UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA FRENTE A *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N°-7

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

ANA GABRIELA CASTILLO GONZAGA

AUTORA

Dra. FABIOLA MARÍA BARBA TAPIA

DIRECTORA

LOJA - ECUADOR

2015

Dra. FABIOLA MARÍA BARBA TAPIA

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación: "CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA FRENTE A *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N°-7" presentado por la Egresada Sra. Ana Gabriela Castillo Gonzaga, previo a optar el grado en Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido elaborado bajo mi dirección y una vez revisado autorizo su presentación ante el tribunal correspondiente.

Loja, Noviembre 2015

Atentamente,

Dra. Fabiola María Barba Tapia

DIRECTORA DE TESIS

AUTORIA

Yo; Ana Gabriela Castillo Gonzaga, egresada en la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja libre y voluntariamente declaro ser autor del presente trabajo de Tesis denominado: "CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA FRENTE A *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N°-7", y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y 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 de la Biblioteca Virtual.

Autora: Ana Gabriela Castillo Gonzaga

Firma:

Cédula: 110135030

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

Yo, ANA GABRIELA CASTILLO GONZAGA, con cedula 110513503-0 declaro ser la autora de la tesis titulada "CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA FRENTE A *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N°-7", como requisito para optar el grado de Licenciada de Laboratorio Clínico, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional del 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 cuales tenga convenio la Universidad.

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

Para la constancia en la ciudad de Loja, a los 17 días del mes de Diciembre del 2015.

Firma

Autora: Ana Gabriela Castillo Gonzaga

Cédula: 110513503-0

Dirección: Daniel Álvarez Correo: anit051993@gmail.com

Teléfono: 072564100 Celular: 0981012481

Datos complementarios

Director de tesis: Dra. Fabiola María Barba Tapia

Tribunal de Grado:

Presidenta: Lic. Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc

Vocal: Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc

Vocal: Dra. Diana Alexandra Montaño Peralta, Mg.Sc

AGRADECIMIENTO

A mi Directora de tesis Dra. Fabiola Barba docente de la carrera de Laboratorio Clínico de la ASH la cual me asesoró con cada una de sus valiosas aportaciones, al Hospital Militar Brigada N°7 de la Ciudad de Loja el cual me abrió sus puertas para realizar mi investigación, a la Dra. Elsa Ramírez Jefa del Laboratorio del Hospital Militar quien fue un pilar muy importante para la realización del presente trabajo y también al personal del Laboratorio por su valiosa ayuda.

A mis padres quienes a lo largo de toda mi vida me han apoyado y motivado mi formación académica, ya que creyeron y confiaron en mí en todo momento y no dudaron de mis destrezas y habilidades. A mis queridos Docentes quienes les debo gran parte de mis conocimientos adquiridos y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa Universidad la cual me abrió sus puertas preparándome para un futuro competitivo y formándome como persona de bien.

EL AUTOR

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico en primer lugar a Dios quien me dio la fortaleza necesaria para poder continuar con mis estudios y también por haberme regalado lo más hermoso que es la vida y la salud, a mi hijo Lenin Jair quien ha sido el motivo y la razón que me ha impulsado a seguir superándome día a día para alcanzar mis metas e ideales de superación, a mis padres por su apoyo y confianza ya que gracias a ellos he logrado concluir con mi carrera, a mi hermana Ximena quien con un gran amor y cariño ha sido como una segunda madre para mi hijo, y todos ellos con su apoyo han impulsado mis deseos de ser una gran profesional llena de valores.

EL AUTOR

TÍTULO:

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA FRENTE A *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N°-7

RESUMEN

La infección de vías urinarias figuran entre las enfermedades infecciosas más prevalentes y la carga económica que suponen para la sociedad es considerable. El objetivo del presente estudio fue determinar la concentración mínima inhibitoria de amikacina frente a *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes de Consulta Externa del Hospital Militar Brigada Nro.7, fue una investigación de tipo descriptiva – prospectiva de cohorte transversal. Para la identificación de la bacteria *Escherichia coli* se usaron técnicas de bacteriología convencional como cultivo, conteo de colonias, GRAM y pruebas bioquímicas; para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de amikacina frente a *Escherichia coli* se aplicó la técnica de macrodilución. Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 como control de calidad. Durante el periodo de estudio en total se obtuvieron 106 muestras de las cuales 50 (47,2%) resultaron ser positivas con un conteo mayor a 100.000 UFC/ml, criterio usado para determinar la presencia de una infección de vías urinarias. La bacteria más frecuentemente aislada fue *Escherichia coli* con un 68%, seguida de *Klebsiella pneumoniae* con un 12%, *Pseudomona aeruginosa* con un 8%, *Klebsiella oxytoca, Proteus vulgaris y Proteus mirabillis* con un 4%.

Las 34 cepas de *Escherichia coli* identificadas, el 100% presentaron sensibilidad a amikacina ≤ 16 µg/ml, según datos del CLSI M100-S25 del 2015 de la tabla M02-A12 y M07-A10.

PALABRAS CLAVES: Infección de vías urinarias, *Escherichia coli*, Cepa control, Concentración mínima inhibitoria, Amikacina.

SUMMARY

Urinary tract infection among the most prevalent infectious disease and economic burden to society is considerable. The aim of this study was to determine the minimum inhibitory concentration of amikacin against *Escherichia coli* in urine cultures outpatient Brigade Nº 7 Military Hospital, it was a descriptive research - prospective cohort cross. For the identification of Escherichia coli bacteriology conventional techniques such as culture, colony counting, GRAM and biochemical tests they were used; for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against Escherichia coli amikacin the macrodilution technique was applied. *Escherichia coli* strain ATCC 25922 as quality control was used. During the study period a total of 106 samples of which 50 (47.2%) were found to be positive with a higher count of 100,000 CFU / ml, criteria used to determine the presence of a urinary tract infection were obtained. The most frequently isolated bacteria was Escherichia coli with 68%, followed by *Klebsiella pneumoniae* 12%, *Pseudomonas aeruginosa* with 8%, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* with 4%.

The 34 strains of Escherichia coli identified, presented 100% sensitivity to amikacin ≤ 16 mg / ml, according to the CLSI M100-S25, 2015 of the M02-M07-A12 and A10 table.

KEYWORDS: Urinary tract infection, Escherichia coli, strain control Minimum Inhibitory Concentration, amikacin.

1. INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) es causada por la entrada de diferentes microorganismos como bacterias, los cuales lo colonizan causando infección. La incidencia es mucho mayor en mujeres que en hombres y se presenta más en mujeres embarazadas, ya que aquella condición fisiológica estimula cambios hormonales, que a su vez coadyuvan en la aparición de estas infecciones y así mismo en los ancianos es mayor que en los niños. En las diferentes regiones del mundo se caracteriza por altas tasas de incidencia y morbilidad en la población pediátrica y adulta. La ITU constituye un importante problema de salud que afecta a millones de personas cada año. Es la segunda causa de infección más frecuente en los humanos, es solo superada por las infecciones del tracto respiratorio. (Luján & Pajuelo 2008)

Se presenta generalmente porque las condiciones de higiene suelen ser deficientes y por lo tanto la presencia de gérmenes patógenos como bacterias ingresan a la uretra y luego a la vejiga causando una infección. Los mecanismos por los cuales se produce la infección urinaria son variados y complejos y no solo dependen de los factores del huésped sino también de los mecanismos de patogenicidad con los que cuentan las bacterias. (Suarez, Milián, Espinoza, Hart, Llanes, & Martinez. 2014)

Algunos síntomas de las ITU son: orina turbia o con sangre que puede tener un olor fuerte o fétido, fiebre, dolor o ardor al orinar, presión o calambres en la parte inferior del abdomen o en la espalda, necesidad de orinar con frecuencia, incluso poco después de haber vaciado la vejiga. (Echevería, Sarmiento, Osores 2006)

En más del 95% de los casos, un único microorganismo es el responsable de la ITU. El agente etiológico más frecuente de ITU en ambos sexos es la *Escherichia coli*, responsable del 75% a 80% de casos; el 20% a 25% restante incluye microorganismos como: *Staphylococcus saprophyticus, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Klebsiella sp., Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa.* (Echevería Sarmiento, Osores 2006)

En los Estados Unidos, las infecciones del tracto urinario son responsables de más de 7 millones de visitas médicas al año, incluidos más de 2 millones de visitas por cistitis. En torno al 15 % de todos los antibióticos de prescripción comunitaria en los Estados Unidos se dispensa por ITU, con un coste anual calculado que supera los 1.000 millones de dólares. (Grabe, Bjerklund, Botto, Cek, Naber, Tenke, Wagenlehner 2010)

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador (INEC), en el 2009, las ITU fueron un problema de salud que se ubicó en el octavo puesto con una tasa de 10.3% en las mujeres con relación a las diez principales causas de morbi–mortalidad. Estas infecciones consideradas como complicaciones de la diabetes, enfermedades y trasplantes renales pueden causar sepsis por bacterias gramnegativas en los pacientes hospitalizados. (MSP 2012). Según datos del Hospital General "Isidro Ayora" en el año 2012 atendió a 310 426 pacientes y según criterio médico se pidieron 2340 estudios de urocultivos, de los cuales, 722 fueron de consulta externa, 707 de hospitalización y 911 de emergencia, lo que representaría el 0,75% de consultas al año.

La resistencia bacteriana es aquella entendida como la capacidad que tienen las cepas bacterianas para disminuir el efecto antimicrobiano de los antibióticos y cada vez es un problema presente en las infecciones de vías urinarias, debido al uso indiscriminado de antibióticos, a la prescripción sin receta médica o a la incompleta toma de los tratamientos con los antibióticos, son factores que inciden para que las bacterias demuestren su capacidad evolutiva de adaptación, siendo muy evidente que cada vez es más difícil el tratamiento y la cura de infecciones las cuales tienden a ser recurrentes y por lo tanto el aumento de la resistencia bacteriana es motivo de gran preocupación ya que dificulta el enfoque terapéutico de los pacientes. (Còrdova 2012)

El presente trabajo investigativo fue aplicado a pacientes que fueron atendidos en consulta externa en el Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria de amikacina frente a *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes, para ello se realizó técnicas de bacteriología convencional como cultivo, GRAM y para la determinación de la CMI se aplicó la técnica de la macrodilución.

Con orden médica de urocultivo se procesaron 106 muestras de orina, resultando 50 muestras ser positivas o con un conteo mayor a 100 000 UFC. Una vez finalizada la investigación se obtuvieron los siguientes resultados: La bacteria más frecuentemente aislada en este estudio fue *Escherichia coli* con un 68%, seguida de *Klebsiella pneumoniae* con un 12%, *Pseudomona aeruginosa* con un 8%, *Klebsiella oxytoca, Proteus vulgaris y Proteus mirabillis* con un 4%. Las 34 cepas de *Escherichia coli* identificadas, el 100% presentaron sensibilidad a amikacina ≤16 µg/ml, según datos del CLSI M100-S25 del 2015 de la tabla M02-A12 y M07-A10.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Infección de vías urinarias

2.1.2 Definición

Infección es la entrada y multiplicación de microorganismos en el interior o en la superficie del ser humano, existiendo distintos grados de relación entre el huésped y el microorganismo: colonización, infección inaparente y enfermedad infecciosa. La infección del tracto urinario (ITU) se caracteriza por la presencia de microorganismos en el tracto urinario a cualquier nivel, desde el extremo distal de la uretra hasta el cortes renal (uretra, vejiga, próstata, uréteres, pelvis renal o riñones), englobando diferentes entidades clínicas que requieren su catalogación mediante la correlación clínica-laboratorio. (Hernández. 2010)

2.1.3 Epidemiología

En el boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud se reportó en el año 2007 un total de 3, 076,468 casos de infecciones del tracto urinario, de los cuales 2, 294,451 (74.5 %) fueron en mujeres y 749,755 (23%) se presentaron en hombres. (UNAM 2015)

En 2013, las infecciones de vías urinarias se mantienen como una de las primeras causas de morbilidad. *E. coli* es el principal agente causal con más del 90% de este tipo de infecciones, seguida por otros géneros bacterianos, como son *Klebsiella, Proteus* y *Staphylococcus*. Es muy probable que el número de casos de ITU en México sea mucho mayor que lo reportado, por lo que se considera un problema frecuente de salud pública. (UNAM 2015)

2.1.4 Etiología

a) Agentes comunes: *Escherichia coli* (hasta 90% de los casos), *Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas, Serratia, Cándida*.
b) Agentes no comunes: *Staphylococcus*.
c) Raros: *Nocardia*, *Brucella*, adenovirus y Torulopsis. (Tumbaco & Martínez 2013)

2.1.5 Patogenia

Algunos microorganismos pueden invadir a las vías urinarias por diseminación hematógena o linfática, aunque hay abundantes datos clínicos y experimentales que demuestran que el ascenso de microorganismos desde la uretra es la vía más frecuente que produce infecciones urinarias (IU), especialmente por microorganismos de origen intestinal (es decir, *Escherichia coli* y otras enterobacterias). Esto ofrece una explicación lógica de la mayor frecuencia de IU en las mujeres que en los varones y del mayor riesgo de infección después de un sondaje o instrumentación vesical. Una sola inserción de una sonda en la vejiga urinaria de pacientes ambulatorios provoca una IU en el 1 % a 2 % de los casos. Las sondas permanentes con sistemas de drenaje abierto producen bacteriuria en casi el 100% de los casos en el plazo de 3 a 4 días. El uso de un sistema de drenaje cerrado, con una válvula para impedir el flujo retrogrado, retrasa la aparición de la infección, aunque no la previene en último término. Se cree que las bacterias migran por el espacio mucopurulento existente entre la uretra y la sonda, lo que da lugar a la aparición de bacteriuria en casi todos los pacientes en el plazo de unas 4 semanas. (Grabe, Bjerklund, Botto, Cek, Naber, Tenke & Wagenlehner. 2011)

2.1.6 Fisiopatología

El tracto urinario normal es estéril excepto la uretra, generalmente colonizada por microorganismos que se encuentran también en recto y periné. El mecanismo común inicial de la infección urinaria es la adhesión de las bacterias a moléculas específicas en la superficie celular del epitelio urotelial seguida por la invasión de éste. El huésped dispone de una serie de mecanismos como son el flujo de orina y moco. La bacteriuria constituye el eje del dinamismo de la infección urinaria y su persistencia explica, de manera racional, la lesión inflamatoria crónica del parénquima renal. (Chalá & Treder 2013)

2.2 Enterobacterias

Las Enterobacteriaceae es un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos los cuales habitan en el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros como *Escherichia coli, Shigella, Salmonella, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Proteus* y otros más. La bacteria *Escherichia coli* es parte de la microflora normal y aquella en forma incidental produce enfermedad, en tanto que otros, las *Salmonellas* y las *Shigellas* son patógenos para el ser humano. (Jawetz, Melnick & Adelberg 2011)

2.2.3 Características típicas y distintivas de las enterobacterias

Las Enterobacteriaceae son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Son bacilos gramnegativos, móviles con flagelos o también no móviles; se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros suplementos; se multiplican bien en agar MacConkey; proliferan en medios aerobios y anaerobios facultativos; fermentan en vez de oxidar glucosa, a menudo producen gas; catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitrato a nitrito. (Jawetz, Melnick & Adelberg 2011)

2.3 *Escherichia coli*

Es una bacteria Gramnegativa cilíndrica con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas. Se trata de una enterobacteria móvil, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, normalmente fermenta la lactosa, produce indol a partir del triptófano siendo negativa la reacción de la ureasa y fenilalanina desaminasa. El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*. La especie tipo es *E. coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *E. hermanni*, y *E. vulneris* han sido involucradas en infecciones de heridas aunque de manera muy ocasional. (Faleiro 2009) (Hernández 2010)

2.3.1 Estructura antigénica

La estructura antigénica está formada por tres clases de antígenos:

- Antígenos somáticos o antígenos O son cadenas de polisacárido procedente del lipopolisacáridos capsular que están presentes en todas las bacterias gramnegativas; es el que le confiere especificidad serológica.
- Antígenos flagelares o antígenos H son proteínas que se localizan en los flagelos.
- Capsulares o antígenos K presentes en cepas con cápsula, constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria, son un factor de virulencia fundamental porque impide la fagocitosis. (Faleiro 2009)

2.3.2 Poder patógeno

E. coli es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones urinarias en los seres humanos. La mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos. (Faleiro 2009)

Algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). Hay comunicaciones de cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC, verde) causando infecciones urinarias. Ese patotipo es caracterizado por la producción de las toxinas Shiga que usualmente son codificadas por bacteriófagos y dentro de ese grupo hay cepas que también son capaces de adherirse a las células epiteliales, borrar el microvilli intestinal y provocar la condensación de la actina del citoesqueleto lo que ocasiona la aparición de un pedestal en forma de copa sobre el que descansa la bacteria. (Faleiro 2009)

2.3.3 Sensibilidad a los antimicrobianos

Las cepas de *E. coli*, como las otras bacterias Gramnegativas, son intrínsicamente resistentes a los antimicrobianos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico. Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones urinarias causadas por cepas de *E. coli* son la amoxicilina, amoxicilina - ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Al adquirir *E. coli* genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que debe siempre determinarse por antibiograma. Resistencia adquirida a los aminoglucósidos, betaláctamicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim se ha descrito para cepas de *E. coli* por cuatro mecanismos distintos: alteración de diana, inactivación enzimática, menor acumulación intracelular del antimicrobiano y desvió de una etapa metabólica. (Faleiro 2009)

Una proporción elevada (40 a 90%) de las cepas de *E. coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas y sulfamidas. También son muchas las cepas resistentes a las

cefalosporinas de 1ª generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas. Entre los antibióticos que presentan menores tasas de resistencias se dispone de amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 2a y 3a generación, gentamicina, tobramicina, amikacina, colistina y polimixina B. (Faleiro 2009)

