

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

“CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA
FRENTE A *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE
PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL
MILITAR DE LA CIUDAD DE LOJA”.

TESIS PREVIA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE LICENCIADA EN
LABORATORIO CLÍNICO.

AUTORA:

XIMENA LIZBETH LANCHE SILVA

DIRECTORA:

Lic. GLENDA ALFARITA RODRÍGUEZ LEÓN, Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2016

CERTIFICACIÓN

Licenciada

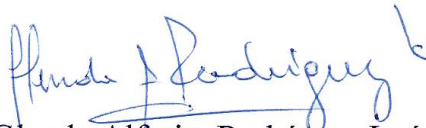
Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación denominado “CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA FRENTE A *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR DE LA CIUDAD DE LOJA”, llevado a cabo por la egresada XIMENA LIZBETH LANCHE SILVA, previo a la obtención del título de Licenciatura en Laboratorio Clínico, ha sido dirigido y prolijamente revisado desde el inicio de su ejecución; por lo tanto, se autoriza su presentación para la calificación correspondiente.

Loja, 04 de Enero del 2016.



Lic. Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Ximena Lizbeth Lanche Silva, declaro ser la autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja "Área de la Salud Humana" 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.

Loja, enero del 2015.

Autora: Ximena Lizbeth Lanche Silva

Firma:



C.I. 1900592856.


CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR, PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.

Yo, **Ximena Lizbeth Lanche Silva**, declaro ser autora de la tesis titulada: **“CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA FRENTE A *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR DE LA CIUDAD DE LOJA, MARZO-MAYO 2015”**, como requisito para optar al grado de **Licenciada en Laboratorio Clínico**; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad 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 realiza un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 13 días del mes de Febrero del 2016, firma el autor.

Firma: 

Autora: Ximena Lizbeth Lanche Silva

Cédula: 1900592856

Dirección: Barrio Daniel Álvarez/ Calles: Monte Sinahí y Jacob

Correo electrónico: ximel92@hotmail.es

Teléfono: 072109154

Celular: 0994811469

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora de Tesis: Lic. Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc

Tribunal de Grado:

Presidenta: Dra. Mariela Alexandra Idrovo Vallejo, Mg. Sc.

Vocal: Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

Vocal: Dra. Maricela del Rosario López Morocho, Mg. Sc.

DEDICATORIA

Infinitas gracias padre santo y Virgen Santísima de Cisne por escuchar mis oraciones día a día y por permitirme llegar a esta etapa final. A mis padres Miguel y Gloria quienes son el motor y el pilar fundamental en mi vida ya que con sus esfuerzos, sacrificios, dedicación, enseñanzas y entrega me han permitido seguir adelante para crecer como persona y ahora como profesional para servir a la sociedad. Gracias por todo el amor que me brindan, por ser los testigos de mis alegrías y tristezas; y, por hacer de mí una mujer formada con principios y valores.

A todos mis familiares y amigas (os) que de una u otra forma me han brindado ánimos y fuerzas para culminar con mis estudios universitarios. Una vez más gracias a todos, sin su apoyo no hubiera sido posible alcanzar esta meta.

Ximena Lanche Silva

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Loja Área de Salud Humana, en especial a la carrera de Laboratorio Clínico quien me acogió en sus aulas en esta etapa de estudio.

A mis docentes por impartirme sus conocimientos y enseñanzas en estos cuatro años de vida universitaria para así poder realizarme profesionalmente; y de manera especial, un agradecimiento eterno al Dr. Luis Morocho y al Ing. Patricio Aguirre por brindarme su ayuda y asesoría necesaria durante el desarrollo de este trabajo investigativo en el Centro de Investigaciones y Servicios de Análisis Químicos (CISAQ) de la UNL; así mismo, al Laboratorio Clínico SER por brindarme su apoyo y servicio.

A la Lic. Glenda Rodríguez León quien dirigió mi tesis de grado. Muchas gracias a todos ustedes y a las personas que directa o indirectamente presenciaron esta etapa final.

La Autora.

1. TÍTULO

**“CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA FRENTE A
Escherichia coli EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE PACIENTES DE
CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR DE LA CIUDAD DE LOJA”.**

2. RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) constituyen un grave problema de salud para la población, siendo principal motivo de consulta a nivel intra y extra hospitalario. Estas infecciones se desarrollan por la invasión, colonización y multiplicación de gérmenes en el tracto urinario, habitualmente enterobacterias que producen alteración de la flora residente facilitando la infección. La gentamicina es un antibiótico utilizado como terapia alternativa para tratar ITU complicadas, pertenece al grupo de los aminoglucósidos, con acción bactericida y es activo frente a microorganismos gramnegativos como la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*). La presencia de ciertos factores, entre estos: la automedicación, el inadecuado cumplimiento de la terapia antimicrobiana, posologías incompletas y la falta de conocimiento han sido la causa primordial para que las bacterias desencadenen modificaciones genéticas y resistencia a los antibióticos. Es importante conocer la sensibilidad o resistencia a los antimicrobianos mediante métodos convencionales como la macrodilución que resulta muy efectiva para estudiar la concentración mínima inhibitoria (CMI) o la mínima cantidad que el antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. En el presente estudio se determinó la CMI de gentamicina frente a la bacteria *E. coli* para evaluar la sensibilidad y/o resistencia bacteriana. El estudio fue de tipo descriptivo y corte transversal, en el que se analizaron 146 urocultivos, de los cuales 59 resultaron con crecimiento bacteriano, se realizaron pruebas bioquímicas identificando *E. coli*, como el principal agente causal de ITU en un 76% (45 cepas). Se aplicó la técnica de macrodilución para determinar la CMI del antibiótico sobre el microorganismo, obteniendo como resultado que, de las 45 cepas de *E. coli* identificadas, el 65% resultaron sensibles, el 22% con sensibilidad intermedia y el 13% resistentes.

Palabras Claves: *Concentración mínima inhibitoria (CMI), gentamicina, Escherichia coli, método de macrodilución.*

SUMMARY

The infections of the urinary tract (UTI) constitute a serious problem of health for the population, being the main reason of consultation to level intra and extra hospitably. These infections are developed for the invasion, settling and multiplication of germs in the urinary tract, usually enterobacteria that produce alteration of the resident flora facilitating the infection. Gentamicin is an antibiotic used in the treatment of not complicated UTI, belongs to the group of the aminoglycosides, with bactericidal action against gramnegative microorganisms as the bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*). The presence of certain factors, between these: the automedication, the inadequate compliance of the antimicrobial therapy, incomplete dosages and that the lack of knowledge have been the primary cause for bacterium unchain genetic modifications and resistance to antibiotics. It is important to know the sensibility or resistance to antimicrobial drugs using conventional methods such as the macrodilución that is very effective to study the minimum inhibitory concentration (MIC) or the minimum quantity that the antibiotic is able to inhibit the bacterial growth. In the present study was to determine the MIC of gentamicin against *E. coli* germ to assess the sensibility and/or bacterial resistance. The study was descriptive and transversal cut, which analyzed 146 urine cultures, of which 59 were with bacterial growth, biochemical tests were performed to identify *E. coli*, as the main causal agent of ITU in 76% (45 strains). The technique of macrodilution was applied to determine the MIC of the antibiotic on the microorganism, obtaining as result that, of the 45 strains of *E. coli* identified, 65% were susceptible, 22% with intermediate sensibility and 13% resistant.

Key words: *Minimum Inhibitory Concentration (MIC), gentamicin, Escherichia coli, macrodilución method.*

3. INTRODUCCIÓN

Las Infecciones del tracto urinario constituyen un grave problema de salud pública que afecta a la población a nivel mundial, regional y local; y, ha sido motivo principal de consulta intra y extra hospitalaria durante estos últimos años. Algunos estudios demuestran que estas infecciones en su mayoría afectan a las mujeres en más del 70 % de los casos (Lujan, D. & Pajuelo, G., 2008).

En los Estados Unidos de Norteamérica las cifras de ITU corresponden a más de 7 millones de visitas médicas y 1 millón de atenciones por emergencia anual, siendo el 84% recurrente en mujeres. En Centroamérica y América Latina las ITU ocupan el segundo lugar; otros datos estadísticos indican que México ocupa el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad. Nuestro país, no es la excepción, en Ecuador en el año 2009 el INEC (Instituto Nacional de Estadística) reveló que las ITU se ubican en el octavo puesto con una tasa de 10.3% en las mujeres, con relación a las diez principales causas de morbi-mortalidad (Colombiana de Salud, S.A., 2014) (Lujan, D. & Pajuelo, G., 2008) (Tumbaco, A., & Martínez, L., 2013).

La mayoría de infecciones de este tipo tienen como agente causal bacterias que invaden el aparato urinario, de las cuales *E. coli* es el microorganismo aislado en más del 90% de infecciones. El uso indebido de antibióticos, la ingesta empírica sin prescripción previa y la falta de conocimiento han hecho que las bacterias adopten resistencias frente a los antibióticos desarrollando mecanismos que impidan ejercer su acción, complicando el tratamiento y convirtiéndose en la causa principal para la producción de ITU (Tumbaco, A., & Martínez, L., 2013).

Ante la situación expuesta, se ha realizado este trabajo investigativo con el objetivo de realizar urocultivos en muestras de pacientes de Consulta Externa del Hospital Militar de

Loja y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de gentamicina frente a *Escherichia coli* para evaluar la sensibilidad y/o resistencia bacteriana mediante la mínima concentración en la que actúa el antibiótico sobre el microorganismo; y con ello, socializar los resultados de la investigación a los participantes y a los profesionales médicos de la institución.

En este estudio, se realizó urocultivos y se utilizaron procedimientos y técnicas laboratoriales como pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana y, el método de macrodilución por diluciones seriadas dobles para medir la acción del antibiótico frente a la bacteria *E. coli*. Se analizaron 59 muestras de urocultivo de las cuales el 76% (45 cepas) resultaron positivos para *Escherichia coli*; y, en el 24 % de las cifras restantes positivos para *Klebsiella pneumoniae* (10%), *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis* (9 y 5%).

Para determinar la sensibilidad y/o resistencia bacteriana de las cepas de *E. coli* se realizó la CMI de gentamicina dando como resultado sensibilidad en el 65 % de las cepas ensayadas a concentraciones < 4 ug/mL, sensibilidad intermedia en el 22 % a 8 ug/mL y resistencia en el 13 % de las cepas a concentraciones >16 ug/mL de antibiótico. Los resultados obtenidos de la investigación se socializaron a los participantes y a los profesionales de salud del Hospital Militar mediante exposición y entrega de trípticos.

4. REVISIÓN DE LA LITERATURA

4.1 Infección de Vías Urinarias

4.1.1 Definición

La Infección Urinaria se define como la invasión, colonización y multiplicación del tracto urinario por microorganismos, habitualmente bacterias o gérmenes que pueden proceder por diferentes situaciones y causar infección (Tumbaco, A., & Martínez, L., 2013).

4.1.2 Etiología

La vía ascendente es la ruta utilizada para la mayoría de los microorganismos que infectan al aparato urinario; es por ello, que las propiedades físico-químicas de la orina favorecen el crecimiento y proliferación de gérmenes. “Se considera que alrededor del 90 % de las ITU están causadas por bacterias y de éstas el 90% son causadas por bacterias Gran Negativas” (Aljama, P.; Arias, M.; Caramelo, C.; Egido de los Ríos, J.; Lamas, S. et al. 2008, pág: 529).

“*Escherichia coli*, es el agente causal que se encuentra en la mayoría de las ITU de pacientes ambulatorios (80-90%) y menos frecuentes en hospitalarios (50%). El resto de infecciones son producidas por otras enterobacterias, como: *Proteus mirabilis* y *Klebsiella spp*” afirma Aljama, P., et al 2008 (Aljama, P.; Arias, M.; Caramelo, C.; Egido de los Ríos, J.; Lamas, S. et al. 2008, pág: 529).

La mayoría de estudios destacados conservan la misma tendencia, ubicando a *Escherichia coli* como el principal agente causante de ITU con un 73% según un estudio de la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, seguido de *Proteus spp.* con un 27% (Romero, C., 2012).

En el año 2007 se realiza un estudio, donde se analizaron cultivos de 100 muestras de orina, de gestantes que acuden Centro de Salud No 1 del cantón Loja, donde se determinó

que en un 43% de los casos el germen identificado fue *E. coli*, seguido de *Klebsiella spp.* con un 32% y *Proteus spp.* en 25% (Romero, C., 2012).

4.1.3 Patogenia

El mecanismo predominante de este grave problema es la infección por vía ascendente. En personas que presentan ITU, los microorganismos situados en el reservorio intestinal colonizan la región perianal y por vía ascendente a partir de una contaminación fecal alcanzan el vestíbulo vaginal, penetran por la uretra, llegan a la vejiga y posteriormente al resto del aparato urinario. Con frecuencia se manifiesta en el sexo femenino, debido a la diferencia anatómica de la uretra que es corta y está ubicada cerca al ano; mientras que, en el varón la uretra tiene mayor longitud y además es poco probable su contaminación debido a la presencia de secreción prostática que posee una actividad bactericida (Aljama, P.; Arias, M.; Caramelo, C.; Egido de los Ríos, J.; Lamas, S. et al. 2008, pág: 531).

Algunos factores contribuyen con la penetración y colonización del germen, estos son: la actividad sexual, la instrumentación del aparato urinario, las alteraciones en el flujo urinario y pH, la menstruación, cambios hormonales, hábitos higiénicos y la presencia de orina residual que produce la alteración de la flora residente facilitando la infección (Aljama, P.; Arias, M.; Caramelo, C.; Egido de los Ríos, J.; Lamas, S. et al. 2008, pág: 530).

Las ITU son el resultado de interacciones entre el patógeno urinario y el huésped; dependen en gran parte de los factores de virulencia de las bacterias, del tamaño del inóculo y de la presencia de mecanismos de defensa del huésped que determinan el nivel definitivo de colonización y la generación de lesión de las vías urinarias (Wein, A., et. al. 2008, pág: 288).

4.1.4 Vías de acceso a la infección

4.1.4.1 Vía Ascendente

Esta vía favorece la adhesión de los microorganismos patógenos a la mucosa del introito siendo necesarios algunos factores para que esto ocurra, estos son: la colonización periuretral de patógenos provenientes de la flora intestinal, la colonización del vestíbulo vaginal de la uretra distal de los cuales dependerán las alteraciones que ocurran en la flora local y el pH vaginal, influenciado por el nivel de estrógenos y su déficit que se relaciona con las cistitis recurrentes en mujeres menopáusicas (Wein, A., et. al, 2008. Pág 228; Romero, C., 2012).

4.1.4.2 Vía Hematógena

Es poco corriente, ocurre en situaciones en las que existen alteraciones en la resistencia del individuo, siendo las infecciones sistémicas un factor asociado importante en casos donde se presentan disfunciones anatómicas o funcionales de los riñones (Aljama, P.; Arias, M.; Caramelo, C.; Egido de los Ríos, J.; Lamas, S. et al. 2008, pág: 531).

Algunas circunstancias favorecen la colonización hematógena como: obstrucción urinaria, traumatismos e isquemias renales, analgésicos, poliquistosis renal y la diabetes mellitus; entre otras (Aljama, P.; Arias, M.; Caramelo, C.; Egido de los Ríos, J.; Lamas, S. et al. 2008, pág: 531).

4.1.4.3 Vía Linfática

La posibilidad de ITU por las vías linfáticas es infrecuente, permaneciendo dudosa su relevancia, no siendo posible la caracterización de forma definitiva. Se piensa que la transmisión directa de bacterias desde órganos adyacentes por el conducto linfático se puede producir en circunstancias inusuales, como infecciones intestinales graves o absesos retroperitoneales; así como también, en condiciones en que la infección ocurra de forma

ascendente, desde la vejiga a los riñones, pero por medio de capilares linfáticos periureterales (Wein, A., et. al., 2008. pág: 228.; Romero, C., 2012).

4.2 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Su nombre se debe la localización habitual como saprofitos en la flora normal del tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre.

Escherichia coli es el microorganismo más prevalente de esta familia que se encuentra constantemente en las materias fecales. Reside en el intestino delgado y grueso formando parte de la flora nativa intestinal, sin causar daño. Las infecciones producidas por cepas de *E. coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o diseminarse; es una de las bacterias prototípicas más importantes del género *enterobacteriaceae* sometidas a estudio (Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F., 2010) (Romero, R., 2007).

4.2.1 Características generales

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por bacilos gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos, fermentan glucosa con producción de ácido y en ocasiones gas, son oxidasa negativos y reducen nitratos a nitritos. Algunos forman cápsula, desarrollan pilis y fimbrias y pueden ser flagelados no esporulados, móviles o inmóviles. Son poco exigentes y pueden actuar como oportunistas invadiendo la vía ascendente del tracto urinario produciendo infección; sobreviven en el ambiente, contaminan agua y alimentos y crecen en medios de cultivo comunes (Romero, R., 2007.; Prats, G., 2006, pág 41).

4.3 *Escherichia coli*

Patógeno oportunista, forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*; está conformada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos. (Romero, R., 2007, pág: 753).

Son bacterias de crecimiento rápido y de amplia distribución en el suelo, agua, vegetales y gran variedad de animales. *E. coli* en su hábitat natural, reside en los intestinos de los mamíferos. En personas sanas; es decir, cuando la bacteria que habita en su interior no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando a la absorción de diversos nutrientes (Romero, R., 2007, pág: 753; Cervantes, B., & Vera, L., 2011).

4.3.1 Características morfológicas

Son bacilos rectos, cortos, generalmente flagelados peritricos y, móviles que pueden desarrollarse en condiciones aerobias y anaerobias; son fácilmente cultivables en medios nutritivos convencionales. En la tinción de Gram se pueden observar bacilos que se tiñen de color rosado a rojo (V, Ausina & S, Moreno., 2006, pág: 327).

4.3.2 Características nutricionales

Son aerobios y anaerobios facultativos no exigentes, pueden crecer en un rango de temperatura mínima que oscile entre 5-7 °C, siendo óptima a 37 °C y máxima como a 45 °C; con pH de 7. Poseen una elevada actividad metabólica, fermenta glucosa, lactosa y otros azúcares a partir de hidratos de carbono. (V, Ausina & S, Moreno., 2006, pág: 327).

