



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

TÍTULO

Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* causante de infección de vías urinarias en usuarios del Laboratorio Clínico MEDILAB-Loja

Tesis previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico

AUTORA:

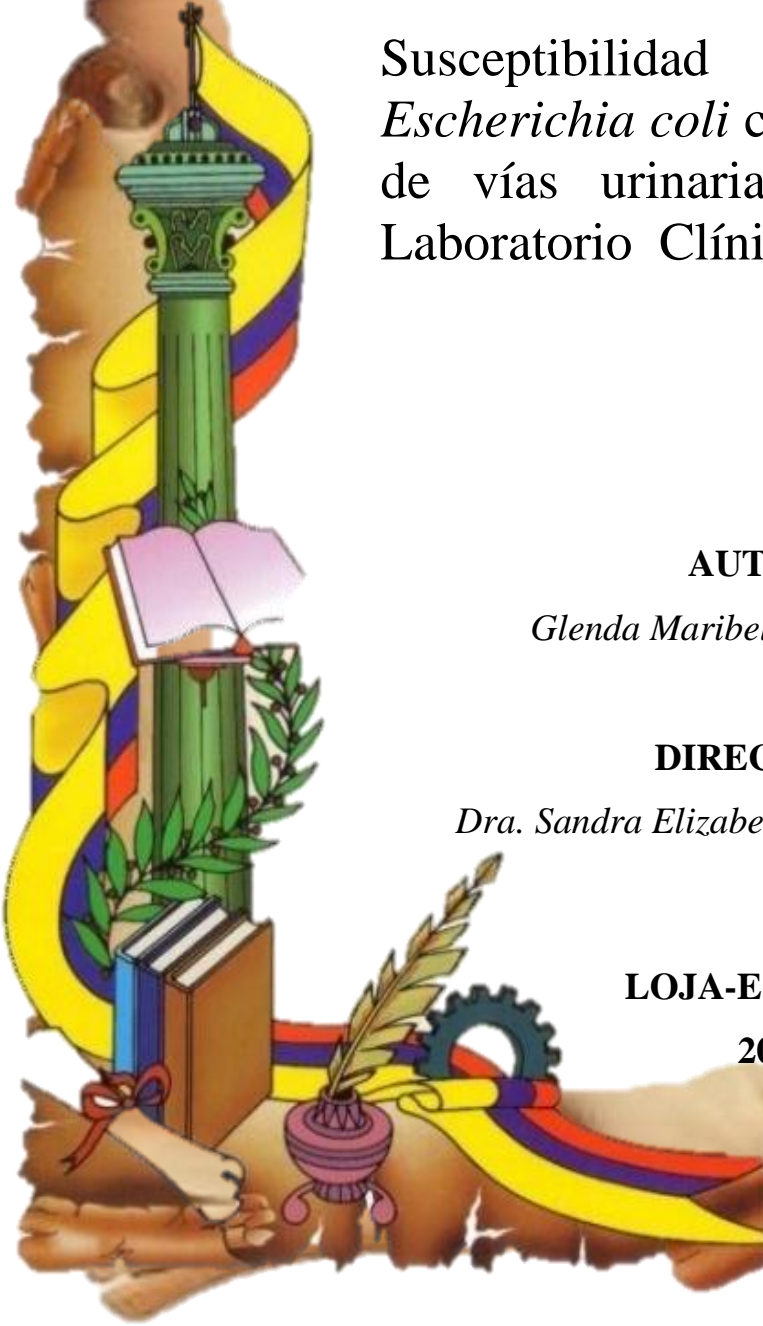
Glenda Maribel Morocho Marín

DIRECTORA:

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

LOJA-ECUADOR

2018



CERTIFICACIÓN

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada “**SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTE DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO MEDILAB-LOJA**”, de autoría de la Srta. Glenda Maribel Morocho Marín, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido supervisada y elaborada bajo mi dirección por lo que certifico que cumple con los requisitos establecidos por el Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja y una vez revisada autorizo su presentación ante el tribunal correspondiente.

Loja, 04 de Octubre del 2018

Atentamente,



.....

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Glenda Maribel Morocho Marín, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y se exime expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Glenda Maribel Morocho Marín

Firma: 

Cédula: 1900815695

Fecha: 04 de Octubre del 2018

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

Yo, Glenda Maribel Morocho Marín, declaro ser autora de la tesis titulada **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTE DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO MEDILAB-LOJA”**, como requisito para optar el grado de Licenciada en Laboratorio Clínico, autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, 04 del mes de Octubre del 2018

Firma: 

Autora: Glenda Maribel Morocho Marín

Cédula: 1900815695

Dirección: Celi Román

Teléfono: 0985898647

Correo Electrónico: glenda.morocho@unl.edu.ec

Datos complementarios:

Directora de tesis: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

Tribunal de Grado:

Presidenta de tribunal: Lcda. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc

Vocal: Lcdo. Marlon Rolando Bravo Bonilla, Mg. Sc

Vocal: Lcda. Gladys Margoth Jumbo Chuquimarca, Mg. Sc

DEDICATORIA

Este trabajo dedico a mi amigo leal Dios, por darme la vida y fortaleza necesaria para llegar al feliz término de mi carrera profesional, por mostrarme día a día que con humildad, paciencia y sabiduría todo es posible; a mis padres: Angel y Carmen quienes juntos me dieron palabras de aliento y me acompañaron a lo largo de mi vida estudiantil. A mis hermanos y toda mi familia por la confianza que depositaron en mí y que de alguna manera con sus palabras de motivación me han impulsado para lograr mis objetivos.

Quiero resaltar que el éxito alcanzado sirva de motivación y ejemplo de superación a Ashly y Nayeli

Glenda Maribel Morocho Marín

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos a Dios por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias en el transcurso de mi carrera universitaria. A mis padres por su apoyo incondicional, ser mi motivación y ejemplo a seguir.

A la Universidad Nacional de Loja, al Área de la Salud Humana, a la carrera de Laboratorio Clínico, especialmente a la planta docente por haber impartido sus sabios conocimientos durante toda esta trayectoria universitaria ayudando a cristalizar este sueño de ser profesional. A la Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, por su esfuerzo y dedicación, que con su conocimiento, experiencia y mística profesión me guio de mejor forma para culminar el presente trabajo de tesis.

Al Laboratorio Clínico MEDILAB por su colaboración brindada y la apertura para obtener las muestras para el desarrollo del proyecto de tesis y a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo para la realización del mismo.

A alguien en especial por acompañarme a lo largo de mi carrera universitaria y quien con su apoyo y motivación me impulsó a seguir luchando y demostrándome que nunca hay que dejar que los miedos ocupen el lugar de los sueños.

Glenda Maribel Morocho Marín

ÍNDICE

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE.....	vii
1. Título	1
2. Resumen	2
Summary.....	3
3. Introducción.....	4
4. Revisión de literatura.....	6
4.1. Infección de vías urinarias.....	6
4.1.1. Definición	6
4.1.2. Etiología	6
4.2. Género Enterobacteriaceae	7
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	7
4.2.1.1. Generalidades	7
4.2.1.2. Morfología	7
4.2.1.3. Taxonomía.....	8
4.2.1.4. Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	8
4.2.1.5. Estructura antigénica.	9
4.2.1.6. Susceptibilidad a los antibióticos	9
4.3. Antibióticos	10
4.3.1. Definición	10
4.3.2. Clasificación.	10
4.3.2.1. Según su efecto.	10
4.3.2.2. Según su espectro antibacteriano.....	10
4.3.2.3. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.....	10
4.3.2.3.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.	10
4.3.2.3.2. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas	13
4.3.2.3.3. Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.....	14
4.3.2.3.4. Antimetabolitos	14

4.3.2.3.5. Otros antibióticos.....	15
4.4. Resistencia bacteriana	15
4.4.1. Definición	15
4.4.2. Tipos de resistencia.	16
4.4.2.1. Resistencia natural.....	16
4.4.2.2. Resistencia adquirida.....	16
4.4.3 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	16
4.4.3.2 Alteración del sitio blanco del antibiótico.....	17
4.4.3.3 Alteración en las barreras de permeabilidad.....	17
4.4.3.4 Bombas de expulsión.....	17
4.4.4. Mecanismos de resistencia de <i>Escherichia coli</i>	17
4.5.Métodos de estudio de la susceptibilidad bacteriana	18
4.5.1 Métodos cualitativos.....	18
4.5.1.1 Método de disco difusión.	18
4.5.2 Métodos cuantitativos.....	19
4.5.2.1 Métodos de dilución.	20
4.5.2.1.1 Método de microdilución en caldo.	20
4.5.2.1.2 Método de macrodilución en caldo.	20
4.5.2.2 Método Épsilon Test.....	21
4.5.2. 3 Métodos Automatizados.	21
4.5.2.3.1 Vitek.	21
4.6. Criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad.....	22
4.7. Control de calidad en las pruebas de susceptibilidad.....	23
4.7.1. Control de calidad del medio Muller Hinton.....	23
4.7.1.1 Inóculo.....	23
4.7.1.2. Incubación.	23
4.7.1.3. Sensidiscos.	23
4.7.2 Cepas ATCC.....	24
5. Metodología.....	25
6. Resultados	28
7. Discusión	33
8. Conclusiones	37
9. Recomendaciones	38
10. Bibliografía.....	39
11. Anexos.....	44
12. Apéndices	85

1. Título

Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* causante de infección de vías urinarias en usuarios del Laboratorio Clínico MEDILAB-Loja

2. Resumen

Las infecciones del tracto urinario son causadas en su mayoría por la bacteria *Escherichia coli* y cada vez se va tornando más resistente a los antibióticos por el uso indiscriminado de los mismos lo cual favorece la creación, adaptación y diseminación de mecanismos de resistencia llegando a convertirse en un problema de salud pública. El presente estudio descriptivo y de corte transversal denominado susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* causante de infección de vías urinarias en usuarios del laboratorio clínico MEDILAB-Loja; tuvo como objetivo identificar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana y determinar las cepas resistentes de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido según edad, sexo y área de servicio de salud. La muestra estuvo conformada por 44 cepas aisladas de *Escherichia coli*. La susceptibilidad se la determinó por el método manual Kirby Bauer de acuerdo a los protocolos establecidos. La sensibilidad antibiótica de *E.coli* presento mayores porcentajes a carbapenémicos 100%, Cefoxitina 91%, Nitrofurantoína 86%, Amikacina 80%, Ceftazidime 61% y los mayores porcentajes de resistencia a Ciprofloxacina 57%, Cefazolina 43%, Trimetropim-Sulfametoxazol 42%, La resistencia a la cefalosporinas de tercera generación mostró el patrón de resistencia BLEE que fue confirmada por el método de sinergia y combinación de discos. Para garantizar el control de calidad se utilizó muestras ATCC 25922 y 700603 así como protocolos de referencia internacionales.

Palabras claves: Susceptibilidad antimicrobiana, *Escherichia coli*, Método Kirby Buer.

Summary

Urinary tract infections are caused mostly by the bacterium *Escherichia coli* and each time it becomes more resistant to antibiotics due to the indiscriminate use of them which favors the creation, adaptation and dissemination of resistance mechanisms, becoming a public health problem. The present quantitative, descriptive and cross section study called antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* causing urinary tract infection in users of the "MEDILAB" clinical laboratory; the objective of this study was to identify the antimicrobial susceptibility profile and determine the resistant strains of *Escherichia coli* that produce extended-spectrum beta-lactamases according to age, sex and health service area. The sample consisted of 44 strains isolated from *Escherichia coli*. Susceptibility was determined by the Kirby Bauer manual method according to established protocols. The antibiotic sensitivity of *E. coli* showed higher percentages of carbapenems 100%, Cefoxitin 91%, Nitrofurantoin 86%, Amikacin 80%, Ceftazidime 61% and the highest percentages of resistance to Ciprofloxacin 57%, Cefazolin 43%, Trimetropim-Sulfamethoxazole 42%, Resistance to third-generation cephalosporins showed the BLEE resistance pattern that was confirmed by the synergy and disk combination method. To ensure quality control samples were used ATCC 25922 and 700603 as well as international reference protocols.

Key words: Antimicrobial susceptibility, *Escherichia coli*, Kirby Buer method.

3. Introducción

En la salud pública las infecciones del tracto urinario se estima que alrededor de 150 millones de casos se dan al año generando gasto económico en los cuidados de la salud, los principales organismos causales pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y dentro de este grupo el 70 y 95% son producidos por *Escherichia coli* adquiridas en la comunidad mientras que la mitad de estos casos se generan en un ambiente hospitalario (Guevara et al., 2015). En los últimos años se ha observado un aumento de las tasas de resistencia de estos uropatógenos frente a los antibióticos considerados de primera línea, jugando un papel importante en la presión selectiva producida por el uso indiscriminado de estos antimicrobianos (Galván, Agapito, Bravo, Lagos, & Tamariz, 2016).

Escherichia coli es una bacteria gramnegativa que ha desarrollado una serie de mecanismos de resistencia antimicrobiana principalmente a antibióticos betalactámicos presentes en los esquemas terapéuticos de las infecciones urinarias, esta resistencia se puede producir por varios mecanismos, el más común es la hidrólisis enzimática por producción de betalactamasas de espectro extendido capaces de conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda, tercera e inclusive de cuarta generación (Jiménez-Guerra, Hoyos-Mallecot, Rodríguez-Granger, Navarro-Marí, & Gutiérrez-Fernández, 2016).

En España revelan que la frecuencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido se encuentra entre el 5-10%, variando el porcentaje según la zona geográfica y aproximadamente un 60% es de procedencia extrahospitalaria y de infecciones urinarias (García, 2013).

En Latinoamérica Zúñiga et al., (2016) señala que en Honduras la sensibilidad reportada de *Escherichia coli* a los antibióticos aminoglucósidos, y cefalosporinas está por encima del 60%, y presenta una resistencia importante a trimetropim-sulfametoxazol y quinolonas como ciprofloxacina. Nocua-Báez et al., (2017) menciona que en Colombia el 13,8% de las cepas aisladas de *E.coli* son resistentes a las cefalosporinas de tercera generación y de este el 6,9 % expresan el mecanismo de resistencia BLEE.

Datos disponibles de la Red Nacional de Resistencia Bacteriana del Ecuador conformada por 22 hospitales coordinados por el Instituto de Investigación en Salud Pública INSPI, en el 2014 mencionan que la resistencia de *Escherichia coli* a las cefalosporinas de tercera generación fue del 37%, a fluoroquinolonas el 50%, carbapenemicos 2%, aminoglucósidos 30%. Sin embargo no existe datos fidedignos sobre los mecanismos de resistencia dada a la poca importancia por parte del personal de salud la cual ha permitido que se siga propagando especialmente en la comunidad (Reyes, Villacís, Vasquez, & Cartelle, 2014).

Considerando que *Escherichia coli* es la causa más frecuente de infección urinaria y ser un microorganismo capaz de generar mecanismos de resistencia se realizó la presente investigación titulada: Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* causante de infección de vías urinarias en usuarios del Laboratorio Clínico MEDILAB-Loja, con el propósito de identificar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas y determinar las cepas resistentes de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido según edad, sexo y áreas de servicio de salud del que provienen las muestras mediante el antibiograma Kirby Bauer.

A su vez estos datos servirán como indicador para conocer el porcentaje de sensibilidad y resistencia bacteriana a los antimicrobianos en nuestra área de estudio y encontrar mecanismos de resistencia como es la producción de betalactamasas de espectro extendido.

Al finalizar la presente investigación se determinó que de las 44 cepas aisladas de *Escherichia coli* los mayores porcentajes de sensibilidad antibiótica se presentaron al 100% a carbapenémicos, el 39% de las cepas de *E.coli* fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido las mismas que presentaron halos de inhibición < 22 mm para las cefalosporinas de tercera generación.

Los resultados confirman la emergencia del surgimiento de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido la cual es similar a datos obtenidos en diferentes estudios a nivel de Latinoamérica donde la resistencia está asociada por el uso de antibióticos de amplio espectro provocando un problema de difícil solución con el aumento de fracasos terapéuticos.

4. Revisión de literatura

4.1. Infección de vías urinarias

4.1.1. Definición. La infección del tracto urinario consiste en la colonización y multiplicación microbiana, generalmente bacteriana a cualquier órgano de las vías urinarias (riñón, uréteres, vejiga o uretra); la presencia bacteriana causa un proceso inflamatorio y puede presentarse clínicamente como:

- Bacteriuria asintomática: si las bacterias se encuentran en la orina y no producen síntomas
- Cistitis aguda: si la infección se localiza en la vejiga y produce micciones frecuentes, con urgencia y ardor
- Pielonefritis: si afecta al riñón y pelvis renal
- Prostatitis: si la infección se localiza en la próstata (MSP, 2014).

Las infecciones urinarias son más frecuentes en las mujeres con edad entre 20 y 56 años, se estima que entre el 40 y 50% de las mujeres presenta una infección a lo largo de su vida, lo que se relaciona con la posición anatómica en donde la longitud de la uretra es más corta que la del hombre, aspectos que aumentan el riesgo de infección por enterobacterias. En el hombre las infecciones urinarias tienen dos picos de incidencia uno durante el primer año de vida y en mayores de 50 años, en relación con la presencia de patología prostática (Orrego- Marín, Henao-Mejía, & Cardenas-Arias, 2014).

4.1.2. Etiología. La vía de infección urinaria casi siempre es ascendente, a partir de bacterias procedentes del intestino que se encuentran en el área perineal y asciende por la uretra hasta la vejiga. Las condiciones favorables para que se produzca una infección urinaria depende de la capacidad de la bacteria para adherirse al tracto urinario y la habilidad del huésped para activar una respuesta inmune. La causa principal de las infecciones urinarias se genera del 70-90% de los casos por la bacteria *Escherichia coli* uropatogenica, esta cepa tiene en su superficie factores de adherencia como fimbrias que facilitan la unión con la mucosa vesical y por lo tanto mayor capacidad para desarrollar una infección urinaria. Otras bacterias de origen fecal que ocasionalmente también causan

infecciones son *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis*, otros bacilos entéricos gramnegativos y *Enterococos* (Oconitrillo Chaves, 2016).

4.2. Género Enterobacteriaceae

La familia Enterobacteriaceae es un grupo extenso y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Son microorganismos ubicuos que se encuentran en el suelo, agua, vegetación, su hábitad natural es el intestino del ser humano y de los animales. Las bacterias de esta familia presentan características en común como ser microorganismos aerobios o anaerobios facultativos, móviles o inmóviles por flagelos peritricosos, poseen una estructura antigénica compleja y otros factores de virulencia (Castro, 2014).

Dentro de esta familia se reconocen algunos géneros diferentes como *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Providencia*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*. *Escherichia coli* es el microorganismos más prevalente de esta familia, es el principal agente etiológico de infecciones urinarias, tanto en pacientes internados como ambulatorios ya que poseen fimbrias capaces de adherirse al epitelio urinario y colonizarlo (Brooks, Carroll, & Butel, 2011).

4.2.1. *Escherichia coli*.

4.2.1.1. Generalidades. Es una de las especies más estudiadas forman parte de la familia Enterobacteriaceae Romero Cabello (2007) señala que es la bacteria más constantemente encontrada en la materia fecal del hombre y de especies animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en la calidad de saprobio sin causar daño, puede ser agente etiológico de trastornos gastrointestinales graves en niños menores de 3 años y producir infecciones de heridas, vías respiratorias, meningitis y urogenitales (pág. 753).