2.4 AMINOGLUCÓSIDOS

Los aminoglucòsidos son antibióticos bactericidas que desempeñan un papel relevante en el tratamiento de las infecciones graves causadas por bacterias gramnegativas aerobias sobretodo *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas.* La necesidad de administración parenteral para conseguir un efecto sistémico y, sobre todo, la frecuente toxicidad constituyen importantes limitaciones para su empleo. (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza , Moro & Portoles. 2008)

2.4.1 Clasificación y Estructura Química

La mayoría de los antibióticos aminoglucòsidos son sustancias naturales producidas por actinomicetos (*Streptomyces* y *Micromonospora*), aunque la amikacina, netilmicina son derivados semisintèticos. Los aminoglucòsidos se denominan asì por su estructura quìmica. Todos contienen un anillo aminociclitol unido por enlaces glucosídicos a dos o más azácares (generalmente aminoazùcares). (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza , Moro & Portoles. 2008)

2.4.2 Mecanismos de Acción

Todos los aminoglucósidos acceden al interior bacteriano mediante mecanismos de transporte dependientes de energía, que solo se producen en condiciones aerobias, y alteran la síntesis proteica bacteriana en los ribosomas. Esta acción no puede explicar por si sola el efecto bactericida, pues otros inhibidores de la síntesis proteica son solo bacteriostáticos. Por ello se ha propuesto que otros mecanismos principalmente alteraciones en la composición de la membrana bacteriana y, en menor medida, modificaciones en el metabolismo y la respiración bacteriana. (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro & Portoles. 2008)

En las bacterias gramnegativas los aminoglucósidos atraviesan la membrana externa mediante mecanismos pasivos (no dependientes de energía) y acceden al espacio periplásmico. Desde aquí alcanzan el interior bacteriano, atravesando la membrana interna, mediante

mecanismos de transporte dependientes de energía que no se producen en condiciones anaerobias. (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro & Portoles. 2008)

En el citoplasma bacteriano los aminoglucósidos se unen a los ribosomas en la subunidad 30S (algunos aminoglucósidos también en la 50S) e interfieren en la síntesis proteica bacteriana al alterar la lectura del ARNm. El resultado puede ser un bloqueo del inicio de la síntesis proteica, una terminación prematura del ARN (con la consiguiente síntesis de proteínas incompletas) o una lectura errónea del ARNm con la incorporación de aminoácidos incorrectos a la proteína sintetizada. Algunas de estas proteínas alteradas se incorporan a la membrana citoplasmática y modifican su permeabilidad, lo que provoca la pérdida de sustancias del interior del microorganismo y facilita el acceso de mayores concentraciones de aminoglucósido al citoplasma y los ribosomas. (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro & Portoles. 2008)

Los aminoglucòsidos producen un efecto posantibiótico (actividad antimicrobiana que persiste después de disminuir la concentración del antibiótico por debajo de la concentración mínima inhibitoria) prolongado, cuya duración (hasta 5-6 horas) depende del microorganismo, la dosis del aminoglucósido y la presencia de neutrófilos. La actividad bactericida de los aminoglucòsidos *in vitro* es sinérgica con la de los inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana, que facilitan notablemente el paso de los aminoglucòsidos a través de la membrana citoplasmática. Por ello a menudo se utiliza asociados ambos tipos de antibióticos. En cambio el efecto de los aminoglucòsidos *in vitro* puede ser antagonizado por agentes bacteriostáticos (p. ej., tetraciclina y cloranfenicol). (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro & Portoles. 2008)

2.4.3 Resistencia Microbiana

Las bacterias pueden ser resistentes a los aminoglucósidos, por que pueden producir enzimas que inactivan al antibiótico, por escasa afinidad del compuesto al ribosoma bacteriano, o por incapacidad del antibiótico para penetrar al interior de la bacteria. El mecanismo más importante es la producción de enzimas, se han descubierto bacterias que codifican más de 20 enzimas inactivadoras, principalmente microorganismos intrahospitalarios, la menos susceptible a su acción es la amikacina, por eso es la más utilizada en este medio.

La frecuencia de aparición de resistencia es:

gentamicina=sisomicina>tobramicina>metilmicina>amikacina

Existen tres mecanismos de resistencia:

- Inactivación enzimática
- Alteración del ingreso
- Alteración del sitio de unión del ribosoma (Ramos 2012)

2.5 AMIKACINA

Es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, semisintéticos, derivado de la kanamicina, de acción bactericida. Se une a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos produciendo un complejo de iniciación 70S de carácter no funcional, de forma que se interfiere la síntesis proteica.

Resiste la degradación causada por la mayoría de las enzimas inactivantes de aminoglucósidos que se sabe afectan a gentamicina, tobramicina, kanamicina. Estudios *in vitro* indican que AMIKACINA combinado con antibióticos β-lactámicos actúan sinérgicamente frente a microorganismos Gram-negativos clínicamente significativos. Después de la exposición *in vitro* (efecto post-antibiótico) se produce la supresión persistente del crecimiento bacteriano de muchos microorganismos Gram-negativos. (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad 2005)

Los aminoglucósidos, incluyendo AMIKACINA no están indicados en episodios iniciales no complicados de infecciones del tracto urinario, a menos que los microorganismos causantes no sean sensibles a antibióticos de menor toxicidad potencial. Amikacina se absorbe rápidamente y es bien tolerado localmente tras la administración intramuscular. (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad 2005)

2.5.1 Gram-negativos

Especies de *Pseudomonas (Pseudomonas aeruginosa)*, *Escherichia coli*, especies de *Proteus (Proteus rettgeri)* (indol-positivos e indol-negativos), especies de *Providencia (Providencia stuartii)*, especies de *Klebsiella-Enterobacter-Serratia (Serratia marcescens)*, especies de *Acinetobacter* (*Mima-Herellea*) y *Citrobacter freundii*.

2.5.2 Gram-positivos

Especies de estafilococos productores y no productores de penicilinasa, incluyendo cepas resistentes a la meticilina. *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente (SAMR) no es completamente sensible a amikacina.

No obstante, la amikacina es poco activa frente a otras bacterias Gram-positivos: *Streptococcus pyogenes*, *enterococos* y *Streptococcus pneumoniae.* (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad 2005)

2.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y PRUEBAS DEL LABORATORIO

2.6.1 Métodos de recolección para la muestra de orina

Tipos de muestras de orina útiles para realizar el urocultivo son la muestra obtenida por cateterismo, la de chorro medio y la de aspiración suprapúbica. La muestra de orina de chorro medio o la primera orina de la mañana, además de ser una muestra ideal para el cribado, es muy esencial para prevenir resultados falsos negativos, es una muestra concentrada de por lo menos 8 horas. Se necesita una muestra limpia para realizar el urocultivo la cual consiste en realizar un lavado previo de los genitales tanto femeninos como masculinos con un jabón neutro y recolectar sólo la orina del chorro medio, así se obtendrá una muestra adecuada para realizar el análisis bacteriológico, la cual se encontrará menos contaminada por células epiteliales y bacterias saprófitas. (Strasinger, King, Schaub, & Marjorie. 2010)

2.7 Pruebas del Laboratorio

2.7.1 Urocultivo

El diagnóstico del laboratorio para la identificación de una ITU se realiza mediante un urocultivo, el cual consiste en sembrar mediante el método de asa calibrada por el sistema de agotamiento la primera muestra de orina de la mañana del paciente en estudio para la

determinación y cuantificación de gérmenes patógenos. (Velasco, Araque, Araujo, Longa, Nieves, Ramírez, Sánchez & Velasco E. 2008)

Requieren medios selectivos y no selectivos, como una combinación de agar sangre complementado con sangre de carnero al 5% o hemoglobina y agar MacConkey para el aislamiento de los microorganismos. Los microbiólogos prefieren utilizar agar eosina azul de metileno (EMB) debido a la morfología distintiva que presenta *E. coli* en este medio, ya que el patógeno esperado en pacientes ambulatorios es por lo general *E. coli*. Forman colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados. (Koneman 2008)

Agar sangre medio no selectivo en el cual crece cualquier tipo de bacterias ya sean cocos o bacilos Gram negativos o Gram positivos, *E. coli* presenta colonias blanquecinas, pequeñas, secas, cóncavas; agar MacConkey medio selectivo para bacilos gramnegativos, *E. coli* es fermentadora de lactosa sus colonias en este medio son de color rosado, pequeñas y secas; agar eosina azul de metileno medio selectivo para bacilos gramnegativos, específico para identificar *E. coli* en este medio fermenta azucares y forma colonias verdes con un brillo metálico. (Koneman 2008)

La identificación de los agentes se hace mediante el estudio de las características microscópicas de las colonias y la utilización de los sustratos del medio, ejemplo: lactosa, hemólisis y la identificación final a través de pruebas fisiológicas diferenciales, como la prueba de la oxidasa, acción sobre azúcares. Contar el número de colonias y multiplicar por el factor 1000 o 100, de acuerdo a la capacidad del asa utilizada, para determinar las unidades formadoras de colonia por mililitro de orina (UFC/ml). (Velasco, Araque, Araujo, Longa, Nieves, Ramírez, Sánchez & Velasco E. 2008)

2.7.2 Tinción de GRAM

La tinción de GRAM es una de las pruebas más importantes utilizada para la identificación bacteriana. Este tipo de procedimiento separa casi todas las bacterias en dos tipos generales: bacterias Gram positivas que se tiñen de un color violeta oscuro y las bacterias Gram negativas

que se tiñen de un color rosa. Esta importante distinción de su color se debe a las diferencias en los componentes de las paredes celulares bacterianas que tiene que ver con la capacidad de la célula para retener ciertos colorantes aun después de la decoloración con alcohol cetona. (Bailey y Scott 2009)

Esta prueba consiste en aislar una o dos colonias en el portaobjetos y fijar el material orgánico flameando sobre el fuego, después de la fijación el primer paso es la aplicación del colorante cristal violeta, luego se aplica un mordiente (Lugol) para que el colorante alcalino se una a la pared celular de las bacterias a través de enlaces químicos. La decoloración (alcohol-cetona) distingue las células de las Gram positivas de las Gram negativas. Después de la decoloración los microorganismos que aparecen como Gram positivos retienen el cristal violeta y los gramnegativos lo pierden. El colorante de contraste safranina teñirá de color rosa o rojo las bacterias Gram negativas. (Bailey y Scott 2009)

2.7.3 Pruebas Bioquímicas para bacterias GRAMNEGATIVAS

Permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. (Cercenado, & Cantón 2010)

Evalúan la capacidad metabólica de un microorganismo relacionado con:

- Los sustratos que puede utilizar la bacteria para crecer (hidratos de carbono, aminoácidos, entre otros.)
- Las enzimas que posee la bacteria (descarboxilasas, ureasas, peroxidasas, entre otras).
- Los productos metabólicos producidos por las bacterias (ácido fórmico, succínico, butírico, entre otros).
- La capacidad para metabolizar azúcares por oxidación o fermentación.

- La capacidad de reducir ciertos iones (ferroso a férrico).
- La capacidad de movilidad por la presencia de flagelos. (Velasco, Araque, Araujo, Longa, Nieves, Ramírez, Sánchez & Velasco 2008)

2.8 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

2.8.1 Definición

La concentración mínima inhibitoria es aquella cantidad mínima del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. (Romero. 2007)

2.8.2 Utilidad

Al manejar cierta cantidad de antibiótico llega un momento en que ya no se puede aumentar esta cifra por su toxicidad o por que se excreta con cierta rapidez y ya no se puede alcanzar mayor concentración a nivel sanguíneo. Eso significa un tope o concentración máxima que se puede obtener en sangre, y si los microorganismos sobreviven a esa cantidad colocada en una caja Petri o en un tubo de ensayo quiere decir que por más que se use ese antibiótico no se obtendrá el efecto deseado, porque no se puede alcanzar la mayor concentración requerida para inhibir el crecimiento del microorganismo. Por lo tanto ese microorganismo es resistente. Los estudios de susceptibilidad de los microorganismos a un antibiótico consiste en estudios *in vitro* en el laboratorio realizados para enfrentar bacterias con antimicrobianos, bajo un control de la cantidad de bacterias, y la cantidad de antibiótico, de tal manera que usamos un mismo número de bacterias a diferentes concentraciones de antibióticos, hasta encontrar en donde se mueren o sobreviven las bacterias. De esta manera por un lado obtenemos la concentración mínima inhibitoria y por el otro también conocemos la resistencia antimicrobiana. (Romero. 2007)

2.9 Técnicas para la determinación de la CMI

2.9.1 Método de Macrodilución

En esta técnica se prepara una serie de tubos con una cantidad determinada de caldo de cultivo en cada uno, a los que se incorpora una cantidad de antibiótico creciente de modo que se obtengan concentraciones dobles progresivas; por ejemplo: en el primer tubo 0,12 µg, en el segundo tubo 0,25 µg, en el tercer tubo 0,50 µg, en el cuarto tubo 1 µg, y así sucesivamente hasta el decimosegundo tubo, con 256 µg. Se siembra la bacteria en los tubos, se incuba y a las 18 a 48 horas se observa el crecimiento. Se podrá ver que el caldo está transparente en los tubos donde hay mayor concentración de antibiótico porque el crecimiento de la bacteria ha sido

inhibido, pero que existe crecimiento en los tubos de menor concentración de antibiótico, por ejemplo en los tubos con 0,12 y 0,25 µg/mL. El tubo con la menor concentración de antibiótico que ha inhibido la bacteria indica la concentración inhibitoria mínima. (Prats. 2008)

2.9.2 Método de Microdilución

Está técnica es de gran utilidad práctica para el estudio de la CMI. No es más que la técnica de dilución en medio líquido, señalada anteriormente, pero realizada en placas de poliestireno, con micropocillos en lugar de tubos. Los pocillos de cada columna contienen concentraciones crecientes de un antibiótico en forma de suspensión liofilizada o desecada, por lo que solo debe añadirse el medio de cultivo líquido en el que se ha efectuado una suspensión de la bacteria a estudiar. Tras la incubación se determina la CMI. Como en la macrodilución la concentración inhibitoria mínima de cada antibiótico se lleva a una tabla que señala si el microorganismo es sensible o resistente. (Prats. 2008)

2.9.3 Epsilon-Test

Combina la simplicidad y la especificidad de las pruebas de disco-difusión con la capacidad para cuantificar la concentración inhibitoria mínima de las técnicas de dilución. E-Test consiste en una tira de plástico no poroso de 5 cm de largo por 5mm de ancho a lo largo se dispone un gradiente predefinido y señalado en la tira de un antimicrobiano equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas. Una vez que se ha sembrado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-Test, sobre la superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte del plástico hasta el agar, creándose de este modo alrededor y al largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la 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. (Parts. 2008)

2.10 Tratamiento

El tratamiento de la ITU depende de si es complicada o no complicada y siempre se debe tener en cuenta a los factores de riesgo. Es importante seleccionar en forma empírica –hasta que se cuente con el resultado del urocultivo y antibiograma–un antibiótico con alta eficacia sobre el agente sospechado, muy buena distribución corporal, alta concentración en las vías urinarias y con toxicidad baja. Los objetivos del tratamiento deben ser la obtención de una respuesta

rápida y efectiva, prevención de la recurrencia y evitar la aparición de resistencia a los antibióticos. La elección de un antibiótico, en diversas infecciones, depende de los niveles de concentración plasmática que alcanza el antibiótico para lograr una susceptibilidad antimicrobiana alta. Pero en el caso de la ITU, lo importante es la concentración del antibiótico en el parénquima renal, en la capa más profunda de la pared de la vejiga y de la próstata. Por tanto, la excreción, concentración urinaria y la determinación de la actividad del antibiótico en la orina son importantes para la decisión de si su uso se justifica o no en el tratamiento de la ITU. (Echevería, Sarmiento, Osores 2006)

3. METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación fue de tipo descriptivo - prospectivo realizado en el Hospital "Militar Brigada Nro. 7" de la ciudad de Loja.

3.2 ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se realizó en el Hospital "Militar Brigada Nro.7", de la Ciudad de Loja, hospital ubicado en el centro de la Ciudad que recibe a pacientes afiliados y civiles de cualquier cantón o provincia.

3.3 PERIODO DE ESTUDIO

Se analizaron los urocultivos pedidos bajo criterio médico durante el período del 16 de marzo hasta el 29 de mayo del 2015.

3.4 POBLACIÓN

En la presente investigación se incluyó todas las muestras de orina provenientes de pacientes atendidos en el Hospital "Militar Brigada Nro. 7" de la ciudad de Loja, pacientes que bajo criterio médico obtuvieron un pedido de urocultivo.

3.5 MUESTRA

Se incluyeron las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, habiéndose procesado un total de 106 muestras de los cuales 50 tuvieron un crecimiento igual o mayor a 100 000 UFC/ml, en los que se procedió a identificar la bacteria *Escherichia coli* y determinar la concentración mínima inhibitoria.

3.6 Criterios de inclusión y exclusión

3.6.1 Criterios de Inclusión:

- Muestras de orina con pedido médico de urocultivo atendidos en Consulta Externa del Hospital Militar Brigada Nro. 7
- Pacientes que aceptaron ser parte del estudio firmando el consentimiento informado.
- Urocultivos de pacientes que tengan crecimiento en el medio diferencial.
- Urocultivos que presenten más de 100.000 UFC.

3.6.2 Criterios de Exclusión:

- Muestra de orina insuficiente para realizar el urocultivo.
- Pacientes que tomaron algún antibiótico.
- Urocultivos que no tengan crecimiento durante las 24 a 48 horas de incubación.