4.3.3 Características coloniales

Las colonias de *E. coli* son cremosas de color blanquecino. En agar E.M.B. (eosina y azul de metileno) miden de 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja. En agar MacConkey las colonias son rojas con halo turbio (Bonilla, S., 2011.; V, Ausina & S, Moreno., 2006, pág: 327).

4.4 Resistencia Antimicrobiana

Es un fenómeno por el cual un microorganismo se hace inmune a los efectos de los medicamentos antimicrobianos a los que anteriormente era sensible. Se ve facilitada por el uso inadecuado de los medicamentos, como, por ejemplo, cuando se toman dosis insuficientes o no se finalizan los tratamientos prescritos, de esta manera, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten (Olano, M., Ochoa, M., Salirrosas, J., & Vazquez, A. et al. 2014).

4.4.1 Mecanismos de resistencia de las bacterias

Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de punto diana para un antibiótico dado (falta de pared en el *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos) (Olano, M., Ochoa, M., Salirrosas, J., & Vazquez, A. et al. 2014).

Desde el punto de vista clínico, la resistencia adquirida es realmente importante debido a la modificación de la carga genética de la bacteria que puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes, pero la resistencia transmisible puede estar mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Olano, M., Ochoa, M., Salirrosas, J., & Vazquez, A. et al. 2014).

4.4.1.1 Inactivación del antibiótico por enzimas:

La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico (las betalactamasas). En los gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas (Romero, C., 2012).

4.4.1.2 Obstrucción de la llegada del antibiótico al punto diana:

Las mutaciones en las porinas de la pared producidas por las bacterias impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente (Romero, C., 2012.; Olano, M., J., & Vazquez, A. et al. 2014).

4.4.1.3 Alteración del punto diana:

Impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Las alteraciones a nivel del ADN girasa (quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos), de las enzimas PBPs, proteínas fijadoras de penicilina, que causan la resistencia a betalactámicos (Romero, C., 2012.; Olano, M., Ochoa, M., Salirrosas, J., & Vazquez, A. et al. 2014).

4.5 Antibiótico

Son sustancias (obtenidas de bacterias u hongos, o bien obtenidas de síntesis química) que se emplean en el tratamiento de infecciones. La elección de uno u otro antibiótico en el tratamiento de una infección depende del microorganismo (obtenido por cultivo), de la sensibilidad del microorganismo, la gravedad de la enfermedad, la toxicidad, los antecedentes de alergia del paciente y el costo. Romero, C., 2012.; Olano, M., Ochoa, M., Salirrosas, J., & Vazquez, A. et al. 2014).

4.5.1 Gentamicina

Antibiótico aminoglucósido de uso parenteral, producido por un actinomiceto (*Micromonospora purpurea*), inhibe la síntesis proteica de los microorganismos, son relativamente tóxicos en comparación con otras clases de antibióticos y son útiles para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas aerobias. A pesar de que casi todos los inhibidores de la síntesis proteica de los microbios son bacteriostáticos, los aminoglucósidos son bactericidas (DeCherney, A.; Laufer, N.; Nathan, L.; Román, A., et al. 2014) (Vives, E.; Medvedovsky, E. & Rothlin, R., et al. 2010).

4.5.2 Mecanismo de acción

Son bactericidas rápidos, la destrucción de la bacteria depende de la concentración, y cuanto más alta es esta, mayor es la rapidez con que destruye a los microorganismos. Actúan fundamentalmente sobre bacterias gram (-), por lo tanto deben atravesar una membrana externa, que las gram (+) no poseen, y la membrana citoplasmática para llegar a su sitio de acción intracelular (Vives, E.; Medvedovsky, E. & Rothlin, R., et al. 2010).

Penetra en la pared de la membrana celular, se une de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano impidiendo la transcripción de su DNA e inhibe la síntesis de proteínas en los microorganismos susceptibles (DeCherney, A.; Laufer, N.; Nathan, L.; Román, A., et al. 2014).

Paso a la membrana externa: Atraviesan esta membrana difundiendo por poros formados por unas proteínas denominadas porinas. En células bacterianas mutantes (densidad de porinas 3%), no se afecta la susceptibilidad a estos antibióticos, por lo que la disminución de la densidad de porinas no parece ser un mecanismo efectivo de resistencia (la ausencia de porinas es incompatible con la vida bacteriana) (Vives, E.; Medvedovsky, E. & Rothlin, R., et

al. 2010).

Paso a la membrana celular: Se efectúa por un mecanismo que requiere energía proveniente del transporte de electrones en la membrana (la membrana bacteriana tiene las funciones de las membranas plasmática y mitocondrial de las células eucariotas), por la necesidad de que haya un potencial de membrana para impulsar el paso de los antibióticos al interior de la bacteria. Este transporte es concentrativo (contra gradiente) y permite que los aminoglucósidos alcancen altas concentraciones en el interior de la bacteria (Vives, E.; Medvedovsky, E. & Rothlin, R., et al. 2010).

Efectos sobre la función ribosomal: Cuando penetran la pared de la membrana celular, se unen a la subunidad 30s de los ribosomas bacterianos. Los sitios de unión son proteínas que constituyen, a su vez, el sitio de unión del ARNt al ribosoma, esto provoca una alteración en la interacción codón – anticodón, resultando una mala lectura del código genético, existe una correlación importante entre la actividad bactericida (Vives, E.; Medvedovsky, E. & Rothlin, R., et al. 2010).

4.5.3 Complicaciones

Los aminoglucósidos son utilizados ampliamente y son medicamentos importantes, pero una limitación grave es su toxicidad notable, entre las consecuencias están la nefrotoxicidad y ototoxicidad (Vives, E.; Medvedovsky, E. & Rothlin, R., et al. 2010).

Contraindicada en pacientes alérgicos, puede causar diversos grados de nefrotoxicidad debido a una elevación en el nitrógeno ureico en sangre y creatinina produciendo enfermedad renal previa; se vuelve reversible al discontinuar las dosis del antibiótico. Contraindicada en el embarazo debido a la posible anormalidad del feto (DeCherney, A.; Laufer, N.; Nathan, L.; Román, A., et al. 2014., pág: 743).

4.6 Métodos de Diagnóstico

4.6.1 Cultivo de Orina (Urocultivo)

Permite conocer la cantidad de bacterias presentes mediante la colocación de una gota de orina que se siembra por agotamiento con un asa bacteriológica en una placa con agar. Tras incubación de 24 horas, el crecimiento bacteriano se observa y se expresa en unidades formadoras de colonias UFC por mililitro (Wein, A., et. al., 2008., pág.: 240).

Este procedimiento diagnóstico es muy esencial, constituye una prueba firme que sirve para identificar el agente causal, su sensibilidad y resistencia; así como también, para conocer la epidemiología en el área. Un recuento menor a 100.000 UFC/ml o el desarrollo de más de dos microorganismos reflejan contaminación de la muestra y no una infección del tracto urinario (Garzón, J. & Guamán, M., 2008.; Wein, A., et. al., 2008., pág: 240).

4.6.1.1 Agar sangre:

Medio no selectivo, empleado para el aislamiento primario de bacterias; en este medio proliferan todo tipo de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (Wein, A., et. al., 2008., pág: 240).

4.6.1.2 Agar MacConkey

Medio diferencial exclusivo para el crecimiento de enterobacterias ya que la mayoría de estas utilizan la lactosa; las colonias metabolizadoras aparecen rosadas debido a la producción de ácidos mixtos. Este medio inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas (Koneman, E.; Allen, S. et al., 2006. pág: 214).

4.6.2 Tinción de Gram

Técnica utilizada para el examen microscópico de las bacterias, con ella se puede diferenciar a las bacterias en dos grandes grupos: las que captan colorante básico o cristal violeta que se tiñen de color púrpura (grampositivas), y las que pierden ese colorante por lavado con el decolorante alcohol o acetona se tiñen de color rosa o rojo (gramnegativas).

La diferencia radica en la composición de la pared de las células grampositivas que contienen una capa gruesa de peptidoglucano con enlaces cruzados de ácido teicoico que le confieren capacidad para resistir la decoloración con el alcohol; por el contrario, las paredes de las células gramnegativas contienen una capa de peptidoglucano más delgada; esto explica las diferencias en la tinción de Gram entre los dos grupos principales (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 81).

4.6.3 Pruebas basadas en enzimas

Se usan para determinar la presencia de una enzima específica o una vía metabólica completa que puede contener varias enzimas diferentes. Proporcionan resultados rápidos, son fáciles de realizar e interpretar y desempeñan un papel fundamental en el esquema de la identificación (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 110).

4.6.3.1 Catalasa:

Cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. Se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano que se mezcla con una solución de peróxido de hidrógeno; la aparición de burbujas (catalasa positiva), si no hay aparición de burbujas (catalasa negativa). Se utiliza para la identificación de microorganismos grampositivos (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág.: 110).

4.6.3.2 Oxidasa:

Participa en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato de ciertas bacterias. Se determina haciendo pasar una tira impregnada de reactivo sobre una colonia del agar. Se emplea para la identificación de bacterias gramnegativas (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 110).

4.6.4 Pruebas Bioquímicas

Son la base en la identificación de los diferentes agentes bacterianos debido a que cada microorganismo emplea un cuadro diferente de reacciones, determinan el género y la especie según el microorganismo de interés. (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 110).

4.6.4.1 Agar Triple Sugar Iron (TSI):

Medio de cultivo diferencial basado en la capacidad que tienen los bacilos gramnegativos para fermentar carbohidratos, azúcares, producir H₂S y gas. (Prats, G., 2006., pág: 63).

4.6.4.2 Prueba de Ureasa:

Permite la detección de cantidades de amoníaco para aquellos microorganismos que hidrolizan la urea a través de la enzima ureasa (Prats, G., 2006., pág: 64).

4.6.4.3 Citrato de Simmons (CIT):

Determina la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono y energía para su metabolismo y crecimiento; debido a esto, las bacterias que lo requieran crecerán alcalinizando el medio (Prats, G., 2006., pág: 63).

4.6.4.4 Agar Lisina- Hierro (LIA):

Método basado en la decarboxilación y desaminación de la lisina y en la producción de

ácido sulfhídrico (Prats, G., 2006., pág: 64).

4.6.4.5 Sulfide Indole Motility (SIM):

Ayuda a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno de la bacteria. El indol producido a través del triptófano, se determina al añadir una solución alcohólica para dar lugar a coloración roja en fase sólida (Prats, G., 2006., pág: 64).

4.6.5 Antibiograma

Método in vitro que determina la susceptibilidad de microorganismos a una variedad de agentes microbianos, por medio de discos impregnados de antibióticos sobre un medio previamente inoculado de una suspensión bacteriana para determinar la inhibición del antibiótico mediante la cuantificación del halo que mide su resistencia o sensibilidad.

Un antibiótico se considera activo frente a una bacteria cuando inhibe su multiplicación; estos métodos se realizan bajo condiciones laborales específicas y estandarizadas (Prats, G., 2006., pág: 48).

4.7 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

4.7.1 Concepto

Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macrodilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial) (Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R., 2008).

4.7.2 Utilidad

Determina la susceptibilidad antimicrobiana de organismos involucrados en procesos infecciosos cuando la susceptibilidad del organismo no puede ser predecida por su identificación. La susceptibilidad del patrón de antibiótico es algunas veces utilizada como monitor en las infecciones nosocomiales y para evaluar el seguimiento y el desarrollo de resistencia de los nuevos antimicrobianos (Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R., 2008).

4.8 Técnicas de dilución

Miden directamente de forma cuantitativa la actividad "in vitro" de un antimicrobiano a diferentes concentraciones frente a una suspensión de bacterias. Se realizan en tubos o placas con caldo o agar Mueller Hinton para determinar el impacto de la presencia del fármaco sobre el crecimiento bacteriano e informar al médico sobre la resistencia o la disminución de la sensibilidad del microorganismo (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 188).

4.8.1 Dilución en caldo

Consiste en exponer el microorganismo de interés a agentes antimicrobianos en un medio líquido (caldo de cultivo). Cada agente antimicrobiano se prueba en un rango de concentraciones que suele expresarse en un μg de fármaco activo/mL de caldo nutritivo. Se pueden emplear dos métodos: (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 190).

4.8.1.1 Microdilución:

Este método involucra pequeños volúmenes de caldo con antimicrobiano a diferentes concentraciones de forma creciente. La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo o en placas de microtitulación. El volumen total de caldo es de 0.05 a 0.1 mL (CLSI.2012) (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 190).

4.8.1.2 Macrodilución:

Se considera como una "Prueba de Oro", ya que mediante este método se puede medir de forma exacta y confiable la CMI del antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Aunque la técnica resulte tediosa, este procedimiento se realiza en tubos de ensayo, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones (normalmente mediante diluciones seriadas dobles). Luego se inoculan cada uno de los tubos con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio (0.5 escala de Mcfarland). Después de incubar las pruebas, se observa la presencia de crecimiento bacteriano en cada tubo para determinar la CMI en ug/mL del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado y así poder evaluar la sensibilidad o su resistencia. El volumen habitual de caldo es de 1 mL, o más (NCLSI.2012) (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 191).

4.8.2 Dilución en medio sólido

Se realiza en un medio sólido; implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antimicrobianos, en un medio solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág: 193).

4.8.3 Método de epsilonometría E-test

Es un método muy simple y fácil de usar; el epsilonómetro se compone de una tira sólida de un material inerte, con una gradiente predefinido y señalado de antimicrobiano con una escala de lectura. La tira de E-test se coloca sobre una placa debidamente inoculada; tras incubación de las placas, se puede observar a ambos lados de la tira una zona de inhibición

elipsoidal y simétrica. La carga indicada del punto de la tira en que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con ella es el valor de la CMI (Prats, G., 2006., pág: 52).

4.8.4 Métodos automatizados

Estos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia). Se realizan de forma fácil y rápida (Sahm, D. & Weissfeld, A., 2007., pág. 200).

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación, se enmarcó en las características de un estudio descriptivo y de corte transversal.

5.2 ÁREA DE ESTUDIO.

Se realizó en el Hospital Militar Básico 7-BI, nivel II de la ciudad de Loja. A nivel hospitalario cuenta con 40 camas y ofrece atención médica en 15 especialidades, entre ellas: medicina interna, emergencia, rehabilitación, dermatología, ginecología, traumatología, pediatría, laboratorio clínico, imagenología, cardiología, radiología, psicología, psiquiatría, nutrición y cirugía. Se encuentra ubicado en la calle Colón, entre Bernardo Valdivieso y Bolívar.

5.3 Universo: El universo estuvo constituido por todos los pacientes de consulta externa que acuden a recibir atención médica.

5.4 Muestra: 146 pacientes que acudieron a consulta externa con solicitud de urocultivo durante el período marzo- mayo del 2015.

5.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- ✓ Pacientes de consulta externa que asistieron al Hospital Militar 7-BI con diagnóstico presuntivo de ITU y con pedido de urocultivo.
- ✓ Pacientes que firmaron el consentimiento informado y que aceptaron participar voluntariamente en el proceso de investigación. (ANEXO Nro. 3)
- ✓ Aquellos pacientes cuyos urocultivos resultaron positivos para *Escherichia coli* con crecimiento de colonias mayor a 100.000 UFC.

5.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- ✓ Pacientes que recibieron terapia antimicrobiana previo a la recolección de la muestra.
- ✓ Urocultivos que resultaron negativos para *E. coli*.

5.7 MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS:

Para el desarrollo del trabajo investigativo se aplicó los siguientes procedimientos:

5.7.1 Fase Preanalítica

- ✓ Oficio al Director del Hospital Militar 7-BI de la ciudad de Loja solicitando el permiso respectivo para realizar la investigación. (ANEXO 1)
- ✓ Oficio dirigido al Director del Centro de Investigaciones y Servicios de Análisis Químicos "CISAQ" de la Universidad Nacional de Loja solicitando autorización para la realización del trabajo de campo. (ANEXO 2)
- ✓ Se elaboró una hoja de consentimiento informado al paciente para que autorice la participación en el proyecto de investigación. (ANEXO 3)
- ✓ Se llenó una ficha de registro con información de datos personales del usuario, se registró el número de muestra y observaciones. (ANEXO 4)

5.7.2 Fase Analítica (Procesamiento de la muestra)

- ✓ **Preparación de Medios de Cultivo:** Agar MacConkey, agar base sangre utilizando hemoglobina de cordero liofilizada; y, pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli*. En la preparación del Agar Base Urea se usó un aditivo de úrea al 50 %. Además se verificó su esterilidad por medio de la adición de cintas indicadoras de esterilización; se realizó la preparación del caldo Mueller Hinton para medir la CMI. (ANEXO 5)

- ✓ **Cepa Control:** Se realizó la reconstitución de la Cepa Control ATCC 25922 *E. coli*; para su crioconservación durante el tiempo del muestreo, se colocó en viales con glicerina al 50% a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su congelación. (ANEXO 6)
- ✓ **Control de calidad:** Los diversos medios de cultivo se realizaron siguiendo protocolos establecidos: 1). Control de esterilización en cada lote; se incubó una muestra representativa del lote preparado por 24 a 48 horas a una temperatura de 37°C , verificando luego de este tiempo que no haya presencia de crecimiento bacteriano. 2). Prueba de funcionalidad en medios de cultivo; se ensayó un vial de cepa control ATCC 25922 de *E. coli* semanalmente para verificar el crecimiento óptimo y la reacción que produce en cada medio. (ANEXO 7)
- ✓ Protocolo de control de calidad con la cepa ATCC 25922 de *E. coli* para medir la Concentración Mínima Inhibitoria del antibiótico frente a la cepa control; este procedimiento se realizó por triplicado teniendo como referencia los manuales de estandarización del CLSI 2015. (ANEXO 7)
- ✓ Se realizó una prueba piloto previo al análisis de las muestras utilizando la cepa control ATCC 25922 de *E. coli* en donde se ensayó la siembra, identificación con pruebas bioquímicas y la CMI usando controles positivos y negativos mediante la aplicación de cálculos para las diluciones seriadas del antibiótico. (ANEXO 8)
- ✓ Se procedió a realizar la siembra del espécimen usando como protocolo el método de *Kass* para el aislamiento de colonias. Las muestras de orina se sembraron por triplicado en el Hospital Militar 7-BI en agar base sangre y medio diferencial agar MacConkey para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo; posteriormente para su incubación fueron transportadas al CISAQ. (ANEXO 9)
- ✓ Se aplicó un protocolo para el transporte y conservación de cultivos de orina, mismas que fueron llevadas en couler (medio de transporte) hasta el CISAQ-UNL. Se

incubaron a 37 °C por 24-48 horas; transcurrido este tiempo se observó crecimiento bacteriano, se dio lectura y procedió al contaje de las colonias. (ANEXO 10)

- ✓ Se procedió a realizar el método de tinción de Gram a partir de las colonias aisladas para identificar el grupo de bacterias que crecieron en el medio de cultivo; a través del microscopio, se identificó cocos y bacilos grampositivos y negativos. (ANEXO 11)
- ✓ Se efectuó las pruebas bioquímicas para bacterias gramnegativas en agar TSI, Citrato, Urea, Lisina y SIM, respectivamente. En el SIM se realizó la prueba de indol mediante la adición de reactivo de Kovac. Además se realizó pruebas como: catalasa y oxidasa. (ANEXOS 8 y 12)
- ✓ A las 24 horas se procedió a la lectura de las pruebas utilizando la tabla de identificación de enterobacterias, especialmente para determinar *E. coli*. (ANEXO 13)
- ✓ Se realizó la CMI mediante el Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución estandarizado en el CLSI (macrodilución); las diluciones del antibiótico se realizaron en caldo Mueller Hinton, se adicionó suspensión de bacteria (*E.coli*) al 0.5 de la escala de McFarland; previo a incubación, a las 24 horas se dió lectura a la observación del crecimiento bacteriano en cada tubo. (ANEXO 14)

5.7.3 Fase Post Analítica:

- ✓ Los resultados de los análisis se registraron en un “Informe Interno de Resultados del Laboratorio” con los datos obtenidos de las pruebas ensayadas. (ANEXO 15)
- ✓ Los resultados de la CMI de gentamicina se registraron por triplicado en un formato acorde a la cantidad de tubos utilizados en las diluciones seriadas de antibiótico. (ANEXO 16)

- ✓ Se entregó trípticos mediante socialización de resultados a los médicos y a los usuarios que acudieron al Hospital Militar 7B-I de la ciudad de Loja. Se presentaron las tablas estadísticas obtenidas en el estudio. (ANEXO 17)
- ✓ Se entregó los resultados obtenidos al responsable del Centro de Investigaciones y Servicios de Análisis Químicos para su revisión, otorgando un certificado de desarrollo de Tesis durante el período marzo-mayo 2015. (ANEXO 18)

5.7.4 PLAN DE TABULACIÓN

- ✓ La tabulación y análisis de resultados se realizaron en tablas estadísticas desarrolladas en el programa Excel; se elaboraron gráficas para mejorar la interpretación de los datos en el estudio.