4.2.1.2. Morfología. Morfológicamente es un bacilo gramnegativo, corto y grueso de 1 a 4 micras de largo por 0.4 a 0.8 micras de ancho, posee una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y aerobio facultativo, con flagelos peritricosos. La mayoría forma fimbrias y pilis, no capsulado, no fabrican esporas. Fermentan la glucosa y lactosa, es positiva al indol, descarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa. Tienen información genética en los plásmidos, que son responsables de la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos (Romero Cabello, 2007).

4.2.1.3 Taxonomía.

- Reino: *Protista procariota*
- Filo: *Proteobacteria*
- Clase: *Gamma proteobacteria*
- Orden: *Enterobacteriaceae*
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Escherichia*
- Especie: *E.coli* (Alvarado, Guzmán, & Saquipay, 2011, pág. 15).

4.2.1.4 Clasificación de *Escherichia coli*.

- **Enteropatógena (EPEC):** causa diarreas acuosas, infecta el intestino delgado y es un patógeno frecuente de diarreas infantiles.
- **Enteroinvasiva (EIEC):** afecta a la mucosa del colón, produce evacuaciones sanguinolentas con dolor abdominal tipo cólico y fiebre en todas las edades.
- **Enterohemorrágico (EHEC):** produce colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.
- **Enteroagregativa (EAEC):** es una causa frecuente de diarrea del viajero y diarrea aguda y crónica en los lactantes, produce diarrea acuosa, mucoide, fiebre de baja intensidad y raramente vomito.
- **Enterotoxigénica (ETEC):** causa la diarrea del viajero en niños con edad inferior a 5 años en países en vías de desarrollo, estas infecciones tienen lugar cuando un individuo que reside en una región libre de ETEC viaja a una zona endémica y consume agua y alimentos contaminados. Produce diarrea acuosa, infecta el intestino delgado.
- **Uropatogénico:** Causa infecciones del tracto urinario comienza con la colonización de la uretra por cepas originarias del colon previa colonización de la vagina (Vila Estapé & Zboromyrska, 2012).

4.2.1.5. Estructura antigénica.

- **Antígeno O:** constituye la parte más extensa del lipopolisacárido de la pared celular, son resistentes al calor y alcohol. Los antígenos O específicos de *E.coli* se detectan en la diarrea y en las infecciones del sistema urinario.
- **Antígeno K:** está presente solo en algunas bacterias capsuladas como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, algunos son polisacáridos y producen la adherencia de las bacterias a las células epiteliales antes de la invasión al tubo digestivo o del sistema urinario.
- **Antígeno H:** están situados en los flagelos, es proteico, es específico de especie y está presente solo en las especies móviles (Brooks, Carroll, & Butel, 2011, pág. 216).

4.2.1.6. Susceptibilidad a los antibióticos. Las cepas de *Escherichia coli*, como otras bacterias gramnegativas, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas y ácido fusídico. Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *Escherichia coli* son la amoxicilina, amoxicilina / ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglucósidos, Trimetropim Sulfametoxazol y quinolonas. Sin embargo, la capacidad de *Escherichia coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que ésta debe determinarse siempre mediante antibiograma.

Resistencia adquirida a los aminoglucósidos, betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas y Trimetropim se ha descrito para cepas de *E. Coli* por tres mecanismos distintos: alteración de diana, inactivación enzimática, menor acumulación intracelular del antimicrobiano. Del 40 a 90% las cepas *Escherichia coli* son resistentes a la ampicilina y sulfamidas. Del 15 al 30% resistentes a cefalosporinas de primera generación y quinolonas. En menores tasas de resistencia se dispone de amoxicilina-acido clavulánico, amikacina, cefalosporinas de 2 y 3 generación (Faleiro Naves, 2010, pág. 39).

4.3. Antibióticos

4.3.1. Definición. Es cualquier sustancia química producida por un microorganismo que desarrolla una actividad antimicrobiana, su origen puede ser natural si se obtiene de cultivos de microorganismos como hongos y bacterias o semisintéticos a partir de un agente obtenido de forma natural, se modifica algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables (Paredes & Roca, 2004).

4.3.2 Clasificación.

4.3.2.1. Según su efecto.

- **Bactericidas.** Provocan la muerte de las bacterias, por lo que su efecto es irreversible (Penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, glucopéptidos, quinolonas, rifampicina, polimixinas)
- **Bacteriostáticos.** Bloquean el desarrollo y multiplicación de las bacterias, pero no las destruye, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse (tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, lincosaminas, sulfamidas, trimetropim (Turrado, 2016).

4.3.2.2. Según su espectro antibacteriano.

- **De amplio espectro.** Son activas contra múltiples grupos de gérmenes
- **Espectro reducido.** Agentes que actúan solo contra un escaso grupo de gérmenes (Gamazo de la Rasilla, Sánchez, & Camacho, 2013).

4.3.2.3. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.

4.3.2.3.1. *Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.* El principal componente estructural de la mayoría de las paredes de las células bacterianas es la capa de peptidoglucano que consta de moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que se entrecruzan con puentes peptídicos creando una malla rígida que recubre la bacteria, este entrecruzamiento están catalizados por enzimas llamadas proteínas de unión a la penicilina (PBP) pertenecientes a la familia serina proteasas. Cuando las bacterias en

crecimiento quedan expuestas, el antibiótico en cuestión se une a PBP específicas de la pared celular bacteriana e inhiben el ensamblaje de las cadenas de peptidoglucano. Esto a su vez activa autolisinas que degradan la pared celular, lo que da lugar a la muerte de la célula bacteriana. Así los antibióticos betaláctámicos actúan como bactericidas. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2017).

Antibióticos betalactámicos. Petri (2007) señala que son antibióticos de gran utilidad que se prescriben a menudo, comparten una estructura común y el mismo mecanismo de acción, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana formado por peptidoglucano. Se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes:

- **Penicilinas.** El espectro de las penicilinas está dirigido a bacterias gram positivas no productoras de β -Lactamasas, algunas bacterias gramnegativas fastidiosas aeróbicas y algunos anaerobios. Las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina) poseen actividad frente a otras especies de bacterias gramnegativas, incluyendo miembros de la familia Enterobacteriaceae. La actividad de la ampicilina contra los bacilos gramnegativos se limita a especies de *Escherichia coli*, *Proteus* y *Haemophilus*. (Malbran, 2012)
- **Inhibidores de betalactamasas.** Los inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) son relativamente inactivos por sí mismos, pero, cuando se combinan con algunas penicilinas (es decir ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina), son eficaces en el tratamiento de algunas infecciones causadas por bacterias productoras de betalactamasas. Los inhibidores se unen irreversiblemente a las betalactamasas bacterianas susceptibles y las inactivan lo que permite que el fármaco acompañante desestructure la síntesis de la pared celular bacteriana. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2017).
- **Cefalosporinas.** Constituyen el segundo grupo de derivados de los betalactámicos, poseen mayor actividad contra bacterias gramnegativas que las penicilinas, esta actividad varía entre las diferentes generaciones.
 - **Primera generación.** cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefradina. Actividad de corto espectro, queda restringida a especies de *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis* y cocos grampositivos sensibles a la oxacilina.

- **Segunda generación.** cefaclor, cefuroxime, cefoxitina. Son moléculas con mayor resistencia frente a las betalactamasas lo que les confiere actividad frente a algunas enterobacterias.
 - **Tercera generación.** cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, ceftibutén. Son de amplio espectro activas frente a la mayoría de enterobacterias y *Pseudomona aeruginosa*
 - **Cuarta generación.** cefepima, cefpiroma. Son moléculas similares a las de tercera generación pero con mayor estabilidad frente a las betalactamasas (Gómez, García & Hernández, 2015).
- **Carbapenémicos.** Los carbapenémicos (Imipemen, meropenem, ertapenem) son betalactámicos de amplio espectro, poseen acción bactericida y es activo sobre la mayoría de aislamientos de enterobacterias incluyendo las cepas productoras de betalactamasas (Campero, Figueredo, Correa, & Torres, 2016, pág. 2)
 - **Monobactámicos.** (Aztreonam) el único monobactámico disponible para uso clínico, son de corto espectro activos solo contra bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. El Aztreonam se emplea en el tratamiento de las infecciones urinarias (Marín & Gudiol, 2003, pág. 47)

Glucopéptidos. La vancomicina, es un glucopéptido que desestructura la síntesis de peptidoglucano de la pared celular en las bacterias grampositivas en crecimiento. Se emplea en el tratamiento de las infecciones causadas por estafilococos resistentes a la oxacilina y otras bacterias grampositivas resistentes a los antibióticos betalactámicos, es inactiva contra las bacterias gramnegativas, porque la molécula es demasiado grande y no puede pasar a través de los poros de la membrana externa y alcanzar el sitio diana del peptidoglucano (Carcoma, Rua, & Del Pozo, 2016).

Lipopéptidos. La daptomicina posee una actividad contra cepas multirresistentes de estafilococos, estreptococos y Enterococos (incluidas cepas resistentes a la vancomicina). Murray, Rosenthal & Pfaller (2017) “Posee una potente actividad contra las bacterias grampositivas, pero las bacterias gramnegativas son resistentes porque el fármaco no puede penetrar a través de la pared celular a la membrana citoplasmática” (pág. 166)

4.3.2.3.2. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas.

Aminoglucósidos. Se consideran bactericidas, ejercen su acción al pasar a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas hasta el citoplasma en donde inhiben la síntesis de proteínas ribosómicas 30S. Son activos frente a bacterias gramnegativas y algunas grampositivas. Los aminoglucósidos empleados con mayor frecuencia y que se utilizan para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas sensibles son amikacina, gentamicina y tobramicina.

- Amikacina. Utilizado para tratar infecciones por bacilos gramnegativos, se consideran de primera elección para tratar infecciones que no se ha obtenido respuesta con gentamicina o tobramicina (Calvo & Martínez, 2009)

Tetraciclina. Antibiótico bacteriostático de amplio espectro que inhibe la síntesis proteica bacteriana. Actúa sobre bacilos y cocos grampositivos y bacilos gramnegativos (*H.influenzae*, *Brucella*, *Legionella pneumophyla*) así como sobre Rickettsia, Mycoplasma, Chlamydia y Espiroquetas (Quizhpe, 2014, pág. 40)

Macrólidos. claritromicina, eritromicina, azitromicina), Son antibióticos bacteriostáticos con un amplio espectro de actividad. Son eficaces contra infecciones respiratorias causadas por algunos gérmenes gramnegativos, micobacterias y especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Legionella*, así como en el tratamiento de infecciones causadas por especies de *Campylobacter* y bacterias grampositivas en pacientes alérgicos a la penicilina (Hernández, 2008).

Oxazolidinonas. Linezolid es el único fármaco disponible de uso clínico en humanos. Inhibe la síntesis proteica ribosómica bacteriana. Es activo frente la mayoría de los grampositivos de importancia clínica como *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Es inefectivo frente a gérmenes gramnegativos a excepción de *N. meningitidis* y *H. influenzae* (Calvo, 2017).

Estreptograminas. Las estreptograminas incluyen al quinupristín-dalfopristin y linopristin-flopristin, son una combinación de dos péptidos cíclicos producidos por *Streptomyces ssp*. Ellos actúan en forma sinérgica para inhibir la síntesis de proteínas, este fármaco en combinación es activo contra *estafilococos*, *estreptococos* y *E. faecium* (Malbran, 2012).

4.3.2.3.3. *Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.*

Quinolonas. Son agentes quimioterapéuticos sintéticos que interactúan con dos sitios diferentes pero relacionados dentro de la célula bacteriana inhibiendo la topoisomerasa II (ADN girasa) o la topoisomera IV, que se requiere para la replicación, recombinación y reparación del ADN. La ADN girasa es más sensible a la acción de las quinolonas por gérmenes gramnegativos y la topoisomerasa IV es la principal diana en las bacterias grampositivas (Alvarez-Hernández, Garza-Mayen, & Vázquez- López, 2015) Las quinolonas se clasifican en:

- **Quinolonas de primera generación.** Ácido nalidíxico. activas contra bacilos gramnegativos especialmente enterobacterias: *E. Coli*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Serratia* excepto *Pseudomonas spp*. Solo se usa para tratar infecciones del tracto urinario.
- **Quinolonas de segunda generación.** Ciprofloxacino, norfloxacina. Actúan sobre los mismos gérmenes del grupo anterior más *Pseudomonas ssp*, *Neisseria ssp* y *micobacterias*
- **Quinolonas de tercera generación.** Levofloxacina, gatifloxacina. Son bactericidas y de amplio espectro tienen actividad contra bacterias grampositivas y negativas así como también microorganismos como *Chlamydia* y *Mycoplasma*.
- **Quinolonas de cuarta generación.** Moxifloxacina, gatifloxacina. Son bactericidas y activas frente a muchos patógenos grampositivos y negativos, por su amplia concentración a nivel pulmonar son activas en patología respiratoria (Alvarez-Hernández, Garza-Mayen, & Vázquez- López, 2015).

4.3.2.3.4. *Antimetabolitos.* Las sulfamidas son antimetabolitos que compiten con el ácido p-aminobenzoico, con lo que se previene la síntesis del ácido fólico requerido por ciertos microorganismos. La trimetropina es otro antimetabolito que interfiere con el metabolismo del ácido fólico al inhibir la dihidrofolato reductasa, con lo que se previene la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato lo cual repercute sobre la síntesis nucleotídica con la consiguiente inhibición del crecimiento bacteriano. La combinación trimetroprima-sulfametoxazol es eficaz contra una gran variedad de microorganismos grampositivos y gramnegativos y es el fármaco de elección para el tratamiento de las

infecciones agudas y crónicas del tracto urinario causado por bacterias sensibles como *Escherichia coli* (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2017).

4.3.2.3.5. Otros antibióticos.

Nitrofurantoína. Se utiliza específicamente para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario. Inhibe la acetil coenzima A bacteriana, interfiriendo con el metabolismo de los carbohidratos e impidiendo la formación de la pared celular. Es bacteriostática, pero en altas concentraciones puede ser bactericida frente a determinados microorganismos. Son sensibles a la nitrofurantoína *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter*, *Staphylococcus epidermis*. Los *Enterobacter* y *Klebsiella* requieren dosis más altas y algunas cepas pueden ser resistentes (Apaza, 2016).

Fosfomicina. Es un antibiótico bactericida activo frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos, incluidas cepas productoras de penicilinasas y los patógenos más comunes en las vías urinarias, como *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Inhibe la síntesis de la pared bacteriana impidiendo la formación de ácido N-acetilmurámico (precursores del peptidoglucano) por inhibición de la enzima enolpiruvato-transferasa con la correspondiente inactivación de la bacteria (Robino, Pardo, & Speranza, 2017).

4.4. Resistencia bacteriana

4.4.1. Definición. Se la define como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en presencia de un compuesto tóxico como los antibióticos, permitiendo que las bacterias se multipliquen en presencia del fármaco. Esta capacidad de resistencia bacteriana cobra importancia por su efecto en el control de enfermedades y su impacto en las limitaciones terapéuticas, restringiendo la capacidad de fármacos disponibles, prolongando estadías de hospitalización, aumentando costos médicos e incluso generando mortalidad.

El ampliado uso de antibióticos ha creado una presión selectiva que se ha reconocido como la base de la emergencia de resistencia adaptativa. Así esta resistencia antibiótica es el resultado de modificaciones estructurales y características funcionales propias del microorganismo o características adquiridas en respuesta al estrés sufrido por una presión selectiva (Troncoso, Pavez, Santos, Salazar, & Barrientos, 2017).

4.4.2. Tipos de resistencia.

4.4.2.1. Resistencia natural. Es el resultado del estado normal, genético, estructural o fisiológico de un microorganismo que se desarrolla en forma natural en ausencia de mecanismos de presión de selección antimicrobiana, es decir no hay exposición previa a los antibióticos (Forbes, Sahm, Weissfeld, & Trevino, 2009).

4.4.2.2. Resistencia adquirida. Es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). Son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos (Forbes, Sahm, Weissfeld, & Trevino, 2009).

- **Mutación.** Los descendientes heredan esta característica y con el tiempo, esta resistencia se difunde entre otras bacterias de la misma especie.
- **Adquisición de genes.** Se debe a la adquisición de material genético a través de elementos móviles como plásmidos, transposones o secuencia de inserción a través de fagos. Se denomina resistencia transmisible, ya que el microorganismo que se han hecho resistentes pueden transmitir este mecanismo a otros sin necesidad de que sean sus descendientes (Gamazo de la Rasilla, Sánchez, & Camacho, 2013).

4.4.3 Mecanismos de resistencia bacteriana. Existen básicamente tres mecanismos por el cual las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico.

4.4.3.1 Modificación enzimática del antibiótico. Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad, las β -lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico, como resultado la célula es resistente a la acción de los medicamentos β -lactámicos. Estos antibióticos entran a la célula a través de las porinas y encuentran a las β -lactamasas en el espacio periplásmico. Las β -lactamasas destruyen las moléculas betalactámicas, esto evita que dichos antibióticos puedan unirse a las proteínas transportadoras (PBP) y de esta forma impedir la formación de la pared bacteriana, por lo que no se logra la lisis bacteriana. (Pérez & Robles, 2013).

4.4.3.2 Alteración del sitio blanco del antibiótico. Consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales. Un ejemplo, la modificación por mutación de los genes que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofrecen resistencia bacteriana a *E.coli* frente a quinolonas o las PBPs tanto en bacterias grampositivas y negativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los betalactámicos no puedan unirse a ellas; por lo tanto la célula es resistente agentes antimicrobianos (Moreno, González, & Beltrán, 2009, pág. 187).

4.4.3.3 Alteración en las barreras de permeabilidad. Este mecanismo se debe a alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana como la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana. La penetración de antimicrobianos a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas puede tener lugar a través de las porinas (canales hidrófilicos). La pérdida de una o más porinas o su modificación estructural haciéndolas más estrechas disminuye la penetración de los antimicrobianos. (Pérez & Robles, 2013).

4.4.3.4 Bombas de expulsión. En la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo proveen resistencia antimicrobiana tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembranales. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra. Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, betalactámicos (Pérez & Robles, 2013).

4.4.4. Mecanismos de resistencia de *Escherichia coli*.

- **β -lactamasas de espectro extendido (BLEE):** estas enzimas confieren resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, el aztreonam, las penicilinas y las cefalosporinas de espectro reducido. Por el contrario, son incapaces de hidrolizar cefamicinas como cefoxitina y carbapenem. Las BLEE son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas. Se han descrito varias familias de BLEE, y las más prevalentes son las TEM, SHV y CTX-M. Una característica importante es que son

mediadas por plásmidos, lo cual les confiere una increíble capacidad de diseminación entre diferentes especies. Además, en el mismo plásmido que porta los genes de BLEE, pueden encontrarse genes que codifican resistencia para aminoglucósidos y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual puede contribuir a la resistencia de múltiples antibióticos (Pineda, Tzoc, Rivera, Herrera, & Moncada, 2017, pág. 53).

4.5. Métodos de estudio de la susceptibilidad bacteriana

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana a los antibióticos se ha convertido en uno de los procedimientos de rutina en la práctica clínica y la información generada a partir de ellas es primordial para la vigilancia de los diferentes perfiles de susceptibilidad y la detección de nuevos mecanismos de resistencia; por lo tanto la selección del agente antimicrobiano más adecuado para las pruebas de susceptibilidad y el informe médico es una decisión importante que debe tomarse en el laboratorio para disminuir la resistencia bacteriana y lograr el uso adecuado de los antibióticos (López, 2013).