3.7 Métodos, técnicas y procedimientos de la investigación

Para realizar este proceso investigativo se emplearon las siguientes técnicas y procedimientos:

3.7.1 Desarrollo de la fase pre-analítica

- Oficio de autorización para la adquisición de las muestras de orina con pedido de urocultivo dirigido al Cnel. Edison Moreno Director del Hospital Militar Brigada Nro.7. (anexo1)
- Oficio de autorización para hacer uso de las instalaciones y realizar el procesamiento de las muestras en el Centro de Diagnóstico Médico, Lic. Rosa Rojas Directora del Área de la Salud Humana. (anexo 2)
- Consentimiento informado aplicado a los pacientes atendidos en Consulta Externa del Hospital Militar. (anexo3)
- Procedimiento para la toma de muestras de orina para la realización de los urocultivos. (anexo4)
- Transporte de los cultivos. (anexo 5)
- Diagrama del proceso de la investigación. (anexo 6)
- Certificado de haber realizado el procesamiento de las muestras de orina en el Centro de Diagnóstico Médico entregado por la Jefe del Laboratorio Lic. Carmen Ullauri, Mgs. (anexo7)

3.7.2 Desarrollo de la fase analítica

- Reconstitución de la Cepa Control ATCC 9522 (anexo 8)
- Medios para el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli:* Agar Sangre y Agar MacConkey. (anexo 9)
- Siembra de la muestra de orina por el método de Kass-Asa Calibrada. (anexo 10)
- Tinción de GRAM para identificación de bacterias GRAMNEGATIVAS O GRAMPOSITIVAS. (anexo 11)
- Identificación de bacterias GRAMNEGATIVAS a través de las pruebas bioquímicas: CITRATO, SIM, TSI, LISINA, UREA, OXIDASA. (anexo 12)
- Interpretación de pruebas bioquímicas de bacterias GRAMNEGATIVAS.(anexo 13)

- Técnica del Caldo Müller Hinton. (anexo 14)
- Desarrollo de la Macrodilución en Caldo para la determinación de la concentración inhibitoria mínima de amikacina frente a cepas de *E. coli*. (anexo 15)

3.7.3 Desarrollo de la fase post-analítica

- Registro de los pacientes a través de un formulario(anexo 16)
- Registro de los resultados de los urocultivos a través de un formulario.(anexo 17)
- Registro de los resultados de la CMI de Amikacina a través de un formulario elaborado. (anexo 18)
- Tríptico de la difusión de los resultados. (anexo 19)
- Certificación de la difusión de los resultados. (anexo 20)
- Medios de verificación del procesamiento de las muestras y difusión de resultados. (anexo 21)

3.8 Plan de tabulación y análisis de los resultados

Aquellos resultados finales fueron presentados en tablas, utilizando para ello el programa Microsoft Excel 2013. También se procedió a elaborar tablas y gráficas permitiendo realizar una mejor interpretación y análisis de los datos obtenidos en el presente estudio investigativo.

4. RESULTADOS

TABLA Nº-1

Identificación de *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada nro.7

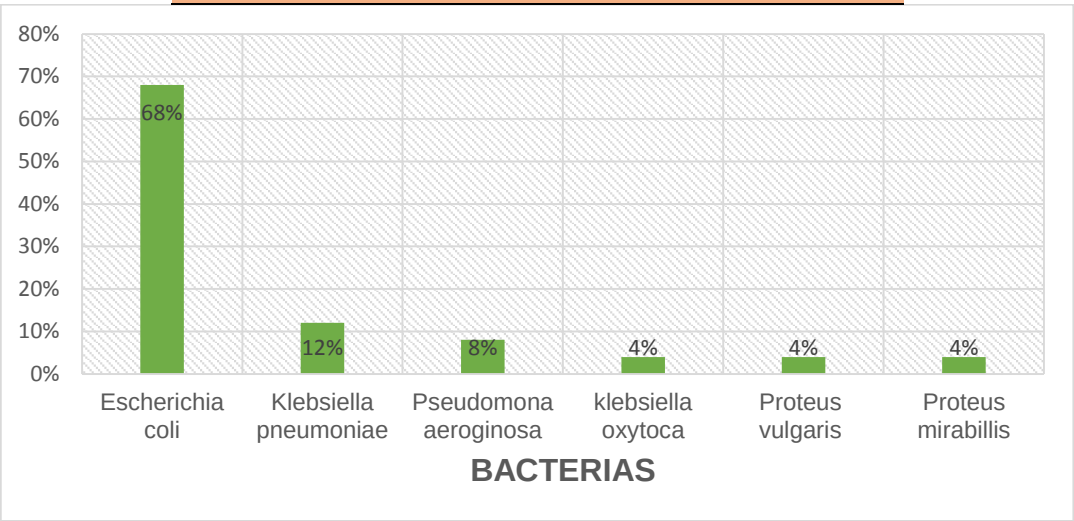
BACTERIAS	FRECUENCIA	%
Escherichia coli	34	68
Klebsiella pneumoniae	6	12
Pseudomona aeroginosa	4	8
klebsiella oxytoca	2	4
Proteus vulgaris	2	4
Proteus mirabillis	2	4
TOTAL	50	100

Fuente: Registro de Resultados de la Identificación de *Escherichia coli*.
Autor: Ana Castillo.

TABLA Nº1

Identificación de *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada nro.7.

CMI de Amikacina µg/ml	Frecuencia	%
Sensible (≤ 16)	34	100%
Intermedio (32)	0	0%
Resistente (≥ 64)	0	0%
TOTAL	34	100%



Fuente: Registro de resultados de la identificación de *Escherichia coli*.
Autor: Ana Castillo.

Interpretación:

La bacteria más frecuentemente aislada fue *Escherichia coli* con un 68%, seguida de *Klebsiella pneumoniae* con un 12%, *Pseudomona aeruginosa* con un 8%, *Klebsiella oxytoca, Proteus vulgaris y Proteus mirabillis* con un 4%.

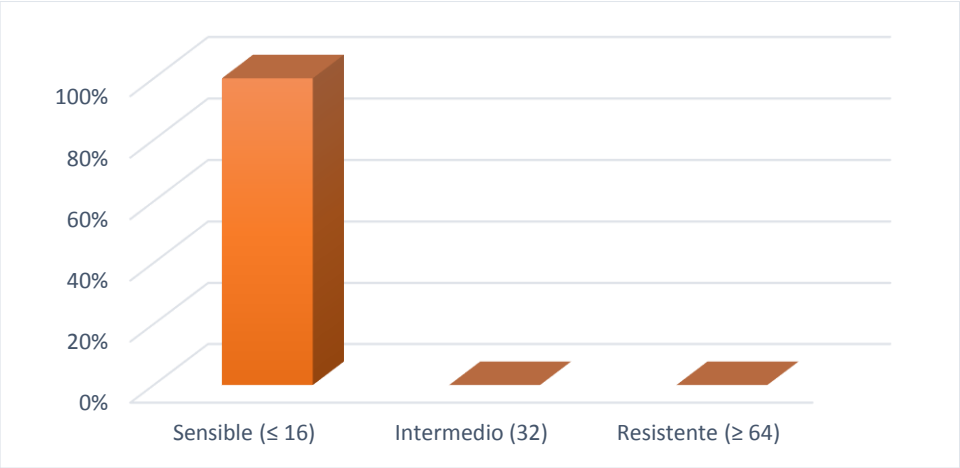
TABLA Nº 2

Concentración mínima inhibitoria de amikacina frente a cepas de *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro.7 de la ciudad de Loja.

Fuente: Registro de resultados de la investigación.
Autor: Ana Castillo.

TABLA Nº2

Concentración mínima inhibitoria de Amikacina frente a *Escherichia coli.*



Fuente: Registro de resultados de la investigación.
Autor: Ana Castillo.

Interpretación

Las 34 cepas de *Escherichia coli* identificadas, el 100% presentaron sensibilidad a amikacina (≤ 16 µg/ml) según datos del CLSI del 2015.

Difusión de los Resultados

La difusión de los resultados de la tesis se la realizó al personal del Hospital Militar Brigada Nro.7 (Médicos, Enfermeras y al Personal del Laboratorio Clínico), donde se explicó los objetivos de la tesis, cual es la bacteria más frecuentemente aislada en los urocultivos de aquellos pacientes, para que sirve saber la CMI de Amikacina y sobre la macrodilución, etc. También se entregó un tríptico sobre el tema. (Anexo nro. 19)

5. DISCUSIÓN

La mayoría de las infecciones de vías urinarias son producidas por los bacilos gramnegativos de la familia Enterobacteriaceae, de los cuales *Escherichia coli* es la bacteria que se encuentra con mayor frecuencia. Los estudios para conocer los patrones de resistencia en los aislamientos de *Escherichia coli* causante de infecciones de vías urinarias, son importantes al momento de elegir la terapia empírica más adecuada. El diagnóstico acertado, así como el tratamiento temprano de las infecciones urinarias, es de suma importancia, ya que además de que se

resuelven los signos y síntomas del cuadro agudo, se evitan complicaciones secundarias. Debido a que el uropatógeno sembrado tarda hasta 72 horas en crecer, se recomienda iniciar un tratamiento empírico cuando se cuente con un examen general de orina sugestivo de infección urinaria. El incremento del consumo de antibióticos ha sido una de las principales causas de aumento de las resistencias bacterianas a los mismos. La Sociedad Americana para las Enfermedades Infecciosas (IDSA) recomiendan no utilizar antimicrobianos en las infecciones de vías urinarias cuando los estudios de vigilancia demuestren una prevalencia de resistencia >20.0%. (Tucto, Mercado, & Hurtado 2014)

En el presente estudio investigativo la bacteria más frecuentemente aislada fue *Escherichia coli* con un 68%, seguida de *Klebsiella pneumoniae* con un 12%, *Pseudomona aeruginosa* con un 8%, *Klebsiella oxytoca, Proteus vulgaris y Proteus mirabillis* con un 4%. El 100% de cepas de *Escherichia coli* frente a amikacina fueron sensibles según datos del CLSI del 2015.

Estudio realizado en el Hospital infantil de México en el 2014 menciona que: el patógeno aislado con más frecuencia fue *E. coli* (312 pacientes, 68.3%); en segundo lugar se consideraron tanto *E. faecalis* como *E. faecium* (42, 9.7%). Estos patógenos, junto con *K. pneumoniae* (40, 8.7%), representaron el 86.2% de todos los aislamientos recolectados. La resistencia de *E. coli* a los fármacos tradicionales fue de la siguiente manera: para trimetoprima-sulfametoxazol (TMP/SXT) fue superior al 73%; para ciprofloxacina, del 34%; nitrofurantoína, del 4.4%; amikacina, del 4.7%; y para gentamicina, del 26.5%. El presente estudio ha sido realizado en niños que asistieron a consulta externa y a urgencias en cambio en la presente investigación ha sido realizado en adultos (mujeres y hombres), se asemeja en cuanto al patógeno aislado con mayor frecuencia que es *Escherichia coli* con un 68.3% y a *K. pneumoniae* con un 8.7%. En lo referente a la susceptibilidad de amikacina frente a cepas de *Escherichia coli* el mencionado estudio presentó una resistencia de un 4.7% a amikacina, en cambio en la presente investigación las 34 cepas de *Escherichia coli* identificadas, el 100% presentaron sensibilidad a amikacina (López, Calderón, Olivar, Parra, Alcázar, Castellanos & Garza 2014)

Tantry & Rahiman en el 2012 analizaron un total de 2842 muestras de orina según la norma de aislamiento e identificación de métodos bacterianos, de los cuales 1980 (67 %) muestras eran pacientes hospitalizados (IPs); 1.100 (56 %) eran de las muestras de pacientes ambulatorios

(OPs). El estudio revela que el aislado con mayor frecuencia de especies fueron *E. coli* (OP 63 %, 45,5 % IP) seguido de *K. pneumoniae* (OP 15,9 %, IP 21.7 %). *P. mirabillis* mostraron una menor frecuencia en la prevalencia (OP 1,2 %, IP 2.7 %). Un total de ocho antibióticos fueron probados contra todos los uropatógenos en el estudio, entre los que amikacina, cefixima, ciprofloxacina y nitrofurantoína se encontró que eran los más eficaces. Los resultados mostraron que *E. coli* presentaba resistencia a cotrimoxazol (OP 76%, IP 79%) seguido por cefalexina (OP 72%, 81% IP) y la menor resistencia a la amikacina (OP 11%, IP 13%) y la cefixima (OP 16%, IP 19%). En aquel estudio se analizaron muestras de orina de pacientes hospitalizados (67 %) y de pacientes ambulatorios (56 %), en cambio en la presente investigación se analizaron muestras de orina solo de pacientes ambulatorios. En este estudio la bacteria aislada con mayor frecuencia fue *E. coli* presentando un 63%, seguido de *K. pneumoniae* con un 15,9 % y *P. mirabillis* con 1,2 % en pacientes ambulatorios, siendo un porcentaje casi similar a la presente investigación, igualmente seguido de *K. pneumoniae* con 12% y *P. mirabillis* con 4%. La susceptibilidad de amikacina frente *E. coli* en este estudio en pacientes ambulatorios presentó una resistencia de un 11%, al comparar con la presente investigación las 34 cepas de *Escherichia coli* identificadas, el 100% presentaron sensibilidad a amikacina.

García M., en el 2013 realizó un estudio en el cual manifiesta, que de las 10.330 muestras procesadas durante los años 2009, 2010 y 2011 se identificaron 667 cepas de *E. coli* (6,46%), 224 cepas en el 2009, 189 en 2010, y 254 en 2011. De las cuales solo 563 cepas de *Escherichia coli*: (84,41%) provenían de infecciones urinarias, de otras procedencias como heridas quirúrgicas 40 cepas (6%), exudados vaginales 32 (4,8%), de exudados faríngeos, muestras de contenido biliar y exudados ópticos 5 cepas (0,75%) respectivamente, de hemocultivos 7 (1,05%), muestras de catéteres y otros 9 (1,35%) y una de esputo (0,15%); 104 cepas en total (15,59%). La sensibilidad de las cepas estudiadas: todas fueron sensibles a Imipenem-Meropenem (100%), Amoxicilina/ clavulánico el 61,75%, Piperacilina/tazobactam el 79,40%, Cefoxitina 94,10%, Ciprofloxacina y Levofloxacino 35% ambos, Amikacina 85,3%, Gentamicina 76,5%, Tobramicina 61,8%, Cotrimoxazol (SxT) 50%, Nitrofurantoína 100% y Fosfomicina 87% sensibles. La resistencia a las Cefalosporinas de 2a y 3ª generación junto con el Aztreonam y Ampicilina fue del 100%; Piperacilina/tazobactam el 20,6% fue resistente, Amoxicilina/clavulánico el 38,25%; Ciprofloxacina y Levofloxacino el 65% en ambas,

Amikacina, Gentamicina y Tobramicina 14,7%, 23,5%, 38,2% respectivamente, SxT 50%, Fosfomicina 13%, y Cefoxitina el 5,9%.

En aquel estudio se analizaron 10.330 muestras (orina, catéteres, heridas quirúrgicas, exudados: vaginales, faríngeos ópticos; hemocultivos, contenido biliar y otros) durante 3 años, de las cuales 563 eran cepas de *Escherichia coli* (84.41%) causantes de infección de vías urinarias, en cambio en la presente investigación solo se analizaron muestras de orina y en un periódo de 2 meses, es por ello que el porcentaje de *Escherichia coli* es menor 68%. En aquel estudio las cepas frente a amikacina presentaron una sensibilidad del 85.3% y una resistencia del 14.7%, en comparación con la presente investigación el 100% de las cepas de *Escherichia coli* fueron sensibles a amikacina.

En el hospital de Infectología se realizó un estudio el cual señala que: La mayor parte de los pacientes correspondió al sexo femenino: 916 (76.4%), 432 (36%) fueron niños; los organismos aislados, *Escherichia coli*: 638 (53.2%), *Klebsiella spp*.: 166 (13.9%), *Proteus spp*.: 110 (9.1%); *Morganella morganii*: 84 (7.0%); *Serratia spp*.: 84 (7.0%), *Enterobacter spp*.: 66 (5.5%) y *Citrobacter spp*.: 52 (4.3%). La resistencia a *Escherichia coli fue*: amikacina 37.3%, cefalexina 55.8%, ceftibuten 0.4%, cefuroxima 55.2%, ciprofloxacina 77.8%, gemifloxacina 67.6%, netilmicina 3%, moxifloxacina 66.5%, levofloxacina 77.3%, trimetoprim-sulfametoxazol 68.3%. La sensibilidad a *Escherichia coli fue*: amikacina 57.3%, cefalexina 41%, ceftibuten 99,36%, cefuroxima 42%, ciprofloxacina 21%, gemifloxacina 31.8%, netilmicina 95.2%, moxifloxacina 32.6%, levofloxacina 22%, trimetoprim-sulfametoxazol 31.7%. (Barriga, Mercado & Arumir. 2008)

En aquel estudio se analizaron muestras de orina de mujeres y niños siendo *Escherichia coli* el microorganismo frecuentemente aislado con un 53.2%, seguida de *Klebsiella spp*. con 13.9%, *Proteus spp*.: 110 (9.1%); también se identificaron otros microorganismos como *Morganella morganii*: 7.0%; *Serratia spp*. 7.0%, *Enterobacter spp*.5.5% y *Citrobacter spp*.: 4.3%, siendo el porcentaje de *Escherichia coli* (68%) casi similar en la presente investigación, también *Klebsiella pneumoniae* con 12% y *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabillis* con 4%. En cuanto a la susceptibilidad en aquel estudio las cepas de *Escherichia coli* frente a amikacina presentó un 37.3% de resistencia y con un porcentaje mayor de sensibilidad 57.3%, en cambio en la presente investigación el 100% de las cepas de *Escherichia coli* fueron sensibles a amikacina.

