de inactivar cefalosporinas de tercera generación, lo que obliga al uso inmediato de carbapenemes. En infecciones causadas por este tipo de microorganismos es imprescindible realizar un estudio de la sensibilidad antimicrobiana para seleccionar el fármaco más adecuado y específico. La combinación de un betalactámico más aminoglucósido pudiese ser el tratamiento de elección de las infecciones más graves mientras que las fluoroquinolonas o el cotrimoxazol pueden constituir alternativas terapéuticas para cepas que son sensibles a estos antibióticos. (Cartagena , Centellas, & Saavedra , 2009)

2.5. *Serratia*

2.5.1. Características Generales

Son bacterias móviles, oportunistas que colonizan el tracto respiratorio y urinario en pacientes hospitalizados y en neonatos coloniza de forma habitual el tracto digestivo, se transmite a través de las manos del personal sanitario produciendo bacteriemias. (García Martos, Fernandez del Barrio, & Paredes Salino, 1997)

Existen 3 especies:

- *S. marcescens*
- *S. liquefaciens*
- *S. rubidiae*

La mayoría de las especies de *Serratia* desarrollan con gran facilidad resistencia frente a numerosos fármacos, por lo que pueden llegar a constituir un grave problema terapéutico en algunos hospitales.

Las cefalosporinas de tercera generación y los aminoglucósidos como la amikacina son activos frente a esta bacteria y la asociación de una cefalosporina de tercera o cuarta generación más un aminoglucósido parece ser la terapéutica de elección en la mayoría de pacientes. (Ocaña, Rocchi , & Gasparotto, 2007)

2.6. *Citrobacter*

2.6.1. Características Generales

Son bacilos gram negativos aerobios que se encuentran frecuentemente en el agua, el suelo, la comida, vegetación y como flora saprófita en el tracto intestinal de muchos animales además del hombre, móviles, fermentadoras de la lactosa, algunos utilizan citrato, ciertas especies tienen antígenos somáticos O, flagelar H y de superficie K, lo que hace que den reacciones cruzadas con otros tipos Enterobacterias.

Existen tres especies:

- *C. amalonaticus*
- *C. diversus*
- *C. freundii*

Son capaces de producir de forma exclusiva infecciones hospitalarias como neumonías e infecciones del tracto urinario, aunque en neonatos se han relacionado con meningitis y abscesos cerebrales, la elección del antibiótico para el tratamiento se basa en los estudios de sensibilidad antimicrobiana. (Ruiz & Moreno Guillén, 2005)

2.7. *Proteus, Morganella, Providencia*

entre los que destacan maltosa, D-xilosa, trehalosa, D-manitol, L-arabinosa, L-ramnosa, siendo incapaz de fermentar lactosa, rafinosa, D-sorbitol, inositol y adonitol. Son susceptibles a antimicrobianos como quinolonas, carbapenémicos, cloranfenicol, aminoglucósidos, monobactam y cotrimoxazol y resistentes a penicilina, oxacilina y amoxicilina/ácido clavulánico. (Ardila Medina , 2010)

TABLA 1. Localización del foco infeccioso originario de bacteremia

Foco de origen de la bacteriemia	Bacterias gram negativos
Vías urinarias	<i>Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus</i>
Tubo digestivo	<i>Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Salmonella</i>
Vías biliares	<i>Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>
Aparato genital femenino	<i>Escherichia coli</i>
Aparato circulatorio	<i>Serratia, , Enterobacter cloacae</i>
Piel y tejidos blandos	<i>Serratia</i>
Aparato respiratorio	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>

FUENTE: (Famiglietti, y otros, 2010)

2.9. INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

La ITU se caracteriza por la presencia de microorganismos en el tracto urinario desde el extremo distal de la uretra hasta el corte renal (uretra, vejiga, próstata, uréteres, pelvis renal o riñones). (Prats, 2005)

Más del 95% de las ITU son monobacterianas, donde *E. coli* es el microorganismo frecuentemente implicado en la infección aguda y en infecciones producidas en pacientes ambulatorios. Sin embargo en el caso de infecciones recurrentes y anomalías estructurales del aparato urinario, como son anomalías congénitas, vejiga neurogénica y obstrucciones del aparato urinario, las especies asociadas son *Proteus, Pseudomonas, Klebsiella, y Enterobacter* seguido de



Enterococcus y *Staphylococcus*. Otros agentes que han sido implicados en las ITU son *Corynebacterium urealyticum*, reconocidos como un importante patógeno nosocomial, microorganismos anaerobios, levaduras del género *Candida* y *Staphylococcus saprophyticus* que se asocia a ITU en mujeres jóvenes sexualmente activas. (Remington, 2003)

2.9.1. Epidemiología

La prevalencia de ITU varía con el sexo y la edad, en recién nacidos y lactantes varones suelen asociarse a anomalías congénitas mientras que en la edad escolar predominan en mujeres, lo cual se mantiene durante la edad adulta.

Ciertas condiciones como el embarazo y la diabetes, se asocian a una mayor incidencia. En la vejez, las tasas de ITU son mayores en mujeres asociada a un vaciamiento vesical disminuido debido a prolapso uterino, sin embargo también se ha identificado un aumento de casos en hombres debido a una uropatía obstructiva por enfermedad prostática. (Medina Asensio, 2000)

2.9.2. Agentes etiológicos

En la mayoría de los casos, se observa infecciones monomicrobianas en donde predominan los bacilos gram negativos. Estos agentes pueden variar según la edad, sexo y patología subyacente. En las infecciones de pacientes ambulatorios predomina *E. coli*, seguido de *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. y otros bacilos gram negativos y cocos gram positivos como *S. saprophyticus*, *Enterococcus* spp. y *Streptococcus agalactiae*. *Proteus* spp. generalmente suele asociarse a anomalías de la vía urinaria, principalmente litiasis; raramente *Haemophilus influenzae* se aísla de infecciones comunitarias.

En pacientes con enfermedad urológica subyacente o portadores de sondas, la frecuencia relativa de *E. coli* tiende a disminuir y se aíslan *Pseudomonas* spp., otros bacilos gram negativos no fermentadores, Enterobacterias como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. y levaduras. (Signorini , y otros, 2008)

2.9.3. Resistencia bacteriana

Fenómeno biológico natural, de modo que cada vez que se pone en uso un nuevo agente antimicrobiano (AAM) en la práctica clínica, el laboratorio de microbiología detecta cepas resistentes capaces de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas con dosis terapéuticas. (Medina Asensio, 2000)

2.9.4. Mecanismos de resistencia

La resistencia a los antibióticos constituye un problema serio de Salud Pública en el mundo, especialmente en los países subdesarrollados donde no existen políticas apropiadas para la utilización de estos fármacos, contribuyendo a su uso indiscriminado y la aparición de cepas bacterianas multiresistentes, transmisibles y que se diseminan rápidamente. La resistencia puede ser:

- ✓ **Resistencia natural:** mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)
- ✓ **Resistencia adquirida:** aparece por cambios puntuales en el DNA.
- ✓ **Resistencia relativa o intermedia:** se produce un incremento gradual de la MIC (concentración inhibitoria mínima) a través del tiempo. Para obtener un efecto terapéutico eficaz es necesario alcanzar niveles séricos y tisulares adecuados.
- ✓ **Resistencia absoluta:** incremento súbito en la MIC de un cultivo durante o después de la terapia.
- ✓ **Pseudoresistencia:** se puede observar una resistencia *in vitro* pero una gran efectividad *in vivo*. (Medina Asensio, 2000)

2.10. β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

2.10.1. Definición

Son aquellas enzimas que se caracterizan por conferir resistencia a Penicilinas, Cefalosporinas, Cefamicinas, Carbapenems y Monobactámicos, entre otros, los cuales son utilizados para el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas, debido a su baja toxicidad y su amplio espectro de acción.

Los microorganismos son capaces de desarrollar enzimas inactivantes que se caracterizan por conferir resistencia a estos antibióticos. Una de esas enzimas, es la β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), que le confiere resistencia a los β -lactámicos, siendo inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores como el tazobactam y el sulbactam. Las BLEE clásicas derivan de las β -lactamasas con que tienen actividad a la penicilinas y debido a mutaciones en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos. (Rupp & Fey , 2006)

2.10.2. Clasificación de las β -Lactamasas de Espectro Extendido

Las betalactamasas se pueden agrupar de diferentes maneras:

- **Grupo 2a:** generadas por *Estafilococos* y *Enterococos* para dejar de lado las penicilinas hacia 1940.
- **Grupo 2b:** en 1965 se describe una cefalosporinasa que amplía su espectro hacia las cefalosporinas.
- **Grupo 2c:** contra la oxacilina.
- **Grupo 2d:** contra las carbenicilinas

La presión de selección hizo que las bacterias gram negativas generen nuevas cefalosporinasas (Grupo 2e), y carbapenemasas (Grupo 2f), que tenían la particularidad de ser bloqueadas por inhibidores de las betalactamasas.

Las betalactamasas de espectro extendido o BLEE (Grupo 2be) aparecen el año 1980 siendo capaces de destruir el grupo de oximino de las cefalosporinas de tercera generación, lo que genera resistencia. (Echevarria Zarate, 2008)

Las bacterias *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* y distintas especies del género *Kluyvera* producen β -lactamasas cromosómicas que, en el caso de una hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico. (García-Hernández, y otros, 2011)

La aparición de bacterias productoras de BLEE tiene importantes repercusiones clínicas y terapéuticas:

- a) Codificación de los aislamientos que tienen resistencia en plásmidos que pueden ser transmitidos a otros microorganismos.
- b) Causantes de brotes.
- c) Aumentan la morbimortalidad.
- d) Limitación de las opciones terapéuticas, incrementándose el uso de antibióticos costosos como el Imipenem.

Se ha determinado que las infecciones causadas por un microorganismo productor de BLEE representa un riesgo de falla en el tratamiento con un antibiótico β -lactámico de espectro extendido; por lo tanto, es importante recomendar que cualquier microorganismo BLEE positivo, de acuerdo a los lineamientos descritos por el Control and Laboratory Standard Institute (CLSI), sea reportado como resistente a todos estos antibióticos (Cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación), independientemente de que resulten sensibles *in vitro*. (Pino I, y otros, 2007)

2.10.3. Antibióticos Betalactámicos

Estos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos, se trata de compuestos de acción bactericida lenta, independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen

Johanna Marisol Cajas Bravo

Johanna Gabriela Cobos Argudo

terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando con el pasar de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gram negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. (Marín & Gudiol, 2003)

2.10.3.1. Penicilinas

Grupo de antibióticos que están caracterizados por contener un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico siendo esto lo que define sus propiedades. Las penicilinas son bactericidas debido a su capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana y de activar enzimas que destruyen dicha pared. Tienen el inconveniente de presentar reacciones alérgicas, las cuales se producen entre el 5 % y el 10 % de las personas, y que van desde una erupción leve hasta una anafilaxia que puede causar la muerte. No obstante, éstas se encuentran entre los antibióticos más útiles y que con más frecuencia se prescriben para el paciente. (Cué Brugueras & Morejón García, 2008)

2.10.3.2. Cefalosporinas

Son antibióticos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, producido del hongo *Cephalosporium acremonium*. El núcleo activo, ácido 7-aminocefalosporánico, está relacionado con el ácido 6-aminopenicilánico, por poseer ambos un anillo betalactámico. Son bactericidas que inhiben la síntesis de la pared bacteriana al igual que las penicilinas. (García-Hernández, y otros, 2011)

2.10.3.3. Carbapenémicos

Bactericidas e inhiben la síntesis de la pared celular. Su espectro de acción es amplio e incluye a microorganismos gram positivos y gram negativos, aerobios y anaerobios. Se utiliza en el tratamiento de infecciones intraabdominales combinadas, nosocomiales, incluyendo las de microorganismos gram negativos resistentes, como son las de *Enterobacter*. 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 tienen la mayoría de las penicilinas y cefalosporinas. (Sandrea-Toledo, Paz-Montes, Piña-Reyes, & Perozo-Mena, 2007)

2.10.3.4. Monobactámicos

Fueron los primeros antibióticos betalactámicos monocíclicos obtenidos de bacterias, aunque en la actualidad son producidos sintéticamente. El aztreonam fue el primero disponible comercialmente. Es bactericida y actúa sobre la síntesis de la pared celular.