6. RESULTADOS

TABLA N° 1

UROCULTIVOS REALIZADOS EN PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR HB-7 PARA IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

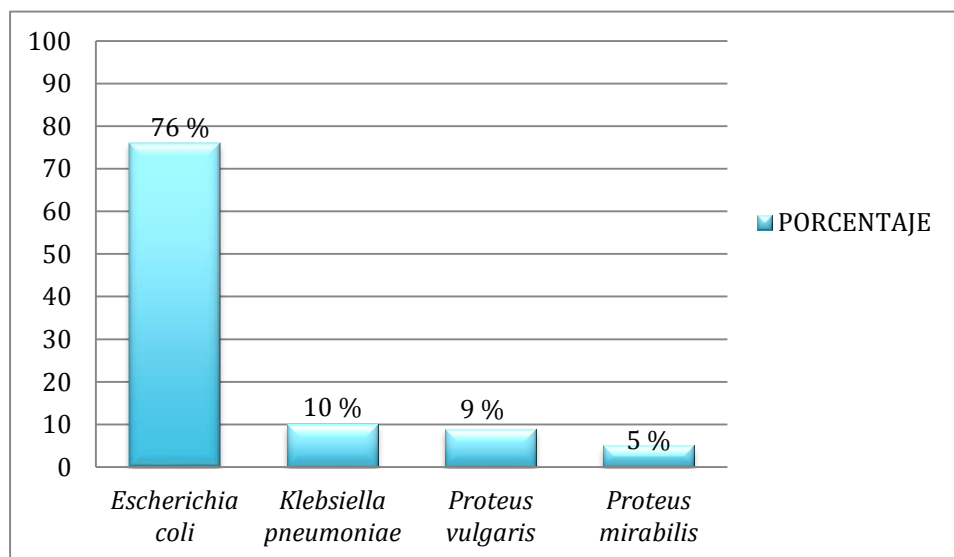
MICROORGANISMO	FRECUENCIA	PORCENTAJE %
<i>E. coli</i>	45	76 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	10 %
<i>Proteus vulgaris</i>	5	9 %
<i>Proteus mirabilis</i>	3	5 %
TOTAL	59	100 %

Fuente: Registro de la investigación.

Elaborado por: Ximena Lizbeth Lanche Silva

GRÁFICO N° 1

UROCULTIVOS REALIZADOS EN PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR HB-7 PARA IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*.



Fuente: Registro de la investigación.

Elaborado por: Ximena Lizbeth Lanche Silva

Interpretación:

Se analizó un total de 59 muestras de urocultivo, de las cuales se observó que el microorganismo aislado con mayor frecuencia fué *E. coli* con un 76% (45 cepas), esto indica que este género bacteriano es el principal agente causal que con relevancia se manifiesta en ITU de pacientes que acuden a consulta externa del Hospital Militar.

TABLA N° 2

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR HB-7 Y DETERMINACIÓN DE SU SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA

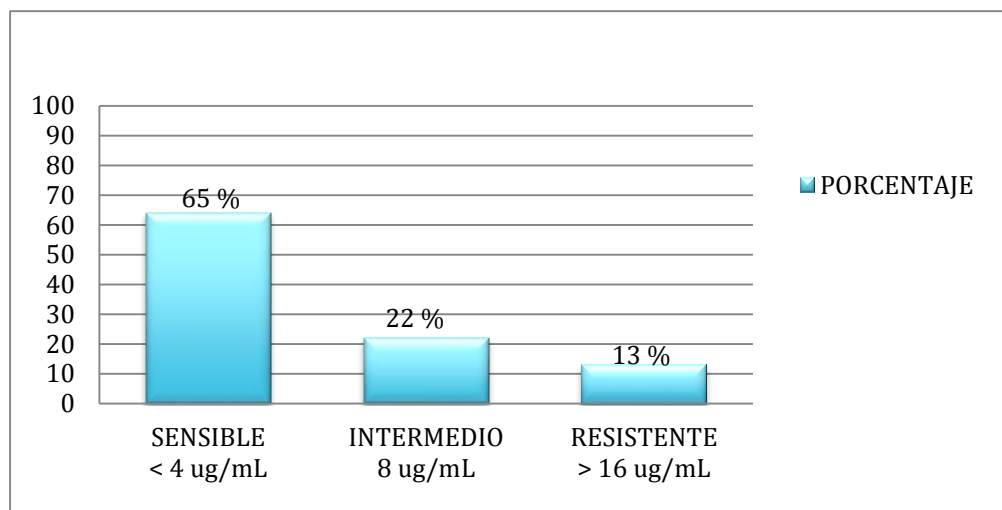
<i>Escherichia coli</i>	GENTAMICINA CLSI 2015	FRECUENCIA	PORCENTAJE %
SENSIBLE	< 4 ug/mL	29	65 %
INTERMEDIO	8 ug/mL	10	22 %
RESISTENTE	>16 ug/mL	6	13 %
TOTAL		45	100 %

Fuente: Registro de la investigación.

Elaborado por: Ximena Lizbeth Lanche Silva

GRÁFICO N° 2

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR HB-7 Y DETERMINACIÓN DE SU SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA



Fuente: Registro de la investigación.

Elaborado por: Ximena Lizbeth Lanche Silva

Interpretación:

De los 45 urocultivos positivos para *Escherichia coli*, se evidenció CMI de gentamicina en diluciones < 4ug/ml, observando inhibición del crecimiento bacteriano a esta concentración. Además tenemos que, la alta tasa de sensibilidad (65%) y baja resistencia (13%) para las cepas de *Escherichia coli* dan como resultado elevada eficacia del antimicrobiano.

SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS

Luego de realizado el trabajo de campo, se llevó a cabo la socialización de resultados a los profesionales de salud y a los participantes de la investigación el día miércoles 05 de agosto del 2015, a las 08h00 bajo la supervisión del Tnte. José Zambrano en el salón de exposiciones del Hospital Militar 7-BI de Loja; por medio de exposición, se abordaron temas como: objetivos de la investigación, infección de vías urinarias, *Escherichia coli* como agente causal de ITU, antibióticos usados para tratar las infecciones, resultados, conclusiones y recomendaciones del estudio. El evento se desarrolló con el propósito de crear conciencia y tomar medidas preventivas para minimizar las ITU en los usuarios del centro de salud, erradicar la ingesta de antibióticos sin prescripción médica y la importancia que tiene la realización de exámenes laboratoriales (urocultivos) en la confirmación de este tipo de infecciones y en el diagnóstico oportuno de enfermedades.

7. DISCUSIÓN

Uno de los propósitos principales de la terapia antimicrobiana es proveer una cantidad óptima del medicamento para que sea activo en el sitio de infección.

La presente investigación se orientó a caracterizar la CMI de gentamicina frente a *Escherichia coli* como agente principal causante de ITU en pacientes de consulta externa del Hospital Militar de Loja. Se analizó mediante urocultivo muestras de 146 pacientes, de las cuales 59 fueron positivos con crecimiento bacteriano, en las que se identificó cuatro tipos de bacterias: *E. coli* 76% (45 cepas), *Klebsiella pneumoniae* 10% (6 cepas), *Proteus vulgaris* (5 cepas) y *Proteus mirabilis* (3 cepas) en un 9% y 5% respectivamente. Por otro lado, se realizó la Concentración Mínima Inhibitoria por macrodilución de gentamicina frente a las cepas positivas de *E. coli* en las cuales se observó sensibilidad de las bacterias con inhibición a concentraciones < 4 ug/mL de antibiótico en un 65% (29 cepas), el 22% (10 cepas) intermedio con 8 ug/mL y el 13% (6 cepas) que mostró resistencia a concentraciones > 16 ug/mL según lo establecido por la tabla M-100 S25 del NCLSI 2015.

En un estudio similar realizado en el Hospital Modelo de Kathmandú- Nepal (2007), se analizaron 710 muestras de orina de pacientes ambulatorios y hospitalizados con casos sospechosos de ITU, 219 muestras presentaron aislamiento bacteriano, presentándose *E. coli* en un 81.3% (178 aislamientos; 167 en pacientes hospitalizados y 11 en ambulatorios). Mediante la técnica de macrodilución, 35 cepas de 48 sometidas a estudio mostraron resistencia de 72.9% a gentamicina. Al contrastar estos datos con el estudio realizado, hemos encontrado una alta prevalencia de infecciones del tracto urinario en ambos casos siendo *E. coli* el agente causal de ITU. En la población de Nepal se revela un elevado porcentaje de resistencia a gentamicina debido a las condiciones de las instalaciones para el cultivo de orina y de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana que aún no están disponibles, lo que lleva a un diagnóstico incorrecto y tratamiento irracional. Los factores influyentes fueron la

demografía del paciente y el uso imprudente de los agentes antimicrobianos, que es una práctica común de los malos usos de antibióticos en Nepal (la automedicación). En nuestro estudio aún se muestran cifras bajas de resistencia siendo alta la sensibilidad de la bacteria para el antibiótico aplicado, esto podría deberse a que la población en estudio fueron pacientes de consulta externa; por lo tanto, se presentaron pocos casos de ITU.

Ferdosi-Sh E, (2015) en otro estudio realizado en "Ayatollah Rouhani" Hospital Docente de la Universidad de Ciencias Médicas de Babol al norte de Irán, en el año 2013 aislaron 57 muestras de orina con *Escherichia coli* procedentes de pacientes de la comunidad, estas fueron analizadas para evaluar los patrones de resistencia frente a varios antimicrobianos que comúnmente son utilizados para la terapia empírica. Al aplicar gentamicina, los resultados mostraron sensibilidad de un 63.2 %, sensibilidad intermedia 12.3% y resistencia 24.6%. El hallazgo de nuestro estudio muestra gran similitud con los resultados de esta investigación; al igual que otros estudios, esto podría afirmar que bajo control gentamicina sería un antibiótico que sí se puede emplear como terapia alternativa para tratar ITU complicadas debido a su gran eficacia en cepas multirresistentes.

En Ecuador no se han realizado estudios que permitan determinar la CMI, a pesar de existir tecnología, equipos y personal capacitado para desarrollar investigaciones que contribuyan a obtener datos estadísticos de posibles resistencias a los antibióticos y minimizar en cierta parte las enfermedades que ocasionan las ITU.

Si bien la morbilidad a nivel mundial de ITU actualmente es alta, la resistencia de la bacteria a los aminoglucósidos aún es baja porque de acuerdo a los estudios se ha presentado con menor frecuencia. Esto afirma que gentamicina puede seguir siendo utilizado para la terapia antimicrobiana de ITU complicada debido a la alta sensibilidad que muestran las cepas de *E. coli*. Cabe recalcar que este grupo de antibióticos al igual que otros se han

convertido en un problema para el tratamiento de algunos casos de infecciones sobre todo cuando hay factores que provocan que las bacterias adopten mutaciones genéticas y la acción del fármaco resulte ineficaz.

El método de macrodilución se considera como una técnica exacta y confiable que mide con precisión de forma manual las concentraciones en las que actúa el antibiótico. Actualmente no se la emplea en los laboratorios de rutina por ser laboriosa y necesita un lapso prolongado de tiempo, hecho que limita la posibilidad de realizar investigaciones por este método. Algunos investigadores han optado por el método de microdilución que no es más que el mismo método ensayado con concentraciones más pequeñas de volumen en pocillos que son leídos en un equipo automatizado para medir la CMI.

8. CONCLUSIONES

- En las 59 muestras de urocultivos con crecimiento bacteriano, se pudo determinar que el principal microorganismo causal de ITU fue *E. coli* en un 76% de los casos (45 cepas), lo que confirma que es el agente etiológico comúnmente aislado en la gran mayoría de infecciones de vías urinarias de pacientes del Hospital Militar.
- Con la información obtenida a través de la técnica de macrodilución se logró establecer la CMI de gentamicina determinando que a concentraciones < 4 ug/ml, el 65% de las cepas de *E. coli* tienen alta sensibilidad antimicrobiana, el 22% sensibilidad intermedia y el 13% resistencia. Estos resultados nos indican que gentamicina es un antibiótico que tiene un amplio espectro de acción sobre las bacterias gramnegativas; por lo tanto, se lo considera efectivo para el tratamiento de infecciones urinarias complicadas debido a su elevada sensibilidad y baja resistencia.
- Se socializó los resultados en el salón de exposiciones del Hospital Militar 7-BI Loja a los usuarios y profesionales de salud concluyendo que *E. coli* es el agente causal de la mayoría de ITU que actualmente afecta a la población local y por medio de métodos de diagnóstico el laboratorio clínico aporta datos de gran interés para la selección antimicrobiana, siendo la correcta toma de muestra es un paso principal para garantizar la confiabilidad de los resultados.

9. RECOMENDACIONES

- A los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico que realicen estudios sobre resistencia bacteriana mediante técnicas moleculares que proporcionen información exacta y precisa debido a que no existen investigaciones a nivel local respecto al tema.
- Que, la Universidad Nacional de Loja, en especial la Carrera de Laboratorio Clínico motive a los estudiantes a realizar estudios similares, en diferentes ciudades de la región sur del Ecuador, con el fin de establecer estadísticas de acuerdo a nuestra realidad y en base a ella las autoridades pertinentes tomen acciones frente al problema de la resistencia bacteriana.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acofarma S.A. *Gentamicina Sulfato*. (2006). La Formulación Magistral en la Oficina de Farmacia. Recuperado de: http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4016f466_5e2cbf0c4a8a24306edc49ac502edd233f56/main/files/Gentamicina%20sulfato.pdf

Ausina, V & Moreno, S. (2006). *Tratado de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Buenos Aires- Madrid. Editorial Médica Panamericana S.A. 1ª Edición. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=1FBKR_17ZFsC&pg=PA327&dq=estructura+antigenica+de+las+enterobacterias&hl=es&sa=X&ei=hRyWVez2B4LYggTA47zgDA&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=estructura%20antigenica%20de%20las%20enterobacterias&f=false

Aljama, P.; Arias, M.; Caramelo, C.; Egido de los Ríos, J.; Lamas, S. et al. (2008). *Nefrología Clínica*. España. Editorial Médica Panamericana S.A. 3ª Edición. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=LfvX3WgYsNIC&pg=PA529&dq=tracto+urinario&hl=es&sa=X&ei=mbuRVYv4AoarQHmi4LgAw&ved=0CCAQ6AEwAQ#v=onepage&q=tracto%20urinario&f=false>

Bonilla Rojas, S. (2011). E.E. *Microbiología General*. Recuperado de <http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-I.pdf>

Cervantes, B., & Vera, L. (2011). *Infecciones Bacterianas en el Tracto Genito Urinario en mujeres embarazadas del Hospital Verdi Cevallos Balda de la ciudad de Portoviejo*. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Manabí, Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/397/1/infecciones%20a%20las%20vias%20urinarias%20en%20EMB.pdf>

CLSI. (2012). Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. MIC testing. Volúmen 32. Recuperado de: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>

Colombiana de Salud. S.A. *Guía de Infección de Vías Urinarias en Adultos*. (2014). Coordinación Médica. Colombia. Recuperado de: http://www.colombianadesalud.org.co/GUIAS_ATENCION_MEDICINA/GUIA%20CLINICA%20IVU%202014.pdf

DeCherney, A.; Laufer, N.; Nathan, L.; Román, A., et al. (2014). *Diagnóstico y Tratamiento Ginecoobstétricos*. México D.F. McGRAW- HILL Interamericana Editores S.A. de C.V. 11ª Edición. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=DpWHBwAAQBAJ&pg=PA743&dq=gentamicina+tratamiento&hl=es&sa=X&ei=qiGeVYWsLMibwATxtpCQDA&ved=0CEQQ6AEwBw#v=onepage&q=gentamicina%20tratamiento&f=false>