6. CONCLUSIONES:

- ✓ El 92% de los agentes etiológicos aislados de muestras de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro.7 estudiadas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y el 8% a bacilos gramnegativos no fermentadores; las bacterias patógenas aisladas más frecuentemente en urocultivos fueron *Escherichia coli* (68%), seguida de seguida de *Klebsiella pneumoniae* con un 12% y en tercer lugar *Pseudomona aeruginosa* con un 8%.

- ✓ Durante el estudio realizado mediante la técnica de la Macrodilución para determinar la concentración mínima inhibitoria de amikacina se evidenció que el 68% de las cepas de

Escherichia coli fueron sensibles ≤ 16 µg/ml según datos del CLSI M100-S25 del 2015 de la tabla M02-A12 y M07-A10.

- ✓ La difusión de los resultados se la realizó al Personal de Salud (médicos, enfermeras y al personal del laboratorio) con la finalidad de hacerles conocer la bacteria más frecuentemente aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa, y la susceptibilidad de amikacina frente a *Escherichia coli.*

7. RECOMENDACIONES:

- Asesorar bien a los pacientes en la forma de la recolección de la muestra de orina para el urocultivo, para de esta manera evitar la contaminación y obtener resultados fiables.
- Para obtener buenos resultados y de calidad se debe aplicar muy bien el control de la calidad de los medios que son utilizados para la siembra de la muestra de orina.
- Es importante realizar otros estudios de la misma naturaleza en otras poblaciones como en niños y mujeres embarazadas con el objetivo de saber la sensibilidad y resistencia de aquella bacteria.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez M., Boquet E., & Fez M. (2002). MANUAL DE TÉCNICAS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. Quito-Ecuador.
2. Bailey y Scott. (2009). Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana.
3. Barriga G., Mercado N. & Arumir C. (2008). Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de 1200 microorganismos GRAMNEGATIVOS causales de infección de vías urinarias. ENF INF MICROBIOL. 28(3): 90-98.
4. Brito M., Alvarez D. & Mena R. (2010). Comportamiento de la infección del tracto urinario en pacientes del Hospital Héroes de Baire. Habanera de Ciencias Médicas. 9(1): 49-59.

5. Cercenado E. & Cantón R. (2010). Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. ISBN-978-84-614-7932-0. Recuperado de: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf
6. Chalá P. & Treder M. (2013). Incidencia de las Infecciones de Vías Urinarias en Mujeres en Edad Fértil de 20 a 40 años y su Relación con la frecuencia de esta Patología, que acuden al Subcentro de salud la esperanza provincia de Imbabura. Universidad Técnica del Norte. Facultad ciencias de la Salud. Recuperado de: http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1261/3/INCIDENCIA%20DE%20LAS%20INFECCIONES%20DE%20VIAS%20URINARIAS%20EN%20MUJERES%20EN%20EDAD%20FERTIL%20DE%2020%20A%2040%20A%C3%91OS.pdf
7. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum. Edición 2012. Amikacina. Recuperado de: http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Amikacina.pdf
8. Còrdova F. 2012. AUTOMEDICACIÒN Y SUS COMPLICACIÒNES EN LOS PACIENTES QUE ACUDEN A LA SALA DE EMERGENCIA IESS AMBATO. Facultad de Ciencias Médicas. Recuperado de: http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/80/1/TUAMED013-2012.pdf
9. Echevarría Z. J., *Sarmiento A. E. & Osores P. F.* (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Medica Peruana. 23(1). Págs. 26, 27, 29
10. Faleiro N. P. (2009). Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia Departamento de Microbiología II. Madrid-España. Recuperado de: http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf
11. García M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia. Sanid. Mil. 69(4):244-248; ISSN: 1887-8571.
12. Grabe M., Bjerklund‐Johansen T.E., Botto H., Cek M., Naber K.G., Tenke P., & Wagenlehner F. (2010). Guía clínica sobre las infecciones urológicas. European Association of Urology. 136 (1), 1296-1297. Recuperado de: http://www.uroweb.org/gls/pdf/spanish/17%20GUIA%20CLINICA%20SOBRE%20LAS%20INFECCIONES%20UROLOGICAS.pdf

13. Hernández E., Madrid, (2010). ESCHERICHIA COLI" Productores de Blee aislados de urocultivo: implicaciones en el dignóstico y tratamiento de la infección urinaria. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense Facultad de Medicina Departamento de Microbiología. Madrid-España. Recuperado de: http://eprints.ucm.es/10442/1/T31499.pdf
14. Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2011). Microbiología Médica. México. McGRAW – HILL INTERAMERICANA.
15. Koneman E. (2008). Diagnóstico Microbiológico Texto y atlas en color. México: Médica Panamericana.
16. López B., Calderón E., Olivar V., Parra I., Alcázar V., Castellanos M., & Garza A. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de infección de vías urinarias bajas en un hospital pediátrico. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 71(6): 339-345
17. Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J., Moro M. & Portoles A. (2008). Velazquez Farmacologìa Bàsica y Clìnica. Buenos Aires; Madrid: Mèdica Panamericana.
18. Luján R. D., Pajuelo C. G. (2008 Mayo-Agosto). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos aislados en infección del tracto urinario. Biomed. 19:110-115. Recuperado de: www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081925.pdf
19. Ministerio de Salud Pública. (2000-2010). Datos Esenciales de Salud: Una Mirada a la Década. Recuperado de: http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/05/Datos-esenciales-de-salud-2000-2010.pdf
20. Ministerio de sanidad política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Madrid
21. Prats G. (2008). Microbiología Clínica. Buenos Aires; Madrid. Panamericana S.A. Págs. 48, 49-51,52
22. Ramos J. (2012). Infectologìa Clìnica. El Manual Moderno.
23. Romero R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Panamericana S.A.
24. Strasinger, Susan K., Schaub L., & Marjorie. (2010). Análisis de orina y otros líquidos corporales. 5° ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.
25. Suárez B., MiliánY., Espinosa F., Hart C. M., Llanes R. N., & Martínez B. M. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* aisladas a partir de urocultivos. Cubana de Medicina. 53(1): 3-13.

26. Tantry A. & Rahiman S. (2012). Resistencia antibacteriana y presencia de patógenos en el tracto urinario utilizando comúnmente antibióticos en el Valle de Cachernira. West Indian Med. 61(7):703
27. Tucto S., Mercado P. & Hurtado T. (2014). Resistencia Bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope- Essalud (PERÚ). Rebiolest. 2(1): e26.
28. Tumbaco A. & Martínez L. (2013) Factores de Riesgo que Influyen en la Predisposición de Infecciones Urinarias en Mujeres de 15 – 49 años que Acuden al Subcentro Virgen del Carmen. Universidad Estatal Península de Santa Elena. Recuperado de: http://repositorio.upse.edu.ec:8080/bitstream/123456789/1003/1/TESIS%20INFECCIONES%20%20URINARIAS.pdf
29. Universidad Nacional Autónoma de México. (2015). Infecciones de Vías Urinarias – *Escherichia coli.* Recuperado de: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/enfermedades-vias-urinarias.html
30. Velasco J., Araque M., Araujo E., Longa A., Nieves B., Ramírez A., Sánchez K., Velazco E. (2008). Manual Práctico de Bacteriología Clínica. Recuperado de http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%20libro%20digital/Manual%20de%20Bacteriologia.pdf

9. ANEXOS

ANEXO NRO. 1

20150107

Loja, 06 febrero de 2015 Secret. Dir.

Dra Rosa Rojas

DIRECTORA DEL ÁREA DE LA SALUD HUMANA
Ciudad.-

Autorizado. Sírvase coordinar con la Lic. Carmen. Allanis Romero
Informar Dra Rojas
09.02.2015

De mis consideraciones.-

Yo, ANA GABRIELA CASTILLO GONZAGA, portadora de la cedula de ciudadanía Nro. 110513030, estudiante del séptimo 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 desearle éxitos en sus funciones a la vez me permito solicitarle comedidamente autorice a quien corresponda el permiso para poder realizar el procesamiento de las muestras de orina en el **Centro de Diagnóstico Médico** mi proyecto de tesis denominado: **DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA DE AMIKACINA FRENTE A ESCHERICHIA COLI EN PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DURANTE EL PERDIODO MARZO-JUNIO 2015**, además se me facilite el permiso correspondiente para poder hacer uso de las instalaciones y equipos a fin de realizar los análisis respectivos.

Por la gentil y favorable atención que se digne dar a la presente, le antelo mis más sinceros agradecimientos.

Atentamente

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DEPARTAMENTO DE ARCHIVO
AREA DE LA SALUD HUMANA
RECIBIDO POR: 06-02-2015

ANA GABRIELA CASTILLO GONZAGA
Nro. 1105135030

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

RECIBIDO 09 02 2015
10:30

Coordinar con docencia

ANEXO NRO. 2

ANEXO NRO. 3

Fecha: _____

1859

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo ……identificado con la cédula de ciudadanía Nro …….. Declaro que he sido informado de los siguientes aspectos concernientes al estudio **"CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE CEFUROXIMA, CEFTRIAXONE, AMPICILINA, CEFOTAXIMA, CIPROFLOXACINA, AMIKACINA, GENTAMICINA, FRENTE A *Escherichia coli spp.* AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nº7 LOJA"** en el que participaré voluntariamente como sujeto:

1. La orina será utilizada para urocultivo el cual va a determinar si hay presencia de ***Escherichia coli spp.*** Si hay la presencia de esta bacteria, se realizará la concentración mínima inhibitoria de todos estos antibióticos que podrán ser usados para el **tratamiento de infección de vías urinarias.**
2. Los resultados de las pruebas no podrán ser divulgados con mi nombre sin mi autorización previa.
3. Los investigadores no obtendrán ningún beneficio económico de este proyecto de tesis sin mi consentimiento.
4. Mi participación en este proyecto de tesis es de carácter voluntario, y en caso de no participar en él, está decisión no afectará la relación médico-paciente

Yo……Como sujeto del estudio me comprometo a que toda la información que brinde será ajustada a la verdad.

Declaro que estoy de acuerdo con descrito anteriormente y que participo voluntariamente y no he sido sometido a ninguna intervención con coacción en esta decisión. En constancia firmo a continuación:

Nombre:…… Firma:……

Cédula de Ciudadanía Nº …….. Fecha: ……

HUELLA DIGITAL ÍNDICE DERECHO (en caso de pacientes que no sepan leer mi escribir)

ANEXO NRO. 4

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE ORINA

Mujeres: apartar los labios uretrales y lavar cuidadosamente la vulva con una esponja empapada en una solución jabonosa no bactericida. La operación se repite tres veces, y se eliminan los restos de del lavado con una esponja seca, o, mejor aún, con una gasa estéril. La micción se efectúa manteniendo los labios separados, desechando la primera porción y recogiendo la porción media en un recipiente estéril.

Hombres: se retira el prepucio, y se lava el glande con una esponja empapada en solución jabonosa no bactericida, durante tres veces consecutivas; después se seca con una gasa estéril y se recoge la parte intermedia de la micción en un recipiente estéril.

Niños pequeños y bebés: se lava la región genital con una esponja empapada en detergente no bactericida, repitiendo la activación tres veces y secándolo con una gasa estéril. A continuación le se sostiene boca abajo, frotandole los músculos paraespinales, lo cual estimula sus deseos de orinar. Si no resulta se coloca una bolsa estéril sobre los genitales del niño, esperando que la orina fluya espontáneamente. La bolsa se debe retirar tan pronto se haya producido la micción. Si esto no ocurre en una hora, se volverán a lavar los genitales, y se colocará de nuevo el recipiente. (Alvarez M., Boquet M. & Fez M. 2002)

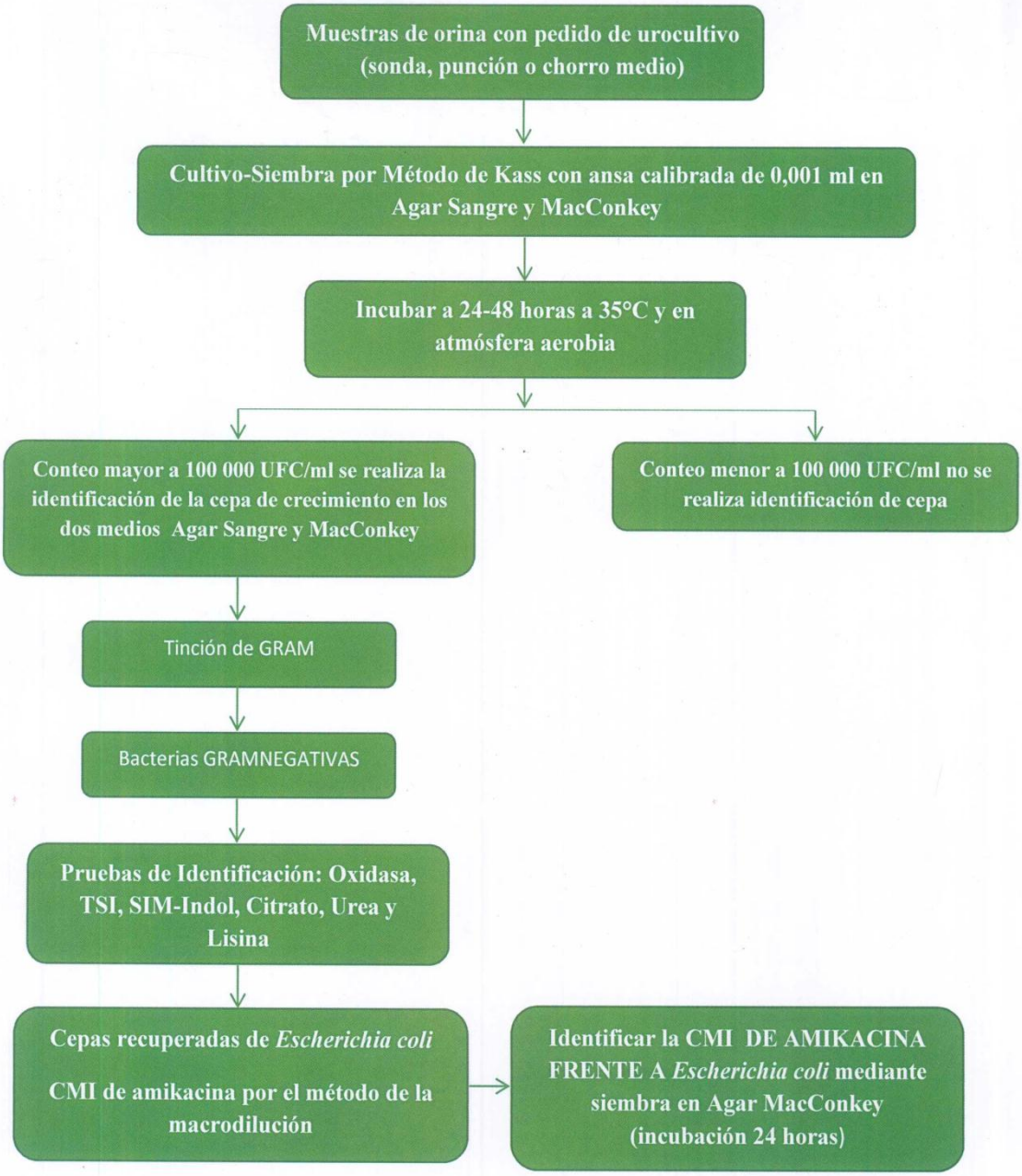
ANEXO NRO.5

Transporte:

La orina es un medio apropiado para el crecimiento bacteriano, por lo que las muestras de orina se contaminan con facilidad. Es bien conocido que el retraso en el procesamiento de los urocultivos permite la multiplicación de la flora contaminante, lo que afecta a la validez de los resultados. (Koneman 2008). Tanto la refrigeración (2ºC - 8ºC) como los conservantes químicos de distintos preparados comerciales inhiben el crecimiento bacteriano durante las primeras 24 horas.

- Llegada la muestra de orina al laboratorio, las cajas Petrí fueron rotuladas con sus respectivo número, la orina fue sembrada en agar sangre y MacConkey con un ansa calibrada.
- Una vez sembrada las muestra de orina, estas fueron colocadas en una caja térmica en cadena de frío e inmediatamente transportadas al laboratorio para su posterior incubación durante 24-48 horas y seguir con el procedimiento hasta la identificación de los microorganismos. (Koneman 2008)

ANEXO NRO. 6


Muestras de orina con pedido de urocultivo (sonda, punción o chorro medio)
Cultivo-Siembra por Método de Kass con ansa calibrada de 0,001 ml en Agar Sangre y MacConkey
Incubar a 24-48 horas a 35°C y en atmósfera aerobia
Conteo mayor a 100 000 UFC/ml se realiza la identificación de la cepa de crecimiento en los dos medios Agar Sangre y MacConkey
Conteo menor a 100 000 UFC/ml no se realiza identificación de cepa
Tinción de GRAM
Bacterias GRAMNEGATIVAS
Pruebas de Identificación: Oxidasa, TSI, SIM-Indol, Citrato, Urea y Lisina
Cepas recuperadas de *Escherichia coli*
CMI de amikacina por el método de la macrodilución
Identificar la CMI DE AMIKACINA FRENTE A *Escherichia coli* mediante siembra en Agar MacConkey (incubación 24 horas)

ANEXO NRO. 7

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO "CENTRO DE DIAGNÓSTICO MÉDICO"

Of. Nº. 226- CDM- ASH-UNL

Loja, 10 de junio del 2015

Sra.