2.10.4. Inhibidores de betalactamasa

Actúan por inhibición competitiva por analogía al sustrato de la enzima, que es seguida de una reacción química más lenta tras la unión al centro catalítico, que da lugar a una inactivación transitoria o permanente de la enzima. Cuando se emplean en combinación con ampicilina, amoxicilina; estos se vuelven efectivos frente a algunas bacterias productoras de betalactamasas que de otra manera serían resistentes. (Marín & Gudiol, 2003)

2.10.4.1. Ácido clavulánico

Introducido en 1984 tiene un núcleo similar al de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno y la falta de la cadena lateral acilamino en posición 6.

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 inhibiendo a las betalactamasas periplasmáticas. (García Martos, Fernandez del Barrio, & Paredes Salino, 1997)

2.10.4.2. Sulbactam

Es una sulfona semisintética del ácido penicilánico, inhibidor semisintético, es 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. (Rupp & Fey, 2006)

Johanna Marisol Cajas Bravo

Johanna Gabriela Cobos Argudo

2.10.4.3. Tazobactam

Se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo triazol en posición 3. 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, tiene una pequeña actividad antibacteriana. (Marín & Gudiol, 2003)

2.10.5. Epidemiología

- ❖ **β -lactamasas TEM** se derivan de las iniciales del primer paciente en quien fue aislada una *E. coli* productora de β -lactamasa en 1965. En 1982 en la unidad de cuidados intensivos en un hospital de Inglaterra se produjo una brote epidémico con una cepa de *Klebsiella oxytoca* portadora de una betalactamasa TEM-1.

De la misma manera en Francia, fueron aisladas cepas del mismo germen produciendo otra tipo de betalactamasas, las TEM-3, producto de mutaciones de la TEM-1.

- ❖ **β -lactamasas SHV** es considerada un pariente lejano de la TEM, las siglas se derivan de la clasificación inicial como una “variedad sulfidrido”. En 1983 se aisló una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania que poseía una betalactamasa con una actividad hidrolítica mayor frente a cefotaxima que frente a ceftazidima más tarde se demostró que esta enzima difería de SHV-1 por la sustitución de la glicina por serina en la posición 238 (Gly-238→Ser). Esta única sustitución confiere actividad frente a cefalosporinas de amplio espectro y fue denominada SHV-2. Las betalactamasas SHV aparecen principalmente en el género *Klebsiella* aunque también pueden encontrarse en otras Enterobacterias. (Oliver & Cantón, 2010)
- ❖ **CTX-M-1** a comienzos del año de 1989, en Alemania Bauernfeind y Cols informaron de un aislamiento clínico de una cepa de *E.coli* resistente a cefotaxima. Este nombre refleja la potente actividad hidrolítica de estas betalactamasas frente a cefotaxima. Estas enzimas presentan mayor



actividad hidrolítica frente a cefotaxima y ceftriaxona que frente a ceftazidima.

- ❖ **PER, VEB-1, BES-1, SOF** son poco frecuentes y casi no presentan una relación clara con la familia de betalactamasas ya establecidas hasta el momento en la actualidad. Se caracterizan por hidrolizar a la ceftazidima que a otros betalactámicos. (García-Hernández, y otros, 2011)
- ❖ **BLEE PER** (*Pseudomonas* Extended Resistance) comparten un 25-27% de homología con las BLEE tipo TEM y SHV.
- ❖ **BLEE PER-1**: se aisló en Turquía, Francia e Italia; son capaces de hidrolizar a penicilinas y cefalosporinas siendo sensibles a la inhibición por el ácido clavulánico. Al comienzo fueron detectadas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y después en *Enterobacterias* y *Acinetobacter*.
- ❖ **BLEE PER-2**: comparte un 86% de homología con PER-1, han sido detectadas en *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, y *Vibrio cholerae*.
- ❖ **BLEE VEB-1**: presentan un 38% de homología con PER-1 Y PER-2. Esta betalactamasa confiere un alto nivel de resistencia a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam y alta sensibilidad al ácido clavulánico. Se aisló por primera vez en un niño vietnamita que estuvo hospitalizado en Francia.
- ❖ **SFO**: fue descrita por primera vez en una cepa de *Enterobacter cloacae* en Japón en 1988. Presenta una acción hidrolítica mayor frente a cefotaxima que frente a ceftazidima y su acción es inhibida por clavulánico e imipenem.

Existen otros tipos diferentes de betalactamasas los cuales están mediados por plásmidos asociadas a la clase A que han sido recientemente descubiertos (GES, TLA, IBC, TLA, BES). (Tabla 2) (Oliver & Cantón, 2010)

Tabla 2. Diferentes grupos de β -lactamasas de espectro extendidoFUENTE: Hernández JR. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21:77-82.

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>

Las fluoroquinolonas han sido consideradas como alternativas de importancia en la comunidad, debido a que al no ser agentes β -lactámicos no son afectadas por las BLEE, sin embargo se documentó un incremento en la resistencia de los microorganismos productores de BLEE a estos antibacterianos mediante plásmidos o mutaciones. Actualmente, los carbapenems son las drogas preferidas para el tratamiento de este tipo de infecciones. Su uso está avalado por su resistencia a la hidrólisis por las BLEE, su excelente actividad *in vitro* y la eficacia clínica. (García-Hernández, y otros, 2011)

Por último, son necesarias medidas de control para evitar la diseminación de las infecciones por BLEE; entre éstas se encuentran el aislamiento de los pacientes, la descontaminación ambiental y la eliminación del uso indiscriminado de antibacterianos, en especial las cefalosporinas de espectro extendido a nivel hospitalario y comunitario respectivamente. (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MÉTODOS

3.1.1. Diseño y Tipo de Estudio

Descriptivo no experimental, de laboratorio y de corte transversal.

3.1.1.1. Localización Geográfica

- Se receptaron muestras de orina de pacientes ambulatorios y hospitalarios que acudían al “Hospital José Carrasco Arteaga”.
- Los exámenes de urocultivo se realizaron en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas en el área de Microbiología Clínica 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 del Hospital que cumplían con los criterios de inclusión dando un total de 144 muestras, en este caso el universo coincide con el muestreo indicado en nuestro estudio.

3.1.2. Manejo de Datos

3.1.2.1. Criterios de Inclusión

Se trabajó únicamente las muestras idóneas para el cultivo, las que fueron tomadas de una manera correcta y que presentaron las siguientes características:

- Muestras que marcaron en la tira de orina nitritos positivo.
- Muestras que en sedimento urinario presentaron bacterias mayor a +, leucocitos o piocitos mayor a 5 por campo.
- Muestras tomadas mediante la técnica del chorro medio en pacientes ambulatorios y en caso de pacientes hospitalarios la técnica que los médicos utilicen para la obtención de la misma.

- Muestras que fueron transportadas y almacenadas correctamente.
- Muestras de pacientes sin tratamiento con antimicrobianos.

3.1.2.2. Criterios de Exclusión

No se trabajó con muestras con las siguientes características:

- Pacientes con leucorrea o con tratamiento antibiótico previo.
- Muestras con una baja o nula concentración bacteriana.
- Muestras con volúmenes menores a los 100mL.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Procesamiento de muestras

Para lograr resultados precisos, confiables, y reproducibles es necesario evitar errores en la recolección y conservación de la muestra.

3.2.1.1. Muestra de Orina

La orina es un medio adecuado para el crecimiento bacteriano. Se sabe que el retraso en el procesamiento de los urocultivos favorece la multiplicación de la flora contaminante, lo que afecta a la validez de los resultados. Para contrarrestar este problema se recomienda procesar la orina lo antes posible. Para evitar la contaminación puede recurrirse a medios físicos (refrigeración) o químicos (adición de conservantes). Sin embargo, existen dudas sobre si el empleo de estos medios influye en la calidad de las muestras. Es por eso que a la hora de interpretar un análisis de orina deben tenerse en cuenta las condiciones en las que la muestra fue recogida, conservada y transportada. (Elmer W. Koneman, D. Allen, & Jan, 2000)

Tanto la refrigeración (2-8°C) como los conservantes químicos de diferentes casas comerciales inhiben el crecimiento bacteriano durante las primeras 24 horas. Dos estudios realizados por la Dra. Ana García-Raja y Dra. Carmen Mugueta en el Hospital Son Espases (Mallorca) en Junio del 1994, muestran que los conservantes químicos apenas modifican los resultados de los parámetros de

perfil urinario glucosa, cetonas, bilirrubina y sangre, o de leucocitos y nitritos respectivamente. Mientras, que un tercer estudio realizado por el Dr. Tiago Guimaraes en el Hospital Sao Joao del mismo año, muestra cambios en los parámetros de glucosa y nitritos en muestras de orina mantenidas con conservante. (Aguilera, 1994)

3.2.1.2. Recolección de la muestra

- ✚ Los envases fueron químicamente limpios, estériles y provistos de tapa.
- ✚ Evitar contaminación (Ej: menstruación, flujo vaginal).
- ✚ La muestra debe ser recogida en condiciones de asepsia por lo que al paciente se le dio indicaciones para una correcta higiene íntima.

Técnica de chorro medio

- ✚ Es el tipo de recogida de orina más frecuente. Los hombres y los niños deben limpiarse la cabeza del pene. Las mujeres y las niñas deben lavar el área entre los labios de la vagina con agua jabonosa y enjuagarla bien.
- ✚ Desechar el primer y el último chorro de la micción.
- ✚ La muestra idónea es la primera micción de la mañana, ya que permite la multiplicación de bacterias durante la noche.
- ✚ Se recomienda al paciente tener abstinencia sexual de 2 días, antes de realizar el examen. (González Carrión & La Fuente Lorca, 2001)

Cuando se deja la muestra de orina al ambiente por mucho tiempo este puede descomponerse por la presencia de bacterias: incrementa el pH, se produce amoníaco y degrada la urea. La muestra se debe mantener refrigerada a 4 °C.

Para realizar un urocultivo de una muestra de orina primero se debe realizar el cito-químico y microscópico de la muestra a través de las tiras reactivas describiéndola de la siguiente manera:

3.2.1.3. Examen físico

En este proceso se observan las características macroscópicas de la muestra, en esta se encuentran:

- ✓ **Color:** la orina generalmente es de color amarillo claro. Dependiendo de su concentración, puede ser clara y transparente (diluida) o amarilla oscura (más concentrada).
- ✓ **Olor:** tiene un olor débil y aromático de origen indeterminado y los especímenes de crecimiento bacterianos se pueden reconocer por un fétido olor a amoníaco.
- ✓ **pH:** en condiciones normales puede variar entre 5.5 – 6.5 dependiendo de factores como la dieta y el consumo de fármacos.
- ✓ **Densidad:** la densidad o peso específico de la orina oscila entre 1.015 - 1.025.

3.2.1.4. Examen Químico

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

Generalmente estos parámetros son sangre, urobilinógeno, glucosa, bilirrubina, proteínas, nitritos, cuerpos cetónicos, ácido ascórbico.