Faller, A., Schunke, M., Schunke, G., et al. (2006). *Estructura y Función del Cuerpo Humano*. Alemania. Editorial Paidotribo. 13ª Edición. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=IJgQBiDIGwAC&pg=PA484&dq=funcion+de+la+pelvis+renal&hl=es&sa=X&ei=17ySVfGuGYS4ggSi54DgAQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=funcion%20de%20la%20pelvis%20renal&f=false>

Ferdosi-Sh E, J. M.-K. (june de 2015). Resistance patterns of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. *Caspian J Intern Med* , 148-151. Recuperado de: http://www.caspjim.com/files/site1/user_files_6942f6/drjavanian-A-10-131-1-dee28d0.pdf

Garzón, J. & Guamán, M. (2008). *Infección de Vías Urinarias en Mujeres Embarazadas Pacientes del Hospital Vicente Corral Moscoso*. Universidad de Cuenca, Ecuador. Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2473/1/tq1004.pdf>

Guillen, A. (2009). *Incidencia del Agente causal de Infecciones Urinarias asintomáticas en personas mayores de 60 años de edad en la ciudad de Amaluza*. Universidad Nacional de Loja, Amaluza, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/4456/1/GUILLEN%20SALAS%20ADRIAN.pdf>

Grabe, M., Bjerklund- Johansen, T.E., Botto, H., Çek, M., Naber, K.G., Tenke, P., & Wagenlehner, F. (2010). *Guía Clínica sobre las Infecciones Urológicas*. European Association of Urology. Recuperado de <http://www.uroweb.org/gls/pdf/spanish/17-%20GUIA%20CLINICA%20SOBRE%20LAS%20INFECCIONES%20UROLOGICAS.pdf>

Koneman, E.; Allen, S. et al. (2006). *Diagnóstico Microbiológico*. Argentina- Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A. 6ª Edición. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=koneman+diagnostico+microbiologico&hl=es&sa=X&ei=_xyUVdCyBozs-QH6mK9A&sqi=2&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=koneman%20diagnostico%20microbiologico&f=false

Laboratorios Britania S.A. (2010). *Britanialab*. Argentina, Caba. Recuperado de: <http://www.britanialab.com/productos.php>

Lujan, D. & Pajuelo, G. (2008 mayo-agosto). *Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos aislados en infección del tracto urinario*. Medigraphic. Vol. 19, No. 2. P, p 111-112. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2008/bio082e.pdf>

Moore, K., & Dalley, A., (2008). *Anatomía con Orientación Clínica*. México DF. Editorial Médica Panamericana. 5ta edición. Tomo II. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=4ywjo9aQDt8C&printsec=frontcover&dq=editions:GuNV2idhkC&hl=es&sa=X&ei=iQKUVcGRI8PgQG4m4KACQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>

OIE, OMS, FAO. (2008). *Métodos de Laboratorio para los Ensayos de Sensibilidad de las Bacterias frente a los Antimicrobianos*. Recuperado de: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.06.%20M%C3%A9todos%20de%20laboratorio.pdf

Olano, M.; Ochoa, M.; Salirrosas, J.; & Vazquez, A. et al. (2014). *Resistencia Bacteriana Inducida*. Facultad de Ciencia Naturales. Escuela Profesional de Biología. Recuperado de: http://www.academia.edu/9626006/Inducci%C3%B3n_a_la_resistencia_antibi%C3%B3ticos

Pankaj, B., Sanjiv, N., Bishnu, P., Binod, L., & Shrestha. (Enero de 2012). Alta prevalencia de la resistencia a múltiples fármacos en uropatógenos bacterianas de Kathmandu, Nepal. *BioMed Central* . Recuperado de: <http://bmcrenotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-38>

Picazo, J. *Métodos Básicos para el Estudio de Sensibilidad a los Antimicrobianos*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Coesant. Recuperado de http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf

Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). *Enterobacterias*. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete. España. Recuperado de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf

Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. Buenos Aires- Madrid. Editorial Médica Panamericana S.A. 1ª Edición. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=TdsoWPEYaoUC&pg=PA41&dq=microbiologia+familia+enterobacteriaceae&hl=es&sa=X&ei=qHCUVazvOIIm5AGqv4HQCg&ved=0CEoQ6AEwCA#v=onepage&q=microbiologia%20familia%20enterobacteriaceae&f=false>

Romero, C., (2012). *Manejo de Infecciones Urinarias en Gestantes que acuden al Hospital Isidro Ayora de Loja*. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador. Recuperado de: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/4032/1/ROMERO%20ALVARADO%20CARLOS%20ALBERTO.pdf>

Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. México D.F. Editorial Médica Panamericana. 3ª Edición. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=Wv026CUhR6YC&pg=PA753&dq=microbiologia+E.+coli&hl=es&sa=X&ei=4RuUVabKIMzz-AGa6IHYBQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=microbiologia%20E.%20coli&f=false>

Sahm, D. & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. Argentina-Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A. 12ª Edición. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA80&dq=tecnica+de+la+tincion+de+gram&hl=es&sa=X&ei=6gWaVYawBceWgwTigL_YCQ&ved=0CCAQ6AEwAQ#v=onepage&q=tecnica%20de%20la%20tincion%20de%20gram&f=false

Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). *Métodos Básicos para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado de: [http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Bacte CEFA 36.pdf](http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Bacte%20CEFA%2036.pdf)

Tumbaco, A., & Martínez, L. (2013). *Factores de riesgo que influyen en la predisposición de Infecciones Urinarias en mujeres 15 – 49 años que acuden al Subcentro Virgen del Carmen del cantón La Libertad*. Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Ecuador. Recuperado de: [http://repositorio.upse.edu.ec:8080/bitstream/123456789/1003/1/ TESIS %20 INFECCIONE %20%20URINARIAS.pdf](http://repositorio.upse.edu.ec:8080/bitstream/123456789/1003/1/TESIS%20INFECCIONE%20%20URINARIAS.pdf)

Vidal, L., (2012). *Anatomofisiología y Patología Básicas*. Madrid, España. Ediciones Paraninfo S.A. 1ª Edición. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=ulZtoTiD0d8C&pg=PA314&dq=anatomia+del+aparato+urinario&hl=es&sa=X&ei=fPKRVb-9OIbg-QGXkpLYCg&ved=0CBoQ6AEwADgy#v=onepage&q=anatomia%20del%20aparato%20urinario&f=false>

Vives, E.; Medvedovsky, E. & Rothlin, R. et al. Farmacología II. *Aminoglucósidos*.(2010). Recuperado de: <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/aminoglucosidos.pdf>

Wein, A., et. al. (2008). Campbell- Walsh Urología. Argentina. Editorial Médica Panamericana. 9ª Edición. Tomo I. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=ONKVVHU5SNMC&pg=PA228&dq=infeccion+de+vias+urinarias+vias+de+infeccion&hl=es&sa=X&ei=vzGUVc7xCoOp-QG98bbYBA&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Infeccion%20de%20vias%20urinarias%20vias%20de%20infeccion&f=false>.

11. ANEXOS

ANEXO Nro. 1



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Área de la Salud Humana
Carrera de Laboratorio Clínico

Loja, 02 de Marzo del 2015.

Crnel. Edison Moreno.

DIRECTOR DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro 7 DE LA CIUDAD DE LOJA.

Ciudad.

De mis consideraciones:

Por el presente y dando cumplimiento al proyecto de tesis de autoría de la estudiante Ximena Lizbeth Lanche Silva, del séptimo módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, certifico que el proyecto ha cumplido todos los requisitos para su respectiva ejecución; así mismo se conceda el permiso correspondiente para la obtención de las muestras de orina de pacientes de consulta externa que acuden al Hospital Militar con pedido de urocultivo en el período Marzo-Abril del 2015, el cual tiene como tema: **CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA FRENTE A ESCHERICHIA COLI EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR DE LA CIUDAD DE LOJA.**

Por la atención que le conceda a la presente, le expreso mis sentimientos de agradecimientos y consideración

Muy atentamente,



Glenda Rodríguez
Lcda. Glenda Rodríguez
DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

SECCION: P-1
FECH: 02/03/2015
HOR: 12406
ACORD: Autorizado previo coordinación con Laboratorio Clínico

ANEXO Nro.2

Loja, 20 de marzo de 2015.

Ing. Patricio Aguirre

**DIRECTOR DEL LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.**

Ciudad:

De mis consideraciones:

Yo XIMENA LIZBETH LANCHE SILVA, con cédula de ciudadanía N° 1900592856, estudiante del octavo módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo muy respetuosamente a Ud. para extenderle un fraterno saludo y a la vez desearle éxitos en sus funciones.

Aprovechando la oportunidad para solicitarle de la manera más comedida se digne en autorizarme el permiso correspondiente para realizar el procesamiento de las muestras en el LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS; a la misma vez, el uso de los equipos para llevar a cabo mi proyecto de tesis en el periodo marzo-mayo del 2015 que tiene como tema: *CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA FRENTE A ESCHERICHIA COLI* EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N°7 DE LA CIUDAD DE LOJA, tengo a bien solicitar se me conceda el permiso respectivo para el desarrollo del mismo que tiene como propósito servir de aporte para el conocimiento en beneficio de los pacientes.

Por la favorable atención que le conceda a la presente, le expreso mis sentimientos de agradecimiento, consideración y estima

Muy Atentamente.



Ximena Lizbeth Lanche Silva

**ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

C.I. 1900592856



ANEXO Nro. 3.1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES DE EDAD

Fecha: 05-02-15



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA
MENORES DE EDAD

Sr/Sra. [Handwritten Name] mayor de edad, cc [Handwritten ID], C.I. [Handwritten ID] padre/madre de el/la menor [Handwritten Name]

MANIFIESTAN

Que consienten la participación de el/la menor [Handwritten Name] de [Handwritten Age] años de edad, en el proyecto de investigación denominado: **CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA, CEFUROXIMA, CEFTRIAZONE, AMPICILINA, CEFOTAXIMA, CRIPOFLOXACINA Y AMIKACINA, FRENTE A Escherichia coli. AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro.7 LOJA.**

- 6. La orina será utilizada para urocultivo el cual va a determinar si hay presencia de *Escherichia coli*. Si hay la presencia de esta bacteria, se realizará la concentración mínima inhibitoria de todos estos antibióticos que podrá ser usado para el tratamiento de **infección de vías urinarias.**
- 7. Los resultados de las pruebas no podrán ser divulgados con el nombre de mi hija/hijo sin mi autorización previa.
- 8. Los investigadores no obtendrán ningún beneficio económico de este proyecto de tesis sin mi consentimiento.
- 9. En el supuesto de que la autoridad judicial exija la revelación de alguna información, **el/la laboratorista estará obligada a proporcionar sólo aquella que sea relevante para el asunto en cuestión** manteniendo la confidencialidad de cualquier otra información.
- 10. La participación de mi hija/hijo en este proyecto de tesis es de carácter voluntario, y en caso de no participar en él, esta decisión no afectará la relación médico-paciente.

FIRMA DEL PADRE/MADRE: [Handwritten Signature] C.I.: [Handwritten ID]

FIRMA DEL INVERTIGADOR: [Handwritten Signature] C.I.: [Handwritten ID]

ANEXO Nro. 5

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

SANGRE AGAR BASE

Principio: Contiene peptona especial que soporta rápido y abundante crecimiento de microorganismos exigentes y no exigentes, promueve la morfología típica colonial; mejora la producción de pigmentos y reacciones hemolíticas más claramente definidos. Este medio se utiliza como base para los medios que contienen sangre y para las formulaciones de medios selectivos en los que diferentes combinaciones de agentes antimicrobianos se utilizan como aditivos.

INSTRUCCIONES

Preparación:

- ✓ Suspende 44 g de agua en 1000 ml de agua destilada.
- ✓ Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- ✓ Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos.
- ✓ Enfriar a 45-50 ° C antes de añadir compuestos sensibles al calor.

1. **Para el Agar Sangre:** Añadir 5% v / v de sangre de oveja desfibrinada estéril fresco base. Colocar el medio en cajas Petri estériles, tapar, esperar a que se enfríen, empacar y guardarlas en refrigeración con la tapa hacia abajo (4 ° C) hasta su utilización.

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia:** Crema a amarillo polvo fluido homogéneo
- **Gelificación:** Firme, comparable con un 1,5% en gel de agar
- **El color y la claridad de medio preparado:**
Medio de base: La luz de color ámbar transparente a ligeramente opalescente gel.
Después de la adición de 5% w/v de sangre desfibrinada estéril: Cereza formas opacas de color rojo de gel en placas de Petri.
- **Reacción:** 4,4% w/v solución acuosa a 25 ° C. **pH:** 7,3 ± 0,2
- **Cajas Petri con Medio Agar Sangre:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 cajas al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta que las cajas están contaminadas y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, las cajas están listas para su uso.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA EN AGAR SANGRE

- ✓ Retirar las cajas Petri de refrigeración e incubarlas a una temperatura de 37 ° C.
- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular la caja.
- ✓ Esterilizar el asa metálica calibrada; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo.
- ✓ Dejar enfriar, sumergir en urocultivo y realizar el estriado para aislar el microorganismo en el agar.

Siembra por agotamiento (estriado)

- ✓ Colocar una gota de orina con el asa calibrada en la parte superior de la caja y entenderla hacia la parte inferior y estriar desde la parte superior de derecha a izquierda. Este estriado implica una sola inoculación de una sección de la placa Petri y a continuación disminuir la colonia arrastrando microorganismos de la sección inicial de dos a tres secciones adicionales, achicando eficazmente la población de microorganismos. Esterilizar el asa.
- ✓ Incubar las cajas Petri en forma invertida (tapa hacia abajo) a 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar las cajas y observar si existe crecimiento bacteriano.

RESPUESTA DEL CULTIVO

Características culturales observados con adición de 5% w/v sangre desfibrinada estéril, después de una incubación a 35-37 ° C durante 24-48 horas.

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Hemólisis
<i>Escherichia coli</i>	50-100/ UFC	Colonias medianas de color blanquecino, cremosas y redondeadas.	No, pero algunas cepas producen.

Interpretación

Observar las características de las colonias. Para el medio de cultivo conteniendo sangre, observar las reacciones de hemólisis:

- **Hemólisis alfa:** Lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio, debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.
- **Hemólisis beta:** Lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.
- **Hemólisis gamma:** ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

Referencias:

- HiMedia Laboratories. Technical Data. *Columbia blood Agar base* (2011). Recuperado de: <http://himedialabs.com/TD/M144.pdf>
- Bernal, M. (2014). *Identificación Bacteriana*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Departamento de Microbiología, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/microbiologia/Docs/W_IDENTIFICACION_BACTERIA_NA%20I%2014.pdf

ANEXO Nro. 5.1

AGAR MacConkey

Principio: Medio selectivo y diferencial para el cultivo de organismos coliformes, se ha recomendado este medio para la identificación de *Escherichia coli*. Lactosa monohidrato es la fuente de hidratos de carbono fermentables. La acción selectiva de este medio se atribuye al violeta cristal y sales biliares, que son inhibidores para la mayoría de las especies de bacterias gram-positivas. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico en el medio.

INSTRUCCIONES

Preparación:

- ✓ Suspender 49,53 gramos de medio deshidratado en 1000 ml / agua destilada.
- ✓ Calentar hasta ebullición para disolver el medio por completo.
- ✓ Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos
- ✓ Evitar el sobrecalentamiento enfriar a 45-50 °C. Mezclar bien antes de verter en placas de Petri.
- ✓ La superficie del medio debe estar seca cuando se inocula.
- ✓ Colocar el medio en cajas Petri estériles, tapar, esperar a que se enfríen, empacar y guardarlas en refrigeración con la tapa hacia abajo (4 ° C) hasta su utilización

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia** Rojo con tinte violáceo coloreado formas de gel transparente a ligeramente opalescente
- **La gelificación.** Comparable con 1,35% de agar gel.
- **El color y la claridad de medio preparado.** Rojo con tinte violáceo coloreado formas de gel transparente a ligeramente opalescente en placas de Petri.
- **pH** 6,90-7,30
- **Cajas Petri con Medio Agar Macconkey:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 cajas al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta como contaminación y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, las cajas están listas para su uso.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA EN AGAR MacConkey

- ✓ Retirar las cajas Petri de refrigeración e incubarlas a una temperatura de 37 ° C.
- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular la caja.
- ✓ Esterilizar el asa metálica calibrada; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo.
- ✓ Dejar enfriar, sumergir en urocultivo y realizar el estriado para aislar el microorganismo en el agar.

Siembra por agotamiento (estriado)

- ✓ Colocar una gota de orina con el asa calibrada en la parte superior de la caja y entenderla hacia la parte inferior y estriar desde la parte superior de derecha a izquierda. Este estriado implica una sola inoculación de una sección de la placa Petri y a continuación disminuir la colonia arrastrando microorganismos de la sección inicial de dos a tres secciones adicionales, achicando eficazmente población de microorganismos. Esterilizar el asa.
- ✓ Incubar las cajas Petri en forma invertida (tapa hacia abajo) a 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar las cajas y observar si existe crecimiento bacteriano.

RESPUESTA DEL CULTIVO

Características culturales observadas con después de una incubación a 35-37 ° C durante 24-48 horas.

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Incubación
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739	50-100/ UFC	Colonias color rosa rojo con precipitado de bilis.	30-35 C. 18-72 horas

Referencias.

- HiMedia Laboratories. Technical Data. *Columbia blood Agar base* (2011). Recuperado de: <http://himedialabs.com/TD/M144.pdf>
- Bernal, M. (2014). *Identificación Bacteriana*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Departamento de Microbiología, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/microbiologia/Docs/W_IDENTIFICACION_BACTERIA_NA%20I%2014.pd

ANEXO Nro. 5.2

UREA AGAR BASE, CHRISTENSEN

Principio: Urea Agar detecta actividad de la ureasa por todos los organismos *Proteus* rápidamente ureasa positiva y también por otros miembros de *Enterobacteriaceae* que exhiben una reacción de ureasa retardada. Esto se logra:

- la adición de glucosa al medio
- disminuyendo la concentración de peptona, y
- disminuir el sistema tampón, como un medio menos tamponada detecta incluso más pequeña cantidad de álcali.