4.5.1 Métodos cualitativos.

4.5.1.1 Método de disco difusión.

4.5.1.1.1 Fundamento. Es un método cualitativo que consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Muller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en el antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Brooks, Carroll, & Butel, 2011, pág. 347).

4.5.1.1.2 Técnica.

- Funda el medio de cultivo y déjelo enfriar a 45-50 °C
- vierta sépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa petri, para obtener una capa de 4 mm de espesor
- deje solidificar el medio de cultivo y luego seque las placas durante 30 minutos antes de usarlas para la inoculación

- Inocule la placa mediante un hisopo estéril utilizando una suspensión del germen de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez de 0,5 de escala Mc Farland
- Para la inoculación sumerja en hisopo estéril en el cultivo y elimine el exceso rotándolo firmemente contra la pared interna del tubo. Frote el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo
- Repita esta operación por tres veces sucesivas, rotando la placa para obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie
- Coloque la tapa a la placa y deje secar el inóculo por 3 a 5 minutos
- Coloque los discos con los antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles o usando un aplicador de discos. Deben estar espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición
- Incube a 35-37°C hasta el siguiente día (aproximadamente 18-19 horas)
- Leer el diámetro de la zona de inhibición (EUCAST, 2012).

4.5.1.1.3 Lectura e interpretación. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos con una regla en mm pasando por el centro del disco. La placa petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre fondo negro no refractante y se ilumina con luz reflejada. Los tamaños de las zonas de inhibición son interpretados en las tablas CLSI 2018 para ser informado como susceptible, intermedio o resistente a los antimicrobianos que se han probado (EUCAST, 2012).

4.5.2 Métodos cuantitativos.

Los métodos cuantitativos para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana miden la CIM Y CBM.

- Concentración inhibitoria mínima (CIM): se define como la mínima concentración de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un organismo en una prueba de sensibilidad por dilución en caldo o agar.
- Concentración bactericida mínima (CBM): se define como la mínima concentración de un antibiótico que en un periodo de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9 % de una población previamente estandarizada (Horna, Silva, Taboada, & Tamariz, 2005).

4.5.2.1 Métodos de dilución. Son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM), a su vez la determinación de la concentración inhibitoria mínima puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test.

4.5.2.1.1 Método de microdilución en caldo. Se realiza en una placa de poliestereno que contiene aproximadamente 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos. Una celdilla sirve como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirve como control negativo (solo caldo). Se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo Muller Hinton que mantiene el desarrollo del microorganismo. Los antibióticos se preparan en “soluciones madre” concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas. Después de un periodo de incubación se observa la turbidez de los tubos que indican el desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los que no contengan suficiente antibiótico que sea capaz de inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento es la Concentración Mínima Inhibitoria (Malbran, 2012).

- **Lectura de placas de CIM por microdilución:** Revisar el crecimiento en la celdilla de control positivo. Se debe encontrar turbidez o un punto de crecimiento $> 2\text{mm}$ lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de CIM. Revisar la celdilla de control negativo, este debe estar claro, sin turbidez y leer el punto final CIM como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato (Malbran, 2012).

4.5.2.1.2 Método de macrodilución en caldo. En este método, las dos diluciones finales del antibiótico son preparados volumétricamente en el caldo. Para la prueba se requiere un volumen final mínimo de 1 mL de cada dilución. Dentro de los 15 minutos siguientes a la estandarización del inóculo, se añade 1 mL del inóculo ajustado a cada tubo que contiene el agente antimicrobiano. Cada tubo es agitado e incubado a 35°C por 16 a 20 horas en una incubación de aire ambiental. La CIM es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo en los tubos detectada por la observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico.

- **Lectura e interpretación de la CIM por macrodilución:** La CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CIM se expresa en ug/ml. Luego se debe recurrir teniendo en cuenta el valor de CIM obtenido para esa cepa, a las tablas para definir según los valores de CIM que en ellas aparecen si las cepas en estudio son sensibles o resistentes a un determinado antibiótico (Cavalieri et al., 2005).

4.5.2.2 Método Épsilon Test. El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. Es una técnica cuantitativa en placas de Muller Hinton que permite obtener una lectura directa de CIM en ug/ml, ya que se emplea tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antibiótico. El microorganismo se inocula en una placa y sobre ella se deposita la tira del antibiótico o antibióticos a ensayar. Se incuba durante 16 - 24 horas a 35°C y se valora la zona de inhibición alrededor de cada tira. La CIM se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presenta el crecimiento

- **Lectura de CIM por el método de E test:** Se lee el valor de la CIM, donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de concentración de la tira. No se debe leer la placa si hay un cultivo contaminado, poco o excesivo crecimiento (Secretaría distal de salud., 2010).

4.5.2. 3 Métodos Automatizados.

4.5.2.3.1 Vitek. La tarjeta AST para VITEK 2 systems representa una metodología de test automatizado basado en la técnica de la concentración mínima inhibitoria (CIM). Cada tarjeta AST contiene un pocillo de control, que contiene solo medio de cultivo microbiológico. Los pocillos restantes contienen concentraciones precisas de un antimicrobiano específico combinado con el medio de cultivo. Es preciso que la suspensión del organismo este diluida a una concentración normalizada en solución salina al 0,45% antes de utilizarse para rehidratar el medio antimicrobiano en la tarjeta. A continuación, la tarjeta se inocula, se sella y se coloca en el incubador/ lector del instrumento. Dicho instrumento controla el crecimiento de cada pocillo de la tarjeta durante un período de tiempo determinado (hasta 24 horas para bacterias). Al final del ciclo de incubación, se determinan los valores de la CIM para cada antimicrobiano contenido en la tarjeta.

- **Interpretación:** El sistema evalúa el patrón de crecimiento de cada organismo en presencia del antimicrobiano en relación con el crecimiento registrado en el pocillo de control. El resultado de la CIM deber estar vinculado a una identificación de organismo con el fin de determinar una interpretación de categoría (Vargas et al., 2005).

4.6. Criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad

Los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) o diámetro de zona generados por una prueba de susceptibilidad pueden interpretarse en base a los puntos de corte establecidos. Según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI 2018) reconoce las siguientes categorías interpretativas:

- **Susceptible (S).** Implica que los aislamientos con una CIM en o debajo o diámetros de zona en o por encima del punto crítico susceptible son inhibidas por las concentraciones usualmente alcanzables de agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada para tratar el sitio de infección se usa, lo que resulta en probable eficacia clínica.
- **Susceptible dosis dependiente (SDD).** Determina que la sensibilidad de un aislamiento es dependiente del régimen de dosificación que se utilice. El termino SDD se recomienda en lugar de “intermedio” para cefepime ya que existen múltiples regímenes de tratamiento aprobados para su uso, y de esta manera se incorpora la opción de utilizar dosis más altas en aquellos aislamientos con CIM de 4 u 8 ug/ml o 19 a 24 mm de zona de inhibición.
- **Intermedio (I).** Incluye aislamientos con CIM o diámetros de zona dentro del rango intermedio, ese enfoque generalmente alcanza niveles de sangre y tejido para el cual las tasas de respuestas pueden ser menores que para aislamientos susceptibles.
- **Resistente (R).** Esta categoría implica que los aislamientos con una MIC igual o superior a los diámetros de zona en o debajo del punto crítico resistente no son inhibidos por las concentraciones habitualmente alcanzables del agente con ciclos de dosis normales o que muestran CIM o diámetros de zona que caen en el rango en que son probables los mecanismos de resistencia microbiana específicos, y la eficacia clínica del agente contra el aislado no se ha demostrado de manera confiable en los estudios de tratamiento (Weinstein et al , 2018).

4.7. Control de calidad en las pruebas de susceptibilidad

Es el conjunto de acciones que se aplican en el laboratorio durante la ejecución de cada prueba para asegurar que las mismas están llevándose a cabo de la manera correcta. Para el control de calidad en las pruebas de susceptibilidad se debe tener en cuenta:

4.7.1. Control de calidad del medio Muller Hinton. Puede ser de origen comercial o preparado localmente a partir del medio deshidratado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y debe cumplir con las características necesarias para obtener los halos de inhibición dentro de los límites de aceptabilidad. Dentro de estas características se debe considerar las siguientes:

- Altura del agar recomendada: 3,5 a 4,5 mm
- El pH del medio debe estar entre 7.2 y 7.4. El pH se puede evaluar con la cepa E.coli ATCC 25922 frente a gentamicina rango aceptable 19-26mm
- Observar ausencia de gotas de condensación. Secar las placas en la estufa a 35°C 10 a 30 minutos antes de usarla (Secretaría distal de salud., 2010).

4.7.1.1 Inóculo. Se debe utilizar un inóculo con una turbidez al 0.5 de la escala de McFarland. Esta escala debe conservarse a temperatura ambiente y en oscuridad. Se debe tener en cuenta que a mayor densidad hay menos inhibición de los microorganismos y mayor probabilidad de ocurrencia de falsas resistencias a los antimicrobianos estudiados, a menor densidad hay mayor inhibición de los microorganismos y mayor probabilidad de ocurrencias de falsa sensibilidad a los antimicrobianos estudiados (Araya, Prat & Ramírez, 2015).

4.7.1.2. Incubación. La temperatura y tiempo de incubación dependen del microorganismo a probar. En enterobacterias el inóculo debe ser una suspensión directa a una incubación de 16 a 18 horas a 35°C (Araya, Prat & Ramírez, 2015).

4.7.1.3. Sensidiscos. El número de discos a utilizar puede variar dependiendo del tipo de bacteria, entre un máximo de 12 discos en placas de 150 mm o 6 discos en placas de 100 mm. Los discos deben almacenarse a -8°C o en congelación a -14°C hasta su uso sobre todo en antibióticos que son lábiles como son los betalactámicos, imipenem, cefaclor y combinaciones con el ácido clavulánico, sacar los discos 2 horas antes de su uso para

equilibrar a temperatura ambiente. Utilizar discos con fecha de expiración adecuada (Secretaría distal de salud., 2010).

4.7.2 Cepas ATCC. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) recomienda el uso de cepas del American Type Culture Collection ATCC para el control de calidad interno de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Las cepas ATCC han sido seleccionadas con base en su susceptibilidad o resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y a su confiabilidad en los métodos de referencia. Las cepas ATCC básicas recomendadas por CLSI para el método de difusión son las siguientes:

- *Escherichia coli* ATCC 25922. Para el control negativo de screening y confirmatorio de BLEE
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603: Para control positivo de pruebas screening y confirmatorias de BLEE. (Weinstein et al , 2018)

5. Metodología

Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo descriptivo y corte transversal

Área de estudio

El estudio se realizó en la Clínica y Centro de Diagnóstico MEDILAB-Loja, ubicada en la ciudad de Loja, parroquia Sucre, en las calles Manuel Montero y Alfredo Mora (esq).

Universo o población

El universo de la presente investigación estuvo representado por 47 urocultivos positivos para *Escherichia coli* del Laboratorio Clínico MEDILAB-Loja, en el periodo comprendido de Marzo a Mayo del 2017.

Muestra

Estuvo conformada por 44 cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos de la Clínica MEDILAB-Loja.

Se determinó el tamaño de la muestra utilizando la siguiente formula:

$$n = \frac{z^2 \alpha N pq}{e^2 (N - 1) + Z^2 \alpha pq}$$

Dónde:

n= tamaño de la muestra

N= 47 urocultivos positivos para *Escherichia coli*

Z_{α} = 1.96% nivel de confianza del 95%

P= 0,5

q= 0,5

e= error seleccionado de 3% = 0.03

$$n = \frac{z^2 \alpha N pq}{e^2(N - 1) + Z^2 \alpha pq}$$

$$n = \frac{1.96^2 47 \times 0.5 \times 0.5}{0.03^2(46) + 1.96^2 \times 0.5 \times 0.5}$$

$$n = \frac{3.8416 \times 47 \times 0.25}{0.0009 \times (46) + 3.8416 \times 0.25}$$

$$n = \frac{45.1388}{0.414 + 0.9604}$$

$$n = \frac{45.1388}{1.00454}$$

$$n = 44$$

Criterios de inclusión

- Pacientes con solicitud de urocultivos
- Urocultivos positivos para *Escherichia coli*
- Cultivos primarios con crecimiento > 1000 UFC/ml (pacientes inmunodeprimidos, síndrome uretral femenino, punción suprapúbica o renal percutánea) o > 100 000 UFC/ml (pacientes inmunocompetentes)

Criterios de exclusión

- Muestras que no hayan sido recogidas en frascos estériles.
- Pacientes que ya hayan sido muestreados durante este estudio (no puede haber dos muestras del mismo paciente, genera sesgo de muestreo)
- Más de dos patógenos aislados.

Métodos, Técnicas y Procedimientos

Para realizar el presente proceso investigativo se empleó las siguientes técnicas y procedimientos:

Fase pre-analítica

- Oficio dirigido al responsable del Laboratorio Clínico MEDILAB de la ciudad de Loja, para la autorización correspondiente para la obtención de las muestras (**Anexo 1**)
- Se llenó el formato de registro de datos de MEDILAB, con el código, procedencia de las muestras y edad del paciente (**Anexo 2**)
- Sistema de MEDILAB del cual se obtuvieron los datos (**Anexo 3**)
- Se aplicó el protocolo de transporte y conservación de las muestras (**Anexo 4**)

Fase Analítica

- Preparación del Medio de cultivo agar Müller Hinton (**Anexo 5**)
- Protocolo de identificación bacteriana de *Escherichia coli* (**Anexo 6**)
- Protocolo de determinación de susceptibilidad antimicrobiana y registro de los halos de inhibición de acuerdo al documento del CLSI 2018 (**Anexo 7 y 8**)
- Protocolo de detección fenotípica de mecanismos de resistencia (**Anexo 9**)
- Para el control de calidad se utilizaron cepas de control negativo de *Escherichia coli* ATCC 25922 y cepas control positivo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, las cuales se procesaron siguiendo los protocolos definidos en la presente investigación (**Anexo 10**)
- Inserto de cepas control ATCC 25922 Y 706003 (**Anexo 11 y 12**)

Fase pos-analítica

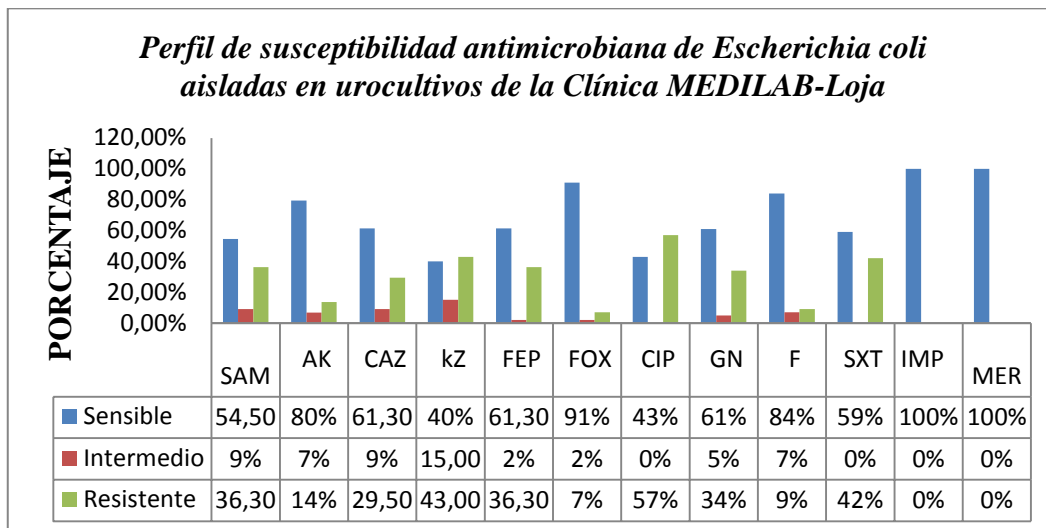
- Registro de resultados para realizar la tabulación (**Anexo 13 y 14**)
- Fotografías del trabajo realizado (**Anexo 15**)

Plan de tabulación y Análisis de los resultados

El análisis y la interpretación de los datos obtenidos se realizaron mediante la representación básica de tablas estadísticas y gráficos realizados en el programa de Microsoft Excel, en donde se plasmarán todos los datos y resultados obtenidos. A cada tabla o grafico se le asignó un título, una fuente de donde se obtuvieron los datos así como también un párrafo explicativo donde se da a conocer la información más relevante.

6. Resultados

Figura 1. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas en urocultivos de la Clínica MEDILAB-Loja



Halos de inhibición en mm de acuerdo al documento de Clinical and laboratory standards institute (CLSI) 2018 **SAM:** S: >15 I:12-14 R: <11 **AK:** S: >17 I: 15-16 R: <14 **CAZ:** S: >21 I: 18-20 R: <17 **kZ:** S: >23 I: 20-22 R: <19 **FEP:** S: >25 SDD: 19-24 R: <18 **FOX:** S: >18 I: 15-17 R: <14 **CIP:** S: >21 I: 16-20 R: <15 **GN:** S: >15 I: 13-14 R: <12 **F:** S: >17 I: 15-16 R: <14 **SXT:** S: >16 I: 11-15 R: <10 **Carbapenémicos :** S>23 I: 20-22 R: <19

Fuente: Registro de datos del tesista

Autora: Glenda Morocho Marín

Interpretación:

La susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas presento un porcentaje de sensibilidad antibiótica el 100% a carbapenémicos; 91% a cefoxitina; 84% a nitrofurantoína; 80% amikacina; 61% a gentamicina, ceftazidima y cefepima, 59% a trimetropim/ sulfametoxazol; 54,5% ampicilina sulbactam mientras que los mayores porcentajes de resistencia se presenta a ciprofloxacina con el 57%, trimetropim/sulfametoaxol 42%, cefazolina 43%, cefepima y ampicilina sulbactam 36,3%, gentamicina 34%, ceftazidima 29.5%. De acuerdo a la bibliografía revisada los carbapenémicos por presentar mayores porcentajes de sensibilidad reafirma la utilidad que sigue teniendo este antibiótico en las infecciones urinarias severas, mientras que el aumento de resistencia de ciprofloxacino se relaciona con el uso de este antibiótico sin prescripción médica.

Tabla 1

Cepas resistentes de Escherichia coli productoras de betalactamasas de espectro extendido en urocultivos de usuarios de la clínica MEDILAB-Loja.

Tipo de resistencia	frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE	17	39%
<i>Escherichia coli</i> no productora de BLEE	27	61%
TOTAL	44	100%

Fuente: Registro de datos del tesista

Autora: Glenda Morocho Marín

Interpretación:

De las 44 cepas aisladas de *Escherichia coli* 17 son productoras de betalactamasas de espectro extendido que corresponde al 39%, mientras que las 27 cepas restantes de *Escherichia coli* no fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido que corresponde al 61%. Este mecanismo de resistencia microbiana es la más común y de gran importancia ya que confiere resistencia a antibióticos betalactámicos especialmente a las cefalosporinas de tercera generación.

Tabla 2

Cepas resistentes de Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido en relación al servicio de salud de la clínica MEDILAB-Loja.

Servicio	<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE	
	Frecuencia	Porcentaje
Ambulatorios	16	94%
Hospitalizados	1	6%
TOTAL	17	100%

Fuente: Registro de datos del tesista

Autora: Glenda Morocho Marín

Interpretación:

De las 17 cepas aisladas de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido, el 6% corresponde a pacientes hospitalizados con 1 caso, los mayores porcentajes se observa en pacientes ambulatorios con 16 casos que representa el 94%. Según la literatura revisada el uso empírico de los antibióticos de amplio espectro y la terapia previa con betalactámicos favorece la diseminación de estas cepas adquiridas en la comunidad.