Se introduce una tira en la muestra de orina, y en poco segundos la tira se pinta de diferente color según su parámetro y con un papel se seca el exceso de líquido que se encuentra en la tira y éstos se compararán con una carta que viene en el producto.

- ✓ **Sangre:** la tira reactiva positiva indica tres posibilidades: hematuria, hemoglobinuria o mioglobinuria. La observación del sedimento en la



muestra de orina centrifugada orientará el diagnóstico. Si hay eritrocitos estamos en presencia de hematuria; en caso contrario deberá realizarse el diagnóstico diferencial entre hemoglobinuria y mioglobinuria para el cual podrá utilizarse cualquiera de los métodos que se enumeran a continuación:

1) Se centrifuga una muestra de sangre y si el plasma es rosado existe hemólisis; por lo tanto, en orina hay hemoglobina (Hb); si el plasma es claro en orina hay mioglobina.

2) Agregando sulfato de amonio (2,8 g) a 5 ml de orina centrifugada, se espera 5 minutos y se filtra. La Hemoglobina precipita y queda en el papel; la mioglobina no precipita, por lo tanto pasa libremente a través del filtro. Sin embargo, la sangre en la orina (hematuria) también puede indicar una serie de enfermedades de la vejiga, los riñones o la vía urinaria.

- ✓ **Proteínas:** la presencia de proteinuria puede ser el indicador más importante en una alteración renal. Sin embargo luego de actividad física, en estado febril, estrés y exposición al frío, puede haber un aumento en la excreción de proteínas en la orina. Normalmente en el riñón sano se excreta solo una pequeña cantidad de proteínas de bajo peso molecular. Esto se debe a que la estructura de la membrana glomerular no permite el pasaje de proteínas de alto peso molecular.
- ✓ **Nitritos:** se hace positivo por la nitrato reductasa presente en las Enterobacterias. Es otra prueba rápida, pero tiene una sensibilidad de 25 % y una especificidad de 94-100 % para ITU.
- ✓ **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. (Perea López & Ruiz de Alegría Puig, 2010)

3.2.1.5. Examen microscópico del sedimento urinario

Se coloca en un tubo de precipitación 8 ml de orina y se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos, una vez centrifugado se elimina el sobrenadante y se coloca una gota del sedimento en el porta objeto y se coloca el cubre objeto y se observa a menor y luego mayor aumento (40x). Constituye uno de los datos más útiles pero no confirmatorios.

3.2.1.6. Urocultivo

- **Siembra**

Debe permitir el aislamiento y el recuento cuantitativo desde 10.000 a 100.000 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC)/mL. de los uropatógenos más comunes.

Los medios utilizados para la siembra de orina son:

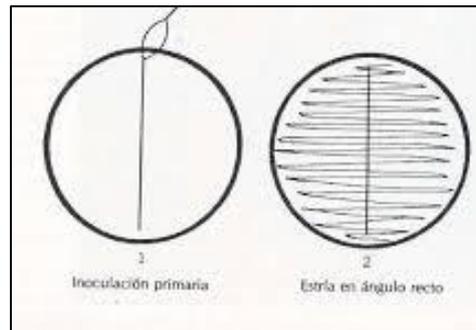
- **Agar Sangre de cordero y Agar Brolacin**

Se empleó un asa calibrada de orina de 0.001 mL., y la técnica que se utilizó fue por método de estría.

Antes de sembrar se debe esterilizar el alambre de el asa calibrada por calentamiento hasta el rojo vivo en la lámpara de alcohol y se deja enfriar, la muestra de orina debe estar correctamente homogenizada es decir mediante movimientos rotatorios, luego se introduce de manera vertical el asa sobre la muestra de orina sin tocar las paredes del recipiente y debe observarse la formación de una lámina sobre el asa e inmediatamente se extiende sobre el medio en línea recta y por estriado sin presionar para que el medio no se rompa, al terminar la siembra se debe flamear el asa para evitar contaminación con las demás muestras.

Una vez sembrada las muestras se deben incubar las cajas, siempre invertidas, a 37°C durante 24 horas y en condiciones de aerobiosis. (Anunciata, 2012)

FIGURA 1. Técnica de siembra en Agar Sangre de cordero y Agar Brolacin



FUENTE: Anunciata, C. E. (2012). Medios de cultivos. Agar Sangre. Obtenido de <http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/manoslimpias/medios.pdf>

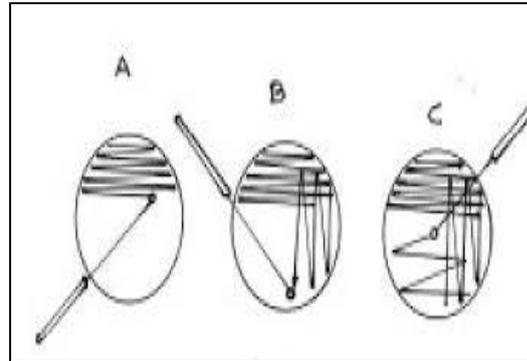
- **Agar EMB y Agar Manitol**

La técnica que se utilizó en estos medio fue por el método de agotamiento y estría respectivamente para obtener colonias aisladas.

Se empleó un asa calibrada, el alambre deber ser esterilizado por calentamiento hasta el rojo vivo en el mechero y se deja enfriar, la muestra de orina debe estar correctamente homogenizada, es decir, mediante movimientos rotatorios, luego se introduce de manera vertical el asa sobre la muestra de orina si tocar las paredes del recipiente y debe observarse la formación de una lámina sobre el asa e inmediatamente se extiende sobre una área pequeña de la superficie de la caja en forma de estrías pero unidas sin presionar para que el medio no se rompa, al terminar la siembra se debe flamear el asa para evitar contaminación con las demás muestras.

Una vez sembrada las muestras se deben incubar las cajas, siempre invertidas, a 37°C durante 24 horas, en aerobiosis. (Britania, 2010)

FIGURA 2. Técnica de siembra en Agar EMB y Agar Manitol



Fuente: Anunciata, C. E. (2012). Medios de cultivos. Agar Sangre. Obtenido de <http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/manoslimpias/medios.pdf>

Agar sangre

TABLA 3. Características de las colonias

Colonias	Microorganismos
Medianas, convexas, blancas, forma circular, bordes redondo, brillantes.	<i>Cocos gram positivos</i>
Medianas, convexas, blanquecinas o translúcidas, forma circular, bordes redondos, hay presencia de Swarming.	<i>Proteus spp.</i>
Presentan colonias medianas, blanquecinas, redonda, algunas cepas pueden producir hemólisis	<i>E. coli</i>

FUENTE: Elmer W. Koneman, E., D. Allen, S., & Jan, W. (2000). *Diagnóstico microbiológico*. Madrid España: Médica Panamericana.

Agar Manitol

TABLA 4. Características de las colonias

Colonias	Microorganismos
Con halo amarillo luminoso; crecimiento intenso	Manitol-positivo: <i>Staphylococcus aureus</i>
Sin cambio de color; crecimiento débil casi siempre	Manitol-negativo: <i>Staphylococcus epidermis</i> y otras.

FUENTE: Elmer W. Koneman, E., D. Allen, S., & Jan, W. (2000). *Diagnóstico microbiológico*. Madrid España: Médica Panamericana.

Agar Brolacin

TABLA 5. Características de las colonias

Colonias	Microorganismos
Grandes, amarillo doradas rodeadas de coloración amarilla	<i>E. coli</i> , <i>Citrobacter lactosa</i> -positivo, otros.
Grandes, amarillo-doradas casi siempre mucosas con coloración amarilla alrededor.	<i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> y otros.
Grandes, incoloras, rodeadas de coloración azul.	<i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> y otros.
Grandes, con el centro parduzco rodeadas de coloración azul.	<i>Pseudomonas</i>
Amarillo pálidas, pequeñas, opacas.	<i>Streptococcus</i>
Amarillas intensas, muy pequeñas, opacas.	<i>Staphylococcus</i>

FUENTE: Elmer W. Koneman, E., D. Allen, S., & Jan, W. (2000). *Diagnóstico microbiológico*. Madrid España: Médica Panamericana.

Agar EMB

TABLA 6. Características de las colonias

Colonias	Microorganismos
----------	-----------------

Transparentes, de color ámbar	<i>Salmonella, Shigella</i>
Verdosas con brillo metálico a la luz reflejada, con el centro negroazulado a la luz transmitida	<i>E. coli</i>
Más grandes que las <i>E. coli</i> , mucosas, confluentes, con el centro pardo grisáceo a la luz transmitida	<i>Enterobacter, Klebsiella y otros.</i>

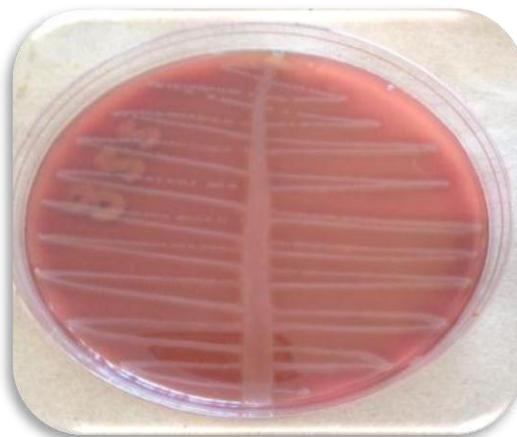
FUENTE: Elmer W. Koneman, E., D. Allen, S., & Jan, W. (2000). *Diagnóstico microbiológico*. Madrid España: Médica Panamericana.

3.2.1.7. Recuento de Colonias

El recuento de colonias se realizó en agar sangre, los resultados se interpretaron en base a los siguientes criterios

- Menor a 10^2 UFC/mL: normalmente es por posible contaminación. Es valorable si la toma de muestra se ha realizado por punción supra púbrica.
- 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: significativo. (Malbran, 2001).

FIGURA 3. Recuento de colonias



FUENTE: Tesis BLEE 2014-2015

3.2.1.8. Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en Bacteriología para la visualización de bacterias. Se utiliza para poder referirse a la morfología celular bacteriana, considerándose bacterias gram-positivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias gram-negativas a las que se visualizan de color rosa.

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico.

Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano. (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009)

- **Prueba de Oxidasa**

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria aerobia, transfiriendo electrones al oxígeno, con formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que la prueba de Oxidasa es importante para identificar aquellos organismos que carecen de esta enzima (anaerobios obligados).

La prueba es muy útil para diferencia Enterobacterias (Todas Oxidasa negativas) de otras especies como *Pseudomona* o *Neisserias* oxidasa positiva.