Ana Gabriela Castillo Gonzaga

ESTUDIANTE DE LA CARRERA LABORATORIO CLÍNICO DEL ÁREA DE SALUD HUMANA DE LA UNL

Presente.-

La presente tiene la finalidad de CERTIFICAR que:

La Sra. Ana Gabriela Castillo Gonzaga procesó 107 muestras (incluida la cepa control) de orina en las que realizó urocultivo y concentración mínima inhibitoria de amikacina, en el Laboratorio Clínico "Centro de Diagnóstico Médico" del ASH desde el 16 de marzo hasta el 29 de mayo del 2015, como parte del trabajo de titulación denominado: "Concentración mínima inhibitoria de amikacina frente *a Escherichia coli*, asislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nº 7"

Es importante mencionar que las actividades se cumplieron satisfactoriamente, con puntualidad y dedicación y se cubrieron los gastos de insumos y reactivos demandados.

Por la atención prestada a la presente antelo mis agradecimientos

Atentamente,

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Centro de Diagnóstico FCM

Lic. Carmen Ullauri González

RESPONSABLE DEL CDM.

Recibido 10 - Junio - 2015

Ana Castillo

Sra. Ana Castillo Gonzaga
1105135030

ANEXO NRO.8

1.- Retire el vial sin abrir LYFO DISCO dejar que el frasco sin abrir se equilibre a la temperatura ambiente.

2.- Eliminar asépticamente una pastilla con pinzas estériles del vial. no retire el desecante

3.- Colocar el precipitado en 0,5 ml de fluido estéril (agua, solución salina) tapar inmediatamente y el vial recapitulación y devolver el vial resellado a de 2 a 8 de almacenamiento.

4.- Aplastar la pildora con la esponja estèril hasta que la suspensión sea homogénea inmediatamente saturar el mismo hisopo con el material hidratado y trasladar al medio de agar.

5.- Inocular la placa de cultivo primario rotando suavemente el hisopo más de un - tercio de la placa.

6.- Utilizando una ansa estéril, rayar para facilitar el aislamiento de colonias.

7.-Mediante la eliminación adecuada bioazard, deseche el material hidratado restante.

8.-Inmediatamente incubar los medios inoculados a temperatura y condiciones adecuadas para el microorganismo.

ANEXO NRO.9

AGAR BASE SANGRE

Agar base Sangre se recomienda como una base a la que se puede añadir sangre para uso en el aislamiento y cultivo de microorganismos patógenos exigentes como *Neisseria, Streptococci* etc.

Composición

Ingredientes	Gms / Litro
Peptona de corazón de res	10.000
Triptosa	10.000
El cloruro de sodio	5.000
Agar	15.000
pH final (a 25 ° C)	7.3 ± 0.2

Fórmula ajustada, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento

Direcciones

Suspender 40 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a

Presión de 15 libras (121°C) durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C y añadir asépticamente 5% v/v de sangre desfibrinada estéril. Mezclar bien y verter en placas de Petri estériles.

Principio y Interpretación

Agar base Sangre es un medio altamente nutritivo utilizado generalmente como un medio basal para la preparación de agar sangre por la suplementación con la sangre. También se puede utilizar como medios de propósito general sin la adición de sangre.

Agar base Sangre medios de comunicación pueden ser utilizados con fosfato de fenolftaleína añadido para la detección de la producción de fosfato.

Los estafilococos, con sal y agar añadido para la evaluación de la contaminación de la superficie en el equipo y cerdo de carcasa y para determinar gama salinidad del flavobacterias marino. También se puede utilizar para la preparación de antígenos de Salmonella Typhi. Agar base Sangre es recomendado por APHA y métodos estándar para la prueba de muestras de alimentos. Extracto de carne de triptosa proporciona carbono, nitrógeno, aminoácidos y vitaminas. Cloruro de sodio ayuda en el mantenimiento del equilibrio osmótico del medio. La adición de la sangre hace que el medio más nutritivo, proporcione un crecimiento adicional para factores requeridos por organismos fastidiosos.

También ayuda en la visualización de las reacciones hemolíticas. Sin embargo, las reacciones hemolíticas dependerán de la sangre animal utilizada. Sangre de oveja da mejores resultados para estreptococos del grupo A. Pero la sangre de oveja no apoya al crecimiento de

Haemophilus haemolyticus ya que la sangre de oveja es deficientes en nucleótidos de piridina. Sin embargo cuando la sangre de caballo es de colonias *H. haemolyticus* usados producen hemólisis e imitan *Streptococcus pyogenes*.

Control de calidad

Aparición

Crema a amarillo polvo fluido homogéneo

Gelificante

Firme, comparable con un 1,5% en gel de agar

El color y la claridad del medio preparado

Medio basal: Luz ámbar de color transparente a ligeramente opalescente gel. Después de la adición de 5 % v/v de sangre desfibrinada estéril: Rojo cereza de color forma un gel opaco en placas de Petri.

Reacción

La reacción de 4,0 % w/v solución acuosa a 25 °C. pH: 7.3 ± 0.2

pH

7.10-7.50

Respuesta Cultural

Las características culturales observados con adición de 5% w/v de sangre estéril desfibrinada, después de una incubación a 35-37 ° C durante 18-48 horas.

Organismo	Inóculo (UFC)	Crecimiento w/o sangre	Recuperación w/o sangre	Crecimiento con sangre	Recuperación con sangre	Hemólisis
Respuesta Cultural						
Neisseria meningitidis ATCC 13090	50-100	equitativo	40 – 50%	exuberante	> = 70%	nada
Staphylococcus aureus ATCC 25923	50-100	útil	50 – 70%	exuberante	> = 70%	beta
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	50-100	útil	50 – 70%	exuberante	> = 70%	nada
Streptococcus pneumoniae ATCC 6303	50-100	Equitativo - útil	40–50%	exuberante	> = 70%	alpha
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	50-100	Equitativo - útil	40–50%	exuberante	> = 70%	beta

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 en la etiqueta.

Referencias

1. Noble W. C., 1962, J. C lin, Pathol., 15:552.
2. Hansen N. H., 1962, J. Appl. Bacteriol., 25:46.
3. Hayes P. R., 1963, J. GEN. Microbiol., 30:1
4. Schuber J. H., Edwards P. R. and Ramsere C. H., 1959,J. Bacteriol., 77:648.
5. Downes F. P. and Ito K., (Eds.), 2001, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., APHA, Washington, DC.
6. U.S. Food and Drug Administration, 1995, Bacteriological Analytical Manual, 8th Ed., AOAC International, Gaithersburg, Md.
7. Atlas R. M., 1993, Handbook of Microbiology of Microbiological Media, CRC Press, Boca Raton, Fla.
8. Snavely J. G. and Brahier J., 1960, Am. J. Clin. Pathol., 33:511.
9. Murray P. R., Baron J. H., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Yolken R. H., (Eds.), 8th Ed., 2003, Manual of Clinical
10. Microbiology, ASM, Washington, D.C.

Agar MacConkey

Agar MacConkey se recomienda para el aislamiento selectivo de *Escherichia coli* de los productos farmacéuticos y está de acuerdo con una metodología armonizada de BP. También

se recomienda para el aislamiento selectivo y para la diferenciación de la lactosa fermentada y la lactosa no fermentada de bacterias entéricas.

Composición

Ingredientes	Gms/Litro
Peptonas (carne y caseína)	3.000
Pancreático compendio de gelatina	17.000
Lactosa mono hidrato	10.000
Sales biliares	1.500
Cloruro de sodio	5.000
Cristal violeta	0.001
Rojo neutro	0.030
Agar	13.500
pH después de la esterilización (a 25 ° C)	7.1 ± 0.2

Fórmula ajustada, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento

Direcciones

Suspender 49.53 gramos de medio deshidratado en 1000 ml / agua destilada purificada. Calentar hasta hervir para disolver el medio por completo. Esterilizar por tratamiento en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos es decir en ciclo validados. Evitar el sobrecalentamiento.

Enfriar a 45-50°C. Mezclar bien antes de verter en placas de Petri estériles. La superficie del medio debe estar seca cuando se inocula.

Principio e interpretación

Agar MacConkey es el medio selectivo y diferencial temprano para el cultivo de organismos coliformes. Posteriormente agar MacConkey y caldo se han recomendado para su uso en análisis microbiológico de los productos alimenticios y para la siembra/inoculación directa de muestras de agua para el recuento de coliformes. Este medio también es aceptado por los métodos estándar para el examen de Leche y Productos Lácteos. Farmacopea Británica ha recomendado este medio para la subcultura e identificación de *Escherichia coli.* También se cita como medio de agar H. También se recomienda por y de acuerdo con el método armonizado de USP/BP/EP/JP.

Jugo pancreático recopilación de gelatina y peptonas (carne y caseína) proporcionar los nutrientes esenciales, vitaminas y factores nitrogenados necesarios para el crecimiento de microorganismos. Lactosa monohidrato es la fuente de hidratos de carbono fermentables. La

acción selectiva de este medio se atribuye a violeta cristal y sales biliares, que son inhibidoras de la mayoría de especies de bacterias gram-positivas. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico en el medio.

Después del enriquecimiento de *Escherichia coli* en caldo de MacConkey (M083B), se subcultivan después en agar de MacConkey. Bacterias gramnegativas suelen crecer bien en el medio y se diferencian por su capacidad de fermentar la lactosa.

La fermentación de la lactosa de cepas crecen como rojo o rosado y pueden estar rodeadas por una zona de ácido precipitó bilis. El color rojo es debido a la producción de ácido a partir de lactosa, la absorción de rojo neutro y un cambio de color posterior del colorante cuando el pH del medio cae por debajo de 6.8. Cepas no fermentan la lactosa, como *Shigella* y *Salmonella* es incolora y transparente y no suelen alterar la apariencia del medio. *Yersinia* enterocolítica puede aparecer como pequeñas colonias que no fermentan lactosa después de la incubación a una temperatura ambiente.

Control de calidad
Aparición
Amarillo claro a rosa polvo fluido homogéneo
Gelificante
Firme comparable con 1.35% de agar gel.
El color y la claridad del medio preparado
Rojo con tinte violáceo coloreado formas de gel transparente a ligeramente opalescente en placas de Petri.
pH
6.90-7.30

Propiedades Indicativas

Las colonias son comparables en apariencia y reacción indicación a los anteriormente obtenidos con anterioridad probado y aprobado en gran cantidad de medios se produce por la temperatura especificada durante un período de tiempo dentro de la gama de inoculación especificada<= 100 UFC (a 30-35 ° C durante 18-72 horas)

Almacenamiento y caducidad

Organismo	Inóculo	Crecimiento	Valor de lote observado (cfu)	Recuperación	color de la colonia	La temperatura de incubación	Periodo de incubación
Crecimiento Promover + Indicativo							
Escherichia coli ATCC 8739	50-100	Exuberante	25-100	>=50%	rosa-rojo con precipitado de bilis	30-35 °C	18 – 72 hrs
Pruebas adicional microbiológicas							
Escherichia coli ATCC 25922	50 - 100	Exuberante	25-100	>=50 %	rosa-rojo con precipitado de bilis	30-35 °C	18 – 24 hrs
Escherichia coli NCTC 9002	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	rosa-rojo con precipitado de bilis	30-35 °C	18 – 24 hrs
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	50 - 100	Exuberante	15 - 40	>=50 %	rosa a rojo	30-35 °C	18 – 24 hrs
Enterococcus faecalis ATCC 29212	50 - 100	Equitativo buena	25 - 100	30 – 40 %	incoloro a Rosa palido	30-35 °C	18 – 24 hrs
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
Staphylococcus aureus ATCC 6538	>=10^3	Inhibido	0	0 %		30-35 °C	24 hrs
Staphylococcus aureus ATCC 25923	>=10^3	Inhibido	0	0 %		30-35 °C	24 hrs
Salmonella Enteritidis ATCC 13076	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
Salmonella Paratyphi A ATCC 9150	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
Salmonella Paratyphi B ATCC 8759	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
Salmonella Typhi ATCC 6539	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
Salmonella Abony NCTC 6017	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs

Proteus vulgaris ATCC 13315	50 - 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
Shigella flexneri ATCC 12022	50 - 100	equitativo buena	15 - 40	30 – 40 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	>=10^3	Inhibido	0	0 %	-	30-35 °C	24 hrs
Corynebacterium diphtheriae type gravis	>=10^3	Inhibido	0	0 %	-	30-35 °C	24 hrs

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 en la etiqueta.

Referencias:

1. MacConkey, 1900, The Lancet, ii:20.

2. MacConkey, 1905, J. Hyg., 5:333.

3. Downes F P and Ito K(Eds.), 2001, Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Foods, 4th ed., APHA, Washington, D.C

4.Eaton A. D., Clesceri L. S. and Greenberg A W.,(Eds.), 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed., APHA, Washington, D.C.5. ,,

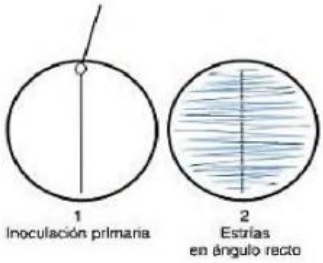
5. Wehr H. M., and Frank J H., 2004, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed., APHA Inc., Washington, D.C.

6. British Pharmacopoeia 2011, The Stationery office British Pharmacopoeia

7. The United States Pharmacopoeia 2011,The United States Pharmacopoeial Convention. Rockville, MD.

8. European Pharmacopoeia 2011, European Dept. for the quality of Medicines

9. Japanese Pharmacopoeia, 2008.



ANEXO NRO.10

MÉTODO DE KASS-ASA CALIBRADA.

Para el recuentro semicuantitativo de colonias para la detección de infecciones de vías urinarias se lo realiza mediante el método de Kass el cual consiste en la utilización de las ansas calibradas la cual contiene 0,001 de líquido.

Procedimiento: se sumerge el ansa calibrada en la muestra de orina no centrifugada de forma vertical. Luego se retira el ansa con cuidado y se coloca el volumen completo sobre la superficie del agar sangre y

MacConkey haciendo una única estría a través del centro. El inóculo se esparce de modo uniforme en ángulos rectos respecto a la primera estría. Después se procede a incubar los cultivos a 35-37°C, durante 24 a 48 horas, se cuenta el número de colonias y el resultado se multiplica por 1000, ya que el ansa calibrada contiene 0.001 ml. (Koneman E. 2008)

ANEXO NRO. 11

TINCIÓN DE GRAM

Principio: las diferencias en la composición de las paredes de las células grampositivas, que contienen una capa gruesa de péptidoglucano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico, y las paredes de las células gramnegativas, en las que la capa de péptidoglucano es más delgada, explican la diferencia en de tinción de Gram entre estos dos grupos principales de bacterias. Es probable que la gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico de los microorganismos grampositivos contribuya su capacidad de resistir la decoloración con

alcohol. Si bien el colorante de contraste puede ser captado por los microorganismos grampositivos su color violeta no se altera. (Bailey y Scott. 2009)

Procedimiento:

1. Con el ansa se coge una colonia y se realiza un frotis fino en el portaobjetos, se lo fija a través de la llama flameándolo de 2 a 3 veces.
2. El frotis fijado con calor se tiñe un minuto con cristal violeta se lava con agua.
3. Se cubre con solución yodada durante un minuto y se lava de nuevo con agua.
4. Se decolora con alcohol acetona y se procede a lavar de nuevo.
5. Por ultimo cubrir con safranina (color de contraste) durante 1 minuto. Lavar y poner a secar.
6. Observar al microscopio con el objetivo de 100x con acetite de inmersión. (Lopez J., Cardenas M., & Osunia A. 2012)

ANEXO NRO. 12

Pruebas Bioquímicas

Agar Citrato

Agar Citrato se recomienda para la diferenciación de los miembros de enterobacterias sobre la base de citrato utilización.

Composición

Ingredientes	Gms / Litro
El sulfato de magnesio	0.200

Fosfato monoamónico	1.000
Fosfato dipotásico	1.000
El citrato de sodio	2.000
El cloruro de sodio	5.000
El azul de bromotimol	0.080
Agar	15.000
El pH final (a 25°C)	6.8 ± 0.2

Fórmula ajustada, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento.

Direcciones

Suspender 24,28 gramos en 1000 ml de agua destilada. El calor, a ebullición, para disolver el medio completamente. Mezclar bien y distribuir en tubos o frascos. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos.

Precaución: antes de usar el agua, asegúrese de pH del agua es 6,5 a 7.0. El color inicial del medio puede desviarse de color esperado, si se tiene en cuenta la precaución arriba.

Principio y Interpretación

Estos medios se utilizan para la diferenciación entre Enterobacterias y los miembros del grupo sobre la base *aerogenes* de la utilización de citrato como única fuente de carbono.

Inicialmente el medio de citrato fue desarrollado por Koser que contiene sal de amonio como la única fuente de nitrógeno y citrato como única fuente de carbono para la diferenciación de Escherichia coli y Enterobacter *aerogenes* mediante pruebas IMViC.

Más tarde Simmons modifico formulación Kosers mediante la adición de agar y bromo azul de timol. Se recomienda por APHA.

Dihidrógeno fosfato de amonio y citrato de sodio sirven como única fuente de carbono y nitrógeno respectivamente.

Los microorganismos también utilizan sales de amonio inorgánicas como su única fuente de nitrógeno. Metabolismo de estas sales hace el medio para convertirlas en alcalina, indicando un cambio de color del indicador de pH de verde a azul.

Azul Bromotimol es el indicador de pH. El medio debe estar recién preparado porque en condiciones secas, cambios en el color pueden aparecer incluso antes de la inoculación, especialmente en la parte inferior de la inclinación.