Tabla 3

Cepas resistentes de Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido en relación a la edad de la clínica MEDILAB-Loja.

Edad	<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE	
	Frecuencia	Porcentaje
Niños (2 a 9 años)	1	6 %
Adolescentes (10-19 años)	1	6%
Adultos (20 a 59 años)	6	35%
Adulto Mayor (más de 60 años)	9	53%
TOTAL	17	100%

Fuente: Registro de datos del tesista

Autora: Glenda Morocho Marín

Interpretación:

En la investigación realizada la población más propensa de infección de vías urinarias por *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido es en adultos mayores de 60 años con 9 casos que representa el 53%, seguido de la edad comprendida entre 20 a 59 años con 6 casos que corresponde al 35% y en menor porcentaje en adolescentes y niños con 1 caso que equivale al 6%. En las personas mayores de 60 años las patologías prostáticas o cambios hormonales propios de la menopausia en donde se ve alterado el balance de la flora bacteriana hace que aumente la probabilidad de infección.

Tabla 4

Cepas resistentes de Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido en relación al sexo de la clínica MEDILAB-Loja.

Sexo	<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE	
	Frecuencia	Porcentaje
Mujeres	11	65 %
Hombres	6	35%
TOTAL	17	100%

Fuente: Registro de datos del tesista

Autora: Glenda Morocho Marín

Interpretación:

De las 17 cepas aisladas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, se aislaron en muestras de orina de mujeres en 11 casos que representa el 65% y en hombres con 6 casos que corresponde al 35%. Debido a que la uretra de la mujer es más corta que la del hombre, explica porque estas infecciones urinarias son más frecuentes en el sexo femenino.

7. Discusión

Las infecciones del tracto urinario es un problema frecuente en la atención de salud causadas en su mayoría por la bacteria *Escherichia coli*, el uso frecuente de antibióticos que se utiliza indiscriminadamente favorece la aparición de mecanismos de resistencia como es la producción de BLEE (Lifonzo, 2018). En la presente investigación a las 44 cepas aisladas de *Escherichia coli* se les realizó un antibiograma por el método Kirby Bauer, en la cual se observó sensibilidad al 100% a carbapenémicos, Cefoxitina 91%, Nitrofurantoína 84%, Amikacina 80%, Gentamicina, Ceftazidima y Cefepime con el 61%, Trimetropim-Sulfametoxazol el 58%, Ampicilina-sulbactam 54,5% y resistencia importante a Ciprofloxacina 57%, Cefazolina 43%, Trimetropim-Sulfametoxazol con el 42%, Ceftazidima con el 29,5%. Las cepas de *Escherichia coli* que presentaron halos de inhibición < 22 mm para las cefalosporinas de tercera generación mostraron el patrón de resistencia BLEE con el 39% siendo más frecuente en pacientes ambulatorios y del sexo femenino en adultos mayores de 60 años.

En España se han publicado datos sobre aislamientos de cepas de *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido en pacientes del Hospital Básico de San Carlos. Se identificaron 224 cepas de *E.coli*, todas las cepas estudiadas son sensibles al 100% a Carbapenémicos, el 86% a Amikacina. La resistencia a Ciprofloxacina, Cefazolina y Trimetropim/Sulfametoxazol con el 55, 45 y 44% respectivamente. Las cepas cuyos resultados fueron positivos a la presencia de BLEE fueron 34 de procedencia extrahospitalaria, las mismas que se confirmaron por el método de discos combinados. Los datos de susceptibilidad antimicrobiana son similares a la presente investigación en la cual los porcentajes varían en un 2%, mientras que las cepas de *E.coli* BLEE que fueron confirmadas por el mismo método en nuestra población fueron 17, es decir menor al encontrado en España, esta diferencia se puede deber a que hubo un mayor número de cepas identificadas de *E.coli* en relación a nuestro estudio que fueron 44 cepas identificadas de *E.coli* en el presente trabajo de investigación. (García, 2013).

Un estudio realizado por Zúñiga et al., (2016) sobre perfil de sensibilidad a los antibióticos de las bacterias en infecciones del tracto urinario en pacientes ambulatorios. Se recolectaron 602 urocultivos en 2 laboratorios diferentes de la ciudad de San Pedro Sula

y El Progreso de Honduras, *E.coli* fue la que más aislamientos presento con 424 casos, se analizó la susceptibilidad mediante el método Kirby Bauer, la sensibilidad reportada fue a Amikacina del 70%, Nitrofurantoína 67%, Gentamicina 62%, Ceftazidima el 53,4%, también se observó resistencia importante a Trimetropim-sulfametoxazol el 50 % y a Ciprofloxacina 38%. Al comparar con nuestro estudio se observa mayores porcentajes de sensibilidad a Amikacina y Nitrofurantoína con el 80 y 84% respectivamente, sin embargo independientemente de que el número de muestras procesadas en la Clínica MEDILAB sea menor, la resistencia de Trimetropim-Sulfametoxazol en nuestra población se observa en menores porcentajes con el 42% y mayores porcentajes de resistencia a Ciprofloxacina con el 57%. Estas diferencias pueden deberse a que las resistencias bacterianas son variables entre regiones geográficas, inclusive dentro de un mismo país y entre instituciones de la misma ciudad, además la aparición de resistencia a estos antibióticos puede estar ligada a su amplia utilización en el tratamiento de las infecciones urinarias.

En un estudio realizado en Colombia, por Nocua-Báez et al., (2017) sobre la susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de ITU adquiridas en la comunidad de paciente con diabetes mellitus, mediante el método automatizado, se aislaron 68 aislamientos de los cuales 58 son de *E.coli*, la sensibilidad reportada a los antibióticos fue 100% a carbapenémicos seguido de Nitrofurantoína con el 94%. El 13,8% de los aislamientos de *E.coli* que presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación como Ceftazidima expresaron el mecanismo de resistencia BLEE; en la presente investigación en la cual el método utilizado fue el antibiograma manual Kirby Bauer, existe una similitud en la sensibilidad antibiótica con el 100% a carbapenémicos, no así la sensibilidad a Nitrofurantoína con un menor porcentajes del 84%. En relación al mecanismo de resistencia el 29,5% de las cepas de *E.coli* que presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación expresaron el mecanismo de resistencia BLEE. Se sabe que el uso masivo de las cefalosporinas orales puede provocar un incremento de la expansión de las betalactamasas de espectro extendido provocando un problema de difícil solución con fracasos terapéuticos.

Un estudio realizado en Chile sobre factores asociados a la presencia de infecciones urinarias por *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. Se evidencio que los factores asociados es el sexo masculino con el 24,7%, edad mayor a 45

años y con antecedentes de hospitalización previa; en el presente estudio los adultos mayores también son los más afectados por *Escherichia coli* productora de BLEE, sin embargo a diferencia del estudio de Chile en nuestra investigación es el sexo femenino con un 65% y son pacientes de consulta externa. Situación problemáticamente causada por la posición anatómica de la mujer, permitiendo a las bacterias un acceso rápido hasta la vejiga produciendo una infección en algún momento de su vida. (Núñez, Campos & Rivera, 2017)

En Venezuela un estudio realizado por Guevara et al., (2015) sobre susceptibilidad antimicrobiana de bacterias gramnegativas aisladas de infecciones urinarias en tres hospitales diferentes, la bacteria más predominante es *E.coli* con 363 aislamientos, los pacientes de donde se obtuvieron los aislados tenían edad de 50 años en adelante. En las tasas de susceptibilidad el antimicrobiano con mayor actividad in vitro fue Ertapemen con el 99,3%, seguido de Amikacina 87% y Cefoxitina con el 93%. El agente antimicrobiano con la tasa de susceptibilidad más baja fue Ampicilina-Sulbactam, seguido de Ciprofloxacina. El 33,8 % de las especies de *E.coli* fueron productoras de BLEE, la proporción de estas cepas adquiridas en la comunidad fue menor a la cepas adquiridas en hospitalización. Los datos obtenidos muestran que en nuestro estudio donde los aislamientos de *E.coli* son menores al de Venezuela los resultados de susceptibilidad antimicrobiana y el mecanismo de resistencia BLEE son similares con variación del 1 a 3%, sin embargo la mayoría de aislamiento de *E.coli* BLEE son adquiridas en la comunidad. Esta diferencia podría deberse en parte a que la mayoría de los aislados solo procedían de pacientes de consulta externa.

En Perú un estudio sobre factores de Riesgo asociados a infección urinaria por *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido en pacientes hospitalizados de la clínica Maison de Sanité Sede-Este del 2015, obtuvieron cepas de *E. Coli* productora de BLEE con el 63%, resultados que difieren con la presente investigación ya que en nuestro estudio en la que se incluyeron pacientes hospitalizados y ambulatorios de la Clínica MEDILAB, la mayoría de los casos de *Escherichia coli* BLEE son de pacientes ambulatorios con el 94 % de acuerdo a los datos mencionados en la presente investigación (Gutiérrez, 2016).

En Ecuador un estudio realizado por Guamán et al., (2017) en las comunidades indígenas nativas de Zumbahua, Colta y Guamote se realizó un estudio sobre los perfiles de resistencia antibiótica de pacientes de consulta externa con ITU no complicadas. Se obtuvieron 75 aislamientos de *Escherichia coli* en un 83%, La resistencia antibiótica fue realizada por la técnica de difusión en disco de Kirby Bauer en la que se observó resistencia para Ciprofloxacina el 32,5%, Ceftazidima y Cefepima 15%, Cefazolina 15,8%, Gentamicina 7,5%, no existió resistencia a Carbapenémicos. El 12% de las cepas de *Escherichia coli* es productora de BLEE en mujeres con el 95%, en un rango de edad entre 11 a 20 años. En relación a la población Loja en nuestro estudio se observa mayores porcentajes de resistencia a Ciprofloxacina y Cefalosporinas. En cuanto al mecanismo de resistencia BLEE existe un mayor porcentaje y se da en adultos de 60 años igualmente mujeres, la diferencia de edades puede estar relacionada a que en las poblaciones indígenas del Ecuador se tomaron las muestras solo de aquellos pacientes con ITU no complicada, esto ocurre con frecuencia en mujeres jóvenes de edad fértil, sanas, no embarazadas y que difieren clínica de cistitis de menos una semana de evolución

En un estudio realizado en pacientes ambulatorios del Hospital Manuel Ignacio Monteros, se evidencio que las ITU son causadas frecuentemente por *E.coli* con 85 aislamientos. Se realizó el método de disco combinado para la confirmación de BLEE, en la que se consideró como sospechosas las cepas que presentaron halos de inhibición < 22 mm para las cefalosporinas de tercera generación. Se encontró que el 70% corresponden a cepas productoras de BLEE. En nuestra investigación empleando las misma técnicas se encontró un menor porcentaje de cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE causante de infecciones urinarias (Malla, 2014).

En la ciudad de Loja un estudio realizado en los usuarios de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora del año 2015, se obtuvieron 56 urocultivos positivos para *E.coli*, de estos 8 fueron productores de BLEE que corresponde el 14 % son aisladas en mujeres en el 100 % de los casos en el grupo etario de 32 años en adelante. En relación a nuestra área de estudio, de los 44 urocultivos positivos para *E.coli*, 17 son BLEE que representa el 39%, un número mayor al encontrado en el Hospital Isidro Ayora, debido a que se incluyeron pacientes de consulta externa y hospitalizados y se aislaron tanto en mujeres como en hombres con el 65 y 35% respectivamente (Villavicencio, 2015).

8. Conclusiones

- *Escherichia coli* presenta una buena sensibilidad antibiótica a los carbapenémicos y resistencia importante a ciprofloxacina.
- Las cepas de *Escherichia coli* que presentaron halos de inhibición menor a 22 mm para las cefalosporinas de tercera generación fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido con el 39%.

9. Recomendaciones

- Se recomienda continuar con este tipo de investigaciones sobre la susceptibilidad a los antibióticos de acuerdo a los métodos estandarizados de sensibilidad frente a las bacterias patógenas y su constante cambio de resistencia por factores sociales como la falta de educación del correcto uso de antibióticos lo que ha contribuido con el desarrollo de mecanismos de resistencia bacteriana siendo la más común la producción de BLEE que antes era considerada un problema intrahospitalario y ahora la emergencia de estas cepas adquiridas en la comunidad es cada vez más frecuente.
- Se recomienda al personal médico lograr enfatizar a los pacientes cumplir con los tratamientos adecuados para las infecciones urinarias para su correcto uso mediante campañas educativas dirigidas a la sociedad por parte de los profesionales de salud capacitados para cambiar las conductas de automedicación evitando resistencia a los antibióticos.

10. Bibliografía

- Álvarez-Hernández, D., Garza-Mayén, G., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista Chilena De Infectología*, 32(5), 499-504. doi: 10.4067/s0716-10182015000600002
- Alvarado, S., Guzmán, F., & Saquipay, W. (2011). *Caracterización y resistencia de Escherichia coli a los antimicrobianos en los hospitales Vicente Corral Moscoso y José Carrasco Arteaga. Cuenca, 2008-2009.* (Licenciatura). Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Médicas, Ecuador.
- Apaza, R. (2016). *Resistencia de uropatógenos gramnegativos y grampositivos a los antimicrobianos que se prescriben en el Hospital Regional Manuel Muñoz Butron.* (Licenciatura). Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias Biológicas, Perú.
- Araya, I., Prat, S., & Ramírez, V. (2015). Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: Estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión por disco. Retrieved from <https://tinyurl.com/yb5vp5bj>
- Brooks, G., Carroll, K., & Butel, J. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología Médica* (25th ed., pp. 213-217). México, D.F.: McGraw-Hill Lange.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Calvo, N. (2017). *Resistencia plasmídica a linezolid en Staphylococcus aureus y estafilococos no productores de coagulasa* (Tesis doctoral). Universidad de Salamanca. Salud y Desarrollo de los Trópicos, España.
- Cavaleri, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., & Sautter, R. et al. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.* Retrieved from <https://tinyurl.com/y84u6rbl>
- Campero, J., Figueredo, C., Correa, D., & Torres, L. (2016). Comparative in vitro activity of Dorypenem and other carbapenems in Pseudomonas aeruginosa isolates on Vargas Caracas Hospital's Microbiology Laboratory. *Revista Del Instituto Nacional De Higiene Rafael Rangel*, 47(1-2), 7-17. Retrieved from <https://tinyurl.com/y7bsywfd>
- Carmona, F., Rúa, M., & Del Pozo, J. (2016). Infección por grampositivos resistentes. *Rev Esp Quimioter*, (29 (1), 15-20. Retrieved from <https://tinyurl.com/yab8dvs6>
- Castro, A. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas (2a. ed.)* (2nd ed., p. 116). México: Editorial El Manual Moderno.

- CLSI. (2018). *Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 28ª ed.* Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.
- European society of clinical microbiology and infectious diseases EUCAST. (2012). *Método de difusión con discos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.* Retrieved from <https://tinyurl.com/ycfghrnt>
- Faleiro Naves, P. (2010). *Formación de biopelículas por " Escherichia coli" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos plactónicos y asociados a biopelículas* (Doctorado). Universidad Complutense de Madrid. España.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., & Trevino, E. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico* (12th ed., p. 180). Argentina: Medica Panamericana.
- Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., & Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de Escherichia coli productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 27(1), 22. doi: 10.20453/rmh.v27i1.2780
- Gamazo de la Rasilla, C., Gómez, S., & Peiro, A. (2013). *Microbiología basada en la experimentación* (pp. 81-82). Barcelona: Elsevier España
- García, M. (2013). Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, 69(4), 244-248. doi: 10.4321/s1887-85712013000400003
- Gómez, J., García, E., & Hernández, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, (28 (1), 1-9. Retrieved from <https://tinyurl.com/ycywywfe>
- Guamán, W., Tamayo, V., Villacís, J., Reyes, J., Muñoz, O., Torres, J., & Paz, W. (2017). Resistencia bacteriana de Escherichia coli uropatogénica en población nativa amerindia Kichwa de Ecuador. *Rev Fac Cien Med Quito*, 42(1), 37-46. Retrieved from <https://tinyurl.com/yaw9q9qr>
- Guevara, N. M. (29 de 10 de 2015). Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias gramnegativas aisladas de infecciones del tracto urinario en venezuela: Resultados del estudio SMART 2009-2012. *Revista chilena de infectología*, 32(6), 639-648.<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000700005>
- Gutiérrez, A. (2016). Factores de riesgo asociados a infección urinaria por Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido en pacientes hospitalizados de la clínica Maison de Santé-Sede Este: enero-noviembre 2015. Retrieved from <https://tinyurl.com/y9rj46jn>
- Hernández, S. (2008). *Resistencia a Macrólidos en estreptococo viridans. Epidemiología Y Estudio Molecular* (Doctorado). Universidad de Salamanca. Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica.España.

- Horna, G., Díaz, S., Taboada, V., & Ortiz, T. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered*, (16 (1), 39-45. Retrieved from <https://tinyurl.com/ydchu6fe>
- Jiménez-Guerra, G., Hoyos-Mallecot, Y., Rodríguez-Granger, J., Navarro-Marí, J., & Gutiérrez-Fernández, J. (2016). Método rápido para la detección de la sensibilidad a cefotaxima en enterobacterias. *Revista Argentina De Microbiología*, 48(4), 320-324. doi: 10.1016/j.ram.2016.08.002
- Lifonzo, S., Tamariz, P., & Champi, R. (2018). Sensibilidad a fosfomicina en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, 35(1), 68. doi: 10.17843/rpmesp.2018.351.3566
- López, M. (2013). *Frecuencia de bacterias patógenas su patrón de sensibilidad antibiótica en el HGR NO 25 en relación con el cuadro básico de medicamentos* (Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores Zaragoza. México, D.F.
- Malbran, C. (2012). *Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución*. Retrieved from <https://tinyurl.com/ya46wos3>
- Malla, Y. (2014). *Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del hospital " Manuel Ygnacio Monteros" durante el periodo octubre - noviembre 2013* (Licenciatura). Universidad Técnica Particular de Loja.
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 21(1), 42-55. doi: 10.1016/s0213-005x(03)72873-0
- Ministerio de Salud Pública MSP. (2014). *Infección de vías urinarias en el embarazo. Guía para embarazadas*. Retrieved from <https://tinyurl.com/ybk8ohn4>
- Moreno M, C., González E, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista De Otorrinolaringología Y Cirugía De Cabeza Y Cuello*, 69(2), 185-192. doi: 10.4067/s0718-48162009000200014
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2017). *Microbiología médica* (8th ed., p. 162). Barcelona: Elsevier, España.
- Nocua Báez, L., Cortés, J., Leal, A., Arias, G., Ovalle-Guerrero, M., & Saavedra-Rojas, S. et al. (2017). Perfil de sensibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad en pacientes con diabetes mellitus en Colombia. *Revista Biomédica*, 37(3), 453-460. doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3348>

- Núñez, A., Campos, K., & Rivera, D. (2017). Factores asociados a la presentación de infecciones urinarias por *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Med Hered*, (28), 142-148. Retrieved from <https://tinyurl.com/yd3jgr2r>
- Oconitrillo Chaves, M. (2016). Infección urinaria en niños. *Revista Médica de Costa Rica y Centro America*, 125-130. Retrieved from: <https://tinyurl.com/yd8usr6>
- Orrego-Marín, C., Henao-Mejía, C., & Cardona-Arias, J. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Retrieved from <http://ref.scielo.org/4s36ky>
- Paredes, F., & Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Elsevier*, (3), 116-124. Retrieved from <https://tinyurl.com/yd9gs8yx>
- Pérez, H., & Robles, A. (2013). Aspectos Básicos de los Mecanismos de Resistencia Bacteriana. *Revista Médica MD*, (4 (3), 186-191. Retrieved from <https://tinyurl.com/y8dj7odn>
- Petri, W. (2007). Penicilinas, Cefalosporinas y otros antibióticos Lactámicos β . In L. Brunton, J. Lazo & K. Parker, *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica* (11th ed., p. 1127). México: Mc Graw Hill. Retrieved from <https://tinyurl.com/ybbbbs2y>
- Pineda, L., Tzoc, E., Rivera, M., Herrera, L., & Moncada, M. (2017). Caracterización clínico y epidemiológica en pacientes con infección por Enterobacteriaceae productoras de B lactamasas de espectro extendido (BLEE), Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras, Año 2013. *Revista Ciencia Y Tecnología*, (20), 50-66. doi: 10.5377/rct.v0i20.5495
- Quizhpe, A. (2014). Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana. Retrieved from <https://tinyurl.com/y7kagsm4>
- Reyes, J., Villacís, J., Vásquez, R., & Cartelle, M. (2014). Resistencia bacteriana en el Ecuador 2014. Retrieved from <https://tinyurl.com/y9kijnz5d>
- Robino, L., Pardo, L., & Speranza, N. (2017). Fosfomicina trometamol: Perfil farmacológico y lugar en el tratamiento de las infecciones urinarias. Retrieved from <https://tinyurl.com/y8h5lr6n>
- Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana* (3rd ed., p. 753). México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.
- Secretaría Distrital de Salud. (2010). *Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20 2010* (p. 9). Bogotá. Retrieved from <https://tinyurl.com/y9p2qtgw>
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia

Antibiótica. *International Journal Of Morphology*, 35(4), 1214-1223. doi: 10.4067/s0717-95022017000401214

Turrado, A. (2016). Antibióticos bactericidas vs bacteriotáticos. Interacción. Retrieved from <https://tinyurl.com/y74bovff>

Vargas, L., Vila, A., Lanza, A., Bonvehi, P., Nazar, J., & Mikietuk, A. et al. (2005). Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, (39 (1), 19-25. Retrieved from <http://ref.scielo.org/6559t8>

Vila Estapé, J., & Zboromyrska, Y. (2012). Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Gastroenterología Y Hepatología*, 35(2), 89-93. doi: 10.1016/j.gastrohep.2011.10.007

Villavicencion, P. (2015). *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora (Licenciatura). Universidad Nacional de Loja.