Hay dos compuestos susceptibles a oxidarse por la acción de esta enzima, produciendo un color inicialmente rosado y luego azul oscuro a negro. Dichos compuestos son dimetil-fenil-diamina y tetrametil-parafenil-endiamina. Siendo el más utilizado el segundo, también se dispone en el mercado de tirillas de Oxidasa o el reactivo ya preparado. (Faddin, 2003)

FIGURA 4. Prueba de oxidasa



FUENTE: Tesis BLEE 2014-2015

- **Pruebas Bioquímicas**

Se basan en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas (catalasas, coagulasas, decarboxilasas, desaminasas, ureasas, peroxidasas, etc) involucradas en el metabolismo bacteriano, pueden ser evidenciadas en medios de cultivo especiales que contienen los substratos (DNA, hidratos de carbono, aminoácidos, etc) sobre los cuales ellas actúan, junto con un sistema indicador que va a poner de manifiesto la degradación del substrato o la presencia de un metabolito específico (ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico, indol, etc). (Murcia Aranguren, 2008)

Las pruebas bioquímicas también evalúan: la capacidad de reducir ciertos iones (ferroso a Férrico), la presencia o ausencia de flagelos (prueba de movilidad), la producción o no de hemolisinas, el requerimiento o no de algunos factores especiales (proteínas séricas), la producción o no de algunas toxinas con capacidad virulenta (toxina diftérica, toxina botulínica, etc). (Murcia Aranguren, 2008)

- **Agar Kligler**

En el medio de cultivo, la peptona de carne y la tripteína, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de azúcares se producen ácidos que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro. (Galeón & Galeón, 2011)

FIGURA 5. Agar kligler



FUENTE: Bact_identificaci%C3%B3n_bioqu%C3%ADmica_enterobacterias.pdf.2008

- **LIA (LISINA-HIERRO)**

Es un medio que sirve para demostrar la producción de dos enzimas: la lisina descarboxilasa y la lisina desaminasa, además la presencia de sales de hierro sirve para detectar la producción de H_2S por algunos microorganismos.

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 que se puede producir por los géneros *Proteus* y *Providencia* tiene lugar en la parte superior del tubo produciendo ácido alfa-cetocarbónico que al combinarse con la sal de hierro y en presencia de oxígeno forma un color violeta rojizo. La producción de H₂S se evidencia por la presencia de un precipitado negro por utilización de las sales de hierro. (Murcia Aranguren, 2008)

- **Citrato**

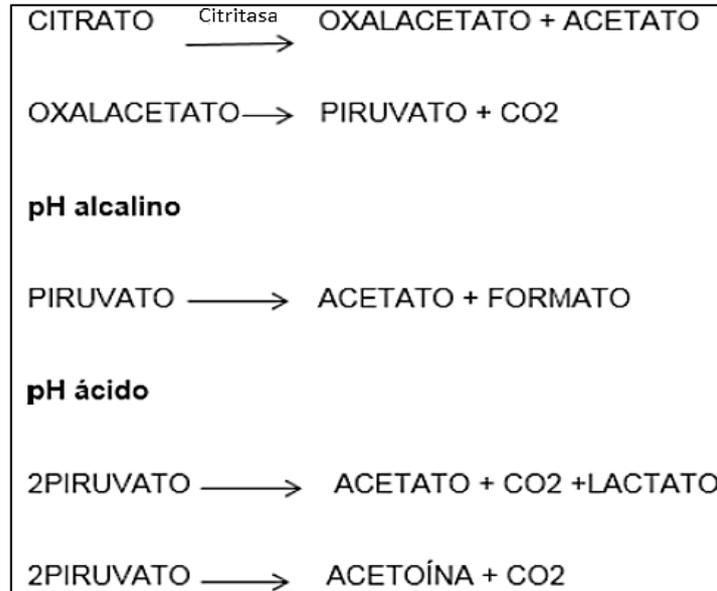
El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

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. (Murcia Aranguren, 2008).

FIGURA 6. Reacciones de Conversión del Citrato



FUENTE: Faddin, M. (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica (3ra ed.). Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana

- **Urea**

Se determina la capacidad de un microorganismo de producir ureasa y desdoblar la urea, formando 2 moléculas de amoníaco, agua y dióxido de carbono. El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, denominada carbamida. Todas las amidas (RCO- NH₂) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica que es la ureasa, es una enzima microbiana importante, relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos.

Las enzimas bacterianas se clasifican en adaptativas o constitutivas. Una enzima adaptativa o inducida es aquella que es producida por una bacteria solamente cuando se encuentra presente su sustrato específico. La ureasa es una enzima constitutiva ya que la sintetizan ciertas bacterias sin tener en cuenta si hay o no el sustrato urea. De acuerdo a la degradación de la urea el color será más o menos intenso. (Galeón & Galeón, 2011)



FIGURA 7. Agar Urea

FUENTE: Bact_identificaci%C3%B3n_bioqu%C3%ADmica_enterobacterias.pdf.2008

- **SIM (SULFURO-INDOL-MOTILIDAD)**

EL SIM es un medio semisólido sin hidratos de carbono que inhiben la producción de H_2S y tiene tiosulfato de sodio como fuente de azufre y hierro peptonado, lo que lo hace más sensible en la detección de H_2S por producción de un precipitado negro de sulfuro ferroso. (Murcia Aranguren, 2008)

- ✚ **Indol:** es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que producen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de Indol, ácido pirúvico y amoníaco. (Anunciata, 2012)

- ✚ **Movilidad bacteriana:** es otra característica importante en la identificación final de especie, se realiza en medios semisólidos como el SIM, debiéndose leer antes la prueba de indol, porque al agregar el reactivo de Erlich ésta se puede enmascarar. La prueba de motilidad se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación. (Murcia Aranguren, 2008)

FIGURA 8. Indol Positivo (Anillo Rosado) – Indol Negativo (Sin coloración)



FUENTE: Registro de Laboratorio

- **CALDO MR-VP**

Rojo de Metilo: la bacteria puede fermentar la glucosa por la vía ácida mixta con producción de metabolitos como ácido láctico, fórmico y succínico, los cuales van a hacer descender el pH inicial del medio de 6.9 a 4.2 (Britania, 2010)

FIGURA 9. Prueba de Rojo de Metilo Positiva (Roja) y Negativa (Amarilla)



FUENTE: Registro de Laboratorio

- **Voges Proskauer:** la bacteria puede fermentar la glucosa por la vía butilen-glicólica con producción de productos neutros como el acetyl methyl carbinol (acetoina), el 2,3 butilen glicol y el diacetil. El producto final más frecuente es el 2,3 butilen glicol, que es fácilmente oxidado a acetyl methyl carbinol y luego a di-acetil. El voges proskauer realmente es una búsqueda de di-acetil, ya que las condiciones de la prueba convierten fácilmente los otros dos componentes en diacetil. Las 3 sustancias son

neutras con el resultado de que pH del medio no baja sensiblemente y por lo tanto la bacteria es rojo de metilo negativa y voges proskauer positiva. La bioquímica de la fermentación de la glucosa hace muy poco probable encontrar cultivos rojo de metilo y voges proskauer positivos, lo que sí es más probable es encontrar las 2 pruebas negativas en el caso de bacterias no fermentadoras. (Aguilera, 1994)

3.2.1.9. Pruebas de Sensibilidad: se exponen colonias de una cepa aislada del medio de agar sangre con diferentes antibióticos para observar la forma como cada antibiótico inhibe el crecimiento del microorganismo; se determinará la efectividad de cada antibiótico contra el organismo particular de acuerdo con el manual CLSI 2014. (Oliver & Cantón, 2010)

- **Medio de Cultivo:** se considera al agar Mueller-Hinton el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas. (Britania, 2010)

- **Preparación del inóculo**

- ❖ **Método de desarrollo previo:** De una caja 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, ajustando la turbidez del inóculo con solución salina hasta el tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland. (Anunciata, 2012)

- ❖ **Inoculación de las placas:** Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo, se coloca un hisopo estéril y presionando el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo, se sembró en las placas de Mueller-Hinton en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Se espera de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. (Britania, 2010)

- **Aplicación de los discos**

Se procede a colocar los discos sobre la superficie del agar inoculada, con una pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 5 discos por placa de 100 mm. (Cristina Seral García & Pardos de la Gándara, 2010)

- **Incubación**

- ✓ Las placas son colocadas invertidas en una estufa a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados. (Anunciata, 2012)

- **Lectura de las placas e interpretación de resultados**

- ✚ Después de 16 a 18 horas de incubación se midió los diámetros de las zonas de inhibición con una regla, si las placas fueron satisfactoriamente hisopadas y el inóculo fue el correcto, las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo confluyente. (Famiglietti, y otros, 2010)
- ✚ El objetivo de la realización de este ensayo fue poder categorizar al microorganismo como sensible, intermedio o resistente al antibacteriano que ha sido ensayado. Para poder acceder a este tipo de clasificación debemos interpretar las diferentes categorías:



SENSIBLE (S)

Implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones.

INTERMEDIO (I)

Incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que las dosis usadas puedan ser aumentadas o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado. También nos indica una "zona buffer" que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación. (Famiglietti, y otros, 2010)

RESISTENTE (R)

Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana y la eficacia clínica no ha sido comprobada. (Malbrán, Enero)

La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE han sido diseñados para Enterobacterias y se fundamentan en el carácter inhibible de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas. Las pruebas de BLEE se deben realizar como se describe en la tabla 7:

TABLA 7. Detección y Confirmación de BLEE

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	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

Fuente: Manual de CLSI, Edición Enero 2014, Número M100-S24. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014)

TABLA 8. Interpretación para detección de BLEE

Resultados	Ceftazidima ≤ 17 mm Aztreonam ≤ 17 mm Cefotaxima ≤ 22 mm Ceftriaxona ≤ 19 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).
-------------------	---	---

Fuente: Manual de CLSI, Edición Enero 2014, Número M100-S24. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014)

- **Procedimiento**

- Se inicia con una muestra identificada (Familia de las Enterobacterias).
- Se preparó un inóculo de concentración 0.5 McFarland y se siembra en Agar Mueller Hinton y se colocaron los discos indicados en la tabla.



- Si los resultados fueron positivos según los parámetros indicados en la tabla del CLSI se procedió a realizar la prueba confirmatoria.
- La prueba confirmatoria consiste en colocar el disco solo y otro en combinación con ácido clavulánico según lo indica el manual CLSI actualizado a Enero del 2014.
- La interpretación se explica en la tabla # 8 y según sea el resultado se expresa como BLEE positivo o negativo. (González Carrión & La Fuente Lorca, 2001)

En la tabla # 9 se encuentran los antibióticos que se emplearon para la realización de las pruebas de sensibilidad en los cultivos presuntivos de BLEE para ayudar a buscar una alternativa de tratamiento en caso de producción de Betalactamasas.

TABLA 9. Antibióticos utilizados para Enterobacterias en Urocultivos

Categoría	Antibióticos	Abreviatura	Concentración	Sensibilidad	Intermedia	Resistencia
Niños	Ampicilina	AM	10 ug	>17	14-16	<13
	Amoxicilina+ Ácido Clavulánico	AMC	10 ug	>18	14-17	<13
	Nitrofurantoína	F	10 ug	>17	13-16	<12
	Gentamicina	CN	10 ug	>15	13-14	<12
Adultos	Norfloxacin	NOR	10 ug	>17	13-16	<12
	Nitrofurantoína	F	10 ug	>17	13-16	<12
	Ciprofloxacina	CIP	5 ug	>21	16-20	<15
	Ampicilina	AM	10 ug	> 17	14-16	<13
Mujeres Embarazadas	Nitrofurantoína	F	10 ug	>17	13-16	<12
	Amoxicilina + Ácido Clavulánico	AMC	10 ug	>18	14-17	<13
	Ampicilina					
	Sulbactam	AmS	10 ug	>15	12-14	<11
Ancianos	Nitrofurantoína	F	10 ug	>17	13-16	<12
	Ciprofloxacina	CP	5 ug	>21	16-20	<15
	Gentamicina	CN	10 ug	>15	13-14	<12

FUENTE: Funke Case, T. (2007). Introducción a la Microbiología (9na edición ed.). Estados Unidos Medica Panamericana

3.3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1 MATERIALES

- ✚ Recipiente para transporte de muestras
- ✚ Lámparas de alcohol (RS®)
- ✚ Asa Calibrada
- ✚ Asa Recta
- ✚ Cajas Petri (Fisherbrand)
- ✚ Tubos Tapa rosca (100 x 13 mm) (125 x 16 mm)
- ✚ Placas Portaobjetos (Inlab®)
- ✚ Cubreobjetos
- ✚ Gradillas para tubos
- ✚ Guantes de examinación (NIPRO®)
- ✚ Papel aluminio (Drocaras®)
- ✚ Suero fisiológico 100ml (Baxter®)

3.3.2. REACTIVOS

- ✚ Tiras reactivas (Combur)
- ✚ Tiras para oxidasa
- ✚ Violeta cristal
- ✚ Lugol
- ✚ Alcohol cetona
- ✚ Fushina
- ✚ Aceite de inmersión
- ✚ Rojo de metilo
- ✚ Reactivo de Erlich
- ✚ Alfa naftol
- ✚ Hidróxido de potasio (KOH 40%)

3.3.3. EQUIPOS

- ✚ Autoclave (Trident® EA 632 y Fanem® 415/3)
- ✚ Cámara de flujo laminar (Labconco® clase II tipo A2)

- ✚ Centrifuga (Hettich)
- ✚ Estufa 37°C (Memmert® DE)
- ✚ Baño María (Memmert® LE-209)
- ✚ Refrigeradora (Indurama® No Frost)
- ✚ Cocineta (2 quemadores) (Haceb® EM2)
- ✚ Balanza digital (Mettler® PC440)
- ✚ Microscopio (Olympus® CX21-FS1)

3.3.4. MEDIOS DE CULTIVO

- **Agar sangre**

El agar sangre es una combinación de un agar base (agar nutritivo) con fuente proteica (digeridos tripticos, digeridos proteicos de soja) el cual tiene un agregado de 5 % de sangre cordero con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales y cloruro sódico. (Britania, 2010)

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.