Control de calidad

<u>Aparición</u>

Crema a amarillo polvo fluido homogéneo

<u>Gelificante</u>

Firme, comparable con un 1,5% en gel de agar

El color y la claridad del medio preparado

Verde bosque de colores, forma un gel ligeramente opalescente en tubos como sesgos

Reacción

La reacción de 2.43% w/v solución acuosa a 25 ° C. pH: 6.8 ± 0.2

pH

6.60-7.00

Respuesta Cultural

M099: características culturales observados después de una incubación a 35-37°C durante 18-24 horas.

Organismo	Inóculo (UFC)	Crecimiento	Citrato utilización
Respuesta Cultural			
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	50-100	Buena-exuberante	Reacción positivo, color azul
Escherichia coli ATCC 25922	> = 10^3	inhibido	
Salmonella Choleraesuis ATCC 12011	50-100	Buena-exuberante	Reacción positivo, color azul
Salmonella Enteritidis ATCC 13076	50-100	Buena-exuberante	Reacción positivo, color azul
Salmonella Typhi ATCC 6539	50-100	Equitativa-buena	Reacción negativoa, color verde
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	50-100	Buena-exuberante	Reacción positivo, color azul
Shigella dysenteriae ATCC 13313	> = 10^3	inhibido	

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 en la etiqueta.

Referencias

1. Koser, 1923, J. Bact., 8:493.

2. Simmons, 1926, J. Infect. Dis., 39:209.

3. MacFaddin J., 1985, Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.
4. Eaton A. D., Clesceri L. S., Rice E. W., and Greenberg A W., (Eds.), 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Ed., APHA, Washington, D.C.

SIM Motilidad Medio, Modificado.

Medio SIM, se recomienda para la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno, formación de indol y motilidad de los bacilos entéricos de acuerdo con BAM FDA.

Composición

Ingredientes	Gms/Litro
Pancreático digestión de la caseína	20.000
Péptica compendio de tejido animal	6.100
Sulfato de amonio ferroso	0.200
El tiosulfato de sodio	0.200

Agar	3.500
El pH final (a 25°C)	7.3 ± 0.2

Direcciones

Suspender 30.0 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta hervir para disolver el medio completamente. Dispense en tubos. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos. Permita que los tubos se enfríen en posición vertical.

Principio y Interpretación

Medio SIM se recomienda por la FDA BAM, 1998 para diferenciar bacilos entéricos particularmente *Salmonella* y *Shigella* sobre la base de la producción de sulfuro, formación de indol y la motilidad. Jordania y Victorson reportaron que la *Salmonella* Paratyphi A y Paratyphi B se pueden distinguir sobre la base de la producción de H2S usando acetato de plomo. Sulkin y Willett utilizaron triple azúcar hierro agar con 1% de agar para la motilidad, junto con la producción de H2S y la fermentación de carbohidratos. Sosa se describe un medio de peptona con bajo agar para la motilidad y la determinación de indol.

Motilidad, indol y la producción de sulfuro, estas pruebas se utilizan para diferenciar los miembros de Enterobacterias. Medio SIM combina estas tres características diferenciales en un solo medio. Hierro peptonizado 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 de hierro. *Salmonella* son H2S positivo y *Shigella* son negativos H2S. Organismos móviles intensifican la reacción H2S. Organismos móviles crecen lejos de la línea de inoculación con un crecimiento difuso mientras que los organismos no móviles crecen a lo largo de la línea. Motilidad de detección es posible debido a la naturaleza semisólida de la media. Salmonella es móvil, mientras que Shigella son no móviles. El triptófano, desde péptica resumen de tejido animal, es degradado por bacterias específicas para producir indol. El indol se detecta mediante la adición de reactivos químicos que siguen al período de incubación.

Inocular cultivo fresco con una solo pinchazo, utilizando aguja recta por el centro del medio. Después de la incubación, se observa la motilidad (crecimiento difuso hacia fuera de la línea o turbidez en todo el medio) y para la producción de H2S (ennegrecimiento del medio).

Indol: para la producción de Indol se añade tres o cuatro gotas de reactivo de Kovacs y se observa para el desarrollo del color rojo (reacción positiva). Se Determina la motilidad y la producción de H2S antes de la determinación de la producción de Indol.

Aparición

Crema a beige polvo fluido homogéneo

Gelificante

Semisólida, comparable con 0.3% de agar gel.

El color y la claridad del medio preparado

Ámbar mediano de color forma un gel ligeramente opalescente en tubos como colillas.

Reacción

La reacción de 3.0% w/v solución acuosa a 25°C. pH: 7.3 ± 0.2

pH

7.10-7.50

Respuesta Cultural

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

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Motilidad	Producción de Indol (Adición de Kovacs)	H2S
Respuesta Cultural *Escherichia coli* ATCC 25922	50-100	exuberante	positivo, el crecimiento desde la línea del pinchazo causando turbiedad	reacción positiva, anillo rojo en la interfaz del medio	Reacción negativa
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	50-100	exuberante	positivo, el crecimiento desde la línea del pinchazo causando turbiedad	Reacción negativa	reacción positiva, ennegrecimien to de medio
Shigella flexneri ATCC 12022	50-100	exuberante	negativo, el crecimiento a lo largo de la línea del pinchazo y su alrededor sigue siendo clara	Reacción negativa	Reacción negativa
Salmonella Paratyphi A ATCC 9150	50-100	exuberante	positivo, el crecimiento desde la línea del pinchazo causando turbiedad	Reacción negativa	Reacción negativa
Salmonella Paratyphi B ATCC 8739	50-100	exuberante	positivo, el crecimiento desde la línea del pinchazo causando turbiedad	Reacción negativa	reacción positiva, ennegrecimien to de medio
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	50-100	exuberante	negativo, el crecimiento a lo largo de la línea del pinchazo y su alrededor sigue siendo clara	Reacción negativa	Reacción negativa

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 en la etiqueta.

Referencias

1. FDA, U.S. 1998. Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. Gaithersburg, MD: AOAC International.
2. MacFaddin, J. F. 1985. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins.
3. Jordan, E. O. and Victorson, R 1917. J. Inf. Dis, 21.
4. Sulkin, S. E. and Willett, J. C 1940. J. Lab. Clin. Med., 25.
5. Sosa, L 1943. Rev. Inst. Bacteriol, 11.

Agar hierro triple azúcar

Agar hierro triple azúcar se utiliza para la identificación de bacilos entéricos gram-negativos sobre la base de fermentación de dextrosa, lactosa y sacarosa y la producción de sulfuro de hidrógeno.

Composición

Ingredientes	Gms/Litro
Peptona	20.000
Extracto de carne	3.000
Lactosa	10.000
La sacarosa	10.000
Dextrosa	1.000
El cloruro de sodio	5.000
Sulfato ferroso, heptahidrato	0.200
Tiosulfato de sodio, pentahidratado	0.300
Rojo de fenol	0.024
Agar	12.000
El pH final (a 25°C)	7.4 ± 0.2

Fórmula ajustado, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento

Direcciones

Suspender 64.32 gramos (el peso equivalente de medios deshidratados por litro) en 1.000 ml de agua destilada. Calentar hasta hervir para disolver el medio completamente. Mezclar bien y distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar por tratamiento en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Dejar que el medio para establecer en forma inclinada con la culata de aproximadamente 1 pulgada de largo.

Principio Y Interpretación

Agar hierro triple azúcar fue propuesto originalmente por Sulkin y Willett y modificado por Hajna para la identificación de enterobacterias. Este medio cumple con las recomendaciones de la APHA, para el examen de la carne y los productos alimenticios, para el examen de la leche y los productos lácteos y para la prueba de límite microbiano para confirmar la presencia de *Salmonella* y en la identificación de bacilos gram-negativos. Comité ISO y BIS ha recomendado una ligera modificación para la identificación de *Salmonella*. BPI ha recomendado el medio (M021S) para la detección de *Escherichia coli* y *Vibrios.*

Peptona, extracto de levadura y extracto de carne proporciona compuestos nitrogenados, azufre, oligoelementos y vitaminas del complejo B, etc.

El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. Lactosa, sacarosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. Sodio iones tiosulfato y férricos o ferrosos hacen del sistema indicador de H2S. Rojo fenol es el indicador de pH. Los organismos que fermentan la glucosa producen una variedad de ácidos, convirtiendo el color del medio de rojo a amarillo. Más cantidad de ácidos se liberan en el trasero (fermentación) que en la inclinación (respiración). Bacterias que crecen también forman productos alcalinos oxidativos descarboxilación de peptona y estos productos alcalinos neutralizan las grandes cantidades de ácido presente en el trasero. Por lo tanto, la aparición de un alcalino (rojo) de inclinación y un ácido (amarillo) a tope después de la incubación indica que el organismo es una glucosa fermentador pero es incapaz de fermentar la lactosa y/o sacarosa. Las bacterias que fermentan la 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 ácido y el fondo ácido. La producción de gas (CO2) se detecta por la presencia de grietas o burbujas en el medio, cuando existe acumulado hay 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. Reducción de tiosulfato procede sólo en un ácido medio ambiente y ennegrecimiento ocurre generalmente en el fondo

del tubo. Agar Hierro Triple Azúcar se debe utilizar en paralelo con Urea Agar/Caldo (M112/M111) para distinguir entre las especies de *Salmonella* y *Proteus*.

Las reacciones son las siguientes:

Inclinación Alcalina /Ácido a tope Sólo glucosa fermentada

Inclinación Ácido/Ácido a tope glucosa y sacarosa fermentada o glucosa y lactosa fermentadas o los tres azúcares, glucosa, lactosa y sacarosa fermentadas.

Burbujas o grietas presente - Producción de gas

Negro presente - precipitado H2S producción de gas

Algunos miembros de las enterobacterias y algunas productoras de H2S *Salmonella* pueden no ser H2S positivo sobre Agar TSI.

Algunas bacterias pueden mostrar producción de H2S en Agar Kligler Hierro pero no en Agar TSI. Esto puede ocurrir debido a la utilización de los sacarosa en Agar TSI suprime la vía enzimática que da lugar a la producción de H2S.

Control de calidad

Aparición

Amarillo claro a rosa polvo suelto homogénea de color

Gelificante

Firme, comparable con el 1.2% en gel de agar.

El color y la claridad del medio preparado

Formas de color rojo rosado claro a ligeramente opalescente gel en tubos como sesgos

Reacción

La reacción de 6.43% w/v solución acuosa a 25ºC. pH: 7.4 ± 0.2.

Respuesta Cultural

M021S: características culturales observados después de una incubación a 35 - 37°C durante 18-24 horas.

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Inclinación	Extremo	Gas	H2S
Respuesta Cultural *Citrobacter freundii* ATCC 8090	50 - 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	50 - 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
Escherichia coli ATCC 25922	50 - 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	50 - 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
Proteus vulgaris ATCC 13315	50 - 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción negativa	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
Salmonella paratyphi A ATCC 9150	50 - 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
Salmonella Typhi ATCC 6539	50 - 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción negativa	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	50 - 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
Shigella flexneri ATCC 12022	50 - 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción negativa	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
Vibrio cholerae ATCC 15748	50 - 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción negativa	reacción negativa, no ennegrecimiento de 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 en la etiqueta.

Referencias

1. Sulkin E.S. and Willett J.C., 1940, J. Lab. Clin. Med.,
2. Hajna A.A., 1945, J. Bacteriol, 49:516.
3. Vanderzant C. and Splittstoesser D., (Eds.), 1992, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. APHA, Washington D.C.
4. Marshall R. (Ed.), 1992, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th ed., APHA, Washington., D.C.
5. Finegold and Baron, 1986, Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology, 7th ed., The C.V. Mosby Co., St. Louis.
6. Greenberg A. E., Trussell R. R. and Clesceri L. S. (Eds.), 1985, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed., APHA, Washington, D.C.
7. MacFaddin J., 1985, Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.
8. International Organization for Standardization (ISO), 1993, Draft ISO/DIS 6579.
9. Bureau of Indian Standards IS: 5887 (Part I) 1976, reaffirmed 1986.
10. Bureau of Indian Standards IS: 5887 (Part V) 1976, reaffirmed 1996.
11. Bureau of Indian Standards IS: 5887 (Part III) 1999.

Agar lisina hierro

Agar lisina hierro se recomienda para la diferenciación de organismos entéricos especialmente *Salmonella arizonae* basado en su capacidad de descarboxilar o deaminate lisina y para formar sulfuro de hidrógeno (H2S).

Composición

Ingredientes	Gms/Litro
Péptica compendio de tejido animal	5.000
Extracto de levadura	3.000
Dextrosa	1.000
L-lisina	10.000

Citrato de amonio férrico	0.500
Tiosulfato de sodio	0.040
Púrpura de bromocresol	0.020
Agar	15.000
PH final (a 25°C)	6.7 ± 0.2

Fórmula ajustada, estandarizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento

Direcciones

Suspender 34,56 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta hervir para disolver el medio completamente. Dispense en tubos y esterilizar por tratamiento en autoclave a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos. Enfriar los tubos en posición inclinada para formar tubos inclinados con colillas profunda.

Principio Y Interpretación

Agar lisina de hierro fue desarrollado por Edwards y Fife para detectar la fermentación de la lactosa Salmonellae. Salmonellae es conocida para descarboxilar la lisina rápidamente y producir grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno. Este medio es un medio sensible para la detección de fermentación de la lactosa y las especies de *Salmonella* que no fermentan la lactosa.

Muchas cepas de este grupo fermentan la lactosa muy rápidamente por lo tanto suprimen la producción de H2S en Agar triple azúcar hierro (M021). Así que hay una posibilidad de que los organismos frecuentes en brotes de intoxicación alimentaria puede ser pasado por alto. Thatcher y Clark describen el aislamiento de especies de *Salmonella* de los alimentos de agar selectivo y para inocular en Agar lisina hierro y Triple Azúcar Hierro (M021) juntos. Usando estos dos medios de comunicación con mayor discriminación se puede hacer entre organismos coliformes por ejemplo, *Escherichia* y *Shigella*.

Péptica compendio de tejido animal y extracto de levadura proporcionan nutrientes esenciales. La dextrosa es una fuente de hidratos de carbono fermentables.

Citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio son indicadores de la formación de H2S. Los cultivos que producen sulfuro de hidrógeno ocasionan oscurecimiento del medio debido a la producción de sulfuro ferroso. Descarboxilación de lisina causa una reacción alcalina (de color purpura) para dar el cadaverina amina y los organismos que eliminan una carboxílico de lisina que produce un tope ácido (color amarillo).

Los organismos que desaminan lisina, forma ácido alfa - cetocarboxílico, que reacciona con sal de hierro cerca de la superficie del medio bajo la influencia del oxígeno para formar el

compuesto de color marrón rojizo. El medio es apuñalado hasta la base de la culata y el veteado de inclinación.

Control de calidad

Aparición

Amarillo claro a grisáceo polvo suelto homogénea amarilla

Gelificante

Firme, comparable con un 1.5% en gel de agar

El color y la claridad del medio preparado

De color púrpura, claras a 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

pH

6.50-6.90

Respuesta Cultural

M377: características culturales observados después de una incubación a 35-37 ° C durante 18-24 horas.

ORGANISMO	INÓCULO (CFU)	CRECIMIENTO	EXTREMO	INCLINACIÓN	H2S
Citrobacter freundii ATCC 8090	50-100	exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
Escherichia coli ATCC 25922	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	
Proteus mirabilis ATCC 25933	50-100	exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	color rojo oscuro, desaminación de lisina	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
Salmonella Arizonae ATCC 13314	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimiento de medio

Salmonella Enteritidis ATCC 13076	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimien to de medio
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimien to de medio
Shigella flexneri ATCC 12022	50-100	exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	

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 en la etiqueta.

Referencias

1. Edward P.R. and Fife M.A., 1961, Appl. Microbiol., 9:478.

2. Moeller V., 1954, Acta Pathol. Microbiol. Scand., 355:259.

3. Ewing W.H., Davis B.R. and Edward P.R., 1960, Pub. Hlth. Labs., 18:77.

4. Thatcher F.S. and Clark D.S., 1968, University of Toronto Press, p. 100.

5. Johnson J.G., Kunz L.J., Barron W. and Ewing W.H., 1966, Appl. Microbiol., 14:212.

6. Finegold S.M. and Martin W.J., 1982, Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology, 6th ed., The C.V. Mosby Co., St. Louis.

Agar Base Urea

Agar Base Urea con la adición de urea se recomienda para la detección de producción de ureasa, en particular por los miembros del género Proteus.

Composición

Ingredientes	Gms/Litro
Péptica compendio de tejido animal	1.000
Dextrosa	1.000
Cloruro de sodio	5.000
Fosfato disódico	1.200
Fosfato monopotásico	0.800
Rojo fenol	0.012

Agar	15.000
El pH final (a 25°C)	6.8 ± 0.2

Fórmula ajustado, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento

Direcciones

Suspender 24.01 gramos en 950 ml de agua destilada. Calentar hasta hervir para disolver el medio completamente. Esterilizar por tratamiento en autoclave a 10 libras de presión (115°C) durante 20 minutos. Enfriar a 50°C y añadir asépticamente 50 ml de estéril 40% solución de urea (FD048) y mezclar bien. Distribuir en tubos estériles y permitir fijar en la posición inclinada. No sobrecalentar o recalentar el medio como la urea ya que se descompone con mucha facilidad.

Principio Y Interpretación

Agar de Urea se utiliza para detectar la producción de ureasa. Agar de Urea descrito por Christense detecta actividad de la ureasa por todos los organismos Proteus rápidamente ureasa positiva y también por otros miembros de Enterobacterias que exhiben una ureasa retardada de reacción. Esto se logró mediante:

a) la adición de glucosa al medio

b) disminuyendo la concentración de peptona y

c) la disminución del sistema de taponamiento, como un medio menos tamponada detecta incluso más pequeña cantidad de álcali.