Weinstein, M., Patel, J., Campeau, S., Humphries, R., Jenkins, S. (2018). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (28th ed., Vol. 38). USE: Clinical and laboratory standards institute.

Zúniga-Moya, Julio C., Bejarano-Cáceres, Suyapa, Valenzuela-Cervantes, Huber, Gough-Coto, Simmons, Castro-Mejía, Andy, Chinchilla-López, Carmen, Díaz-Mendoza, Tannya, Hernández-Rivera, Sthephany, Martínez-López, Joseth. (2016). Perfil de sensibilidad a los antibióticos de las bacterias en infecciones del tracto urinario. *Acta Médica Costarricense* 58 (4) ,146-145 Retrieved from <https://tinyurl.com/ya5nuovg>

11. Anexos

Anexo 1: Oficio de autorización para la recolección de las muestras.

Loja, 10 de Marzo del 2018 .

Dra. Sandra Freire
Responsable de Laboratorio Clínico MEDILAB de Loja.
Ciudad.-

De mi consideración,

Yo, Glenda Maribel Morocho Marín, portadora de la cédula de identidad número 1900815695, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo muy respetuosamente, deseándole un cordial saludo, y a la vez solicitarle muy comedidamente por su intermedio se me autorice el permiso correspondiente para la obtención de datos y muestras con solicitud de urocultivos para la realización del proyecto titulado "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTE DE INFECCION DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLINICO MEDILAB-LOJA", cabe recalcar que los datos obtenidos serán tratados cuidadosamente, guardando la confidencialidad correspondiente.

En espera de ser atendida en la forma más favorable y oportuna, me anticipo expresarle mis sentidos reconocimientos.

Atentamente.

Glenda Maribel Morocho Marín
Estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico

*Autenticado
K. Freire
10-03-2018*

Dra. Sandra Freire Freire
COORDINADORA
DIRECTOR LABORATORIO CLINICO

CEVASCOP S.A.
AUTORIZADO

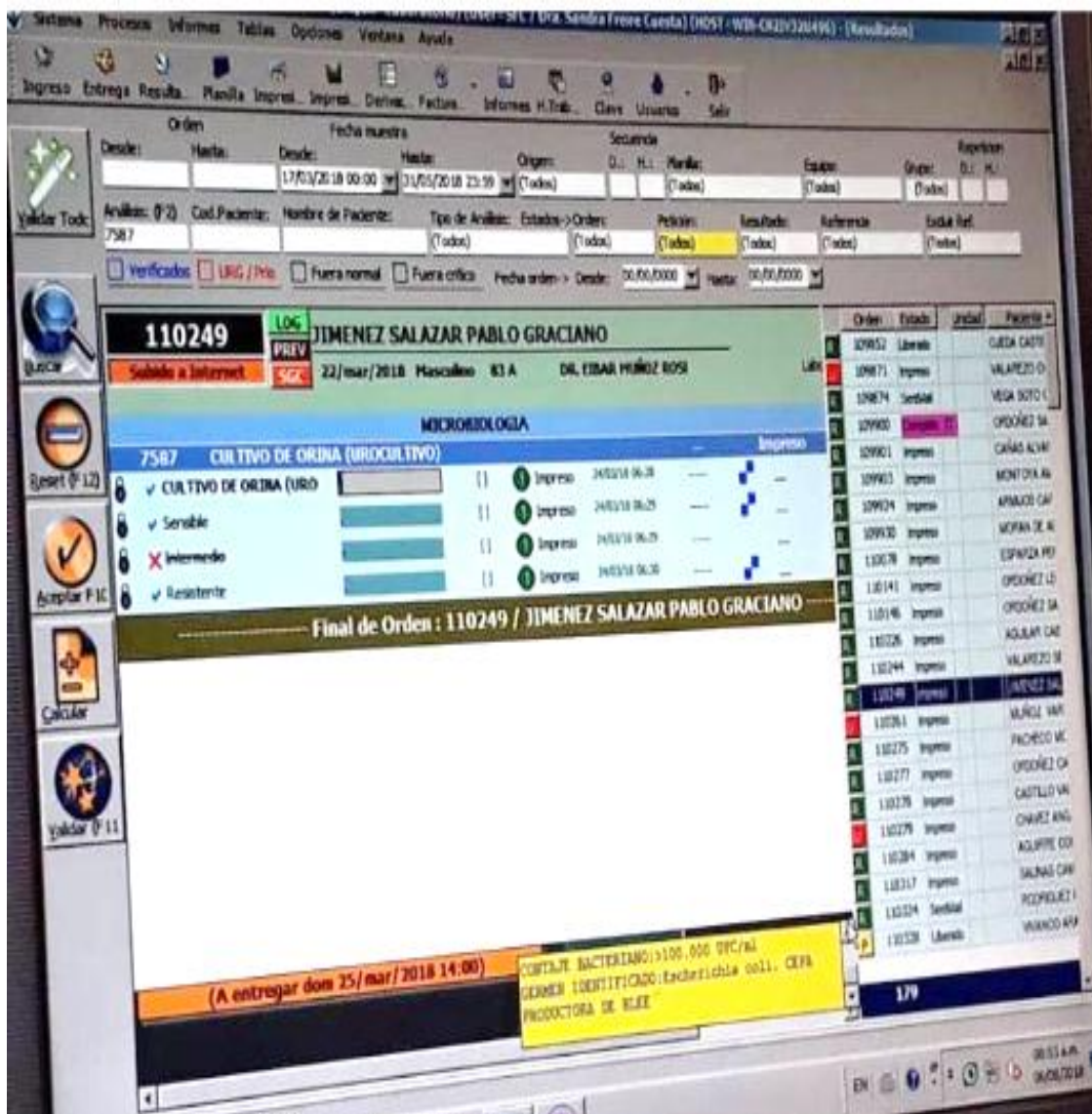
10 JUL 2018


Ing. Ixania Azanza Troncos
GERENTE



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

Anexo 3. Sistema para la obtención de datos de la Clínica MEDILAB-Loja



	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	Transporte de muestras al Laboratorio de la Facultad de la Salud Humana: CDM	CÓDIGO : PB02 REVISIÓN : 1 EDICIÓN : 1 FECHA : PÁGINA : 1/3
---	---	--	---

Anexo 2. Transporte y conservación de muestras

1. Introducción

La obtención y el transporte de muestras son etapas fundamentales en el diagnóstico clínico y en la investigación. Para mantener la integridad de las muestras se deberá tener en cuenta los procedimientos de obtención, transporte, condiciones de conservación, destino final y bioseguridad. El control de estos proporcionará valor a las muestras asegurando la calidad y estabilidad para obtener resultados confiables y oportunos.

El transporte de muestras biológicas tiene importancia a nivel mundial ya que un manejo incorrecto de sustancias con agentes infecciosos puede ocasionar morbilidad y mortalidad

2. Objetivo

Determinar los pasos y requerimientos necesarios para garantizar el transporte adecuado de las muestras biológicas dentro de los parámetros requeridos para su análisis posterior

3. Alcance

Este procedimiento está al alcance de todos los participantes del proyecto de investigación a realizar para garantizar el correcto transporte de muestras de urocultivo de la clínica Medilab hacia el centro de diagnóstico médico para su análisis posterior

4. Responsables

- Estudiantes: Transporte de muestras
- Docentes/ Investigadores: Validación del procedimiento
-

5. Materiales

- Cooler hermético

- Medio de transporte Stuart

6. Procedimiento

Transporte de la Clínica Medilab

- Una vez analizada la muestra e identificado el germen, procedemos a tomar un medio de transporte Stuart retiramos el hisopo y tomamos dos colonias representativas del medio de cultivo agar sangre
- Se rotula el medio de Stuart con el código del paciente de cada una de las muestras, se las guarda en el cooler hermético sin hielo y se las transporta al CDM


7. Observaciones

- Aplicar las medidas de bioseguridad como el uso de guantes, mascarilla, gorro para la recolección de la muestra
- Deber ser transportada por personal capacitado en recipientes de material sólido impermeable y de fácil limpieza

Fuente

Rodriguez, T. (2013). *Cursep*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/parasito/cursep/Transp.pdf>

REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
--

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	Preparación del Agar Muller Hinton	REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA : 01-03-2018 PÁGINA : 1/3
---	---	---	--

Anexo 5. Preparación del agar Muller Hinton

1. Fundamento:

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), para ser utilizado de forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que ha sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo. Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

2. Uso

Mueller Hinton se utiliza para las pruebas de sensibilidad de las bacterias comunes que crecen rápidamente utilizando discos de antimicrobianos por el método de Bauer Kirby. Contiene niveles bajos de timina, timidina, calcio y magnesio

3. Composición del medio:

Composición	Concentración del medio
Caseína hidrolizada	17.5 g/litro
Infusión de carne	300,0 g/litro
Almidón	1.5g/litro
Agar	17.0 g/litro
pH final 25 °C: 7.3 ± 0.1	

4. Procedimiento:

1. Se lee las instrucciones del envase para la preparación del Agar Müller Hinton, por cada 1 litro de preparación debe haber 38 g de polvo. Realizar un cálculo de la cantidad de medio de cultivo necesario, tanto de polvo como del agua destilada, a través de una regla de tres.
2. Una vez pesada la cantidad necesaria de polvo, colocar en el matraz Erlenmeyer. Añadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido. Revolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
3. Calentar la preparación con agitación frecuente. Cuando la solución este homogénea y transparente, se retira de la fuente de calor.
4. Con algodón y gasa se hace un tapón. Se tapa el matraz, teniendo cuidado de no dejar el algodón compacto, colocar un papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico.
5. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
6. Enfriar a 45-50°C y distribuir en placas petri estériles colocadas sobre una superficie horizontal nivelada para obtener una profundidad uniforme de aproximadamente 4mm, esto corresponde a unos 25 ml a 30 ml para las placas de 100 mm de diámetro y dejar solidificar.
7. Para realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando 1 al 5% de la partida y colocando en incubación de 35 a 37 °C durante 48 horas; comprobar su hay signos de deterioro como: contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, o agrietamientos en el medio de cultivo el lote debe ser eliminado.
8. Empaquetar los medios de cultivo con papel aluminio, en paquetes no más de 10 cajas e invertidas. Rotular con nombre y fecha el lote del medio de cultivo preparado.
9. Almacenar y conservar las placas de forma invertida a una temperatura de 2 a 8 °C hasta que el medio sea utilizado. La duración del medio de cultivo es hasta un máximo de una semana.

5. Características del producto

- Medio de cultivo deshidratado: color beige, homogéneo, libre deslizamiento.
- Medio de cultivo preparado: color ámbar claro

- Suplementado con sangre: color rojo cereza

6. Almacenamiento y caducidad

Almacenar por debajo de 30 °C en un recipiente bien cerrado y el medio preparado a 2-8 °C. Usar antes de las fecha de caducidad en la etiqueta.

Fuente:

García, P., Fernández, M., Paredes, F. (1994). *Microbiología clínica práctica*. Obtenido de [https://books.google.com.ec/books?id=4N8qVKckrUUC&pg=PA395&dq=microbiologia+basas+en+la+experimentacion&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwidn6zwrITcAhWGt1kKHWG5AnEQ6AEIOzAE#v=onepage&q=microbiologia%20%20basas%20en%20la%20experimentacion&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=4N8qVKckrUUC&pg=PA395&dq=microbiologia+%20basas+en+la+experimentacion&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwidn6zwrITcAhWGt1kKHWG5AnEQ6AEIOzAE#v=onepage&q=microbiologia%20%20basas%20en%20la%20experimentacion&f=false)

Mast Group. (s.f.). *Mueller Hinton Agar*. Obtenido de http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU335_SPA.pdf


Betty A. Forbes. Bailey & Scott; Diagnóstico microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. 2009. Pág. 93, 245

Garcé, A. Preparación de medios de cultivo

(http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Preparacion%20de%20medios%20de%20cultivo.pdf) Publicado en el 2008.

Álvarez, M. Manual de técnicas en Microbiología Clínica. 1ra Edición. Marzo 1995. Pág. 38.

REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
--

 <p>NIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA</p>	<p>REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA : 01-03-2018 PÁGINA : 1/6</p>
--	---	--

Anexo 6. Protocolo de identificación bacteriana de *Escherichia coli*.

1. Introducción

La identificación de una bacteria sospechosa de ser la causa de una infección es uno de los instrumentos principales del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas. Existen varias pruebas de bacteriología convencional de realización fácil y rápida sobre colonias aisladas a partir de medios de cultivo que permiten la diferenciación entre grupos de microorganismos o entre especies bacterianas. Para la identificación de los bacilos gram-negativos (BGN) aerobios, del tipo de las enterobacterias, se realiza una batería de pruebas bioquímicas con la que se identifica a los que se aíslan más frecuentemente en nuestro medio.

2. Objetivo

Guiar la identificación de la bacteria *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas lisina, citrato, urea, TSI y SIM

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de todos los participantes del proyecto de investigación para la titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

Equipos

- Cabina de bioseguridad
- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol
- Incubadora

Insumos

- Pruebas bioquímicas: Lisina, Citrato, Urea, TSI, SIM.
- Lápiz graso

- Guantes
- Mascarilla

Instrumentos

- Puntas de siembra de platino
- Soportes para las puntas de siembra de platino

Sustancias y reactivos

- Reactivo de Kovacs
- Muestra a estudiar

5. Procedimiento

Prueba de citrato

Fundamento:

Sirve para determinar la capacidad de una bacteria para obtener energía como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento con alcalinidad resultante

Procedimiento

1. Todo el procedimiento se realiza en una cabina de bioseguridad; retirar las baterías bioquímicas del refrigerador y rotular los tubos
2. Esterilizar el asa metálica recta en punta hasta que el alambre quede al rojo vivo, dejar enfriar el asa
3. Destapar los tubos, flamear y tomar una colonia aislada de una caja Petri con crecimiento de bacterias e inocular en el pico de flauta del agar en forma de zig-zag.
4. tapar los tubos, esterilizar el asa, e incubar por 24 horas a 35 a 37 °C
5. Observar si hay recrecimiento bacteriano y cambio de color en el medio

Interpretación

Escherichia coli citrato negativo (-) no cambia de color

Agar SIM (Motilidad, Indol, Sulfuro de hidrogeno)

Fundamento

Con este medio se puede ver la capacidad de las bacterias para producir sulfuro de hidrógeno, gracias a la liberación de azufre por la acción de la enzima tiosulfato reductasa y la cisteína desulfhidrasa. La presencia de la enzima triptofanasa permite a las bacterias oxidar el triptófano en tres metabolitos el indol, escatol y ácido indo acético y la movilidad de las bacterias inoculadas que poseen flagelos y las que carecen de los mismos.

Procedimiento:

1. Encender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que quede al rojo vivo y dejar enfriar el asa
2. Destapar los tubos y flamear, recoger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri con crecimiento de bacterias
3. Sembrar por punción única en la región central del tubo, teniendo cuidado de no tocar el fondo del tubo ni mover el asa durante la siembra
4. Se tapan los tupos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubar por 18 – 24 horas en atmósfera aerobia en 35 a 37 °C.
5. Agregar 2 a 3 gotas del reactivo de Kovacs para detección del indol.

Interpretación:

Sulfuro de hidrógeno: reacción negativa, no se observa ennegrecimiento. *Escherichia coli* no produce sulfuro.

Indol: Prueba positiva: después de añadir unas gotas de reactivo de Kovacs en la superficie del medio, se forma un anillo rojo, si se mantiene la coloración amarillenta del reactivo la prueba será negativa.

Motilidad: motilidad positiva cuando se produce turbidez en el medio

Escherichia coli: motilidad positiva, indol positivo y H₂S negativo (-)

Descarboxilación de la lisina

Fundamento

Mide la capacidad enzimática de una bacteria para descarboxilar un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina.

Procedimiento

1. Esterilizar el asa metálica recta en punta; encender mechero, tomar el asa bacteriológica y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que quede al rojo vivo y dejar enfriar el asa
2. Destapar los tubos y flamear
3. Recoger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri con crecimiento de bacterias
4. Estriar en la superficie inclinada en movimiento de zig-zag y picar en la capa profunda sin tocar el fondo del tubo
5. Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubar de 35 a 37 °C por 24 horas
6. Retirar los tubos y observar si hay crecimiento bacteriano.

Interpretación

Se considera que la prueba es positiva cuando el pico de flauta se mantiene violeta (alcalino) y el fondo violeta. El resultado es negativo cuando el pico de flauta es violeta (alcalino) y el fondo amarillo (ácido), es decir se ha fermentado glucosa. La producción de sulfuro de hidrógeno se observa con un ennegrecimiento en el fondo del tubo.

Escherichia coli: fondo del medio y pico de la flauta alcalino sin cambio de color (color violeta), HS2 negativo

Prueba del triple azúcar hierro (TSI)**Fundamento**

Determina la fermentación de azúcares del medio (lactosa, glucosa y sacarosa), además se puede observar la producción de gas sulfhídrico y de CO₂ o H₂; determinando la capacidad de las bacterias de utilizar 1, 2 o 3 hidratos de carbono presentes en el medio y la posible producción de gases como producto de la actividad bacteriana.