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. (Anunciata, 2012)

- **Agar Manitol**

Agar selectivo para la demostración de *Estafilococos* patógenos. Debido a la concentración extremadamente alta de sal permite solamente el crecimiento de microorganismos tolerantes a ella, entre los que se encuentran, los de género *Staphylococcus*. La degradación del manitol con formación de ácido, está

notablemente correlacionada con la patogenicidad del germen en cuestión, como indicativo de la presencia de *S. aureus*. (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009)

- **Agar Brolacin**

Para la determinación del número de gérmenes, aislamiento e identificación orientativa de microorganismos en orina. Este medio de cultivo favorece el crecimiento de todos los microorganismos existentes en la orina. Debido a la amplia disponibilidad de sustancias nutritivas que ofrece a su carencia de sustancias inhibidores y a la posibilidad de lograr una cierta diferenciación de las colonias, resulta también un medio de cultivo universal que goza de preferencia. (Anunciata, 2012)

Como sustancia reaccionante contiene lactosa. La degradación a ácido de esta última origina un viraje de color hacia el amarillo, del Azul de bromotimol. La alcalinización provoca un viraje a azul intenso. La notable pobreza de electrolitos provoca la represión de la invasión de *Proteus*. (García Martos, Fernandez del Barrio, & Paredes Salino, 1997)

- **Agar EMB**

Agar selectivo para la demostración y el aislamiento de *Enterobacteriaceas* patógenas, según Holt-Harris y Teague (1916). El contenido en lactosa y sacarosa hacen posible la distinción de salmonellas y de *Shigella* lactosa-negativas y sacarosa-negativas, frente a la flora acompañante lactosa-negativa pero sacarosa-positiva. Los gérmenes de acompañamiento indeseables, bacterias gram-positivas especialmente, resultan inhibidos en su crecimiento, gracias a los colorantes presentes en la formulación. (Anunciata, 2012)

- **Agar Mueller-Hinton**

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad.



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 absorber cualquier metabolito tóxico y el agar es adicionado como agente solidificante. (Britania, 2010)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar el presente estudio investigativo se utilizaron muestras de orina procedentes del Hospital “José Carrasco Arteaga”, ubicado en la ciudad de Cuenca. Las muestras recogidas de esta Institución de salud, cumplieron con los criterios de inclusión antes expuestos.

Tabla 10. Distribución de las muestras analizadas de pacientes con ITU.

Días Trabajados	1ra. Semana	2da. Semana	3ra. Semana	4ta. Semana	Total
Lunes	12	12	12	12	144
Martes	12	12	12	12	
Miércoles	12	12	12	12	

FUENTE: Registro de laboratorio

En el Hospital “José Carrasco Arteaga” diariamente llegan al laboratorio más de 100 muestras de orina procedentes de las diferentes áreas, las muestras con ITU que formaron parte de este estudio fueron seleccionadas de manera aleatoria, es decir, muestras de pacientes ambulatorios y muestras de pacientes hospitalizados, donde se recolectaron 12 muestras de orina diarias por tres días dándonos un total de 144 muestras al mes.

Tabla 11. Distribución de las muestras positivas para ITU en Género.

Género	Número de pacientes con ITU	Porcentaje de pacientes con ITU
FEMENINO	100	69%
MASCULINO	44	31%
Total general	144	100%

FUENTE: Registro de laboratorio

En el género femenino se puede apreciar que hay un mayor porcentaje de ITU correspondiente al 69% con respecto al sexo masculino donde hay un menor

porcentaje que corresponde al 31%, por lo que se puede observar que las mujeres tienen más predisposición a sufrir infecciones urinarias por su anatomía.

Según la estadística realizada en el año 2010 por las autoras Carmen León y Michelle Pacheco la mayoría de pacientes fueron de sexo femenino lo que correspondió a un 86,56 %; el estudio realizado en el “Hospital Vozandes Quito” entre los años 2005 y 2009; en el presente trabajo la estadística realizada al sexo femenino le corresponde un porcentaje menor del 69%; esto podría deberse a que el muestreo citado fue de $n= 1038$ durante el período antes mencionado, mientras que el muestreo de este estudio fue de 144 muestras durante un mes y de forma aleatoria. (León & Pacheco, 2010)

Tabla 12. Distribución de las muestras positivas para ITU en Grupo Etario.

FUENTE: Registro de laboratorio

Grupo Etario	Edad	Número de pacientes con ITU	Porcentaje de pacientes con ITU
Adulto	17- 65	114	79%
Adulto Mayor	65-89	17	12%
Niños	0-10	13	9%
Total general		144	100%

En un “Estudio Comparativo sobre infecciones intrahospitalarias entre adultos mayores y menores” realizado en Perú en el año 2000 por Mercy Jhong Olivera, Luis Varela Pinedo y Luis Sialer Vildózola, se evidenció que de los 569 pacientes, el 63% eran adultos menores de 60 años y 37% eran adultos mayores de 60 años que presentaban infecciones del ITU; mientras que en el actual estudio el 79% corresponden a adultos menores y el 12% adultos mayores, esta variación de porcentajes puede deberse a los diferentes tipos de población que presenta cada uno y también el rango de edades que existe para cada grupo etario. (Jhong Olivera, Varela Pinedo , & Sialer Vildózola , 2000)

Otro estudio sobre “ Prevalencia de uropatógenos en los pacientes atendidos en un hospital del departamento de Antioquia-Colombia” realizado en Medellín - Colombia en el 2014 por Jaiberth Antonio Cardona-Arias, Carolina Ramírez Roldán, Sara Álvarez Tamayo, Diana Marcela Mena-Paz, Luis Felipe Higuera Gutiérrez se demostró que el porcentaje de ITU para niños es de 17% con

respecto al presente estudio que fue de tan solo el 9%, observándose un mínimo valor debido al tipo de población utilizado en el estudio anteriormente mencionado que fue de n=312 respectivamente. (Cardona Arias, Mena Paz , & Higueta Gutiérrez, 2014)

Se puede deducir, que los adultos en la población estudiada son los más propensos a sufrir infecciones de las vías urinarias, lo que puede deberse a que se receptaron muestras de pacientes con ITU de manera aleatoria.

Tabla 13. Distribución de las muestras positivas para ITU en procedencia.

Procedencia	Número de pacientes con ITU	Porcentaje de pacientes con ITU
Consulta externa	83	58%
Emergencia	33	23%
Hospitalización	16	11%
Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)	12	8%
Total general	144	100%

FUENTE: Registro de laboratorio

En un estudio realizado por la estudiante María de los Ángeles Miñambres en Valladolid España en el año 2011, con un muestreo de 3949 muestras positivas para infecciones urinarias que fueron atendidas en Servicios de Urgencias hospitalarios se evidenció un porcentaje del 1,8% de las urgencias, mientras que en el actual trabajo se obtiene un porcentaje del 23% lo que constituye un porcentaje de la actividad asistencial mayor con el estudio antes mencionado. En el mismo trabajo se analizó que del muestreo, el 58% corresponden a la atención primaria, en una proporción bastante alta que las referidas en el estudio de comparación con un porcentaje del 41,3% respectivamente. (Miñambres, 2011)

En el mismo estudio a nivel hospitalario se obtuvo un porcentaje del 11% mientras que en el trabajo comparativo de la misma estudiante se manifestó un porcentaje del 5,7%; con lo cual se podría considerar que probablemente de las ITU analizadas no se manejaron de forma correcta en atención primaria. (Miñambres, 2011)

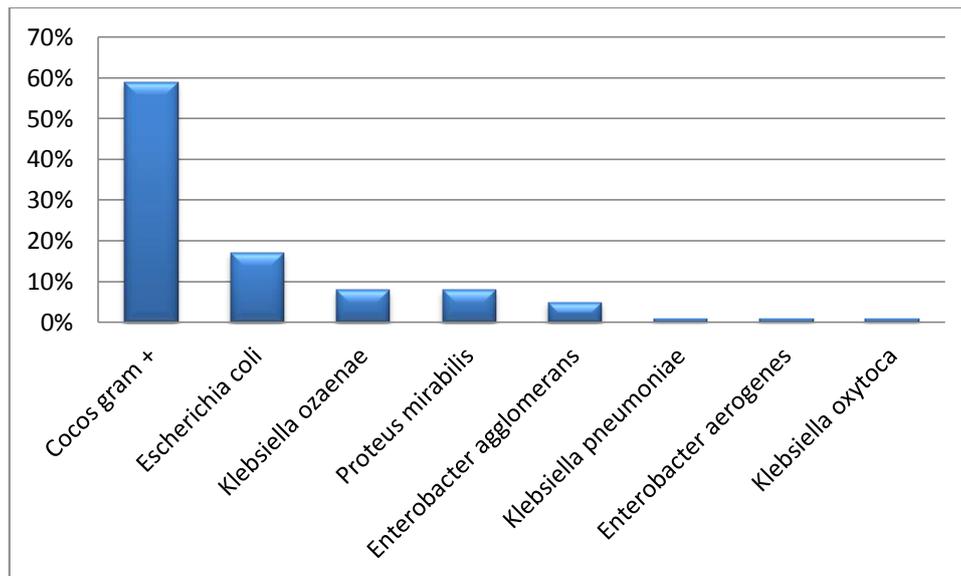
Finalmente para el caso de la UCI en el estudio actual se obtuvo un porcentaje del 8%; mientras que en el trabajo de comparación no hay registro que permita conocer su porcentaje. (Miñambres, 2011)

Tabla 14. Prevalencia de Enterobacterias y Cocos positivos en muestras de orina de pacientes ambulatorios y hospitalizados con ITU.

Microorganismo	Número	Porcentaje
<i>Cocos gram +</i>	86	59%
<i>Escherichia coli</i>	25	17%
<i>Klebsiella ozaenae</i>	11	8%
<i>Proteus mirabilis</i>	10	8%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	8	5%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1%
TOTAL	144	100%

FUENTE: Registro de laboratorio

Gráfico 1. Prevalencia de Enterobacterias y Cocos positivos en muestras de orina de pacientes ambulatorios y hospitalizados con ITU.