Péptica recopilación de tejidos animales es la fuente de nutrientes esenciales. La dextrosa es la fuente de energía. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio, mientras que los fosfatos sirven para amortiguar el medio. La urea se hidroliza para liberar amoníaco.

Indicador rojo de fenol detecta la alcalinidad generada por el cambio de color visible desde el naranja al rosa.

Incubación prolongada puede causar una reacción alcalina en el medio. Un medio sin urea sirve como control negativo para descartar resultados falsos positivos. Además, todos los medios de ensayo urea se basan en la formación de alcalinidad y por lo que no son específicos para la determinación de la tasa absoluta de la actividad ureasa. La utilización de proteínas puede elevar

el pH a la alcalinidad debido a la hidrólisis de proteínas y el exceso de amino ácidos resultados de liberación en reaccion de falsos positivos

Control de calidad

Aparición

Amarillo claro al polvo homogéneo de color rosa claro de flujo libre

Gelificante

Firme, comparable con un 1.5% en gel de agar

El color y la claridad del medio preparado

Naranja amarillento color formas de gel transparente a ligeramente opalescente en tubos como sesgos

Reacción

La reacción de 2.4% w/v solución acuosa a 25°C. pH: 6.8 ± 0.2

pH

6.60-7.00

Respuesta Cultural

M112: características culturales observados en la adición estéril del 40% Urea (FD048) después de una incubación a 35-37°C durante 18-24 horas

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Ureasa
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	50 – 100	Exuberante	Reacción negativa, ningún cambio.
Escherichia coli ATCC 25922	50 – 100	Exuberante	Reacción negativa, ningún cambio.
Klebsiella pneumonia ATCC 13883	50 – 100	Exuberante	Reacción positiva, color cereza.
Proteus mirabilis ATCC 25933	50 – 100	Exuberante	Reacción positiva, color cereza.
Proteus vulgaris ATCC 13315	50 – 100	Exuberante	Reacción positiva, color cereza.
Salmonella Typhimuirium ATCC 14028	50 – 100	Exuberante	Reacción negativa, ningún cambio.

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 en la etiqueta.

Referencias

1. Christensen W. B., 1946, J. Bacteriol., 52:461.
2. MacFaddin J. F., 2000, Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3rd Ed., Williams and Wilkins, Baltimore. Md.
3. Farmer J. J. III, McWhorter A. C., Huntley G. A., Catignani J., J. Clin. Microbiol. 1975: 1 (1): 106-107.
4. MacFaddin J. F, 1985, Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, Md.

OXIDASA

Tiras de diagnóstico Hardy OxiStrips oxidasa se utilizan para la detección de la actividad de la citocromo oxidasa en las bacterias.

RESUMEN

Citocromo contiene Organismos que producen una enzima intracelular oxidasa. Esta enzima oxidasa cataliza la oxidación de citocromo. 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 como parte de su cadena respiratoria no se oxidan el reactivo, dejando incoloro dentro de los límites de la prueba, y son oxidasa negativo.

Tiras OxiStrips ™ oxidasa están listos para usar, son tiras de prueba con un plástico conveniente y una manija para que el usuario puede evitar el contacto de la piel con el área de reacción.

FÓRMULA DE REACTIVOS

Tiras OxiStrips ™ oxidasa se impregnan con N, N, N ', N'-tetrametil dihidrocloruro-p-fenilendiamina, en una solución conservante.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Almacenamiento:. Los productos no deben utilizarse si hay signos de deterioro o si la fecha de vencimiento haya expirado. Tienda OxiStrips ™ y OxiSticks ™ con un desecante en el vial en todo momento.

La fecha de caducidad se aplica al producto en su embalaje intacto cuando se almacena según las indicaciones

Este producto tiene la siguiente vida útil de la fecha de fabricación:

365 dias:	Z93	Tiras OxiStrips ™ oxidasa

PRECAUCIONES

Este producto puede contener componentes de origen animal. Certificado de conocimientos sobre el origen y / o el estado sanitario de los animales no garantiza la ausencia de agentes patógenos transmisibles. Por lo tanto, se recomienda que estos productos pueden tratar como potencialmente infecciosos y manipularse siguiendo las precauciones universales de sangre habituales. No ingerir, inhalar, o permitir que entre en contacto con la piel.

Este producto es sólo para uso diagnóstico in vitro y es para ser utilizado sólo por personal de laboratorio adecuadamente formados y cualificados. Observe las precauciones de seguridad y utilizar técnicas asépticas.

Para obtener información adicional con respecto a las precauciones específicas para la prevención de la transmisión de todos los agentes infecciosos de instrumentos y materiales de laboratorio, y las recomendaciones para la gestión de la exposición a las enfermedades infecciosas, consulte CLSI documento M-29: Protección de los trabajadores de laboratorios de origen ocupacional Infecciones : Pauta Aprobado.

Esterilizar todos los residuos de riesgo biológico antes de su eliminación.

Consulte el documento "Precauciones durante el uso de medios" en la página web Hardy de diagnóstico Documento Técnico para más información.

Consulte las instrucciones de SDS de la búsqueda en el sitio web Hardy diagnósticos para obtener más información.

PROCEDIMIENTO

Recoleccion de muestras: Este producto no está destinado para el aislamiento primario de muestras de pacientes. Este producto se usa en conjunción con otras pruebas bioquímicas para identificar cultivos de organismos aislados.

Modo de empleo:

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 un ansa 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.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La aparición de un color azul/morado dentro de los 30 segundos indica una prueba positiva.

Importante: Cualquier color que aparece después de este tiempo debe ser tomado en cuenta.

LIMITACIONES

La prueba de oxidasa se puede utilizar en la identificación presuntiva de *Neisseria spp*. y en la diferenciación e identificación de bacilos gram-negativos. Todos los organismos oxidasa-positivos deben ser examinados por tinción de Gram para determinar la morfología celular y la reacción gramo. Se recomienda que las pruebas de espectrometría de bioquímicos, inmunológicos, molecular, o la masa se lleven a cabo en colonias del cultivo puro para la identificación completa.

Reacciones oxidasa de bacilos gram-negativos se deben determinar en colonias obtenidas a partir de medios no selectivos y no diferenciales para asegurar resultados válidos.

La mayoría de *Haemophilus spp.* son oxidasa-positivo. Tiras o reactivos de prueba oxidasa menos sensibles pueden dar resultados falsos negativos. Consultar referencia que figura para más información.

Débilmente organismos oxidasa-positivos, tales como *Pasteurella multocida*, puede tomar más tiempo para mostrar una reacción positiva en las tiras reactivas.

Se recomienda el uso de colonias que son de 18-24 horas. Colonias mayores pueden producir reacciones débiles.

La prueba de oxidasa se debe realizar en los aislamientos por encima de 15-30°C.

Cualquier desarrollo del color que aparece después de 30 segundos de la inoculación debe ser tenida en cuenta.

Materiales necesarios no incluidos

Suministros microbiológicos estándar y equipos tales como bucles, pipetas, incubadoras, y los incineradores, etc., así como reactivos bioquímicos y serológicos, no se proporcionan.

Control de Calidad

Los siguientes organismos son habitualmente utilizados para la prueba de diagnóstico de Hardy.

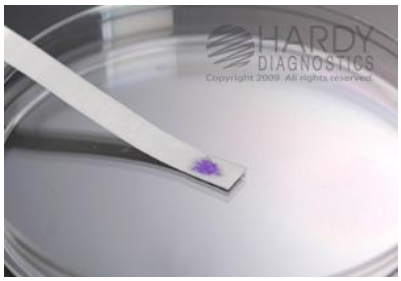
Microorganismos	Reacción
Pseudomonas aeruginosa ATCC ® 27853	Oxidasa-positivo; de color azul / morado se desarrolla dentro de 10-20 segundo
Escherichia coli ATCC ® 25922	Oxidase-negative; no color

USUARIO CONTROL DE CALIDAD

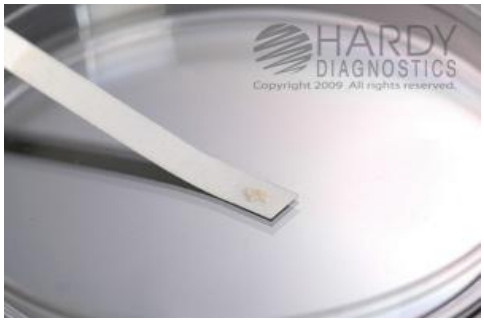
Se recomienda que cada nuevo lote o envío de reactivo de la prueba con controles positivos y negativos conocidos.

APARIENCIA FÍSICA

Tiras OxiStrips ™ oxidasa son las tiras de prueba de reactivos con un mango de plástico, y de color blanco.



Pseudomonas aeruginosa (ATCC ® 27853) aplicada a un OxiStrip ™ (Cat. N. Z93). El desarrollo de un color azul / morado dentro de 10-20 segundos era indicativo de una reacción positiva a la oxidasa.



Escherichia coli (ATCC 25922 ®) aplicado a un OxiStrip ™ (Cat. N. Z93). Sin el desarrollo de un color azul / morado dentro de 10-20 segundos era indicativo de una reacción oxidasa negativo.

Referencias

1. Versalovic, J., et al. *Manual of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

2. Tille, P.M., et al. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology,* C.V. Mosby Company, St. Louis, MO.

3. *Commission on Laboratory Accreditation , Laboratory Accreditation Program Microbiology Checklist.* College of American Pathologists. Rev. 9/30/2004.

4. Koneman, E.W., et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.

5. MacFaddin, J.F. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria,* , 3rd ed. Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

6. Isenberg, H.D. *Clinical Microbiology Procedures Handbook,* Vol. I, II & III. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

7. Holt, J.G. and N.R. Krieg. 1984. *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology* , Vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

8. Centers for Medicare and Medicaid, *Appendix C, Survey Procedures and Interpretive Guidelines for Laboratories and Laboratory Services* . Subpart K - Quality System for Non-Waived Testing. 493;1200-1265

ANEXO NRO.13

BACTERIA	TSI	GAS	H_2S	Cit*	Urea	Mov**	Indol	Lis***
Escherichia coli	a/a	+	-	-	-	+	+	+
Enterobacter aerogenes	a/a	++	-	+	-	+	-	+
Enterobacter cloacae	a/a	++	-	+	+/-	+	-	-
Klebsiella pnemoniae	a/a	++	-	+	+	-	-	+
Klebsiella oxytoca	a/a	++	-	+	+	-	+	+
Proteus vulgaris	k/a	+/-	+	-/+	++	+	+	-
Proteus mirabilis	k/a	+	+	+/-	++	+	-	-
Proteus penneri	k/a	+/-	-	+/-	++	+	-	-
Citrobacter freundii	a/a o k/a	+	+	+	+/-	+	-	-
Citrobacter koseri	k/a	+	-	+	+/-	+	+	-
Serratia marcencens	k/a	+	-	+	-	+	-	+
Pseudomona aeruginosa	k/k	-	-	+	-	+	-	
Morganella morganii	k/a	+	-	-	++	+	+	-
Pantoea aglomerans	k/a	-/+	-	+/-	-/+	+	-/+	-

Salmonella spp	k/a	+	+	+	-	+	-	+
Salmonella tyohi	k/a	-	+	-	-	+	-	+
Salmonella pararyphi A	k/a	-	-	-	-	+	-	-
Providencia rettegeri	k/a	-	-	+	++	+	+	-
Edwarsiella tarda	k/a	+	+	-	-	+	+	+
Alkalescens dispar	k/a	-	-	-	-	-	+	-/+

*Citrato **Movilidad ***Lisina

https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&pg=PA40&lpg=PA40&dq=colonias+de+proteus+mirabilis+en+macconkey&source=bl&ots=5OIf225PjD&sig=Msb5gzcFAHdYU1tHx2zoI_MgD-Y&hl=es&sa=X&ei=WlNzVeeVCcmngwTDmIKgCA&ved=0CD8Q6AEwCA#v=onepage&q=colonias%20de%20proteus%20mirabilis%20en%20macconkey&f=false (Koneman 2008)

ANEXO NRO.14

Caldo Mueller Hinton

Uso previsto

Caldo Mueller Hinton es un medio de propósito general que puede ser utilizado en el cultivo de una amplia variedad de exigentes y no exigentes microorganismos. Este medio no se complementa con iones de calcio o magnesio.

Resumen y explicación

La formulación Mueller Hinton se desarrolló originalmente como una media de agar simple, transparente para el cultivo de patógenos Neisseria. Se desarrollaron otros medios de comunicación que sustituyó el uso de Agar de Mueller Hinton para el cultivo de patógenos Neisseria, pero se convirtió ampliamente utilizado en la determinación de resistencia a la sulfonamida de gonococos y otros organismos. Ahora se utiliza como un medio de prueba para el examen de susceptibilidad antimicrobiana.

Caldo de Mueller Hinton, de cationes no completos, tiene una fórmula similar a la del medio sólido, pero sin agar, para usar cuando se prefiere el medio fluido. Mientras que puede ser utilizado para el cultivo general de bacterias, por coherencia,

Caldo de Mueller Hinton de cationes completos ahora se recomienda para las pruebas de sensibilidad de todas las especies de bacteria anaerobias e aerobias facultativas más comúnmente encontradas. El caldo de Mueller Hinton II es catiónico ajustado, las concentraciones de calcio y de magnesio recomienda ion M7.2 en la norma CLSI.

Difco ™ Mueller Hinton Broth, de cationes no completos, se formula tener un bajo contenido de timina y timidina. Se puede utilizar para la dilución de caldo de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, siempre como las concentraciones de calcio y de ión magnesio se ajustan de acuerdo con M7.2 estándar CLSI

BBL ™ caldo Mueller Hinton, de cationes no completos, no ha sido formulado para tener un bajo contenido de timina y timidina. Puede ser utilizado para el cultivo general de bacterias.

Principios del procedimiento

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.

Especificaciones de la identidad

Difco ™ Caldo Mueller Hinton

Apariencia Deshidratada: Beige claro, de flujo libre, homogénea con algunas manchas oscuras.

Solución: La solución de 2.1 %, soluble en agua purificada a ebullición. La solución es de color ámbar muy claro, puede tener un ligero precipitado.

Apariencia Preparado: ámbar muy claro, claro, puede tener un ligero precipitar.

La reacción de 2.1 %

Solución a 25°C: pH 7,3 ± 0,1

Calcio: 2.9 - 5.9 mg/L

Magnesio: 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.

ORGANISMO	ATCC
Enterococcus faecalis	29212
Escherichia coli	25922
Pseudomonas aeruginosa	27853
Staphylococcus aureus	29213

Fórmulas

Fórmula aproximada por litro

Polvo de extracto de carne.....2.0 g

Ácido Recopilación de caseína..... 17.5 g

Almidón .....1.5 g

Modo de Preparación del Producto Deshidratado.

1. Suspender el polvo en 1 litro de agua purificada:

Difco ™ Mueller Hinton Broth - 21 g;

Mezclar bien.

2. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para que se disuelva completamente el polvo.

3. Autoclave a 116-121°C durante 10-15 minutos (consulte producto etiqueta). No sobrecaliente.

4. Compruebe el preparado del medio para asegurar el pH final es de 7.3 ± 0.1 a 25°C .

5. Las muestras de ensayo del producto acabado para el rendimiento utilizando cultivos de control típicos estables.

Resultados Esperados

Crecimiento en medio del caldo indica por la presencia de turbidez en comparación con un control sin inocular.

Referencias

1. Mueller and Hinton. 1941. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *48*:330.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Approved Standard: M7-A7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. CLSI, Wayne, Pa.
3. Murray, Baron, Jorgensen, Landry and Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Forbes, Sahm and Weissfeld. 2007. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis, Mo.
5. Isenberg and Garcia (ed.). 2004 (update, 2007). Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington , D.C.

ANEXO NRO.15

La CIM es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo.

La técnica de la macrodilución se la realizó en tubos de ensayo de 13 x 100 mm estériles.

PROCEDIMIENTO

1. Se realizaron cálculos mediante los cuales se utilizaron 12 tubos más los tubos control positivo y negativo, con diferentes concentraciones de antibiótico (0,5 – 1 – 2 – 4 - 8 – 16 – 32 – 64 – 128 – 256 -512 – 1024 µg/mL)
2. Solución madre: se colocó en un tubo 6090 µL de caldo para diluir el antibiótico más 160 µL de amikacina.
3. Preparación de las diluciones: en el primer tubo (1024 µg/mL) de 2 mL de caldo se le se le extrajo 640 µL de caldo y se complementó con 640 µL de la solución madre homogenizando

bien el tubo, del primer tubo se extrajo 1 mL de la solución y se lo colocó al segundo tubo(512 µg/mL) homogenizándolo de este se extrajo 1 mL de la solución y se colocó al tercer tubo (256 µg/mL) homogenizando la solución y así sucesivamente hasta el tubo doceavo tubo donde se elimina 1 mL de la solución.