Procedimiento

1. El agar debe solidificarse en forma de pico de flauta en un tubo con una profundidad de por lo menos 3 cm y por lo menos 2 cm de pico de agar.
2. Esterilizar el asa metálica recta en punta; tomar una colonia bien aislada de una caja de agar con crecimiento bacteriano

3. Inocular en el medio TSI picando en la capa profunda hasta de unos 3-5 mm del fondo del tubo, se retira el asa delicadamente y se estría l superficie inclinada con un movimiento de ida y vuelta.
4. Incubar por 18 – 24 horas a una temperatura de 35 a 37°C

Interpretación

Para leer las reacciones en el tubo se anota primero la del pico de flauta y en segundo lugar del fondo existiendo las siguientes posibilidades.

A = ácido (amarilla); K = alcalino (rojo naranja)

A/A= fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa

A/A (g) = fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa + producción de gas (se observan burbujas o resquebrajamiento del agar)

A/A, SH₂ = fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa + producción de gas sulfhídrico.

K/A = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa

K/A (g) = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa + producción de CO₂ o H₂.

K/A, SH₂ = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa + producción de SH₂.

K/K = No fermenta ninguna de las azúcares del medio.

Resultados de *Escherichia coli*: crecimiento abundante colonias pequeñas, en el fondo presenta color amarillo y pico de flauta color amarillo, gas positivo, HS2 negativo.

Urea agar base

Fundamento:

Esta prueba determina la capacidad de una bacteria para desdoblar la urea en amoniaco y CO₂ por acción de la enzima ureasa para reaccionar formando carbonato de amonio, alcalinizando el medio.

Procedimiento

1. Esterilizar el asa metálica en recta punta hasta que el alambre quede al rojo vivo y dejar enfriar
2. Destapar los tubos y flamear; coger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri con crecimiento bacteriano

3. En superficie inclinada se introduce el asa desde el fondo y en progresión ascendente se desliza el asa en movimiento de zig-zag (picar y estriar)
4. Tapar los tubos, esterilizar el asa e incubar a temperatura de 35 a 37 °C por 24 horas
5. Observar si hay crecimiento

Interpretación

Para poder decir que hay una reacción positiva se observa un color rojo intenso o fucsia en el pico de flauta y en el fondo o sólo en el pico de flauta. Y negativo cuando no hay cambio de color, el medio permanece de color amarillo.

Resultados de *Escherichia coli*: crecimiento con pequeñas colonias blanquecinas, color del medio amarillo sin cambio de color.

Fuente:

CLSI, C. a. (2018). *Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 28ª ed.* Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.


Hontangas, L., & Castillo, S. (16 de Mayo de 2016). *Técnicas de Identificación: MEDIA AXON.* Obtenido de MEDIA AXON Web site: <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>

Lopardo, D. H. (26 de Enero de 2015). Obtenido de BritaniaLab.com: <http://www.laensenadacorp.com/documentos/ApunteIII-UROCULTIVO.pdf>

Rodriguez, T. (2013). *Cursep.* Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/parasito/cursep/Transp.pdf>

Santambrosio, I. E. (2009). *Universidad Tecnológica Nacional* . Obtenido de https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf

REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
--

 <p>NIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA ACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	ANTIBIOGRAMA POR EL MÉTODO KIRBY BAUER	REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA : PÁGINA : 1/6
---	---	--

Anexo 7. Antibiograma por método de kirby Bauer

1. Introducción

Este método consiste en depositar en la superficie del medio de cultivo Muller Hinton previamente inoculado con el microorganismo, discos de papel filtro impregnados con antibióticos; el mismo que al ponerse en contacto con la superficie húmeda del agar se difunde. Luego de 18 a 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona o halo de inhibición. Mediante este procedimiento se determina la sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia de las bacterias recuperadas frente a los antimicrobianos, elegidos. La sensibilidad antimicrobiana es importante para guiar el tratamiento clínico, pero cada vez es más frecuente la aparición de procesos de mutación y adaptación bacteriana que hace que el proceso de manejo terapéutico sea conflictivo, por ello la respuesta in vitro de las bacterias frente a la exposición de los antimicrobianos es un procedimiento de laboratorio clínico de mucha importancia.

2. Objetivo

Guiar los pasos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* mediante el método de Kirby Bauer.

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes participantes del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

Equipos

- Cabina de bioseguridad
- Mechero de bunsen
- Lámpara de alcohol
- Incubadora

- Densitómetro
- Agitador vortex

Insumos

- Cajas Petri con medio de cultivo Muller Hinton
- Lápiz graso
- Guantes
- Regla
- Mascarilla
- Hisopos estériles

Sustancias y reactivos

- Muestra a estudiar
- Solución salina estéril

5. Procedimiento

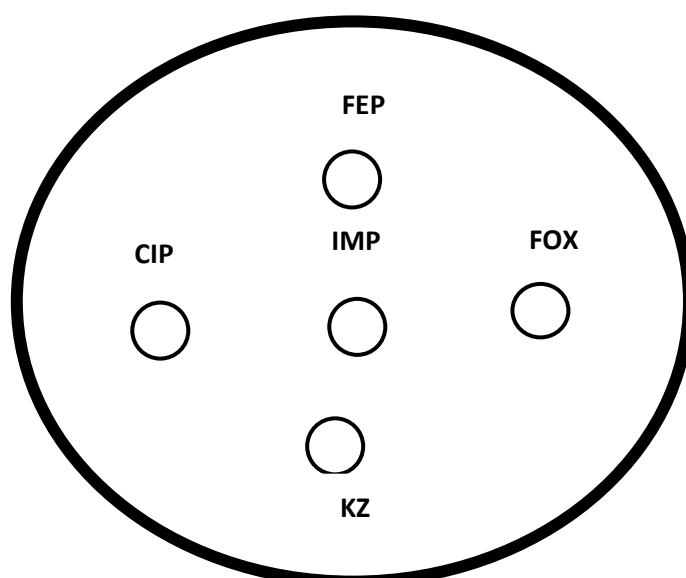
1. Tomar varias colonias bien aisladas de aspecto similar de un cultivo de 24 a 48 horas con un hisopo estéril y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente a 0.5 de la escala MacFarland en el tubo con 3 ml de solución salina.
2. Agitar en un vortex por 15 a 20 segundos.
3. Con una torunda estéril introducir en el inóculo y antes de retirarla rotar varias veces sobre las paredes del tubo por encima del nivel del líquido para eliminar el exceso y garantizar la concentración del inóculo
4. Antes de transcurrido los 15 minutos inocular las placas de Muller Hinton, previamente rotuladas sin dejar zona libre para lo que se necesitara deslizar la torunda en 3 direcciones rotando la placa 60 °C cada vez, para asegurar una distribución uniforme del inóculo sobre toda la superficie del agar. Para finalizar pasar el hisopo por el borde del agar.
5. Dejar secar por 3 a 5 minutos antes de colocar los discos
6. Colocar los discos adecuados, impregnados en los antimicrobianos sobre la superficie del agar, utilizando pinzas
7. Presionar con suavidad cada disco sobre la superficie del agar, para que el contacto sea uniforme. No mover el disco una vez que se haya puesto en contacto con el agar, ya que parte del fármaco se difunde de inmediato.

8. Los discos deben ser distribuidos de forma uniforme de manera que la distancia centro a centro no sea menor de 24 mm de manera que los halos de inhibición no se superpongan; en placas de 100 mm no se debe colocar más de 5 discos y en placas de 150 mm hasta 10 discos.
9. Invertir las placas y colocarlas en una incubadora por 18 a 24 horas a 35°C en atmósfera aeróbica para microorganismos no fastidiosos y para bacterias anaerobias facultativas incubar en atmósfera con 5 % de CO₂.
10. Leer el diámetro de inhibición con una regla milimetrada, en medios transparentes se miden por el reverso de la placa y en los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar.
11. Comparar las mediciones con las tablas aprobadas por el CLSI.

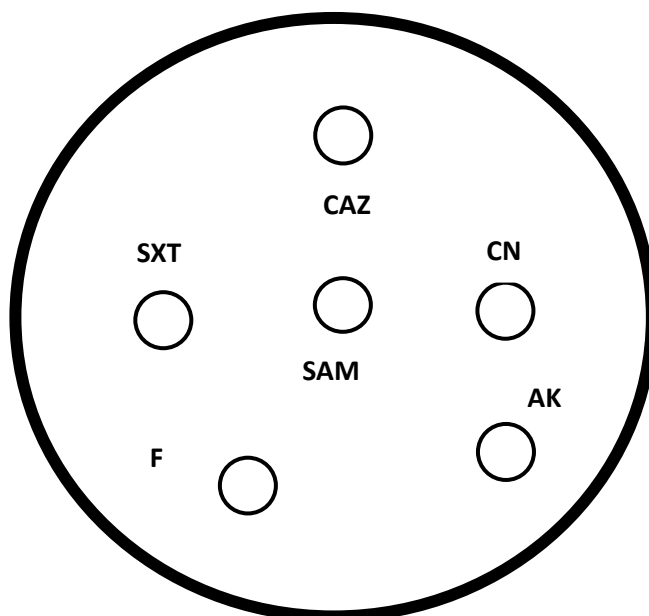
Según el criterio del CLSI y sus tablas rigen tres criterios de reporte:

- ✓ **Sensibles:** las bacterias que en dosis habituales del respectivo antimicrobiano son inhibidas
- ✓ **Sensibilidad intermedia:** cuando puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones que se alcanzan concentraciones altas del antimicrobiano o cuando se elevan dosis más elevadas de lo habitual.
- ✓ **Resistente:** cuando las bacterias no se inhiben por las concentraciones adecuadas habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del antimicrobiano.

Discos para antibiograma en bacterias gramnegativas



ANTIBIOTICO	MEDIDA DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
	S	I	SDD	R
Imipenem	>23	20-22	-	<19
Cefoxitin (FOX)	>18	15-17	-	<14
Cefepime (FEP)	>25	-	19-24	<18
Ciprofloxacina (CIP)	>21	16-20		<15
Cefazolina (KZ)	>23	20-22		<19



ANTIBIOTICO	MEDIDA DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
	S	I	R
Amoxicilina / Sulbactam (SAM)	>15	12-14	<11
Ceftazidime (CAZ)	>21	18-20	<17
Amikacina (AK)	>17	15-16	<14
Gentamicina (CN)	>15	13-14	<12
Trimetropin/Sulfametoxazol (SXT)	>16	11-15	<10
Nitrofurantoína (F)	>17	15-16	<14

6. Observaciones

A pesar de que el medio de Agar Muller Hinton tiene buena reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad, se debe tener precauciones en el momento de la preparación para poder garantizar que la difusión de los antibióticos y la densidad del inóculo sean estandarizados. Así los parámetros importantes que se deben observar en este medio son: el pH, el grosor del medio, la humedad, el efecto de la timina y timidina y la variación de la composición de los cationes divalentes.

- pH: debe ser de 7,2 o 7,3 a temperatura ambiente. Con pH bajo antibióticos como los aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activas (halos más pequeños y posibles falsas resistencias) y de lo contrario con pH alto se espera el efecto opuesto.
- Grosor del medio: el grosor del medio adecuado es de 4 mm, si el medio es muy pequeño la difusión de los antibióticos será mayor y si es muy grueso será menor, por lo que en el primer caso esperamos halos más grandes provocando una lectura de falsas sensibilidades y en el segundo los halos serán menores reportando falsas resistencias.
- Humedad: las placas no deben tener exceso de humedad si esto ocurre se deben colocar en una cabina de flujo laminar por 10 a 30 minutos hasta que no tengan gotas de condensación. Si la superficie de la placa está demasiado húmeda los antibióticos de los discos difundirán en todo el medio y se podrá observar halos inespecíficos y solapados o por el contrario muy pequeños por la acción sinérgica o antagónica de los antibióticos, respectivamente. Efecto de la timina y timidina: los medios con exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos de las sulfonamidas y trimetropina produciendo zonas de inhibición más pequeñas, menos nítidas o sin halo lo que es equiparable a falsas resistencias. Esto lo garantiza la composición del medio de cultivo de la casa proveedora con la estandarización M6 del agar.
- Variación de cationes divalentes: la variación de Ca^{++} y Mg^{++} afectan los resultados de la actividad de los aminoglucósidos y tetraciclina. Un alto contenido de cationes genera reducción de los halos de inhibición y poca cantidad de cationes ocasiona una zona de inhibición falsamente mayor. El efecto está garantizado con el agar M6.

Fuente

- CLSI, C. a. (2018). Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 28^a ed. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.
- Jawetz, M. (2010). Microbiología médica. En *25° Edicion* (págs. 215-219). México, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Murray, R. P. (2013). Microbiología Médica. En *Sexta Edicion* (págs. 269-270). Barcelona, España: Elsevier España, S.L.

REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO


Anexo 8. Halos de inhibición de acuerdo al documento del CLSI 2018

Table 2A-1. Enterobacteriaceae (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints (nearest whole mm)				Interpretive Categories and MIC Breakpoints (µg/mL)				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
PENICILLINS											
A	Ampicillin	10 µg	≥17	-	14-16	≤13	≤8	-	16	≥32	(4) Results of ampicillin testing can be used to predict results for amoxicillin. See general comment (2) .
O	Piperacillin	100 µg	≥21	-	18-20	≤17	≤16	-	32-64	≥128	
O	Mecillinam	10 µg	≥15	-	12-14	≤11	≤8	-	16	≥32	(5) For testing and reporting of <i>E. coli</i> urinary tract isolates only.
β-LACTAM/β-LACTAMASE INHIBITOR COMBINATIONS											
B	Amoxicillin-clavulanate	20/10 µg	≥18	-	14-17	≤13	≤8/4	-	16/8	≥32/16	
B	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	-	12-14	≤11	≤8/4	-	16/8	≥32/16	
B	Ceftiozane-tazobactam	-	-	-	-	-	≤2/4	-	4/4	≥8/4	(6) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1.5 g every 8 h.
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	-	18-20	≤17	≤16/4	-	32/4-64/4	≥128/4	
O	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥20	-	15-19	≤14	≤16/2	-	32/2-64/2	≥128/2	

Table 2A-1. Enterobacteriaceae (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints (nearest whole mm)				Interpretive Categories and MIC Breakpoints (µg/mL)				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
CEPHEMS (PARENTERAL) (including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I) (Continued)											
U	Cefazolin	30 µg	≥15	-	-	≤14	≤16	-	-	≥32	(11) Breakpoints when cefazolin is used for therapy of uncomplicated UTIs due to <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>P. mirabilis</i> . Breakpoints are based on a dosage regimen of 1 g every 12 h. See additional information below under CEPHEMS (ORAL).
C	Ceftaroline	30 µg	≥23	-	20-22	≤19	≤0.5	-	1	≥2	(12) Breakpoints are based on a dosage regimen of 600 mg every 12 h.
B	Cefepime	30 µg	≥25	19-24	-	≤18	≤2	4-8	-	≥16	(13) The breakpoint for susceptible is based on a dosage regimen of 1 g every 12 h. The breakpoint for SDD is based on dosing regimens that result in higher cefepime exposure, either higher doses or more frequent doses or both, up to approved maximum dosing regimens. See Appendix E for more information about breakpoints and dosing regimens. Also see the definition of SDD in the Instructions for Use of Tables section.
B	Cefotaxime or ceftriaxone	30 µg 30 µg	≥26 ≥23	-	23-25 20-22	≤22 ≤19	≤1 ≤1	-	2 2	≥4 ≥4	(14) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1 g every 24 h for ceftriaxone and 1 g every 8 h for cefotaxime. See comment (8).
B	Cefotetan	30 µg	≥16	-	13-15	≤12	≤16	-	32	≥64	
B	Cefoxitin	30 µg	≥18	-	15-17	≤14	≤8	-	16	≥32	(15) Breakpoints are based on a dosage regimen of at least 8 g per day (eg, 2 g every 6 h).
B	Cefuroxime (parenteral)	30 µg	≥18	-	15-17	≤14	≤8	-	16	≥32	(16) Breakpoints are based on a dosage regimen of 1.5 g every 8 h. See comment (8).

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 1/ 6</p>
---	---	---

Anexo 9. Protocolo de detección de mecanismo de resistencia

Identificación fenotípica de BLEE

Introducción

Las betalactamasas de espectro extendido son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, los bacilos Gram negativos tienen gran capacidad de producirlas; Son capaces de hidrolizar la mayoría de betalactámicos, monobactams, sin embargo, no afectan a carbapenémicos. Su detección puede hacerse por medios fenotípicos y moleculares, se considerarán el método de sinergia de discos y discos combinados usando controles de calidad internos y externos.

Objetivos

Detectar por el método de sinergia de discos y discos combinados la presencia de enzimas BLEE en bacterias Gram negativas aisladas de muestras de orina.

Alcance

Estos métodos serán aplicados como parte del proyecto de investigación titulado: “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas de muestras de orina y se realizarán a todas las cepas bacterianas presuntivas de expresar betalactamasas

Responsables

Docente(s)/Investigador (es): Indicaciones, procesamiento y validación de resultados. Reporte y entrega de resultados a Coordinador de los laboratorios participantes

Colaborador en cada hospital: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas BLEE

Estudiantes: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas BLEE y procesamiento.

Materiales

- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Tubos de Ensayo con 3 ml de suero fisiológico estéril
- ✓ Agar Mueller – Hinton

- ✓ Densitómetro
- ✓ Cultivo de bacterias
- ✓ Gasas
- ✓ Gradilla
- ✓ Pinzas metálicas
- ✓ Lámpara de alcohol
- ✓ Contenedores para desechar materiales cortopunzantes, especiales, comunes e infecciosos.
- ✓ Cabina de seguridad biológica
- ✓ Incubadora de 35°C

Sinergia de discos:

- ✓ Cefotaxime
- ✓ Ceftazidime
- ✓ Cefepime
- ✓ Aztreonam
- ✓ Amoxicilina-ácido clavulánico

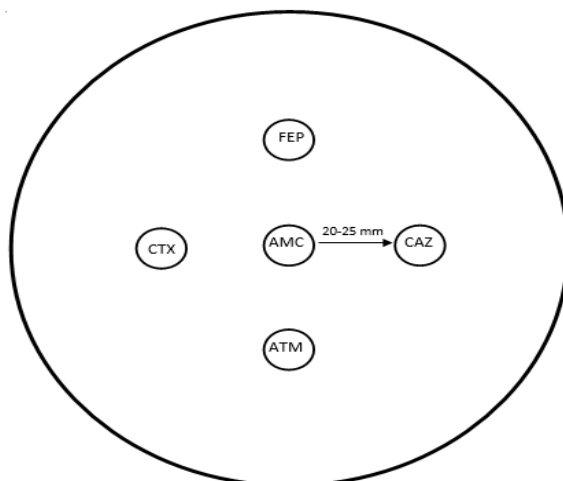
Discos combinados

- ✓ Ceftazidime 30 ug
- ✓ Ceftazidime + Ác. Clavulánico 30/10 ug
- ✓ Cefotaxime
- ✓ Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug

Procedimiento

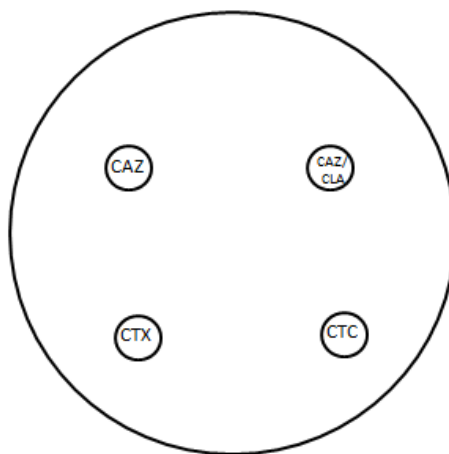
Método de sinergia:

Se colocan los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría. Colocar los discos de cefotaxime, ceftazidime, cefepime y aztreonam a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina-ácido clavulánico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C y se realiza la lectura dentro de las 16-20 horas siguientes. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo



Método de discos combinados:

Colocar los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría. Colocar los discos de Ceftazidime 30 ug, Ceftazidime + Ác.Clavulánico 30/10 ug, Cefotaxime, Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C +/- 2°C y se realiza la lectura dentro de las 10 a 18 horas. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.