FUENTE: Registro de laboratorio

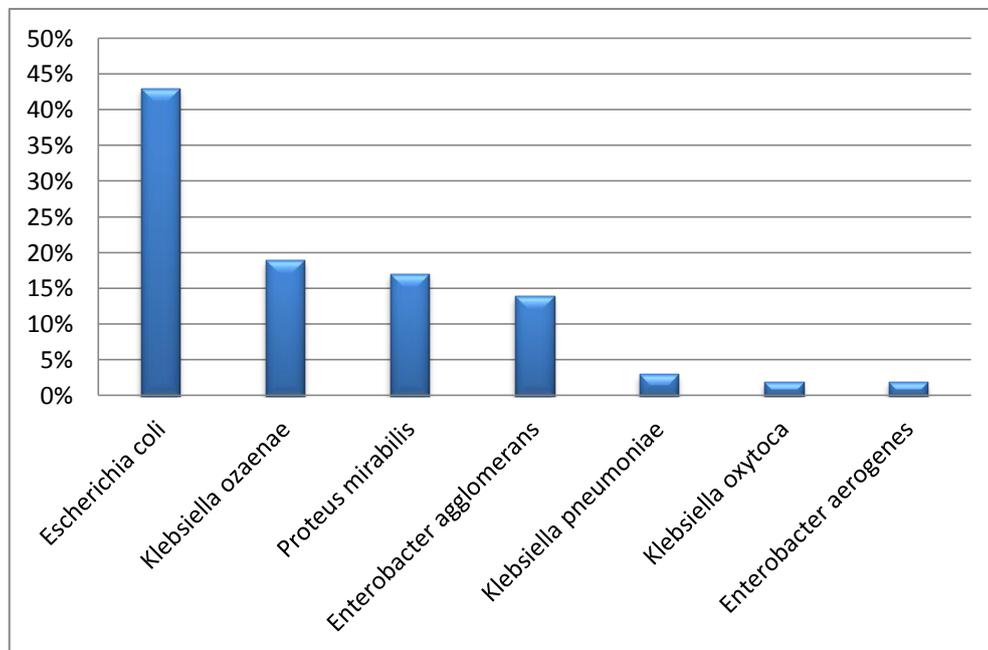
Haciendo relación con la tesis de “Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de orina de pacientes ambulatorios de los Centros de Salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca” por los autores Paúl León y Gabriela Vásquez en el año 2013, el porcentaje de Enterobacterias (64,73%) en relación con los Cocos positivos (35;27%) es mayor, esto se debe a que probablemente obtuvieron un muestreo de n= 224 en tres Subcentros diferentes; en cambio en este estudio se realizó un muestreo de n=144 en un solo lugar dando un mayor porcentaje de Cocos positivos con respecto a las Enterobacterias, esto podría ser propio de la población estudiada, cuyo resultado es similar al establecido en el artículo “Etiología de las infecciones del tracto urinario”, expuesto por Sangrador Ochoa en el año 2005 en España, en el que se dio mayor prevalencia de Estafilococo y Estreptococo responsables de las ITU. (León & Vasquez, 2013)

Tabla 15. Principales Enterobacterias causantes de ITU en pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital “José Carrasco Arteaga” de la ciudad de Cuenca.

Microorganismo	Número	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	25	43%
<i>Klebsiella ozaenae</i>	11	19%
<i>Proteus mirabilis</i>	10	17%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	8	14%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	3%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	2%
Total general	58	100%

FUENTE: Registro de laboratorio

Gráfico 2. Principales Enterobacterias causantes de ITU en pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital “José Carrasco Arteaga” de la ciudad de Cuenca.



FUENTE: Registro de laboratorio

En el gráfico # 2 se puede apreciar que *E. coli* (43%) es la *Enterobacteria* causal de la mayoría de las ITU, seguido de *Klebsiella ozaenae* (19%), *Proteus mirabilis* (17%), *E. agglomerans* (14%) *Klebsiella pneumoniae* (3%), *E. aerogenes* (2%), respectivamente.

Según el estudio realizado por Paúl León y Gabriela Vásquez en la ciudad de Cuenca en el año 2013 con una población de 224 muestras provenientes de los Subcentros 1, 2,3; se estimó la prevalencia de *E. coli* con un 45,98% lo que muestra que no hay una variación significativa con el resultado de la presente investigación a pesar de que la población es diferente. *E. coli* es el agente etiológico más prevalente en ITU. (León & Vasquez, 2013)

Tabla 16. Relación entre la prevalencia de Enterobacterias y el género de los pacientes.

Microorganismo	FEMENINO	PORCENTAJE	MASCULINO	PORCENTAJE
<i>Escherichia coli</i>	15	38%	10	53%
<i>Klebsiella ozaenae</i>	8	21%	4	21%
<i>Proteus mirabilis</i>	6	15%	0	0%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	6	15%	3	16%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	5%	0	0%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	3%	0	0%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	3%	2	10%
Total general	39	100%	19	100%

FUENTE: Registro de laboratorio

Se puede observar que en el género masculino hay mayor prevalencia de Enterobacterias con respecto al género femenino en la población estudiada; es por eso que se realizó el análisis estadístico mediante diferencia de proporciones de acuerdo a la siguiente fórmula para verificarlo (Lopez, 2010):

$$Z = \frac{P1 - P2}{\sqrt{\frac{p(1-p)}{n1} + \frac{p(1-p)}{n2}}}$$

Dónde:

• z = Valor obtenido mediante niveles de confianza. Es un dato constante que, si no se tiene su valor, se lo toma en relación al 95% de confianza y que corresponde a 1,96 o en relación al 99% de confianza equivale 2,58, valor que queda a criterio del investigador.

- P1 = Porcentaje de Enterobacterias en la población masculina
- P2 = Porcentaje de Enterobacterias en la población femenina
- n1 = población masculina
- n2 = población femenina

$$z = \frac{0,6724 - 0,327}{\sqrt{\frac{0,6724(1 - 0,6724)}{39} + \frac{0,327(1 - 0,327)}{19}}}$$

z calculado =2,6

95% de Confianza ----- z = 1,96 (z crítico)

De acuerdo a los valores de z calculado con respecto a z crítico se tomó en cuenta:

❖ Si z calculado < z crítico

Rechazar; no es estadísticamente significativo

❖ Si z calculado > z crítico

Aceptar; es estadísticamente significativo

Según el valor de z calculado: **2,6 > 1,96** → **se aceptó**

Si para el cálculo del tamaño se manejó un valor de confianza del 95%, el valor obtenido para la relación de la prevalencia de *Enterobacterias* respecto al género, representó una variación estadísticamente significativa; lo que significa que en este estudio las mujeres tienen mayor predisposición a sufrir ITU por *Enterobacterias*.

En un artículo denominado “Frecuencia y susceptibilidad antibiótica de *Enterobacterias* aisladas de Urocultivos del estado Sucre en Venezuela durante el lapso 2005-2006” por Juana Espinoza, Elvia Michelli, Marcos De Donato, se evidenció que de n= 718 personas seleccionadas al azar, donde 331 fueron hombres y 387 fueron mujeres; de ahí tan solo 6 hombres correspondiente al 1,86% y 66 mujeres correspondiente al 17,06% presentaron ITU; observándose que el porcentaje de mujeres es mucho mayor al de los varones; el mismo que coincide con los datos del presente estudio a pesar de que el tipo de muestreo realizado fue diferente. (Espinoza, Michelli, & De Donato, 2005-2006)

En el mismo artículo *E. coli* fue la más reportada con un 36,37%, seguida de *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* con un 10,61% respectivamente para el caso de las

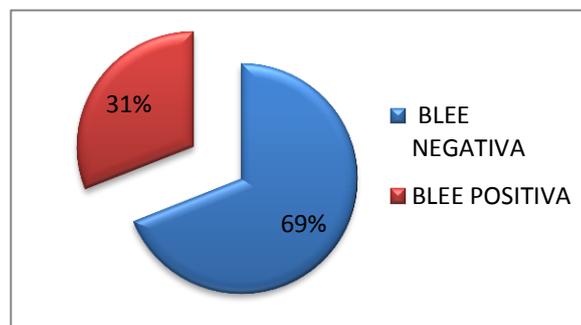
mujeres, cuyas cifras son similares al del estudio actual. Mientras que en el caso de los hombres este mismo artículo evidenció que debido a la diferencia de prevalencia entre mujeres y varones, al bajo número de casos en los últimos años y a las diferencias de factores de riesgo, los análisis posteriores solo se realizaron a participantes femeninas. (Espinoza, Michelli, & De Donato, 2005-2006)

Tabla 17. Distribución de cepas de Enterobacterias en relación a la producción de BLEE.

PRODUCCIÓN DE BLEE	NÚMERO DE CEPAS	PORCENTAJE
BLEE NEGATIVA	40	69%
BLEE POSITIVA	18	31%
TOTAL	58	100%

FUENTE: Registro de laboratorio

Gráfico 3. Distribución de cepas de Enterobacterias en relación a la producción de BLEE.



FUENTE: Registro de laboratorio

De acuerdo con el artículo “Detección de Betalactamasas de Espectro extendido en Cepas de la Familia *Enterobacteriaceae*” publicado en el año 2009 por Perozo Mena Armindo José y Castellano González, Maribel Josefina en Maracaibo-Venezuela indica: que de las 3883 cepas estudiadas se pudo confirmar la producción de BLEE en 951 muestras (24,49%) cepas de Enterobacterias;

mientras que en las 2932 cepas restantes, no se encontró evidencia de producción de BLEE. (Perozo Mena & Castellano González, 2009)

En la población estudiada en el presente trabajo se pudo verificar que de 144 muestras; 58 fueron identificadas parte de la familia de Enterobacterias, de las cuales 18 cepas fueron BLEE positivas con un porcentaje de 31%; y las 40 cepas restantes fueron BLEE negativas, con un 69% respectivamente, lo que coincide con la hipótesis planteada que tanto a nivel ambulatorio como hospitalario circulan cepas de Enterobacterias productoras de BLEE en el Hospital “José Carrasco Arteaga”.

Tabla 18. Sensibilidad de cepas de Enterobacterias productoras de BLEE frente a antibióticos comunes usados en Urocultivo.

NIÑO	NÚMERO DE MUESTRAS			PORCENTAJE		
	S	I	R	S	I	R
Antibiótico						
Nitrofurantoína	1	0	0	100%	0%	0%
Gentamicina	1	0	0	100%	0%	0%
Amoxicilina/A. clavulánico	1	0	0	100%	0%	0%
Norfloxacin	1	0	0	100%	0%	0%
Ampicilina	0	0	1	0%	0%	100%
ADULTO	NÚMERO DE MUESTRAS			PORCENTAJE		
Antibiótico	S	I	R	S	I	R
Nitrofurantoína	13	0	0	100%	0%	0%
Ciprofloxacina	11	0	2	85%	0%	15%
Amoxicilina/A. clavulánico	11	0	2	85%	0%	15%
Ampicilina	5	0	8	38%	0%	62%
ADULTO MAYOR	NÚMERO DE MUESTRAS			PORCENTAJE		
Antibiótico	S	I	R	S	I	R
Nitrofurantoína	4	0	0	100%	0%	0%
Gentamicina	4	0	0	100%	0%	0%
Ciprofloxacina	4	0	0	100%	0%	0%
Norfloxacin	4	0	0	100%	0%	0%

FUENTE: Registro de laboratorio

Niños:

La sensibilidad que presentan las diferentes cepas de Enterobacterias productoras de BLEE frente a otros antibióticos de segunda opción terapéutica para las ITU son relativamente buenas; es así que la Nitrofurantoína, Gentamicina, Amoxicilina/ A. clavulánico y Norfloxacin, presenta una sensibilidad del 100%; a excepción de la Ampicilina que presenta una resistencia del 100% por lo que este medicamento no sería eficaz para el tratamiento de ITU en los niños pertenecientes a este estudio.