INSTRUCCIONES

Preparación:

- ✓ Suspender 24,01 gramos en 950 ml de agua destilada.
- ✓ Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- ✓ Esterilizar en autoclave a 10 libras de presión (115 ° C) durante 20 minutos.
- ✓ Enfriar a 50 ° C y añadir asépticamente 50 ml de solución estéril 40% Urea y mezclar bien.
- ✓ Distribuir en tubos estériles, tapar y colocar en una posición inclinada (pico de flauta). Esperar a que se enfrién o solidifiquen, empacar y guardarlos en refrigeración (4°C) hasta su utilización. No sobrecaliente o recalentar el medio en forma de urea porque se descompone muy fácilmente.

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia:** Amarillo claro al polvo homogéneo de color rosa claro de flujo libre.
- **La gelificación:** Firme, comparable con un 1,5% en gel de agar
- **El color y la claridad de medio preparado:**
Color naranja amarillento, formas de gel transparente a ligeramente opalescente en tubo sesgado.
- **Reacción:** La reacción de 2,4% w/v solución acuosa a 25 ° C. **pH:** 6,8 ± 0,2 (6,60-7,00)
- **Tubos con Medio de Urea:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 tubos al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta que los tubos están contaminados y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, los tubos están listos para realizar las pruebas bioquímicas.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA

- ✓ Retirar los tubos de ensayo con medio de úrea en refrigeración e incubar 37 ° C.
- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular tubos.
- ✓ Esterilizar el asa metálica recta en punta; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo.
- ✓ Destapar los tubos, flamear. Dejar enfriar el asa y recoger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri

Siembra por estría:

- ✓ En superficie inclinada se introduce el asa en el tubo que contiene el medio; desde el fondo y en progresión ascendente se desliza el asa en movimiento de zig-zag (se estría).
- ✓ Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar los tubos y observar si existe crecimiento bacteriano.

RESPUESTA DEL CULTIVO

Características culturales observadas en la adición de Solución de Urea al 40% después de una incubación a 35-37 ° C durante 18-24 horas.

Organismo	Inóculo(CFU)	Crecimiento	Actividad ureásica	Color del medio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50-100	Abundante, colonias pequeñas blanquecinas.	Negativo	Amarillo, sin cambio

Interpretación

Observar actividad ureásica y cambio de color del medio. Bacterias que hidrolizan lentamente la urea, como ser *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, viran al color rojo-rosado de todo el medio de cultivo.

- **Urea positivo:** aparece un color rojo. La bacteria produce ureasa. Ej: En las especies de *Proteus* el medio se alcaliniza poco después de la inoculación, por lo tanto sus resultados deben ser leídos en las primeras 2-6 horas, mientras que *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* tienen actividad ureasa dentro de las 24-48 horas de incubación.
- **Urea negativo:** el medio permanece amarillo. La bacteria no posee ni produce la enzima ureasa. Ej: *Escherichia coli* y *Shigella* Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

Referencias:

- HiMedia Laboratories. Technical Data. *Lysine Iron Agar*, Christensen (2011). Recuperado de: <http://himedialabs.com/TD/M377.pdf>
- López, L., & Torres, C., (2006). *Identificación de Bacterias*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias Microbiología General- Carrera Farmacia. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>
- Bernal, M. (2014). *Identificación Bacteriana*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Departamento de Microbiología, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/microbiologia/Docs/W_IDENTIFICACION_BACTERIA_NA%20I%2014.pdf

ANEXO Nro. 5.3

HIERRO AGAR Lisina (LIA)

Principio: Este medio es sensible para la detección de fermentación de lactosa de microorganismos que descarboxilan lisina rápidamente y puede producir grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno, permite diferenciar especies fermentadoras y no fermentadoras. El digerido péptico y extracto de levadura proporcionan nutrientes esenciales; la dextrosa es una fuente de hidratos de carbono fermentable. Citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio son indicadores de la formación de H₂S.

INSTRUCCIONES

Preparación:

- ✓ Suspender 34,56 gramos en 1000 ml de agua destilada.
- ✓ Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- ✓ Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos.
- ✓ Distribuir en tubos estériles, tapar y colocar en una posición inclinada (pico de flauta). Esperar a que se enfrien o solidifiquen, empaquetar y guardarlos en refrigeración (4 ° C) hasta su utilización.

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia:** Amarillo claro a grisáceo polvo fluido homogéneo amarillo
- **Gelificación:** Firme, comparable con un 1,5% en gel de agar
- **El color y la claridad de medio preparado**
De color púrpura claro, forma un gel ligeramente opalescente en tubos como sesgos
- **Reacción:** La reacción de 3,45% w / v solución acuosa a 25 ° C. **pH:** 6,7 ± 0,2 (6,50-6,90).
- **Tubos con Medio de Lisina:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 tubos al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta que los tubos están contaminados y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, los tubos están listos para realizar las pruebas bioquímicas.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA

- ✓ Retirar los tubos de ensayo con medio de Lisina en refrigeración e incubar 37 ° C.
- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular tubos.
- ✓ Esterilizar el asa metálica recta en punta; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo.
- ✓ Destapar los tubos y flamear. Dejar enfriar el asa y recoger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri con crecimiento de bacterias.

Siembra por estría:

- ✓ En superficie inclinada se introduce el asa en el tubo que contiene el medio; desde el fondo y en progresión ascendente se desliza el asa en movimiento de zig-zag (Se estría).
- ✓ Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar los tubos y observar si existe crecimiento bacteriano.

RESPUESTA DEL CULTIVO

Características culturales observados después de una incubación a 35-37 ° C durante 18-24 horas.

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Fondo	Sesgo (pico de flauta)	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50-100	Abundante, colonias pequeñas	Alcalino, sin cambio de color. (K)	Alcalino, sin cambio de color (púrpura) (K)	-

Interpretación

Los cultivos que producen sulfuro de hidrógeno pueden causar ennegrecimiento del medio debido a la producción de sulfuro ferroso. La descarboxilación de lisina causa una reacción alcalina (color púrpura) para dar el cadaverina amina y los organismos que no descarboxilan lisina pueden producir tope ácido (color amarillo). Los organismos que desaminan lisina, forma ácido alfa - cetocarboxílico, que reacciona con la sal de hierro cerca de la superficie del medio bajo la influencia del oxígeno para formar el compuesto de color rojizo-marrón. El medio es apuñalado hasta la base de la culata y veteado en inclinación

A: Reacción acida. Color amarillo

K: Reacción alcalina. Color violeta

R: Reacción alcalina: color rojo

K/K: Descarboxilación lisina

K/A: Fermentación glucosa. Descarboxilación lisina

R/A: Desaminación lisina. Fermentación glucosa.

Referencia:

- HiMedia Laboratories. Technical Data. *Urea Agar Base, Christensen* (2011). Recuperado de: <http://himedialabs.com/TD/M112I.pdf>
- López, L., & Torres, C., (2006). *Identificación de Bacterias*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias Microbiología General- Carrera Farmacia. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>
- Bernal, M. (2014). *Identificación Bacteriana*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Departamento de Microbiología, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/microbiologia/Docs/W_IDENTIFICACION_BACTERIA_NA%20I%2014.pdf

ANEXO Nro. 5.4

TRIPLE AZÚCAR HIERRO AGAR (TSI)

Principio: El digerido péptico de tejido animal, extracto de levadura y extracto de carne proporciona compuestos nitrogenados, azufre, oligoelementos y vitaminas del complejo B, etc. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico. Lactosa, sacarosa y la glucosa son hidratos de carbono fermentables. Tiosulfato de sodio y los iones férricos o ferrosos hacen sistema de indicadores de H₂S. Rojo fenol es el indicador de pH.

INSTRUCCIONES

Preparación:

- ✓ Suspender 64,52 gramos en 1000 ml de agua destilada.
- ✓ Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- ✓ Mezclar bien y distribuir en tubos de ensayo.
- ✓ Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos.
- ✓ Distribuir en tubos estériles, tapar y colocar en una posición inclinada (pico de flauta). Esperar a que se enfríen o solidifiquen, empacar y guardarlos en refrigeración (4 ° C) hasta su utilización.

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia:** Amarillo claro a rosa polvo fluido de color homogéneo.
- **Gelificación:** Firme, comparable con el 1,2% en gel de agar.
- **El color y la claridad de medio preparado**
Formas de color rojo rosado claro a ligeramente opalescente gel en tubos como sesgos.
- **Reacción:** La reacción de 6,45% w / v solución acuosa a 25°C. **pH:** 7,4 ± 0,2
- **Tubos con Medio de TSI:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 tubos al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta que los tubos están contaminados y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, los tubos están listos para realizar las pruebas bioquímicas.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA

- ✓ Retirar los tubos de ensayo con medio de TSI en refrigeración e incubar 37 ° C.
- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular tubos.
- ✓ Esterilizar el asa metálica recta en punta; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo.
- ✓ Destapar los tubos y flamear. Dejar enfriar el asa y recoger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri con crecimiento de bacterias.

Siembra por estría:

- ✓ En superficie inclinada se introduce el asa en el tubo que contiene el medio; desde el fondo y en progresión ascendente se desliza el asa en movimiento de zig-zag (Se pica en el fondo y se estría).
- ✓ Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar los tubos y observar si existe crecimiento bacteriano.

RESPUESTA DEL CULTIVO

Características culturales observadas después de una incubación a 35-37 ° C durante 18-24 horas.

Organismo	Inóculo(CFU)	Crecimiento	Fondo	Sesgo (pico de flauta)	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50-100	Abundante, colonias pequeñas	Reacción ácido, color amarillo del medio	Acido, color amarillo del medio.	+	-
Interpretación			(A)	(A)		Sin Ennegrecimiento de medio

Los organismos que fermentan la glucosa producen una variedad de ácidos, girando el color del medio de rojo a amarillo. Más cantidad de los ácidos se liberan en el fondo (fermentación) que en la inclinación (respiración). Bacterias que crecen también forman productos alcalinos de la descarboxilación oxidativa de peptona y estos productos alcalinos neutralizan las grandes cantidades de ácido presente en el fondo. Así:

- La aparición de un alcalino (rojo) de inclinación y un ácido (amarillo) a tope después de la incubación indica que el organismo es fermentador de glucosa pero es incapaz de fermentar la lactosa y / o sacarosa.
- Las bacterias que fermentan lactosa o sacarosa (o ambos), además de glucosa, producen grandes cantidades de ácido. Por lo tanto no reversión de pH en esa región es posible y por lo tanto las bacterias presentan una inclinación de ácido y tope ácido.
- La producción de gas (CO₂) se detecta por la presencia de grietas o burbujas en el medio, cuando el acumulado tiene escapes de gas. Tiosulfato se reduce a sulfuro de hidrógeno por varias especies de bacterias y H₂S se combina con los iones férricos de sales férricas para producir el precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso. La reducción de tiosulfato procede sólo en un ambiente con medio ácido y el ennegrecimiento ocurre generalmente en el extremo del tubo.

A: Reacción acida. Color amarillo

K: Reacción alcalina. Color rojo naranja.

K/A: Fermentación de glucosa, No producción de gas.

A/A: Fermentación de glucosa y sacarosa o glucosa y la lactosa; fermentación de todos los tres azúcares, glucosa, lactosa y sacarosa fermentado.

Burbujas o grietas presentes: Producción de gas

Negro presente: Precipitado H₂S producción de gas.

Referencias:

- HiMedia Laboratories. Technical Data. *Triple Azúcar Hierro Agar* (2011). Recuperado de: <http://www.himedialabs.com/TD/M021I.pdf>
- López, L., & Torres, C., (2006). *Identificación de Bacterias*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias Microbiología General- Carrera Farmacia. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>
- Bernal, M. (2014). *Identificación Bacteriana*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Departamento de Microbiología, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/microbiologia/Docs/W_IDENTIFICACION_BACTERIA_NA%20I%2014.pdf

ANEXO Nro. 5.5

CITRATO AGAR SIMMONS

Principio: Este medio se fundamenta en el distinto comportamiento de los Coliformes fecales y los Aerógenos en un ambiente que contiene sales inorgánicas de amonio como única fuente de nitrógeno y citrato como única fuente de carbono. En tal situación los primeros muestran su incapacidad de desarrollo, mientras que los segundos lo hacen sin dificultad. La presencia de azul de bromotimol hace que el medio, inicialmente verde, pueda cambiar de color por la producción de álcali, a un azul oscuro.

INSTRUCCIONES

Procedimiento:

- ✓ Disolver 24,28 gramos en 1000 ml de agua destilada.
- ✓ calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto.
- ✓ Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos a 121 ° C.
- ✓ se distribuye en tubos de ensayo dejar enfriar en posición inclinada, dejando un fondo de 2-3 cm y una superficie inclinada de 4-5 cm

CONTROL DE CALIDAD

- **Polvo Apariencia:** Polvo amarillo, suave y fluido sin color.
- **Aspecto del medio preparado:**
- Gelificante Firme, comparable con un gel de agar al 1,5%.El color y el color verde bosque
- Claridad, ligeramente opalescente forma un gel en tubos.
- **Reacción:** La solución acuosa de reacción 2,43% tiene pH: $6,8 \pm 0,1$ a 25°C .
- **Tubos con Medio de Citrato:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 tubos al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta que los tubos están contaminados y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, los tubos están listos para realizar las pruebas bioquímicas.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA

- ✓ Retirar los tubos de ensayo con medio de Citrato en refrigeración e incubar 37°C .
- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular tubos.
- ✓ Esterilizar el asa metálica recta en punta; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo. Destapar los tubos y flamear. Dejar enfriar el asa y recoger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri con crecimiento de bacterias.

Siembra por estría:

- ✓ En superficie inclinada se introduce el asa en el tubo que contiene el medio, se desliza el asa en movimiento de zig-zag (en pico de flauta). Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37°C por 24 horas. Observar si existe crecimiento bacteriano.

RESPUESTA DEL RESULTADO.

Organismo	Crecimiento	La mitad de color	Utilización de citrato
<i>Escherichia coli</i> (AATC) ATCC(25922)	Inhibido	Verde	– Negativo

Interpretación: *Escherichia Coli* (negativo -)

Referencias.

- HiMedia Laboratories. Technical Data. *Citrato Agar Simmons* (2011). Recuperado de: <http://www.himedialabs.com.br/produtos/detail.asp?iType=37&iPic=112>

ANEXO Nro. 5.6

AGAR SIM (Motilidad, Indol, sulfuro de hidrógeno)

Principio: SIM Medium permite la determinación de tres características por las cuales las bacterias entéricas pueden diferenciar. Hierro peptonizada y tiosulfato de sodio son los indicadores de producción de H₂S. Este H₂S reacciona con el hierro peptonizado para formar un precipitado negro de sulfuro ferroso, organismos móviles intensifican la reacción H₂S. Organismos móviles crecen lejos de la línea de inoculación mostrando difusa crecimiento mientras que los organismos no móviles crecen a lo largo del stabline. Detección de la motilidad es posible debido a la semisólido naturaleza del medio. Crecimiento que irradian desde el centro stabline indica que el organismo de ensayo es móvil. El triptófano, desde digerido péptico de tejido animal, se degrada por bacterias específicas para producir indol. El indol se detecta por la adición de reactivos químicos que siguen al período de incubación.

INSTRUCCIONES

Procedimiento:

- ✓ Suspender 36,23 gramos en 1000 ml de agua destilada.
- ✓ Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- ✓ Distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos.
- ✓ Permita que los tubos se enfrien en una posición vertical.

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia:** Crema a beige polvo fluido homogéneo
- **La gelificación:** Semisólido, comparable con el 0,3% en gel de agar.
- **El color y la claridad de medio preparado:**
Ámbar mediano de color forma un gel ligeramente opalescente en tubos.
- **Reacción.** La reacción de 3,6% w / v solución acuosa a 25 ° C. **pH:** 7,3 ± 0,2 (7,10-7,50)
- **Tubos con Medio de SIM:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 tubos al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta que los tubos están contaminados y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, los tubos están listos para realizar las pruebas bioquímicas.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA

- ✓ Retirar los tubos de ensayo con medio de Lisina en refrigeración e incubar 37 ° C.
- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular tubos.
- ✓ Esterilizar el asa metálica recta en punta; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo. Destapar los tubos y flamear. Dejar enfriar el asa y recoger de 1 a 2 colonias aisladas de la caja Petri con crecimiento de bacterias.

Siembra por estría:

- ✓ Sembrar por punción única en la región central del tubo, utilizando una aguja recta hasta una profundidad de 2/3 del medio. Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubarlos a una temperatura de a 37° C por 24 horas.
- ✓ Agregar 2 ó 3 gotas del reactivo de Kovacs para detección del indol.

RESPUESTA DEL CULTIVO

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Motilidad	Indol	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50-100/ UFC	exuberante	Positivo	Positivo (+) Anillo en la interfaz del medio	Negativo (-)

Interpretación de resultados:

1. **Sulfuro de hidrógeno:** negativo reacción, no se observa ennegrecimiento. La bacteria no produce sulfuro. Ejm. *E. coli*.
2. **Indol:** Prueba positiva: color rojo fucsia en la interface del reactivo y el medio. Este reactivo contiene p-dimetilaminobenzaldehído que forma un complejo de color rojo con el indol.
3. **Movilidad:** Prueba positiva: Se visualiza turbidez parcial del medio.

Almacenamiento y caducidad

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

Referencias:

- HiMedia Laboratories. Technical Data. *AGAR SIM (Motilidad, Indol, sulfuro de hidrógeno)* (2011). Recuperado de: <http://www.himedialabs.com/TD/M021I.pdf>

ANEXO Nro. 5.7

MUELLER HINTON CALDO

Principio: Hidrolizado ácido (digerir) de caseína y de suministro de extracto de carne aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, minerales, vitaminas, carbono y otros nutrientes para apoyar el crecimiento de microorganismos. El almidón actúa como un coloide protector contra sustancias tóxicas que pueden estar presentes en el medio. La hidrólisis del almidón durante el tratamiento en autoclave proporciona una pequeña cantidad de dextrosa, la cual es una fuente de energía.

INSTRUCCIONES:

Procedimiento

- ✓ Suspender el polvo en 1 litro de agua purificada: Difco™ Mueller Hinton Broth - 21 g; mezclar.
- ✓ Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para completamente disolver el polvo.
- ✓ Autoclave a 116-121 ° C durante 10-15 minutos (consulte producto etiqueta). No sobrecaliente.
- ✓ Compruebe preparó medio para asegurar el pH final es de $7,3 \pm 0,1$ a 25 ° C.
- ✓ Las muestras de ensayo del producto acabado para el rendimiento utilizando, cultivos de control típicos estables.