Observaciones

Reporte:

Para todas las cepas productoras de BLEE confirmadas:

Reportar el nombre de la bacteria más productora de BLEE; ya que se usan los puntos de corte actuales de cefalosporinas y aztreonam; por lo tanto la interpretación de la prueba debe informarse como resistente para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam

Discos combinados:

Medir en milímetro los diámetros de las zonas de inhibición completas. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- **Positivo:** Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime, cefotaxime o cefepime en presencia de ácido clavulánico ≥ 5 mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico
- **Negativo:** No incremento o diferencia < 5 mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con ácido clavulánico respecto a los de las cefalosporinas correspondientes sin ácido clavulánico. Los resultados positivos se interpretan según la tabla:

Mecanismo de resistencia	CTX	CTX+CLA	CTX+CLO	
BLEE	CTX+CLA o CTX+CLA+CLO	≥ 5 mm -	- < 4 mm	- ≥ 5 mm

Nota: comparar siempre con el control positivo y negativo

Sinergia de Discos:

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:


- **Positivo:** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor. Usualmente el halo se deforma adquiriendo formas ovaladas o con cola de pescado.
- **Negativo.** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam ni presencia de "zona fantasma".

Fuente:

CLSI. (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.

SEIMC. (2015). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.

REVISADO Y APROBADO POR: Lcda. Carmen Ullauri

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	Validación de la metodología y control de calidad	REVISIÓN: 1 PÁGINA : 1/3	EDICIÓN: 1
---	---	---	---	-------------------

Anexo 10. Viabilización y conservación de cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 700603

Descripción del producto:

Cada KWIK-STIK™ contiene un pallet de microorganismos liofilizados, una ampolla de líquido hidratante y un bastoncillo inoculante. Cada dispositivo esta sellado dentro de una bolsa laminada que contiene un material secante para evitar la acumulación adversa de humedad. Los microorganismos están a un máximo de 4 pasos de cultivo de referencia y se presenta en paquetes de 2 y 6.

Viabilización de microorganismos:

La viabilización de los microorganismos trata de comprobar la viabilidad (vivos) de aquellos microorganismos que han sido rehidratados a partir de cepas liofilizadas y sobre todo se estén multiplicando, y desarrollando sus funciones de manera normal. La Viabilización de *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Klebsiella pneumonie* ATCC 700603 se utiliza para el control y positivo de las pruebas de screening y confirmatorias de BLEE

Procedimiento:

1. Se obtiene esta cepa pura, adquirida comercialmente
2. Abrir el vial por la mitad
3. Apriete solo una vez la ampolla superior que se encuentra en la tapa (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla), para liberar el líquido hidratante
4. Manténgalo vertical y golpee sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido hidratante por el mango hasta la parte inferior de la unidad, que contiene el gránulo. Deje el líquido hidratante fluya por el mango del hisopo hasta llegar al fondo de la unidad, que contiene el gránulo.
5. Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea
6. A continuación proceder a sembrar por agotamiento al medio de agar nutritivo, realizar primeramente una descarga y se estría por toda la superficie de la placa y dejar incubar durante 24 horas

7. A las 24 horas de incubación se procede hacer un pase en agar sangre de cordero y en agar MacConkey para obtener cepas aisladas para el control de calidad.
8. El control de calidad de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* viabilizados se lo realiza mediante la caracterización macroscópica, morfológica y bioquímica. Esto se realiza a partir del cultivo primario.

Mantenimiento de las cepas de referencia para el control de calidad interno

Para conservar las cepas de referencia se recomienda congelarlas usando criopreservantes como caldo glicerol al 15-20% de la siguiente manera:

1. Esterilizar todo el material: tubos, crioviales con 0.8ml de glicerina, hisopos, caldo de infusión cerebro corazón
2. Colocar en un tubo estéril una cantidad de 8 ml de caldo infusión cerebro corazón
3. De las cepas crecidas en el medio de agar se procede a coger colonias y se realizar la escala de McFarland con el caldo infusión cerebro corazón dándonos una cantidad de 1 en la escala
4. A continuación se colocan en los crioviales con 0,8ml de glicerina hasta la marca indicada en los viales, se cierra y se procede a rotular
5. Agitar en vórtex, colocar las alícuotas en una gradilla y mantenerlas en refrigeración a una temperatura de -70 °C (duración indefinida) o -20 °C (alrededor de un año) para su posterior utilización en el control de calidad de la investigación.

Fuente:

Diáz, I., Prat, S., & Ramírez, V. (Marzo de 2015). *Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología*. Obtenido de Estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusion por disco :
http://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendacion_Contra_Calidad_Bacteriologia.pdf

Microbiologics. (s.f.). *Instrucciones de uso KWIK-STIK TM*. Obtenido de
http://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=530&c=915960&h=fe0261b9ecb4cb8f6a9c&_xt=.pdf

REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
--



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO**

Anexo 11. Inserto de la cepa control negativo de *Escherichia coli* ATCC 25922



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-219 Reference Number: ATCC® 25922™* Purity: Pure Passage from Reference: 3</p>	<p>Expiration Date: 2018/11/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/1/23</p>
Performance	
<p>Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough</p> <p>Microscopic Features: Gram negative straight rod</p>	<p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.</p>	<p>Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm</p> <p style="text-align: center;"> Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE</p>
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p>	
<p>  TESTING CERT #2655.01</p>	<p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> <p style="text-align: center;">MEDIBAC-INC S.A. Distribuidor para el Ecuador de MICROBIOLOGICS Registro Sanitario AD-541-04-13</p>

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Escherichia coli
 Sample Description: 0335
 Sample ID: 335-219
 Sample Creation Date/Time: 2017-01-12T15:07:53.975 CC
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
E1(+++) (A)	335-219	<u>Escherichia coli</u>	2.508

Comments:

closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment

MEDIBAC-INC S.A.

Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICS


Registro Sanitario AD-541-04-13

Anexo 12. Inserto de la cepa control positivo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> Catalog Number: 0784 Lot Number: 784-49 Reference Number: ATCC® 700603™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2016/12/6
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types possible: Large, circular, convex, entire edge, gray, glistening. Large, circular, convex, entire edge, cream / off white, mucoid, glistening.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram negative short, plump, straight rod.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative (1) Ceftazidime (30 mcg - Disk Susceptibility): 10 - 18 mm (1) Ceftazidime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): >=5 mm CAZ zone (1) Cefotaxime (30 mcg - Disk Susceptibility): 17 - 25 mm (1) Cefotaxime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): >= 3 mm CTX zone  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



TESTING CERT #2655.01

MEDIBAC-INC S.A.
 Distribuidor para el Ecuador de
 MICROBIOLOGICS
 Registro Sanitario AD-541-04-13

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699		(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A – C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

Analyte Name: Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae
 Analyte Description: 0784
 Analyte ID: 784-49
 Analyte Creation Date/Time: 2016-11-30T08:08:14.304 TB
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, IVD, Listeria
 Applied Taxonomy Tree:

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
F8(++) (A)	784-49	Klebsiella pneumoniae	2.184

Comments:

N/A


MEDIBAC-INC S.A.

Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICS

Registro Sanitario AN 541-04-13

Anexo 13

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	FORMATO DE IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	CÓDIGO: REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 22-03-2018 PÁGINA: 1/1
---	---	---	--


FORMATO DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE MEDILAB																					
FECHA DD/MM/AA	CODIGO	PROVENIENCIA		SEXO		EDAD	BACTERIA AISLADA	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD										TIPO DE RESISTENCIA			OBSERVACIONES
		Consulta externa	Hospitalización	Masculino	Femenino			SAM	AK	CAZ	KZ	FEP	FOX	CIP	CN	F	SXT	IMP	OTROS	RI,FR	

S: sensible; **R:** resistente; **I:** susceptibilidad intermedia; **AK:** amikacina; **SAM:** ampicilina/sulbactam; **KZ:** cefazolina ; **FEP:** cefepime; **CAZ:** ceftazidime; **FOX:** ceftoxitin; **CIP:** ciprofloxacina; **CN:** gentamicina; **MEM:** meropenem; **IMP:** imipenem **F:** nitrofurantoina; **SXT:** Trimetropim/ sulfametoxazol, **ATM:**aztreonam.

Nota:

- **Presuntivas de expresar BLEE:** Que tengan diámetro de CAZ, < 22mm; CRO < 25 mm y Proteus sp. < 27 mm y ATM < 27 mm.
- **Presuntivas de expresar AmpC:** Que tengan disminución de sensibilidad o resistencia a cefotaxima y la R a ceftoxitina, son resistentes también a los inhibidores de betalactamasas.
- **Presuntivas de expresar carbapenemas:** En el caso de Enterobacterias: MEM e IMP < 22mm Proteae ver ERT < 27mm. Acinetobacter IMP < 21 mm o MER < 18 mm

Anexo 14

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS	CÓDIGO:
			REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 22-03-2018 PÁGINA: 1/1

FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS										
BLEE										
Fecha	Código de muestra	Sinergia de discos		Discos combinados						
		CTX	.	CAZ	CAZ/CLA	Interpretación de Resultados	CTX	CTX/CLA	Interpretación de resultado	Control de calidad
		FEP	Control de calidad							
		AMC								
		CAZ								
		ATM								

SIGNIFICADO DE SIGLAS: CRO: Ceftriaxone FEP: Cefepime AMC: Amoxicillina CAZ: Ceftazidime ATM: Aztreonam CTX: Cefotaxime CAZ/CLA: ceftazidime/ claritromicina CTX/CLA: cefotaxime/ claritromicina

Obtención y expresión de resultados

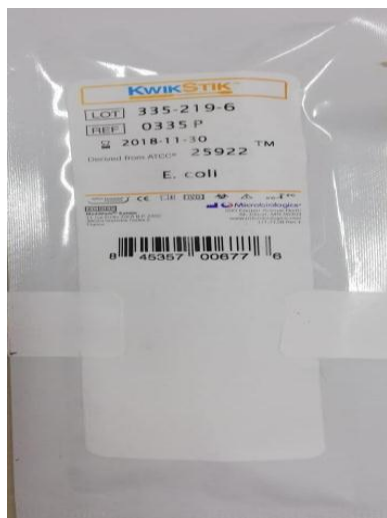
Prueba de Sinergia de Discos:

- **Positivo:** Ampliación del Halo de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam en la “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor.
- **Negativo:** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam ni presencia de “zona fantasma”.

Prueba de Discos combinados:

- **Positivo:** Incremento del halo de inhibición (>5mm) de ceftazidime con inhibidor en presencia de ceftazidime sin inhibidor.
- **Negativo:** No incremento o diferencia (<5 mm) en los halos de inhibición de ceftazidime con inhibidor respecto a los de ceftazidime sin inhibidor.

Anexo 15. Fotografías



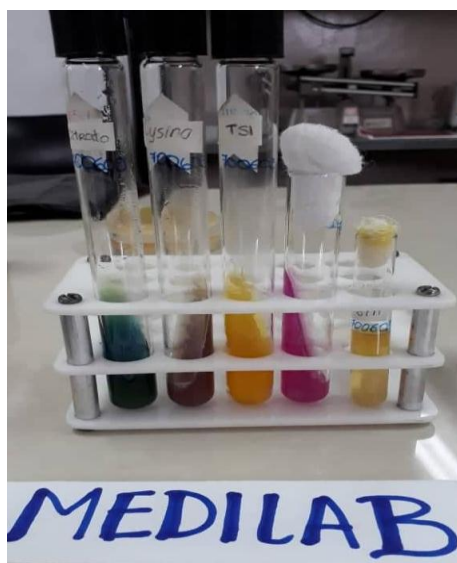
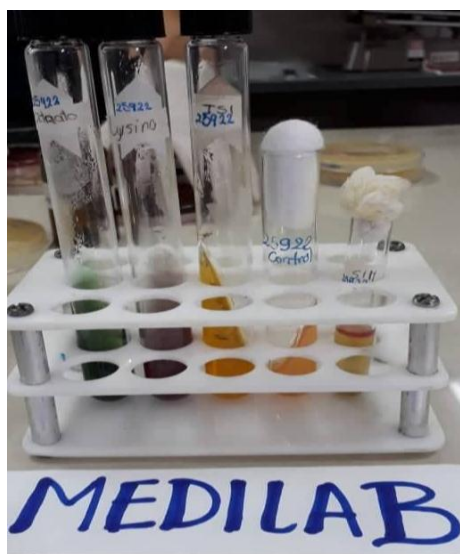
CEPA CONTROL NEGATIVO: *Escherichia coli* ATCC 25922

CEPA CONTROL POSITIVO: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

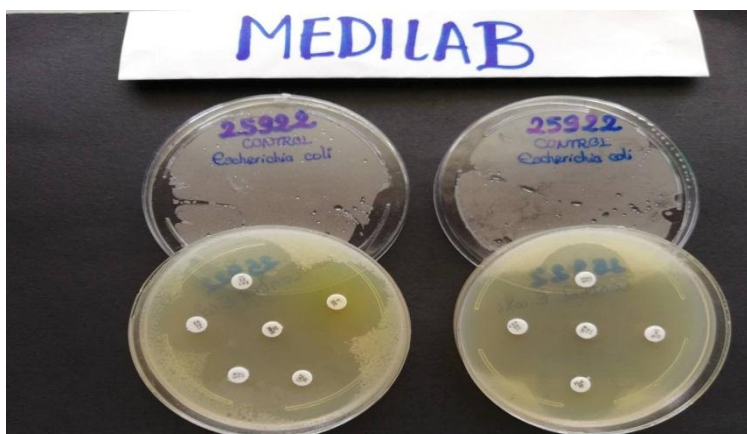
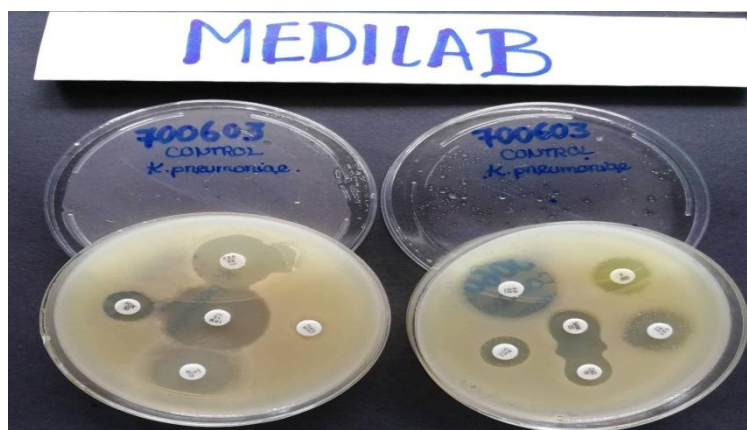


A. *Escherichia coli* en Agar MacConkey y Agar EMB

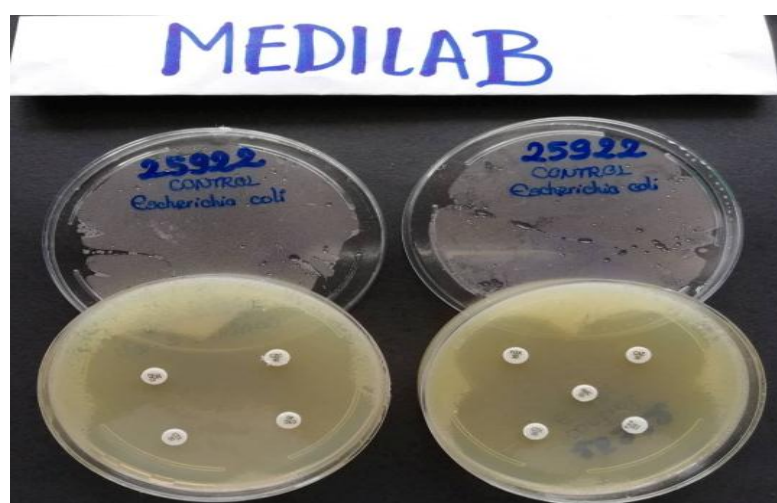
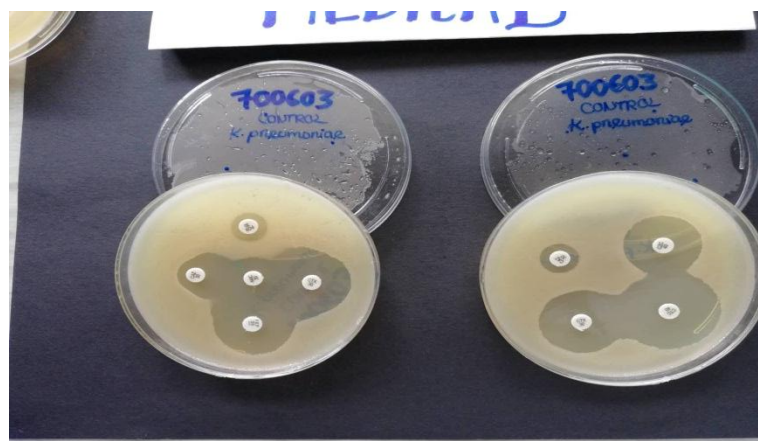
B. *Klebsiella pneumoniae* en Agar MacConkey y Agar EMB



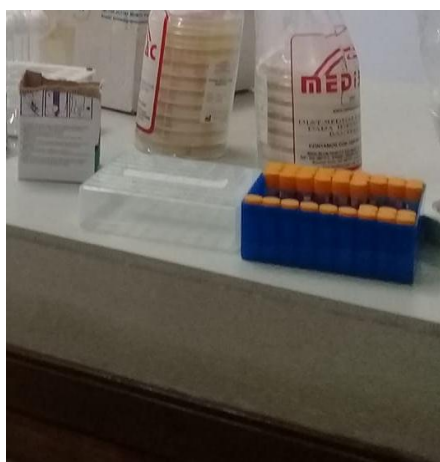
PRUEBAS BIOQUÍMICAS: de las cepas control de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*



ANTIBIOGRAMA: Control de calidad del Müller Hinton y discos control negativo y positivo



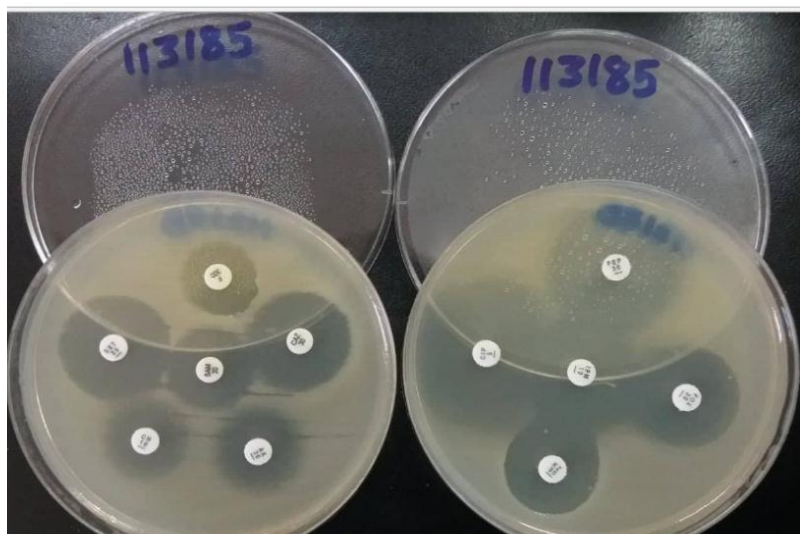
CONTROL POSITIVO DE BLEE: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
CONTROL NEGATIVO DE BLEE: *Escherichia coli* ATCC 25922