Adultos

La Enterobacterias productoras de BLEE presentan una sensibilidad a la Nitrofurantoína del 100%, seguido de la Ciprofloxacina con un 85% de sensibilidad; siendo la Ampicilina el medicamento con mayor resistencia con un 62% respectivamente, lo que es poco probable que este medicamento sea una buena opción terapéutica para tratar las ITU en los adultos del presente estudio.

En un estudio realizado en Bogotá por Clara Varela en el 2008 con su tema “Comparación de la resistencia al tratamiento de las infecciones urinarias.” El porcentaje de resistencia a la Ciprofloxacina fue de un 89% a diferencia del 13% que se encontró en el presente estudio, por lo cual en nuestro medio sigue utilizándose como antibiótico de primera elección para las ITU. (Cires, Vergara, Machado , Borrero, & Breto, 2002) (Varela , 2008)

Adultos mayores

La Nitrofurantoína, Gentamicina, Ciprofloxacina, Norfloxacin resultan ser medicamentos óptimos con un 100% de eficacia frente a los patógenos causantes de ITU.

5. CONCLUSIONES

- En este estudio realizado se analizaron un total de 144 muestras de orina positivas para ITU de las cuales 58 (40,2%) cepas pertenecieron a la familia de Enterobacterias.
- De estas 58 cepas se continuó con el estudio determinando la producción de BLEE obteniendo un total de 18 cepas lo que corresponde al 31 % de las cepas de Enterobacterias, cumpliendo con la hipótesis propuesta inicialmente donde se demuestra que circulan cepas de Enterobacterias productoras de BLEE en el Hospital “José Carrasco Artega” de Cuenca.
- *Escherichia coli* (43%) presentó una prevalencia significativa en la población estudiada; seguida de *Klebsiella ozaenae* (19%), *Proteus mirabilis* (17%), *Enterobacter agglomerans* (14%), *Klebsiella pneumoniae* (3%) que se encuentran presentes en menor porcentaje.
- La sensibilidad de cepas de Enterobacterias productoras de BLEE a otros antibióticos empleados para ITU fue: a la Nitrofurantoína 100% Niños, Adultos y Adultos mayores, Norfloxacin y Gentamicina 100% Niños y Adultos mayores 100%, Ciprofloxacina 85% Adultos y 100% Adultos mayores, Amoxicilina + Ácido Clavulánico 100% Niños y 85% Adultos, finalmente Ampicilina 38% Adultos; los cuales resultarían antibióticos utilizados como alternativa para un tratamiento eficaz.



6. RECOMENDACIONES

- Determinar dentro de los cultivos de rutina la producción de BLEE de las cepas de Enterobacterias recuperadas.
- Realizar periódicamente estudios similares para observar si existen cambios en la prevalencia y comportamiento ante los antibióticos por parte de los microorganismos.
- Elaborar un correcto sistema de vigilancia hospitalaria para la detección temprana de aislamientos productores BLEE.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Cartagena , D., Centellas, K., & Saavedra , E. (2009). Contaminación Enterobacteriana. *Scielo*, 12(2).
- Famiglietti, A., Quinteros, M., Vázquez, M., Marín, M., Nicola, F., & Radice, M. (ene./mar. de 2010). Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en Enterobacteriaceae. *Scielo*, 37(1).
- García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Antonio Herrero1, J., & Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). *Scielo*, 24(2), 57-66.
- Marín , M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. 21(1), 42-55.
- Ocaña, A. C., Rocchi , M., & Gasparotto, A. (marzo de 2007). Bacteriemia por enterobacterias en adultos en un hospital universitario. *Revista Argentina de Microbiología*, 39 (1), 38-43.
- Oliver, A., & Cantón, R. (2010). Enterobacterias productoras de DE β -Lactamasas Plasmáticas de Espectro Extendido. *Seimc*, 1-7.
- Pino I, C., Domínguez Y., M., González R., G., Bello T., H., Sepúlveda, M., Mella, S., . . . Zemelman Z., R. (Abril de 2007). Producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). *Scielo*, 24(2).
- Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *FACMED*, 10(51), 3426-31.
- Aguilera, A. (1994). *Técnicas de Enfermería Clínica*. Madrid: Editex.
- Anunciata, C. E. (2012). *Medios de cultivos. Agar Sangre*. Obtenido de <http://www.laanunciataikerketa.com/trabajos/manoslimpias/medios.pdf>
- Ardila Medina , C. (abril de 2010). Efecto de las enterobacterias. *Scielo*, 22(1).
- Britania. (2 de 2010). *Medios de cultivos, Mueller Hinton Agar*. Obtenido de http://www.britanialab.com/productos/335_hoja_tecnica_es.pdf



- Cardona Arias, J. A., Mena Paz , D. M., & Higueta Gutiérrez, L. F. (25 de Febrero de 2014). Prevalencia de uropatógenos. *E- revistas*, 10(1).
- Cires, M., Vergara, E., Machado , O., Borrero, A., & Breto, A. (2002). Guía para la práctica clínica en infecciones del tracto urinario. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 18(2).
- Cristina Seral García , C., & Pardos de la Gándara, M. (2010). Recuperado el Domingo de Enero de 2015, de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Cué Brugueras, M., & Morejón García, M. (2008). Antibacterianos de acción sistémica. *Rev Cubana*, 14(4), 347-61.
- Echevarria Zarate, J. (Diciembre de 2008). *Estado actual de la resistencia bacteriana*. Obtenido de Revista diagnostico.
- Elmer W. Koneman, E., D. Allen, S., & Jan, W. (2000). *Diagnóstico microbiológico*. Madrid España: Medica Panamericana.
- Espinoza. (s.f.). Frecuencia y susceptibilidad antibiótica de Enterobacterias aisladas de Urocultivos.
- Espinoza, J., Michelli, E., & De Donato, M. (2005-2006). Frecuencia y susceptibilidad antibiótica de Enterobacterias aisladas de Urocultivos. *Salus online*, 33-41.
- Faddin, M. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica* (3ra ed.). Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana.
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico Microbiológico* (12 va ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Funke Case, T. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9na edición ed.). Estados Unidos : Medica Panamericana.
- Galeón, J., & Galeón, D. (Viernes de Julio de 2011). *Pruebas bioquímicas realizadas a Enterobacterias*. Recuperado el Domingo de Enero de 2015



- García Martos, P., Fernandez del Barrio, T., & Paredes Salino, F. (1997). *Microbiología Clínica Aplicada* (3ra ed.). Madrid-España: Diaz de Santos S.A.
- García, P. (2003). Resistencia bacteriana en Chile. *Rev Chil Infect*, 11 - 23.
- González Carrión, P., & La Fuente Lorca, J. (2001). *Técnicas y Procedimientos*. Barcelona: Masson.
- Jhong Olivera, M., Varela Pinedo , L., & Sialer Vildózola , L. (2000). Estudio Comparativo sobre infecciones intrahospitalarias Entre Adultos Mayores y Menores de 60 años. *Bvrevistas*, 13(4).
- León, C., & Pacheco, M. (2010). *Epidemiología de las Infecciones por Microorganismos productores de BLLEE*. Obtenido de http://biblioteca.uazuay.edu.ec/opac_css/index.php?lvl=author_see&id=8602.
- León, P., & Vasquez, G. (2013). 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” . Cuenca, Azuay, Ecuador.
- Lopez, W. (2010). *Estadística Inferencial*.
- Malbrán, C. (Enero). Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). 2014.
- Mandell , G., Bennett , J., & Dollin, R. (2006). *Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica*. (6TA Edición ed.). Churchill Livingstone: Elsevier.
- MAST. (2 de 2008). *Mueller Hinton Agar, interpretacion de resultados*. Obtenido de http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU335_SPA.pdf
- Medina Asensio, J. (2000). *Guía de Antimicrobianos y Tratamientos de las Infecciones* (2da ed.). Madrid- España: Diaz de Santos.
- Miñambres, M. D. (2011). *Estudio de la variabilidad e idoneidad de la prescripción de Antibióticos en las infecciones del tracto urinario*. Valladolid- España.



- Murcia Aranguren, M. (Marzo de 2008). Recuperado el Martes de Diciembre de 2014, de Identificación de Enterobacterias.
- Ochoa , S. (2005). Etiología de las infecciones del tracto urinario.
- Perea López, B., & Ruiz de Alegría Puig, C. (2010). *Indicaciones y Valoración clínica de Urocultivo*. España.
- Perozo Mena, A. J., & Castellano González, M. J. (Junio de 2009). “Detección de Betalactamasas de Espectro extendido en Cepas de la Familia Enterobacteriaceae”. *Scielo*, 37(1).
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica* (1ra ed.). Madrid-España: Medica Panamericana.
- Remington, A. (2003). *La Ciencia y Práctica de Farmacia* (20 va ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Reminthon, A. G. (2003). *Reminthon Farmacia*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (3ra ed.). México: Médica Panamericana.
- Ruiz, A., & Moreno Guillén, S. (2005). *Tratado de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid-España: Médica Panamericana.
- Rupp, M., & Fey , P. (2006). Enterobacterias Productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE). Diagnóstico, Prevención y Tratamiento Farmacológico. *Bago*, 63(4), 353-365.
- Sandrea-Toledo, L., Paz-Montes, A., Piña-Reyes, E., & Perozo-Mena, A. (junio de 2007). Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Scielo*, 35 (1).
- Santambrosio, E., Ortega, I. M., & Garibaldi, I. P. (2009). *Catedra de Biotecnología*. Obtenido de:
http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_ano/biotecnologia/practico4.pdf



Signorini , M. L., Jorge Sequeir , G. S., Julio César Bonazza, J., Dalla Santina , R., Martí , L. E., & Marcelo Raúl Rosmini, M. R. (Abril de 2008). Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias. *Scielo*, 18(2).

Varela , C. (2008). Comparación de la resistencia al tratamiento de las infecciones urinarias.



8. ANEXOS



ANEXO 1

Consentimiento informado

Yo _____ paciente o tutor legal del paciente
_____ con Cédula de Identidad
Nº _____ autorizo la utilización de la muestra de orina que he
dejado en el laboratorio para participar en el estudio **“PREVALENCIA DE
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORES DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO
EXTENDIDO “BLEE” PROVENIENTES DE UROCULTIVOS DE PACIENTES
AMBULATORIOS DEL HOSPITAL JOSÉ CARRASCO ARTEGA”**, teniendo en
cuenta que he sido informado/a claramente de que no existen riesgos que se
puedan presentar, sino todo lo contrario obtendré beneficios ya que al finalizar el
estudio seré informado/a de los resultados.

Al firmar este documento reconozco que lo he leído o que me ha sido leído y
explicado y que comprendo perfectamente su contenido. Se me han dado amplias
oportunidades de formular preguntas, las cuales han sido respondidas en forma
satisfactoria.