CONTROL DE CALIDAD

- **Polvo Apariencia:** Beige claro, de flujo libre, homogénea con algunas manchas oscuras.
- **Aspecto del medio preparado:**
Ambar muy claro, puede tener un ligero precipitar.
La reacción es de 2,1 %, pH $7,3 \pm 0,1$ (Calcio: 2.9 - 5.9 mg/L y agnesio: 3.2 - 5.2 mg/L)

Respuesta Cultural

- **Difco™ Caldo Mueller Hinton:** Preparar el medio por instrucciones de la etiqueta, la suplementación con calcio y iones de magnesio según M7.2 norma CLSI Preparar micro dilución en caldo bandejas, inoculan (con los organismos enumerados a continuación) e incubar según lo recomendado por CLSI.2 Compare el MIC (concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de la bacteria de prueba) de los antimicrobianos probado a la norma CLSI.

Resultados Esperados


Para la dilución de caldo de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, consulte referencias apropiadas para resultados. El crecimiento de microorganismos en medios de caldo se indica por la presencia de turbidez en comparación con un control sin inocular.


Referencias:

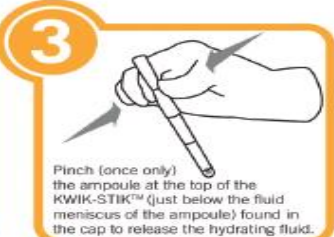
- Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition. Mueller Hinton Broth (Not Cation-Adjusted). Recuperado de: [mhttps://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/275710.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/275710.pdf)

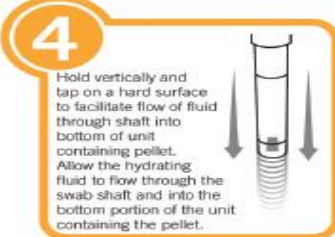
ANEXO Nro. 6


RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA CONTROL ATCC 25922 *Escherichia coli*


- 

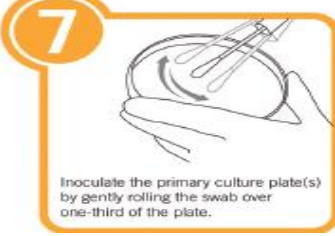
1 Allow the unopened KWIK-STIK™ pouch to equilibrate to room temperature. Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK™ unit.
- 


2 Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record. Do not disassemble the device during hydration.
- 


3 Pinch (once only) the ampoule at the top of the KWIK-STIK™ (just below the fluid meniscus of the ampoule) found in the cap to release the hydrating fluid.
- 


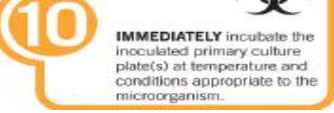
4 Hold vertically and tap on a hard surface to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet. Allow the hydrating fluid to flow through the swab shaft and into the bottom portion of the unit containing the pellet.
- 

5 Using a pinching action on the bottom portion of the unit, crush the pellet in the fluid until the pellet suspension is homogenous.
- 


6 **IMMEDIATELY** heavily saturate the swab with the hydrated material and transfer to agar medium.
- 


7 Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
- 

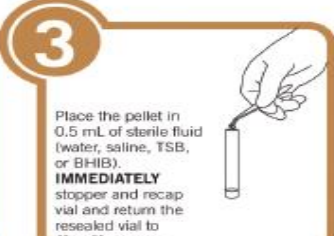
8 Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
- 

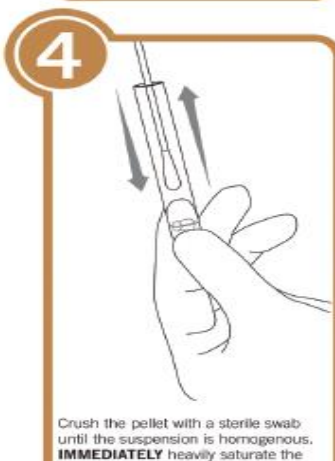
9 Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK™. 
- 


10 **IMMEDIATELY** incubate the inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditions appropriate to the microorganism.


- 


1 Remove the unopened LYFO DISK® vial from 2°C to 8°C storage and allow the unopened vial to equilibrate to room temperature.
- 



2 Aseptically remove one (1) pellet with sterile forceps from the vial. **Do not remove desiccant.**
- 

3 Place the pellet in 0.5 mL of sterile fluid (water, saline, TSB, or BHIB). **IMMEDIATELY** stopper and recap vial and return the resealed vial to 2° to 8° storage.
- 

4 Crush the pellet with a sterile swab until the suspension is homogenous. **IMMEDIATELY** heavily saturate the same swab with the hydrated material and transfer to agar medium.
- 

5 Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
- 

6 Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
- 

7 Using proper biohazard disposal, discard the remaining hydrated material. 
- 

8 **IMMEDIATELY** incubate the inoculated media at temperature and conditions appropriate to the microorganism.

1. Deje que la bolsa sin abrir KWIK - Stik para que se equilibre a la temperatura ambiente. Rasgue la bolsa abierta en la muesca y retire la unidad de KWIK - Stik
2. Arrancar parte de pul-tab en la etiqueta y adjuntar a la placa de cultivo primario o registro de control de calidad, no desmonte el dispositivo durante la hidratación.
3. Presione (sólo una vez) la ampolla en la parte superior de la KWIK- STIK (justo por debajo del menisco del líquido), si encontró, pulse la tapa para liberar el fluido hidratante.
4. Sostenga verticalmente y toque en una superficie dura para facilitar el flujo de fluido a través del eje en la parte inferior de la unidad que contiene pellets. Permitir que el líquido fluya a través de la hidratación del mango de la torunda y en eje porción inferior de la unidad que contiene el sedimento.
5. Usando una acción de pinzamiento en la parte inferior de la unidad de la suspensión de pellets es homogénea.
6. Inmediatamente, fuertemente saturar el hisopo con el material hidratado y trasladarlo al medio de agar.
7. Inocular la placa de cultivo primaria rodando suavemente el hisopo más de un tercio de la placa.
8. Utilizar una asa estéril, para facilitar el aislamiento de colonia.
9. Usar la eliminación adecuada de riesgo biológico, descartar la KWIK – Stik
10. Incubar inmediatamente la placa de cultivo primario inoculado a temperatura y condiciones apropiadas para el microorganismo.

CRIOCONSERVACIÓN DE LA CEPA *Escherichia coli* ATCC 25922

- Luego de reconstituida la cepa se colocó 1ml de Glicerina al 50%(conservante) y 1ml de la cepa control.
- Se mezcló e inmediatamente se llevó a una refrigeradora a -20°C para su posterior uso.

ANEXO Nro. 7

CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO

Este procedimiento se lleva a cabo cada vez que se prepara un lote de medio de cultivo antes de su uso rutinario. Para ello:

- ✓ Se debe medir el pH de cada lote preparado.
- ✓ Se realiza con papel pH o pH-metro.
- ✓ Rango aceptable pH 7.2 – 7.4.

1. Control de Esterilidad de cada lote:

- Cada vez que se prepara el medio de cultivo incubar el 100% de estos o una cantidad representativa de cajas al azar del lote preparado.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- A las 24 horas se observa en cada una de las cajas si hay o no crecimiento bacteriano. El criterio de aceptación es que no debe haber crecimiento, si se presenta desarrollo en alguna caja se rechaza el lote y se preparan nuevamente. Este control permite demostrar que:
 1. El medio es estéril antes de su inoculación.
 2. Se desarrollan o inhiben los microorganismos.
 3. Cumplen con criterios físicos y químicos de aceptación dados por el NCCLS (M22-T).

2. Pruebas de funcionalidad de medios de cultivo

Para evaluar los medios de cultivo se usa una cepa de referencia apropiada (Cepa Control ATCC) para medir la capacidad de crecimiento y de reacción, cuyo comportamiento para reacciones positivas y negativas ya es conocido de acuerdo a lo establecido en la norma ISO/TS 11133-2:2000. A partir de la cepa de trabajo se prepara un cultivo; y:

- ✓ De los viales de crioconservación, se inocula una suspensión de microorganismo de cepa control ATCC 25922 *E. coli* en agar sangre, maCconkey y en pruebas bioquímicas. Incubar a 37 ° C por 24 a 48 horas.
- ✓ A las 24 horas se evalúa el desarrollo del microorganismo; es decir, si la cepa control ya conocida ha crecido o no en los diferentes medios; y, si ha producido su cambio de color característico.
- ✓ Si el medio de cultivo es conforme, se espera que haya o no reacción en los tubos inoculados y el lote de medio se acepta.

3. Medio de cultivo, organismo control reacción esperada:

La reacción que debe producir la cepa ATCC 25922 *E. coli* en el control de calidad de las diferentes pruebas es:

- **Agar Sangre:** Colonias blancas, cremosas, definidas.
 - **Agar MacConkey:** Colonias rosadas-rojas (Lactosa positiva)
 - **TSI:** ácido/ácido (amarillo)
 - **CIT:** color verde, no hay crecimiento.
 - **Urea:** color naranja, negativo.
 - **LIA:** color lila, positivo
 - **SIM:** amarillo, indol positivo, ácido sulfhídrico negativo.
- ✓ En general los medios preparados se guardan a 4° C, no más de tres meses. Colocar los de más reciente preparación al fondo y los más viejos adelante. Se Rotulan todos los medios preparados, tanto en platos Petri como en tubos, indicando además, la fecha de preparación y expiración.

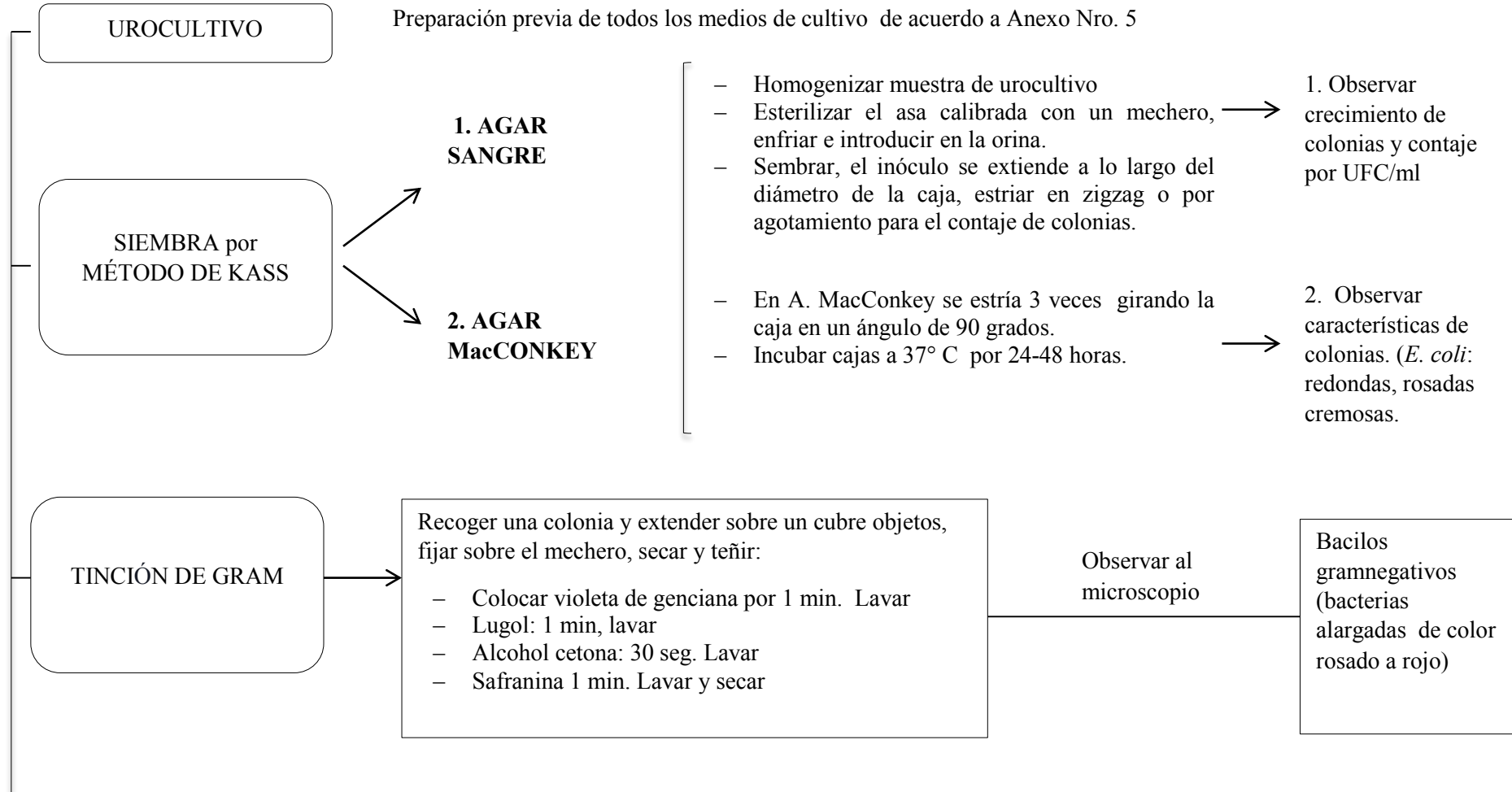
NOTA: El control de Calidad se realizó semanalmente. Todas las cajas de los medios de cultivo preparadas sometidas al control de calidad se eliminaron, independientemente de que desarrollen o no crecimiento bacteriano y se realizaron otras siguiendo el mismo procedimiento de control de calidad.

Referencias:

- HiMedia Laboratories. Technical Data. (2011). Recuperado de: <http://www.himedialabs.com/TD/M021I.pdf>

ANEXO Nro. 8

PRUEBA PILOTO (Ensayo del Proceso del muestreo en la investigación)



PRUEBAS ENZIMÁTICAS

CATALASA

– Recoger una colonia de cultivo bacteriano, colocar sobre un porta, mezclar con peróxido de hidrógeno. *E. coli*: Catalasa positivo (producción de burbujas).

OXIDASA

– Colocar una tirilla de Oxidasa sobre una colonia, leer a los 2 min. Observar cambio de color. *E. coli*: Oxidasa negativo (No hay cambio de color).

IDENTIFICACIÓN *E. coli*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS (siembra)

TSI

Picar fondo del medio y realizar estriado en pico de flauta.

Gas: (+), SH₂: (-)
Reacción: A/A color amarillo del medio

CITRATO

Picar el fondo y realizar estriado en pico de flauta.

No hay cambio de color negativo (-).

UREA

Picar el medio y realizar estriado en pico de flauta.

Crecimiento de colonias: negativo/ variable (-/v)

LISINA

Picar en el fondo y realizar estriado en pico de flauta.

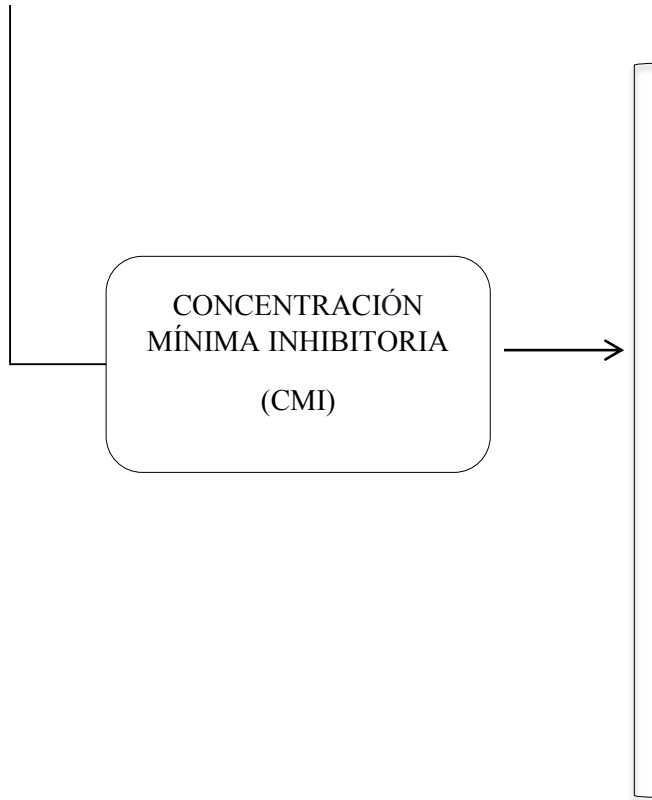
No hay cambio de color (k/k) positivo (+).

SIM

Picar con rectitud en el fondo del medio.

Motilidad: (+)
Indol: (+)
SH₂: (-)

Incubar a 37 ° C por 24 a 48 horas. Leer el resultado (ANEXO 14).



1. Preparación de la solución madre de antibiótico GENTAMICINA.

- Tubos con 1 ml de caldo Mueller Hinton + antibiótico de acuerdo a las diluciones seriadas dobles (primer tubo: 64 ug/ml, 32, 16,8 etc.).
Esquema de diluciones **TABLA 1**
- Colocar 1 ml de suspensión bacteriana al 0.5 de escala de McFarland e incubar 24/48 horas.
- Ver crecimiento en tubos, sembrar en placas e incubar.
- Leer resultados e interpretar la CMI de acuerdo al Patrón que establece la NCLSI M100-S25:
 - SENSIBLE: < 4 ug/ml
 - INTERMEDIO: 8 ug/ml
 - RESISTENTE: >16 ug/ml

NOTA: Todos los procedimientos se realizaron por triplicado.

CÁLCULO PARA LA PREPARACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

TABLA 1. SOLUCIÓN MADRE:

ATB: 10 mg/ 1ml → 10000 ug/ml (Solución inyectable)

10000 ug 1000 ul

256 ug (primer tubo)

10000 ug 1000 ul

X 80 ul AB + 920 ul CMH = 1000 ul ó 1ml AB1 (Sol. Madre)

X = 800 ug

800 ug 1000 ul

256 ug X = 320 ul ATB + 1680 CMH AB2 (Primer tubo)

256 ug ATB ← 2000 ul Sol. preparada

ABREVIATURAS:

- AB: Antibiótico
- CMH: Caldo Mueller-Hinton
- AB1: Antibiótico solución 1
- AB2: Antibiótico solución 2, solución madre final

TABLA 2.