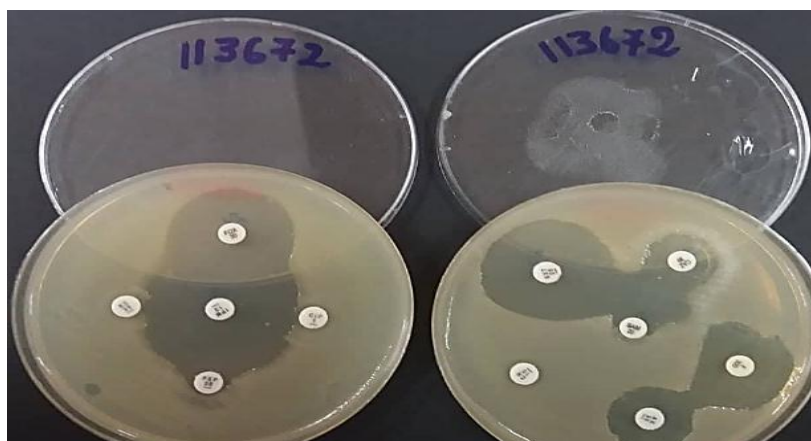
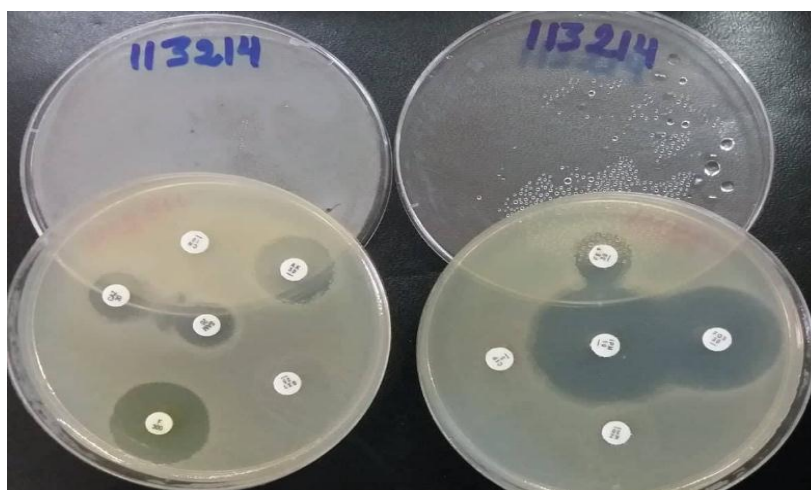
Conservación de las cepas control



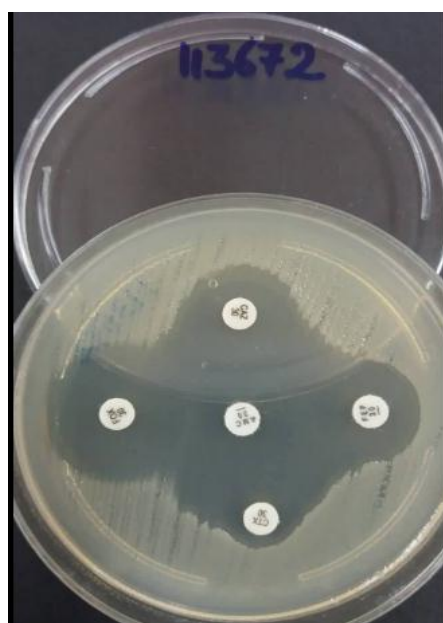
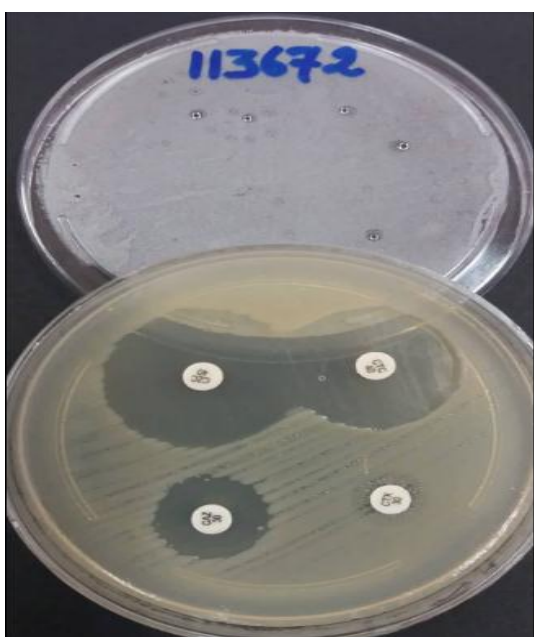
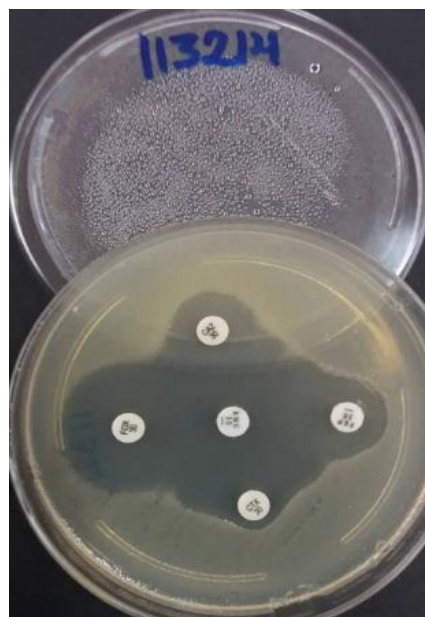
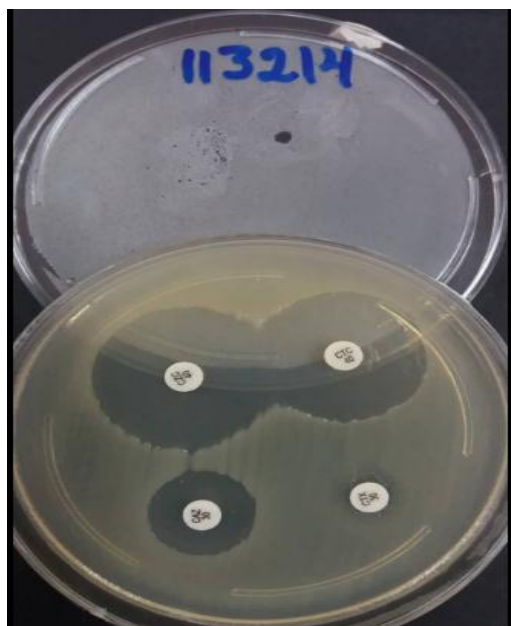
Realización de antibiograma



Antibiograma de *Escherichia coli* no produtora de BLEE



ANTIBIOGRAMA: *Escherichia coli* sospechosa de BLEE



Confirmación de BLEE por el método discos combinados y sinergia de discos

Anexo 16. Certificado de ejecución del proyecto

Loja, 09 de Julio del 2018

Dra. Sandra Freire

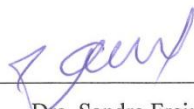
Docente de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

A petición verbal del interesado, CERTIFICO:

Que la Srta. Glenda Maribel Morocho Marín, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, realizó la parte práctica del trabajo investigativo durante los meses de Marzo, Abril, y Mayo del presente año, el cual incluyó la recolección de datos y muestras con solicitud de urocultivos de usuarios que acuden al Laboratorio Clínico MEDILAB, además del procesamiento de muestras de urocultivos positivos en el Centro de Diagnóstico Médico del Área de la Salud Humana de la UNL; con el objetivo de obtener información correspondiente para que sea utilizada en el proyecto de investigación titulado: "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTE DE INFECCION DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLINICO MEDILAB-LOJA", previo a la obtención del título de licenciado en Laboratorio Clínico.

Es cuanto puedo informar en honor a la estricta verdad y faculto al interesado de hacer uso legal que creyera conveniente de la presente certificación.

Atentamente.



Dra. Sandra Freire

Docente de la carrera de Laboratorio Clínico



Anexo 17. Certificado por parte del responsable del Centro de Diagnóstico Médico de constancia de la ejecución del proyecto de investigación

Loja, 09 de Julio del 2018

Ing. María Jiménez

Responsable del Centro de Diagnóstico Médico de la UNL.

A petición verbal del interesado, CERTIFICO:

Que la Srta. Glenda Maribel Morocho Marín, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, realizó la parte práctica del procesamiento de muestras de Urocultivos realizado en el horario de 15:00 a 19:00 de Lunes a Viernes, los meses de Marzo, Abril y Mayo del presente año, en el Centro de Diagnóstico Médico para la realización del proyecto titulado “SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTE DE INFECCION DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLINICO MEDILAB-LOJA”, previo a la obtención del título de licenciado en Laboratorio Clínico.

Es cuanto puedo informar en honor a la estricta verdad y faculto al interesado de hacer uso legal que creyera conveniente de la presente certificación. Atentamente.

Atentamente.



Ing. María Jiménez

Responsable del Centro de Diagnóstico Médico de la UNL.

Anexo 18. Certificado de ver realizado la traducción del resumen del español al inglés de la presente investigación

English Speak Up Center

Nosotros "*English Speak Up Center*"

CERTIFICAMOS que

La traducción del documento adjunto solicitada por la señorita **GLENDA MARIBEL MOROCHO MARIN** con cédula de ciudadanía número **1900815695** cuyo tema de investigación se titula: "**Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* causante de infección de vías urinarias en usuarios del laboratorio clínico MEDILAB - Loja.**", ha sido realizada por el Centro Particular de Enseñanza de Idiomas "*English Speak Up Center*".

Esta es una traducción textual del documento adjunto, y el traductor es competente para realizar traducciones.

Loja, 3 de septiembre de 2018



Mgs. Elizabeth Sánchez Burneo

DIRECTORA ACADÉMICA



Apéndices. Facturas de compra de cepas control, y medio de cultivo Müller Hinton y antibióticos



MEDIBAC- INCS.A.
 MATRIZ
 Guayaquil : Enrique Ortega Moreira (Av. Las Aguas) 1111 y Laureles (Urdesa Central)
 Teléfonos: (04) 288 1414 - 238 8597 - 288 1887
 Celular: (09) 8574 8298
SUCURSAL MULTIPLE GUAYAQUIL
 Victor Emilio Estrada # 916 e Ilanes (Urdesa Central)
 Telfs.:(04) 454 8929 - 463 2714 - 460 2999 - 461 2069
SUCURSAL QUITO
 Av. República de El Salvador N34-399 e Irlanda. (La Carolina), Edificio Rosanía, Planta Baja, Oficinas 4 y 6
 Teléfonos: (02) 226 1478 - 246 6318
SUCURSAL PORTOVIEJO
 Cda. Los Mangos calle Elias Cedeño E/ Bolívar Avila y Manuel Andrade, Piso 1. Telf.: (05) 256 5182 Celular:(09) 5893 5253

R.U.C. 0992401494001
FACTURA
 001-001- 000053616

Autorización S.R.I. 1121363800
 FECHA DE AUTORIZACIÓN: 1/ SEPTIEMBRE/2017

Documento Categorizado: NO

Cliente: **CELLY CAMPOVERDE TAYRON ALBERTO**
 Dirección: **SECTOR CELI-ROMAN, BENJAMIN PEREIRA Y ALFREDO**
 R.U.C. / C.C.: **1105704165**
 Teléfono: **2584360**
 Guía de Remisión:
 Orden de Compra:

Asesor Comercial: **VICTOR V**
 Fecha de Emisión: **31/10/2017**
 Fecha de Vencimiento: **01/11/2017**
 Orden de Pedido: **19.648**

CANT.	CÓDIGO	MARCA	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1	0335P-S		E. COLI ATCC 25922 (DUOPACK)	135,00	135,00
1	01006P-S		K. PNEUMONIAE ATCC BAA-1706	165,00	165,00
1	01005P-S		K. PNEUMONIAE ATCC BAA-1705	165,00	165,00
1	0704P-S		K. PNEUMONIAE ATCC 700603	145,00	145,00

FORMA DE PAGO	OTROS	683,20	SUMAN \$	610,00
Son: Seiscientos Ochenta Y Tres Y 20 / 100 Dólares Americano			DESCUENTO	
			BASE 0	0,00
			BASE	610,00
			I.V.A. 12 %	73,20
			TOTAL \$	683,20

FAVOR EMITIR CHEQUE CRUZADO A NOMBRE DE MEDIBAC INC. S.A.
 Declaro recibir la mercadería de esta FACTURA a mi entera conformidad; por lo tanto, DEBO Y PAGARE a la orden de MEDIBAC INC S.A.
 esta factura de encontrarse vendida, al siguiente día devengará el máximo de INTERES POR MORA autorizado por la LEY, más todos los gastos
 e intereses ocasionados. En caso de juicio me sujetaré a los jueces competentes de la ciudad de Guayaquil y a la acción ejecutiva para
 el cumplimiento a fuer y derecho. PASADO LOS CINCO DIAS DE SALIDA LA MERCADERIA NO SE ACEPTAN DEVOLUCIONES.
 ESPERITE SU RECEPCION POR EL CANCELAMIENTO DE ESTA FACTURA

ORIGINAL: ADQUIRENTE / PAGO EN: EMISOR COMPAÑIA

Cliente: JARA TAMAYO EDGAR JAVIER
Dirección: EL CAPULI, VIA A MALACATOS, LOJA.
R.U.C. / C.C.: 1104870256
Teléfono: 2547116
Asesor Comercial: VICTOR
Fecha de Emisión: 08/03/18
Fecha de Vencimiento: 09/09/18
Orden de Pedido: 22.568

CANT.	CÓDIGO	MARCA	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO
40	AGAR7040-S		CAJA AGAR SANGRE BIPETRI	1,85
35	AGAR7023-S		CAJA AGAR MUELLER HINTON MONO	2,00
1	FLET		FLETE INTERNO	4,00

MEDIBAC
Innovación, Calidad y Servicio

FORMA DE PAGO: OTROS **165,28**
Son: Ciento Sesenta Y Cinco Y 28 / 100 Dólares Americanos

Firma Emisora: MEDIBAC INC S.A.
Firma Cliente:

SUMAN DESCUENTO: BASE 0
BASE: I.V.A. 12%
TOTAL:

Medibac Inc S.A.
 Guayaquil | Enrique Ortega Murria (Av. Las Aguas) 1111
 Y Laureles (Urdesa Central)
 Teléfonos: (04) 288 1414 - 238 8587 - 288 1887
 Celular: (09) 6574 8298
 SUCURSAL MULTIPLE GUAYAQUIL
 Victor Emilio Estrada # 918 e Hanaes (Urdesa Central)
 Telfs: (04) 454 8929 - 463 2714 - 460 2999 - 461 2069
 SUCURSAL QUITO
 Av. República de El Salvador N34-390 e Irlanda. (La Carolina),
 Edificio Rosalia, Planta Baja, Oficinas 4 y 5
 Teléfonos: (02) 226 1478 - 246 6318
 SUCURSAL PORTOVIEJO
 Horacio Villavicencio y Av. Universitaria frente a la Clínica García
 Telf: (06) 263 0711 Celular: (09) 6893 6263

R.U.C. 0952401494001
FACTURA
001-001-000056007
Autorización S.R.L. 1121999579
FECHA DE AUTORIZACIÓN: 26/ DICIEMBRE/2017

Cliente: GLENDA MOROCHO MARIN
Dirección: LOJA
R.U.C. / C.C.: 1900815695
Teléfono: 0985898647
Asesor Comercial: VICTOR V
Fecha de Emisión: 11/04/2018
Fecha de Vencimiento: 12/04/2018
Orden de Pedido: 23.395

CANT.	CÓDIGO	MARCA	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
3	CT0822B	OXOID	SULPHAMETHOX+TRIMETHOPRIM 25 OXOID	4,50	13,50
3	CT0183B	OXOID	FOSFOMYCIN FOS 50MCG OXOID L:2170543 EXP:2020-07-31	4,50	13,50
3	CT0167B	OXOID	AMIKACIN 30MCG OXOID L:2288825 EXP:2021-02-07	4,50	13,50
2	CT8425B	OXOID	CIPROFLOXACIN CIP 500CG OXOID L:2280855 EXP:2021-01-29	4,50	9,00
3	CT0811B	OXOID	CEPHAZOLIN 30MCG OXOID L:2181107 EXP:2020-08-07	4,50	13,50
1	CT0223B	OXOID	AMOXICILIN+ACID. CLAV. 30MCG OXOID L:2280824 EXP:2021-01-22	4,50	4,50
4	CT0455B	OXOID	IMIPENEM IPM 10MCG OXOID L:2252427 EXP:2018-11-27	4,50	18,00
1	CM0337B	OXOID	MUELLER HINTON AGAR 500 GR OXOID L:2269582 EXP:2023-01-05	113,36	113,36
4	C060510	EUROPA	CAJAS TRIPETRI 90X15MM [10] (EUROPA) L:161232 EXP:2022-05-01	2,14	8,56
3	CT0824B	OXOID	GENTAMICIN GN 10MCG OXOID	4,50	13,50
1	CT0771B	OXOID	CEFEPIME FEP 30MCG OXOID	4,50	4,50
2	CT0412B	OXOID	CEFTAZIDIME CAZ 30MCG OXOID L:2277127 EXP:2019-01-15	4,50	9,00
2	CT0168B	OXOID	CEFOTAXIME CTX 30MCG OXOID L:1969539 EXP:2018-11-30	4,50	9,00
3	CT0119B	OXOID	CEFOXTIN FOX 30MCG OXOID L:2217923 EXP:2020-10-04, L:2248255 EXP:2020-11-22	4,50	13,50
1	FLET		FLETE INTERNO	4,00	4,00

FORMA DE PAGO: OTROS **291,75**
Son: Dosecientos Noventa Y Un Y 75 / 100 Dólares Americanos

Firma Emisora: MEDIBAC INC S.A.
Firma Cliente:

SUMAN DESCUENTO: BASE 0
BASE: I.V.A. 12%
TOTAL:

FAVOR EMITIR CHEQUE CRUZADO A NOMBRE DE MEDIBAC INC. S.A.
 Declaro recibir la mercadería de esta FACTURA a mi entera conformidad, por lo tanto, DEBO Y PAGARE a la orden de MEDIBAC INC S.A.
 Esta factura de encontrarse vendida, el siguiente día devengará el máximo de INTERES POR MORA autorizado por la LEY, más todos los gastos
 de cobranzas ocasionados. En caso de juicio me sujetaré a los jueces competentes de la ciudad de Guayaquil y a la acción ejecutiva para
 lo cual renuncio a fuero y domicilio. PASADO LOS CINCO DIAS DE SALIDA LA MERCADERIA NO SE ACEPTAN DEVOLUCIONES.
 SOLICITE SU RECIBO DE COBRO AL CANCELAR ESTA FACTURA. ORIGINAL: ADQUIRENTE // COPIA 1: EMISOR COPIA 2: S.R.L.