FIRMA DEL PACIENTE O TUTOR LEGAL: _____

ANEXO 2

INFORMACIÓN AL PACIENTE

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR: Si Ud. participa en este estudio nos facilitará muestras de la primera orina de la mañana, recogida correctamente como se indica a continuación:

NIÑAS Y MUJERES

- La paciente deberá lavarse sus partes íntimas con agua y jabón que no sea antiséptico antes de la recolección de la orina.
- Siéntese en el inodoro con las piernas separadas. Use dos dedos para separar y abrir los labios de la vagina. Utilice una toallita estéril para limpiar los pliegues internos de los labios.
- Manteniendo los labios vaginales separados y abiertos, orine una cantidad pequeña en la taza del inodoro y luego detenga el flujo de orina.
- Sostenga el recipiente estéril de la orina a unas cuantas pulgadas de la uretra y orine hasta que el recipiente esté medio lleno.
- Usted puede terminar de orinar en la taza del inodoro.

NIÑOS Y HOMBRES

- Limpie la cabeza del pene con una toallita estéril. Si no está circuncidado, necesitará retraer primero el prepucio.
- Orine una cantidad pequeña en la taza del inodoro y luego detenga el flujo de orina.
- Después, recolecte una muestra de orina dentro del recipiente limpio o estéril, hasta que esté medio lleno.

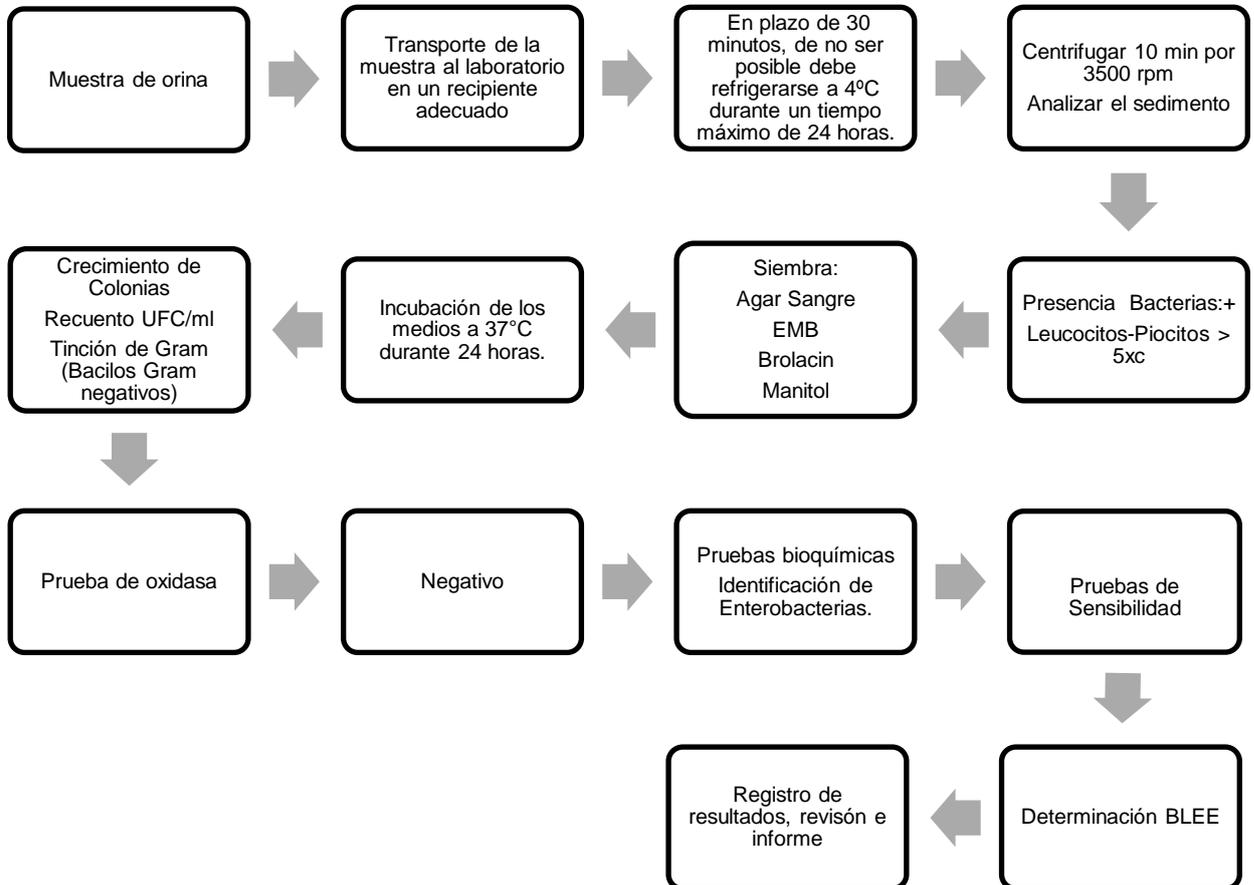


- Puede terminar de orinar en la taza del inodoro.

La muestra de orina debe ser llevada dentro de los primeros 30 minutos.

ANEXO 3

FLUJO GRAMA DE TRABAJO



ANEXO 4

- **Tinción de Gram**

El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Preparar y fijar los frotis bacterianos.
- Teñir con cristal violeta 1 minuto y lavar con abundante agua.
- Cubrir con Solución Yódica 1 minuto y lavar con abundante agua.
- Decolorar con alcohol-acetona durante 30 segundos y lavar con abundante agua.
- Teñir con Fucsina durante 1 minuto y lavar con abundante agua.
- Secar la preparación.
- Observar al microscopio con objetivo 100x, empleando aceite de inmersión. (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009)

- **Prueba de Oxidasa**

Se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomó del medio de cultivo de Agar Sangre una colonia aislada con la ayuda de un palillo de madera.
2. La colonia se coloca sobre la zona de la tira reactiva y se frota
3. Se espera 1 minuto para comparar con la escala colorimétrica
4. En el caso de gérmenes citocromo oxidasa-positivos la zona reactiva se colorea de azul a violeta azulado.
5. Si es citocromo oxidasa-negativo la zona reactiva es incolora y nos permite continuar con el estudio debido a que las Enterobacterias son oxidasa negativa. (Faddin, 2003)

FIGURA 10. Oxidasa positiva – Oxidasa negativa

Fuente: Tesis BLEE 2014-2015

- **Pruebas bioquímicas**

La mayor parte de las pruebas usadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de bacterias, se lleva a cabo mediante el subcultivo del aislamiento primario en una serie de medios diferenciales, cuyos resultados pueden interpretarse después de uno o dos días de incubación.

AGAR KLIGLER: La siembra se realizó con asa recta haciendo una punción central y a continuación una siembra en estría en la superficie inclinada.

AGAR LIA: La siembra se realizó con asa recta haciendo una punción central y a continuación una siembra en estría en la superficie inclinada.

AGAR CITRATO DE SIMMONS: La siembra se realizó con asa recta, solamente en superficie inclinada.

AGAR UREA: La siembra se realizó con asa recta, solamente en estría en la superficie inclinada.

AGAR SIM: La siembra se realizó con asa recta, por punción profunda. Inocular hasta el centro del tubo, abarcando 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. (Galeón & Galeón, 2011)

- **Prueba del Indol:** 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.

- **Motilidad:** se detectó por la presencia de turbidez alrededor del punto de inoculación. (Galeón & Galeón, 2011)

CALDOS MR-VP: La siembra se realizó en cada caldo con asa recta.

- **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.
- **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. (Galeón & Galeón, 2011)

ANEXO 5

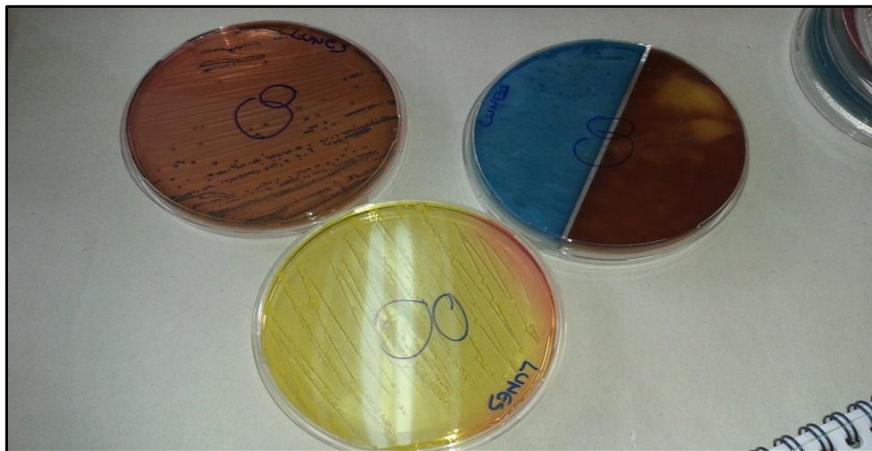
ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. Sangre de cordero para el medio agar sangre



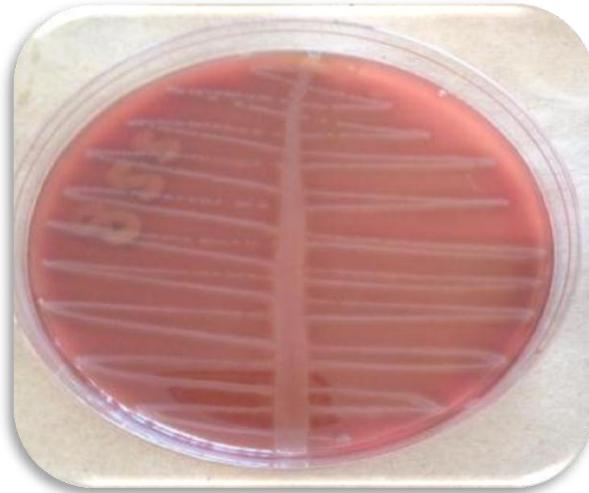
FUENTE: Registro de laboratorio

ILUSTRACIÓN 2. Medios agar Sangre, Brolacin, EMB, Manitol



FUENTE: Registro de laboratorio

ILUSTRACIÓN 3. Recuento de colonias en Agar Sangre



FUENTE: Registro de laboratorio

ILUSTRACIÓN 4. Colonias de Enterobacterias en Agar EMB



FUENTE: Registro de laboratorio

ILUSTRACIÓN 5. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Enterobacterias



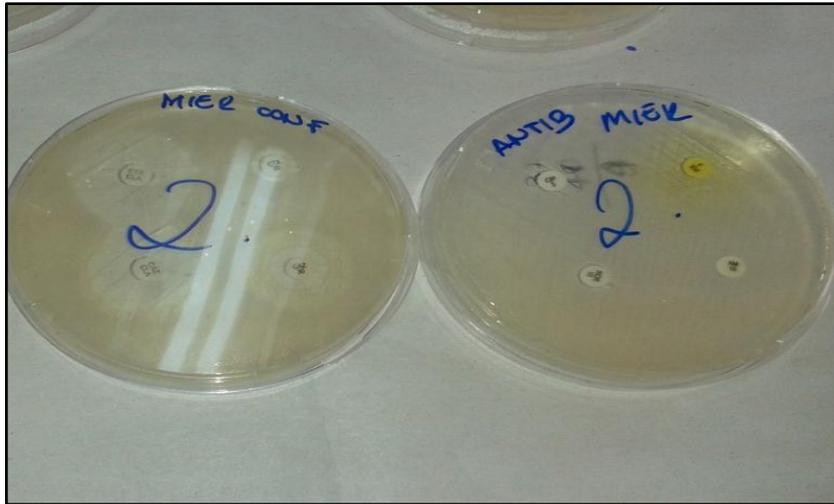
FUENTE: Registro de laboratorio

ILUSTRACIÓN 6. Prueba presuntiva para BLEE



FUENTE: Registro de laboratorio

ILUSTRACIÓN 7. Prueba confirmatoria de BLEE y prueba de sensibilidad con antibióticos de apoyo para una terapia antimicrobiana.



FUENTE: Registro de laboratorio