ESQUEMA DE DILUCIONES

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	C+	C-
CAB	64 ug/ml	32 ug/ml	16ug/ml	8 ug/ml	4 ug/ml	2 ug/ml	1 ug/ml	0.5 ug/ml	0.25 ug/ml	0.125 ug/ml	0.062 ug/ml		
CMH	1. 680 ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	900 ul	1000ul
AB	320 ul											100 ul CLF.	
TA	<i>Pasa 1000ul</i> →	1000ul →	1000ul →	1000ul →	1000ul →	1000ul →	1000ul →	1000ul →	1000ul →	1000ul →	1000ul →		
Dilución VF	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	<i>Desecha 1000ul Queda 1000ul</i>	1ml	1ml
IB	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul	1000ul
Solución VF	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml

ABREVIATURAS:

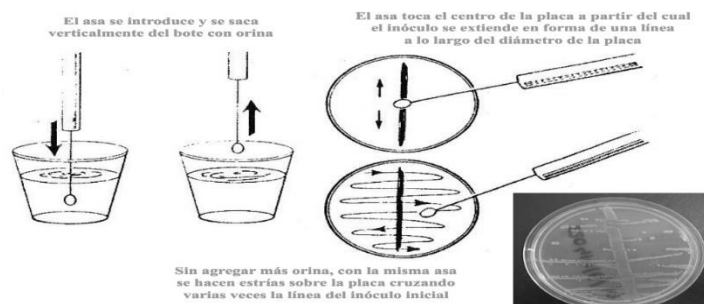
CAB: Concentración de Antibiótico**CMH:** Caldo Muelle-Hinton**AB:** Antibiótico**TA:** solución del Tubo Anterior**Dilución VF:** Volumen Final de dilución**CLF:** Cloroformo**IB:** Inóculo Bacteriano**Solución VF:** Volumen Final de solución final.

ANEXO Nro. 9

UROCULTIVO- MÉTODO DE KASS

Para realizar un cultivo de orina se requieren medios selectivos y no selectivos. Casi siempre es suficiente una combinación de agar Sangre de carnero al 5% y agar MacConkey medio selectivo para identificación de enterobacterias y otros bacilos gram negativos. El procedimiento para realizar la siembra de una muestra de orina es el siguiente:

1. Se homogeneiza bien la muestra.
2. Se esteriliza el asa en el mechero o se saca una nueva asa de su estuche.
3. Se espera unos segundos hasta que el asa este completamente fría
4. Se introduce el asa y se obtiene una porción de orina con el asa calibrada
5. Se procede a realizar la siembra dentro de una Cabina de Seguridad Biológica:
6. Primero sembramos en el medio básico Agar Sangre y se realiza picaduras en la zona de estriado para observar si hay o no hemólisis,
7. Luego sembramos de la misma manera con el asa calibrada en Agar MacConkey medio diferencial.
8. Procedemos a incubar las cajas Petri previamente rotuladas en la base. Durante 24-48horas.
9. Se reporta los resultados según el crecimiento a las 24 o 48 horas.



RESULTADOS

- Una bacteriuria igual o inferior a 1.000 UFC/ml se corresponde con un cultivo negativo o ausencia de IVU.
- La bacteriuria comprendida entre 1.000 y 10.000 UFC/ml se considera que no tiene significado patológico y señala una simple contaminación en el acto de la micción, sobretodo se el cultivo contiene flora mixta. No debe olvidarse, sin embargo que todas las bacteriurias atravieesan este estado al iniciarse o al retroceder en intensidad y que algunos microorganismos como Staphylococcus y Candida deben valorarse con recuentos bajos
- Entre 10.000 y 10.000 UFC/ml de un único microorganismo existe clara sospecha de IVU y hay que valorar cada paso por separado.

Referencia:

Microbiología clínica aplicada. Pedro García Martos, María Teresa Fernández del Barrio, Fernando Paredes Salido

ANEXO Nro. 10

TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir una serie de condiciones generales de las que depende la calidad y eficiencia de los resultados microbiológicos:

- ✓ Las cajas inoculadas del microorganismo deben transportarse de inmediato al laboratorio; para ello, se colocan con la tapa hacia abajo sobre el medio de transporte. No deben utilizarse fijadores ni sustancias conservantes.
- ✓ El tiempo de envío debe ser antes de 1 o 2 h a temperatura ambiente.
- ✓ Enviar en contenedores estériles (couler), de un solo uso y con cierre hermético que conserven la temperatura y las condiciones de crecimiento del microorganismo. (37 °C)
- ✓ Las muestras inoculadas deben ser almacenadas en estufa o incubadora a 37 °C para su crecimiento.

Referencia:

Sahm, D. & Weissfeld, A. (2009). *Bailey&Scott Diagnóstico Microbiológico*. Argentina-Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. S.A. 12^a Edición Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA80&dq=tecnica+de+la+tincion+de+gram&hl=es&sa=X&ei=6gWaVYawBceWgwTigL_YCQ&ved=0CCAQ6AEwAQ#v=onepage&q=tecnica%20de%20la%20tincion%20de%20gram&f=false. pag 62-63.

ANEXO Nro. 11

PROTOCOLO PARA REALIZAR LA TINCIÓN DE GRAM

1. Un extendido fijado al calor se cubre con un colorante violeta básico, por lo general violeta de genciana. Como el colorante violeta imparte su color a todas las células se lo denomina colorante primario.
2. Después de un breve lapso, se escurre el colorante violeta, se lava el extendido y se lo cubre con yodo un mordiente. Cuando se lava el yodo tanto las bacterias grampositivas como las gramnegativas aparecen de color violeta oscuro o púrpura
3. A continuación se lava el portaobjetos con alcohol o con una solución de alcohol-acetona. Esta solución es un agente decolorante que elimina el color violeta de las células de algunas especies pero no de otras.
4. Se elimina el alcohol con agua y se tiñe el portaobjetos con safranina un colorante básico. Luego se vuelve a lavar el extendido, se lo seca con papel absorbente y se lo examina con el microscopio.

Referencia:

Sahm, D. & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. Argentina-Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A. 12^a Edición. Recuperado de:https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA80&dq=tecnica+de+la+tincion+de+gram&hl=es&sa=X&ei=6gWaVYawBceWgwTigL_YCQ&ved=0CCAQ6AEwAQ#v=onepage&q=tecnica%20de%20la%20tincion%20de%20gram&f=false

PRUEBA DE CATALASA

La enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno ($H_2O_2 + \text{catalasa} = H_2O + O_2$); su presencia se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano.

Interpretación:

- La producción rápida de burbujas (efervescencia) cuando el cultivo bacteriano se mezcla con una solución de peróxido de hidrógeno se interpreta como positiva.
- Si no se produce efervescencia o ésta es débil la prueba es catalasa negativa.

OXISTRIPS™ TIRAS DE OXIDASA Y OXISTICKS™ COTONETES DE OXIDASA

Resúmen: Citocromo contiene Organismos que producen una enzima intracelular oxidasa. Esta enzima oxidasa cataliza la oxidación de citocromo c. Los organismos que contienen citocromo c como parte de su cadena respiratoria son oxidasa-positivo y gire el reactivo azul / morado. Organismos que carecen de citocromo c como parte de su cadena respiratoria no se oxidan el reactivo, dejando incoloro dentro de los límites de la prueba, y son oxidasa negativo.

✓ **Procedimiento:**

Tiras OxiStrips™ Oxidasa: Coloque la tira de prueba oxidasa en una placa de Petri y humedecer un área de la tira a ensayar con agua. No sature tira. Con cualquiera de un bucle de platino o aplicador de madera, manchar una pasta bacteriana de 3-4 colonias bien aisladas sobre el área humedecida. Use colonias que son de 18-24 horas de vida.

OxiSticks™ oxidasa hisopos: Retire hisopo del contenedor sin tocar la punta. Utilice el hisopo para recoger cuidadosamente 3-4 colonias bien aisladas. No hay necesidad de pre-humedecer el hisopo. Use colonias que son de 18-24 horas de vida.

Interpretación de resultados: La aparición de un color azul / morado dentro de los 30 segundos indica una prueba positiva. Si no hay cambio de color, el microorganismo es oxidasa negativo (-)

Referencias:

- Sahm, D. & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. Argentina- Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A. 12ª Edición. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA80&dq=tecnica+de+la+tincion+de+gram&hl=es&sa=X&ei=6gWaVYawBceWgwTigL_YCQ&ved=0CCAQ6AEwAQ#v=onepage&q=tecnica%20de%20la%20tincion%20de%20gram&f=false.
- BD Oxidase Reagent Droppers. Recuperado de: [https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001133\(201006\).pdf](https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001133(201006).pdf)

ANEXO Nro. 13

TABLA DE LECTURA: PRUEBAS BIOQUÍMICAS
IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS MÁS FRECUENTES

ENTEROBACTERIAS

MICROORGANISMO IDENTIFICADO	TSI	GAS	HS2	CITRATO	UREA	MOTILIDAD	INDOL	LISINA	ADNasa
<i>Escherichia coli</i>	A/A	+	-	-	-	+	+	+	
<i>Enterobacter aerógenes</i>	A/A	++	-	+	-	+	-	+	
<i>Enterobacter cloacae</i>	A/A	++	-	+	+/-	+	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A	++	-	+	+	-	-	+	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	A/A	++	-	+	+	-	+	+	
<i>Proteus vulgaris</i>	ALC/A	+/-	+	-/+	++	+	+	-	
<i>Proteus mirabilis</i>	ALC/A	+	+	+/-	++	+	-	-	
<i>Citrobacter freundii</i>	A/A o ALC/A	+	+	+	+/-	+	-	-	
<i>Citrobacter kosari</i>	ALC/A	+	-	+	+/-	+	+	-	
<i>Serratia marcescens</i>	ALC/A	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>Morganella morganii</i>	ALC/A	+	-	-	++	+	+	-	
<i>E. agglomerans</i>	ALC/A	-/+	-	+/-	-/+	+	-/+	-	
<i>Hafnia aivei</i>	ALC/A	+	-	-	-	+	-	+	
<i>Providencia</i>	ALC/A	-	-	+	++	+	+	-	
<i>Salmonella typhi</i>	K/A	-	+	-	-	+	-	+	
<i>Salmonella paratyphi</i>	K/A	-	-	-	-	+	-	-	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	K/K		-	+	-	+	-	+/-	

ANEXO Nro. 14

TÉCNICA DE MACRODILUCIÓN

1. Preparar cultivos de 18 horas de las bacterias a estudiar en solución salina.
2. Inocular una porción de una colonia aislada en 2mL de solución estéril e incubar en un baño a 37°C hasta que la turbidez sea visible (2-5h). Ajustar la turbidez con la solución salina o caldo de cultivo estéril hasta una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland aproximadamente 108 UFC/ml.
3. Colocar 11 tubos con 1 ml de caldo Mueller-Hinton (el primer tubo con 2ml). Preparar una solución madre de antibiótico a una concentración de 256 ug/ml equivalente (320 ul) **TABLA 1**.
4. Añadir 320 ul de la solución madre de antibiótico al tubo que contiene 2ml de caldo Mueller-Hinton (concentración de antibiótico de este tubo= 256 ug/ml). A partir de este tubo, preparar diluciones dobles seriadas tomando 1ml del primer tubo (128 ug/ml) y transfiriéndolo al segundo (la concentración de antibiótico será de 64 ug/ml). Después de mezclar bien todo el contenido del segundo tubo, transferir 1ml al tercer tubo (32 ug/ml) y así sucesivamente hasta el último, de cual se toma 1ml y se descarta. De esta manera habremos obtenido diluciones dobles del antibiótico desde 256 ug/ml hasta 0,25 ug/ml en 1 ml.
5. Añadir a cada tubo con antibiótico 1ml del inóculo preparado en el punto 3 que contiene aproximadamente 106 UFC/ml. Esto supone un inóculo final aproximado de 5×10^5 UFC/ml. Las concentraciones finales de antibiótico serán ahora de 64 ug/ml hasta 0,062 ug/ml. **TABLA 1**.
6. CONTROL NEGATIVO: Añadir 1ml del inóculo bacteriano a un tubo de la primera serie denominado C1R1 (Control: 1, Repetición: 1) con 1ml de caldo de cultivo.
7. CONTROL POSITIVO: Añadir 900 ml de Caldo de Cultivo en 100 ul de cloroformo, más 1000 ul de inóculo bacteriano
8. Incubar los tubos de las diluciones durante 18 horas a 37°C. Leer los resultados mediante la observación de crecimiento bacteriano en cada tubo y calcular la CMI.
9. A partir de cada uno de los tubos sin desarrollo bacteriano inocular una placa de agar MacConkey e incubar las placas 18 horas a 37°C; contar el número de colonias en las placas para la determinación de la CMB.

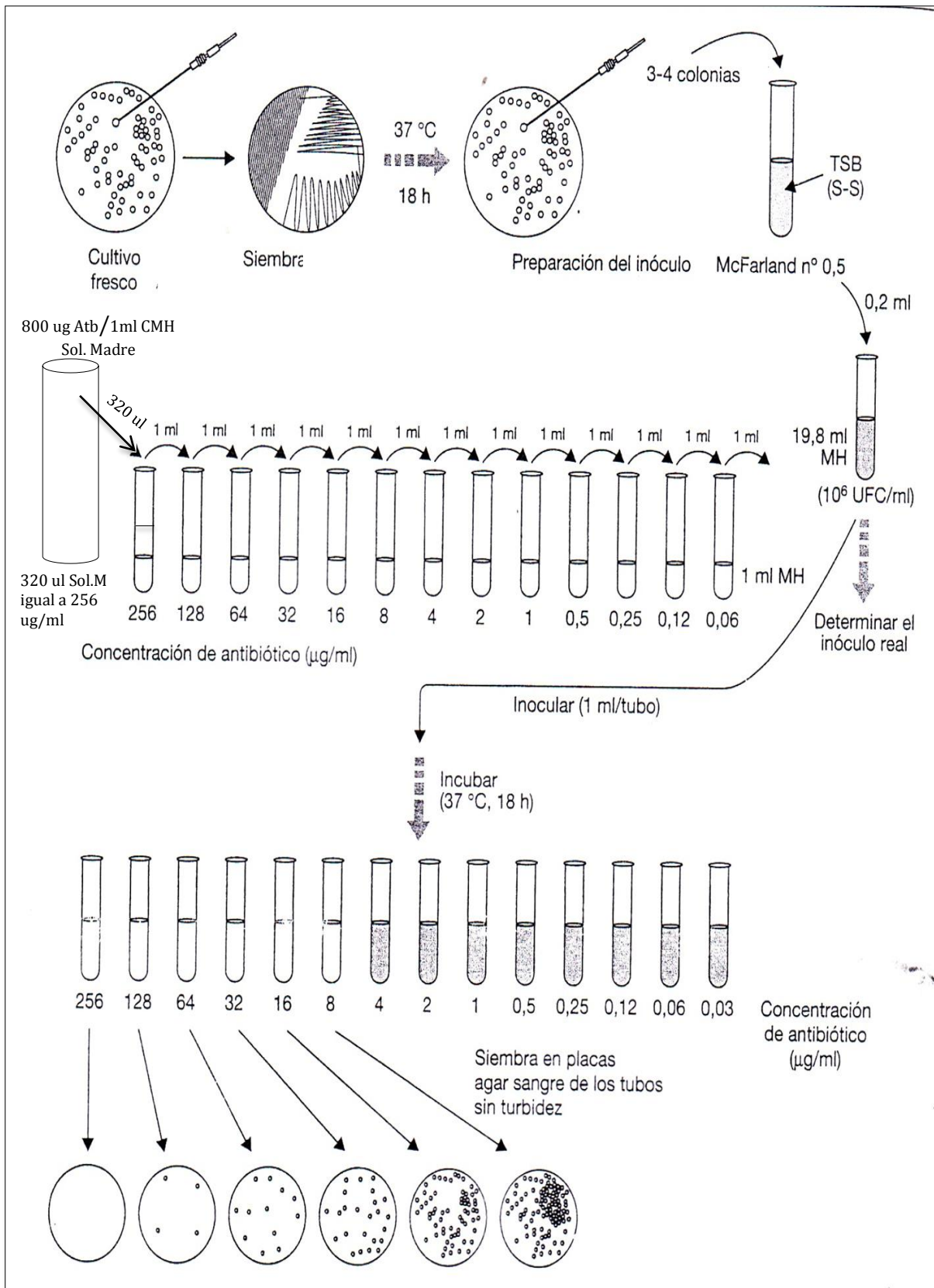
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE CMI

- Se considera CMI como la menor concentración de antibiótico cuyo subcultivo produce un número de colonias menor al 0,1% del inóculo original, demostrado por la presencia de turbidez.
- Los resultados de la CMI pueden ser interpretados en las categorías de sensible, intermedio o resistente de acuerdo a la tabla establecida por el NCLSI (**TABLA 2**)
- Se considera CMB como la menor concentración de antibiótico donde no se ha observado desarrollo bacteriano debido a la actividad bactericida del mismo.

Bibliografía:

- Gamazo, C., López, I., Díaz, R. (2005). *Manual Práctico de Microbiología*. Tercera Edición. Editorial Elsevier.

TABLA N° 1



Procedimiento y Determinación de CMI y CMB. Método de Dilución en caldo.

Interpretación de la Concentración Mínima Inhibitoria para Enterobacterias según el NCLS 2015

TABLA N° 2.

	MIC INTERPRETATIVE CRITERIA (ug/mL)			
	S	SDD	I	R
GENTAMICINA (parenteral)	< 4		8	> 16

Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25

- **S:** Susceptible
- **I:** Intermedio
- **R:** Resistente

Bibliografía:

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth International Supplement M100 S25 (2015)*. Recuperado de: http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf

ANEXO Nro. 15

REGISTRO INTERNO DE RESULTADOS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 AREA DE LA SALUD HUMANA
 CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
 REGISTRO INTERNO DE RESULTADOS

FECHA: 30-03-2015

N°	NOMBRE:	MEDIOS DE CRECIMIENTO			PRUEBAS BIOQUÍMICAS										MICROORGANISMO AISLADO			
		AGAR MACCONKEY	AGAR SANGRE	GRAM	CAT.	OXI.	CITRATO	SIM			UREA	LISINA	TSI					
								MOT.	INDOL	SH2			GAS	SH2		INCL.	PROF.	
4	RUIZ PAQUITA	NO HUBO CRECIMIENTO	24/48 HORAS															
3	JAIME TULCAN	NO HUBO CRECIMIENTO	24/48 HORAS															
15	VELEZ ISMELDA	Colonias rosadas brillantes, cremosas > 100.000 UFC	Colonias blancas cremosas, delgadas > 100.000 UFC	Bacilo Negativo	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	A	A	ESCHERICHIA COLI	
23	YAGUACHE GLORIA	Colonias rosadas pequeñas > 100.000 UFC	Colonias blancas finas, pequeñas > 100.000 UFC	Bacilo Negativo	+	-	+/-	+	-	+	+	-/-	-	+/-	A	A	PROTEUS VULGARIS	

FIRMA DEL JEFE DEL LABORATORIO

REGISTRO DE RESULTADOS MÉTODO DE MACRODILUCIÓN


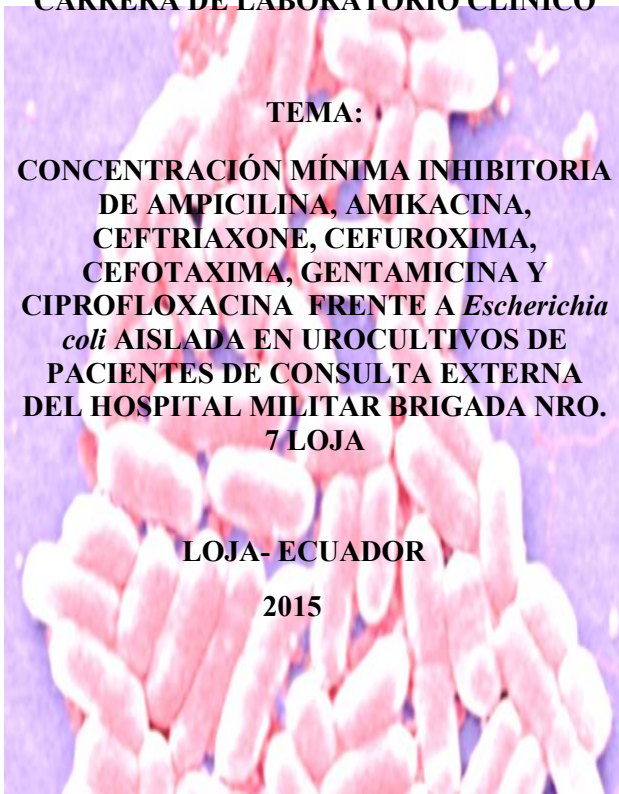


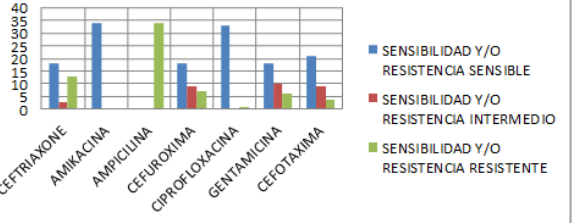
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 AREA DE LA SALUD HUMANA
 CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
 REGISTRO INTERNO DE RESULTADOS DEL METODO DE MACRODILUCIÓN

FECHA: 30-03-2015

Resultados de la concentración mínima inhibitoria de GENTAMICINA obtenidos por el método de MACRODILUCION frente a <i>Escherichia coli spp.</i>																
DILUCIONES	TC-	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	TC+	Macco nkey	CMI	CMB
	ug /ml	64 ug /ml	32 ug /ml	16 ug /ml	8 ug /ml	4 ug /ml	2 ug /ml	1 ug /ml	0,5 ug/ml l	0,25 ug /ml	0,125 ug /ml	0,062 5 ug/ml	ug /ml	No hay crecimien to	Tubo N °	Tubo N °
NOMBRE PACIENTE VELES ISMELDA N°: 15	R1						CMB	CMI	x	x	x	x	x	T6	T7 1 ug/ml	T6 2 ug/ml
	R2						CMB	CMI	x	x	x	x	x	T6	T7 1 ug/ml	2 ug/ml
	R3						CMB	CMI	x	x	x	x	x	T6	T7 1 ug/ml	2 ug/ml
NOMBRE PACIENTE N°:	R1															
	R2															
	R3															
NOMBRE PACIENTE N°:	R1															
	R2															
	R3															

TRÍPTICO Y SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS

CONCLUSIONES	RECOMENDACIONES	 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</p>
<p>◆ El desarrollo de métodos estandarizados de susceptibilidad antimicrobiana, a pesar de las dificultades que presentan, constituyen un notable avance en la terapia de infecciones bacterianas, sobre todo las que comprometen la vida del paciente. Actualmente se cuenta con puntos de corte para varios antimicrobianos de uso clínico y para bacterias frecuentemente aisladas de infecciones de vías urinarias.</p> <p>◆ Con la información obtenida de los métodos estandarizados se ha podido detectar cepas intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos y cepas con CIMs más elevadas que lo habitual, asociado a falla terapéutica</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Destacar la prevención y tratamiento adecuado en las infecciones principalmente la de vías urinarias, que este inmerso en el uso de los antibióticos, con charlas educativas dirigidos por profesionales de la salud debidamente aptos y capacitados, y de esta manera evitarla automedicación 2. Actualizar con mayor frecuencia nuevas investigaciones con la finalidad de conocer nuevos datos estadísticos acerca de la resistencia y/o sensibilidad bacteriana a los antibióticos para que tomen en cuenta al momento de prescribir fármacos 	<p>ÁREA DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO</p> <p>TEMA: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA, AMIKACINA, CEFTRIAXONE, CEFUROXIMA, CEFOTAXIMA, GENTAMICINA Y CIPROFLOXACINA FRENTE A <i>Escherichia coli</i> AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA NRO. 7 LOJA</p> <p>LOJA- ECUADOR 2015</p> 

OBJETIVOS	DEFINICIONES	RESULTADOS																																													
<p>Objetivo General:</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ampicilina, amikacina, ceftriaxone, cefuroxima, cefotaxima, gentamicina y ciprofloxacina frente a <i>Escherichia coli</i> en pacientes de consulta externa con solicitud de urocultivo del Hospital Militar Brigada Nro. 7 Loja. <p>Objetivos específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> Realizar urocultivo a partir de muestras de orina de pacientes que acuden a consulta externa que tengan petición de urocultivo en el Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja. Determinar la concentración mínima inhibitoria de ampicilina, amikacina, ceftriaxone, cefuroxima, cefotaxima, gentamicina y ciprofloxacina en urocultivos de <i>Escherichia colispp</i> en muestras de orina de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja mediante la técnica de macrodilución. Difundir los resultados al personal médico del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja. 	<p>INFECCIÓN DE VIAS URINARIAS: Se considera como infección del trato urinario a la presencia de microorganismo patógeno que puedan estar presentes con o sin síntomas, de ahí que las de origen bacteriano son las más frecuentes.</p> <p>Escherichia coli: La <i>Escherichia coli</i> es un bacilo gramnegativo, bacteria común que se encuentra en los intestinos de los animales y las personas y es la causa más frecuente de infección de vías urinarias y contribuye casi al 90% de las infecciones urinarias en mujeres jóvenes</p> <p>UROCULTIVO: Es el cultivo de orina para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática en pacientes con riesgo de infección.</p> <p>CIM: es la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo después de un tiempo de incubación que generalmente es de 24 horas.</p> <p>RESISTENCIA BACTERIANA: el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos</p>	<p>Sensibilidad y/o resistencia de ceftriaxone, amikacina, ampicilina, cefuroxima, ciproloxacina, gentamicina y cefotaxima frente a <i>Escherichia coli</i> en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada N° 7 Loja</p> <table border="1" data-bbox="1435 676 2007 970"> <thead> <tr> <th rowspan="2">ANTIBIOTICO</th> <th colspan="3">SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA</th> <th rowspan="2">FRECUENCIA</th> <th rowspan="2">PORCENTAJE</th> </tr> <tr> <th>SENSIBLE</th> <th>INTERMEDIO</th> <th>RESISTENTE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CEFTRIAXONE</td> <td>18</td> <td>3</td> <td>13</td> <td>34</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>AMIKACINA</td> <td>34</td> <td></td> <td></td> <td>34</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>AMPICILINA</td> <td></td> <td></td> <td>34</td> <td>34</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>CEFUROXIMA</td> <td>18</td> <td>9</td> <td>7</td> <td>34</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>CIPROFLOXACINA</td> <td>33</td> <td></td> <td>1</td> <td>34</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>GENTAMICINA</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>14</td> <td>34</td> <td>100%</td> </tr> </tbody> </table> <p>SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA DE CEFTRIAXONE, AMIKACINA, AMPICILINA, CEFUROXIMA, CIPROFLOXACINA, GENTAMICINA Y CEFOTAXIMA FRENTE A ESCHERICHIA COLI EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N° 7 LOJA</p> 	ANTIBIOTICO	SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA			FRECUENCIA	PORCENTAJE	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE	CEFTRIAXONE	18	3	13	34	100%	AMIKACINA	34			34	100%	AMPICILINA			34	34	100%	CEFUROXIMA	18	9	7	34	100%	CIPROFLOXACINA	33		1	34	100%	GENTAMICINA	10	10	14	34	100%
ANTIBIOTICO	SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA			FRECUENCIA	PORCENTAJE																																										
	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE																																												
CEFTRIAXONE	18	3	13	34	100%																																										
AMIKACINA	34			34	100%																																										
AMPICILINA			34	34	100%																																										
CEFUROXIMA	18	9	7	34	100%																																										
CIPROFLOXACINA	33		1	34	100%																																										
GENTAMICINA	10	10	14	34	100%																																										

CERTIFICADO DE DESARROLLO DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Laboratorio de Análisis Químico
Unidad de Fitoquímica

Of. N° 006-2015-UFQ-LAQ-UNL

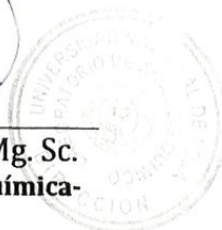
Loja, 10 de julio de 2015

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Responsable de la Unidad de Fitoquímica, del Laboratorio de Análisis Químico-UNL (antes CISAQ), por medio del presente **CERTIFICO** que la señorita Ximena Lizbeth Lanche Silva, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, con C.I. N° 1900592856, desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Fitoquímica el componente práctico de su proyecto de tesis denominado **“Concentración mínima inhibitoria de gentamicina frente a *Escherichia coli* aislada en muestras de urocultivo de pacientes del Hospital Militar de la Ciudad de Loja”**, durante el período marzo-mayo del presente año, trabajo que fue desarrollado bajo mi supervisión y acogiéndose al proyecto de Tesis aprobado por la carrera.

Es lo que puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a la interesada hacer uso del presente como a bien tuviere.

Atentamente,

Dr. Luis A. Morocho Y., Mg. Sc.
Responsable Unidad Fitoquímica-
UNL



EVIDENCIAS

➤ FASE PRE ANALÍTICA



Fig 1. Oficio al Director del Hospital Militar 7-BI



Fig 2. Oficio al Director del CISAQ



Fig 3. Consentimiento Informado

Nº.	NOMBRES Y APELLIDOS	EDAD	CI N°	TELÉFONO	SEXO	OBSERVACION
1	Condy Fíera Cacho	35	110131538	099829105	F	
2	Janna Guzmán León	46	1100592256	099112383	F	
3	Nancy Patricia Sombosa	28	1102145389	0981212508	F	
4	Miguel Páez Válea	51	110151020	0982656201	F	
5	Elly Guzmán León	26	110594582	2565182	F	

Fig 4. Registro de datos del paciente

➤ FASE ANALÍTICA



Fig 5. Medios de cultivo



Fig 6. Preparación de medios de cultivo

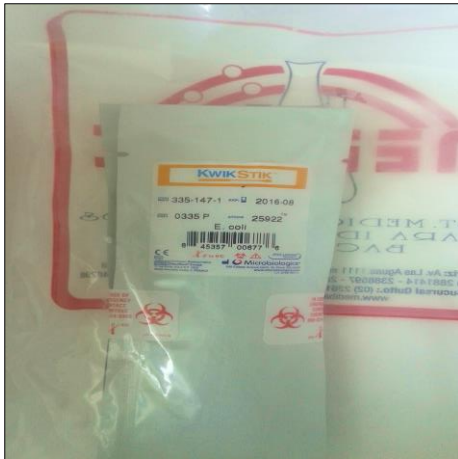


Fig 7. Cepa control ATCC 25922 *Escherichia coli*.



Fig 8. Reconstitución de la cepa control para su criopreservación.



Fig 9. Siembra de urocultivo en Agar MacConkey

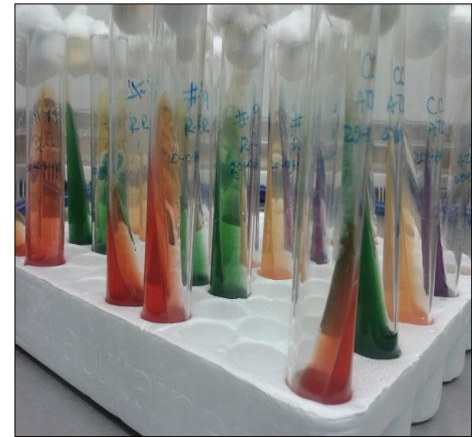


Fig 10. Pruebas bioquímicas e identificación de *E. coli*



Fig 11. Observación de crecimiento bacteriano-método de macrodilución para determinar la CMI



Fig 12. Siembra de 3 tubos previos a los que se observó crecimiento bacteriano en A. MacConkey para confirmar la CMI.

➤ **FASE POST ANALÍTICA**



Fig 13. Personal médico del Hospital Militar Brigada 7-BI de Loja/Difusión de Resultados

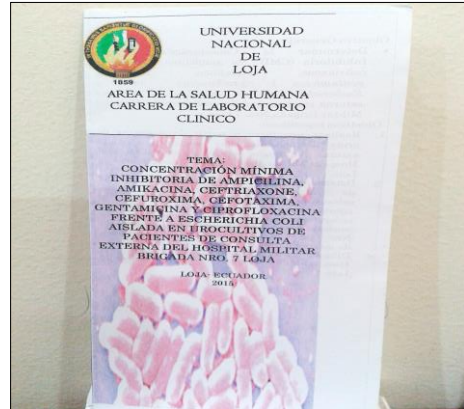


Fig 14. Tríptico

ÍNDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
1. TÍTULO	1
2. RESUMEN.....	2
SUMMARY	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
4.1 Infección de Vías Urinarias.....	6
4.1.1 Definición	6
4.1.2 Etiología	6
4.1.3 Patogenia.....	7
4.1.4 Vías de acceso a la infección.....	8
4.2 Enterobacterias	9
4.3 <i>Escherichia coli</i>	10
4.3.1 Características morfológicas.....	10
4.3.2 Características nutricionales.....	10
4.3.3 Características coloniales	11
4.4 Resistencia Antimicrobiana	11
4.4.1 Mecanismos de resistencia de las bacterias	11
4.4.1.1 Inactivación del antibiótico por enzimas:	12
4.4.1.2 Obstrucción de la llegada del antibiótico al punto diana:.....	12
4.4.1.3 Alteración del punto diana:.....	12
4.5 Antibiótico	12
4.5.1 Gentamicina.....	13
4.5.2 Mecanismo de acción	13
4.6 Métodos de diagnóstico.....	15

4.6.1 Cultivo de Orina (Urocultivo)	15
4.6.1.1 Agar sangre:	15
4.6.1.2 Agar MacConkey	15
4.6.2 Tinción de Gram	16
4.6.3 Pruebas basadas en enzimas	16
4.6.3.1 Catalasa:	16
4.6.3.2 Oxidasa:	17
4.6.4 Pruebas Bioquímicas	17
4.6.5 Antibiograma	18
4.7 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	18
4.8 Técnicas de dilución	19
4.8.1 Dilución en caldo	19
4.8.1.1 Microdilución:	19
4.8.1.2 Macrodilución:	20
4.8.2 Dilución en medio sólido	20
4.8.3 Método de epsilometría E-test	20
4.8.4 Métodos automatizados	21
5. METODOLOGÍA	22
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES	33
9. RECOMENDACIONES	34
10. BIBLIOGRAFÍA	35
11. ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N.- 1 Urocultivos realizados en pacientes de consulta externa del Hospital Militar HB-7 para identificación de <i>Escherichia coli</i>.....	27
Tabla N.- 2 Concentración Mínima Inhibitoria de gentamicina en el crecimiento bacteriano de las cepas de <i>Escherichia coli</i> en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar HB-7 y determinación de su sensibilidad y/o resistencia.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO N.1 Oficio dirigido al director del Hospital Militar HB-7 Loja	41
ANEXO N.2 Oficio dirigido al director del CISAQ-UNL	42
ANEXO N.3 Consentimiento informado para mayores de edad.....	43
ANEXO N.3.1 Consentimiento informado para menores de edad.....	44
ANEXO N.4 Registro de Pacientes.....	45
ANEXO N.5 Sangre Agar Base.....	46
ANEXO N.5.1 Agar MacConkey.....	48
ANEXO N.5.2 Urea agar base, Christensen.....	50
ANEXO N.5.3 Hierro agar lisina (LIA).....	52
ANEXO N.5.4 Triple azúcar hierro agar (TSI).....	54
ANEXO N.5.5 Citrato agar Simmons.....	56
ANEXO N.5.6 Agar SIM (motilidad, indol, sulfuro de hidrógeno).....	57
ANEXO N.5.7 Mueller Hinton caldo.....	59
ANEXO N.6 Cepa control <i>E. coli</i> ATCC 25922 reconstitución de la bacteria	60
ANEXO N.7 Control de calidad de Medios de Cultivo.....	62
ANEXO N.8 Prueba piloto.....	64
ANEXO N.9 Protocolo para Urocultivo-Método de Kass.....	69
ANEXO N.10 Conservación y Transporte de Muestra.....	70
ANEXO N.11 Tinción de gram.....	71
ANEXO N.12 Prueba de catalasa y oxidasa.....	72
ANEXO N.13 Tabla de lectura de pruebas bioquímicas.....	73
ANEXO N.14 Técnica de macrodilución en caldo.....	74

ANEXO N.15 Registro Interno de resultados para identificación bacteriana.....	77
ANEXO N.16 Registro de resultados concentración mínima inhibitoria.....	78
ANEXO N.17 Socialización de resultados.....	79
ANEXO N.18 Certificado de desarrollo de tesis CISAQ-UNL.....	81