4. Preparación del inóculo: Se limpia la base del tubo de ensayo con 4 ml de solución salina estéril con una gasa estéril, se lo pesa y este debe encontrarse en cero, se procede a coger una colonia de la cepa de *Escherichia coli* ajustando el inoculo a una turbidez de 0,5 unidades Mc Farland. Se coloca a cada tubo 1 mL del inóculo.
5. Se utilizó 2 controles uno positivo y otro negativo: control positivo 1 mL de caldo y 1 mL del inóculo sin antibiótico; control negativo solo caldo. Se incubó a 35-37 ºC por 24 horas.
6. Se comprobó la CMI de Amikacina realizando la siembra de los tubos que no presentaban turbidez en agar macConkey y se incubó a 35-37ºC por 24 horas. (CLSI, 2012 & Alvarez M., Boquet M. & Fez M. 2002)

ANEXO NRO.16

FECHA: _____

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

REGISTRO DE DATOS DEL PACIENTE

Nro.	Nombre y Apellido	Edad	C.I. Nro.	Medicamento	Observaciones

ANEXO NRO.17

		Medios de crecimiento				Pruebas Bioquímicas para bacterias Gramnegativas									Microorganismo aislado
Nro.	Nombre y Apellido	Agar MacConkey	Agar Sangre	UFC/mL	GRAM	Citrato	SIM-INDOL			Lisina	TSI		Urea	Oxidasa	
							Motilidad	Indol	SH2						

FECHA: _____

ANEXO NRO.18

Resultados de la concentración mínima inhibitoria de amikacina obtenidos por el método de Macrodilución frente a *Escherichia coli*														
Nro.	Nombre y Apellido		CMI											
		Tubos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
		CMI	1024 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL
		R1												
		R2												
		R3												
		R1												
		R2												
		R3												

FECHA: _____

ANEXO NRO. 19

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA FRENTE A *Escherichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N°-7

Infección de Vías Urinarias: es la entrada y multiplicación de microorganismos en el interior o en la superficie del ser humano, existiendo distintos grados de relación entre el huésped y el microorganismo: colonización, infección inaparente y enfermedad infecciosa.

Etiología:

a) Agentes comunes: *Escherichia coli* (hasta 90% de los casos), *Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas, Serratia, Cándida.*

b) Agentes no comunes: *Staphylococcus*.

Raros: *Nocardia*, *Brucella*, adenovirus y Torulopsis.

***Escherichia coli*:** Es una bacteria Gramnegativa cilíndrica con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas.

Se trata de una enterobacteria móvil, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, normalmente fermenta la lactosa, produce indol a partir del triptófano siendo negativa la reacción de la ureasa y fenilalanina desaminasa.

Sensibilidad a los antimicrobianos

Las cepas de *E. coli*, como las otras bacterias Gramnegativas, son intrínsicamente resistentes a los antimicrobianos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico. Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones urinarias causadas por cepas de *E. coli* son la amoxicilina, amoxicilina - ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas.

AMINOGLUCÒSIDOS

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que desempeñan un papel relevante en el tratamiento de las infecciones graves causadas por bacterias gramnegativas aerobias sobretodo *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas.*

Mecanismos de Acción

Todos los aminoglucósidos acceden al interior bacteriano mediante mecanismos de transporte dependientes de energía, que solo se producen en condiciones aerobias, y alteran la síntesis proteica, bacteriana en los ribosomas. Esta acción no puede explicar por si sola el efecto bactericida, pues otros inhibidores de la síntesis proteica son solo bacteriostáticos. Por ello se ha propuesto que otros mecanismos principalmente alteraciones en la composición de la membrana bacteriana y, en menor medida, modificaciones en el metabolismo y la respiración bacteriana.

Resistencia Microbiana

Las bacterias pueden ser resistentes a los aminoglucósidos, por que pueden producir enzimas que inactivan al antibiótico, por escasa afinidad del compuesto al ribosoma bacteriano, o por incapacidad del antibiótico para penetrar al interior de la bacteria.

AMIKACINA

Es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, semisintéticos, derivado de la kanamicina, de acción bactericida. Se une a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos produciendo un complejo de iniciación 70S de carácter no funcional, de forma que se interfiere la síntesis proteica.

Urocultivo

El diagnóstico del laboratorio para la identificación de una ITU se realiza mediante un urocultivo, el cual consiste en sembrar mediante el método de asa calibrada por el sistema de agotamiento la primera muestra de orina de la mañana del paciente en estudio para la determinación y cuantificación de gérmenes patógenos.

Tinción de GRAM

La tinción de GRAM es una de las pruebas más importantes utilizada para la identificación bacteriana.

Pruebas Bioquímicas para bacterias GRAMNEGATIVAS

Permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas.

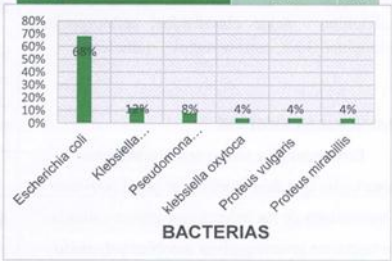
Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Definición

La concentración mínima inhibitoria es aquella cantidad mínima del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. (Romero. 2007)

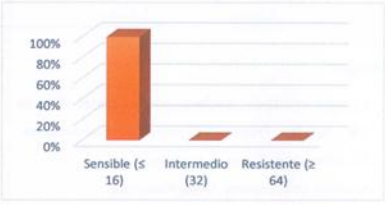
Resultados:

BACTERIAS	FRECUENCIA	%
Escherichia coli	34	68
Klebsiella pneumoniae	6	12
Pseudomona aeraginosa	4	8
klebsiella oxytoca	2	4
Proteus vulgaris	2	4
Proteus mirabillis	2	4
TOTAL	50	100



CMI de Amikacina µg/ml	Frecuencia	%
Sensible (≤ 16)	34	100%
Intermedio (32)	0	0%
Resistente (≥ 64)	0	0%
TOTAL	34	100%

Resultados de la CMI



ANEXO NRO. 20

HOSPITAL BÁSICO HB 7B.I 7 B I "LOJA"

El Ecuador ha sido, es y será
"País Amazónico"

Loja, 05 de Septiembre del 2015.

EL SUSCRITO DEL DIRECTOR DEL HB.7 BI "LOJA" a petición verbal de la parte interesada,

C E R T I F I C A:

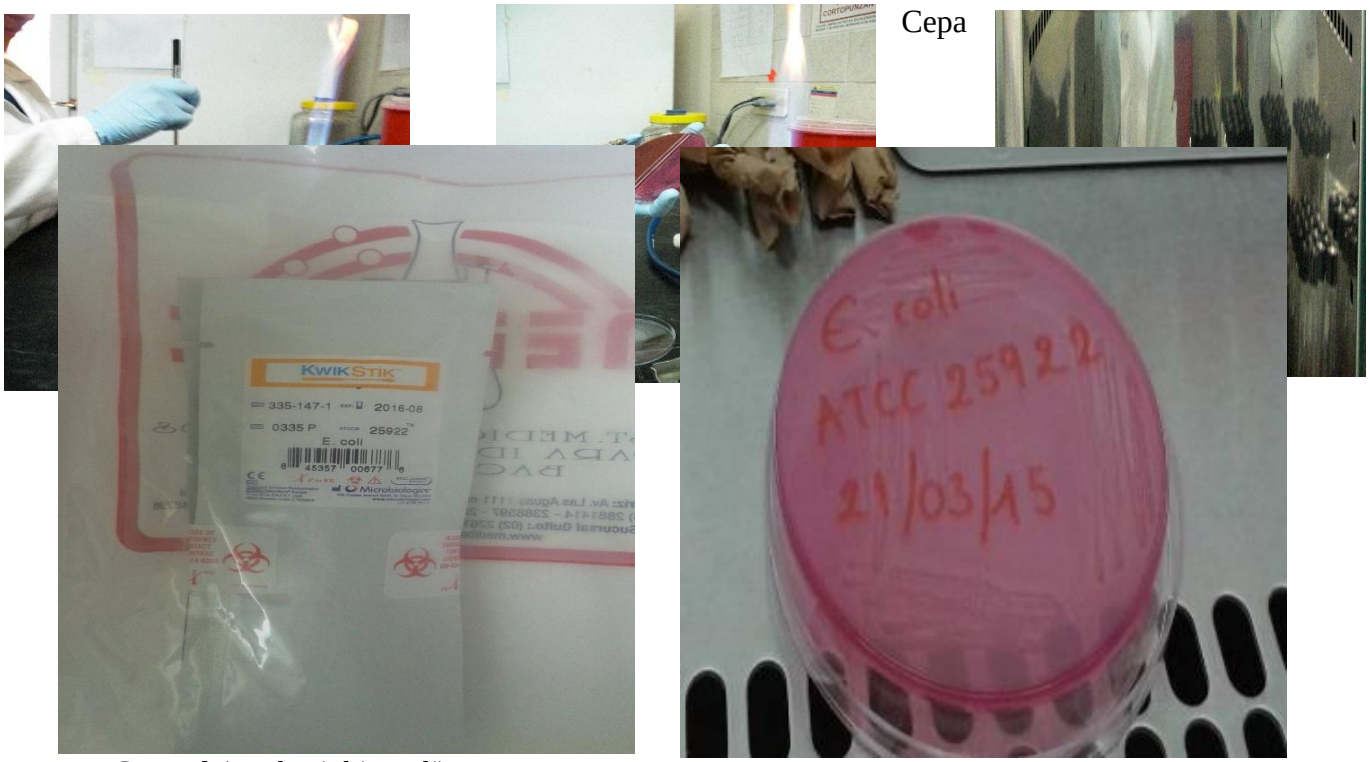
Que la SRTA ANA GABRIELA CASTILLO GONZAGA, con CC. No. 1105135030 Egresa de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humano de la Universidad Nacional de Loja el día Miércoles 29 de Julio del 2015 realizó la difusión de los resultados de su tesis denominada "**CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMIKACINA FRENTE *A Eschirichia coli* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N° -7",** al personal de salud del Hospital Básico de la Brigada de Infantería N° 7 "LOJA", a médicos, enfermeras y al personal del laboratorio Clínico.

Es todo cuanto puedo certificar, pudiendo la interesada, hacer uso del presente, en cualquier fin lícito que creyere conveniente.

EDISON E. MORENO P.
TCRN. DE SND.
DIRECTOR DEL HB.7 BI "LOJA"

HOSPITAL BÁSICO 7 BI LOJA DIRECTOR

ANEXO NRO. 21



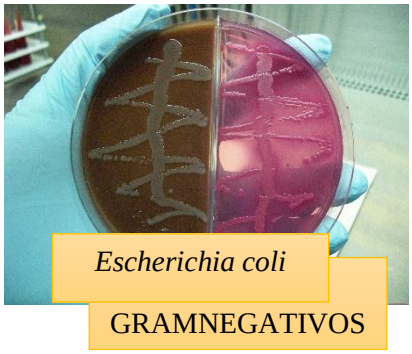
Cepa

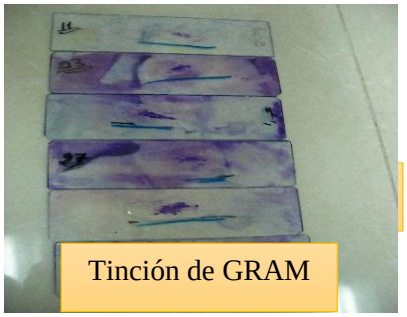
Control (*Escherichia coli*)

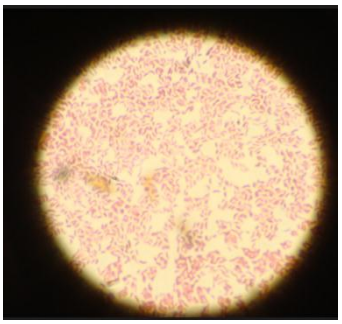
Muestras de Orina

Flameada del ansa

Incubación 24-48h.

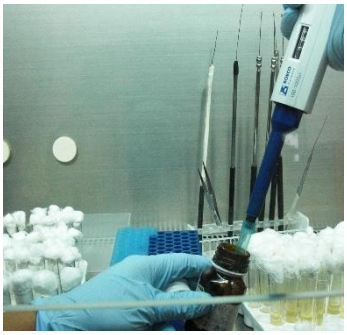


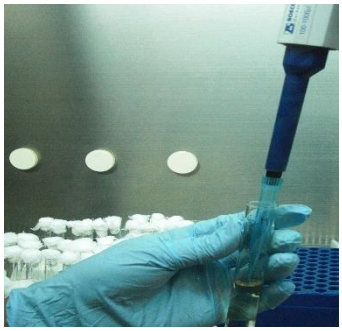




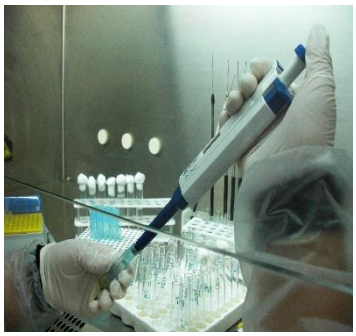
- Concentración mínima inhibitoria de amikacina frente a *Escherichia coli.*

e la
lre

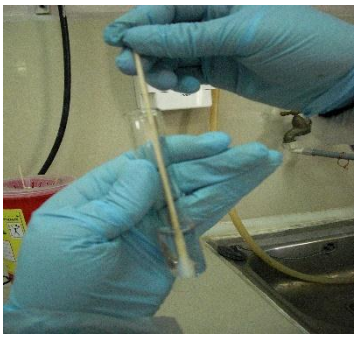


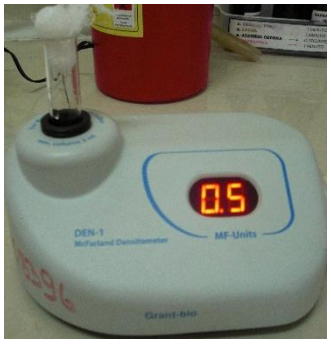


DRE



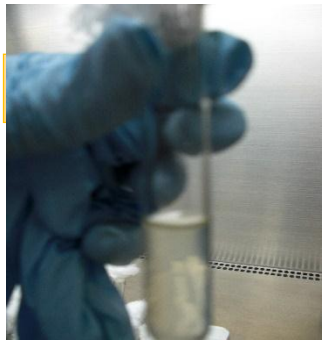
Diluciones

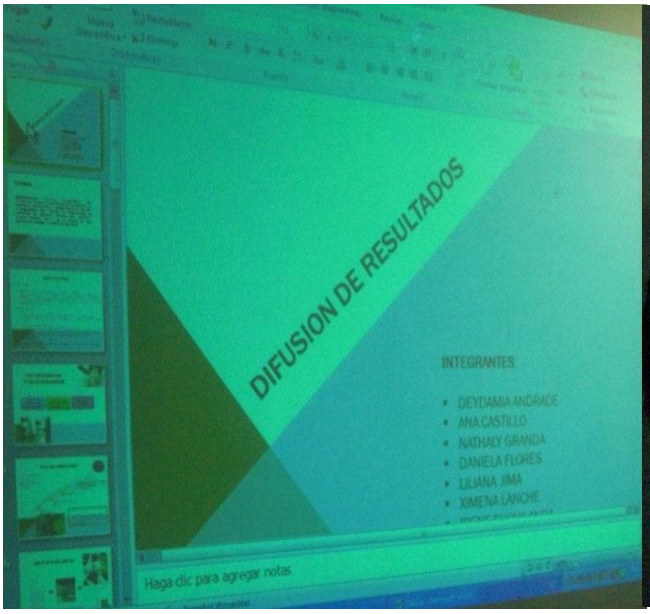


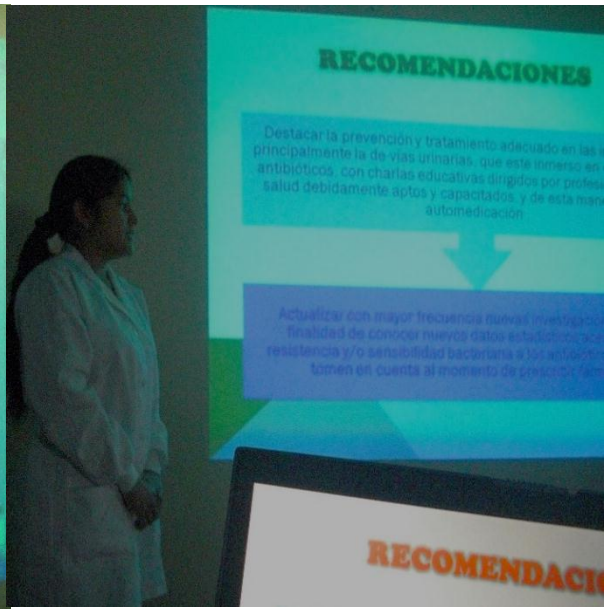


Preparación del inóculo

a coli







Difusión de los resultados

ÍNDICE

Contenido

CERTIFICACIÓN: ii

AUTORIA iii

AUTORIZACIÓN iv

AGRADECIMIENTO v

DEDICATORIA vi

TÍTULO: 1

RESUMEN 2

SUMMARY 3

1. INTRODUCCIÓN 4

2. REVISIÓN DE LITERATURA 6

2.1 Infección de vías urinarias 7

2.1.2 Definición 7

2.1.3 Epidemiología 7

2.1.4 Etiología 7

2.1.5 Patogenia 7

2.1.6 Fisiopatología 8

2.2 Enterobacterias 8

2.2.3 Características típicas y distintivas de las enterobacterias 9

2.3 *Escherichia coli* 9
2.3.1 Estructura antigénica 9
2.3.2 Poder patógeno 9
2.3.3 Sensibilidad a los antimicrobianos 10
2.4 AMINOGLUCÓSIDOS 11
2.4.1 Clasificación y Estructura Química 11
2.4.2 Mecanismos de Acción 11
2.4.3 Resistencia Microbiana 12
2.5 AMIKACINA 13
2.5.1 Gram-negativos 13
2.5.2 Gram-positivos 14
2.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y PRUEBAS DEL LABORATORIO 14
2.6.1 Métodos de recolección para la muestra de orina 14
2.7 Pruebas del Laboratorio 14
2.7.1 Urocultivo 14
2.7.2 Tinción de GRAM 15
2.7.3 Pruebas Bioquímicas para bacterias GRAMNEGATIVAS 16
2.8 Concentración mínima inhibitoria (CMI) 17
2.8.1 Definición 17
2.8.2 Utilidad 17
2.9 Técnicas para la determinación de la CMI 17
2.9.1 Método de Macrodilución 17
2.9.2 Método de Microdilución 18
2.9.3 Epsilon-Test 18
2.10 Tratamiento 18
3. METODOLOGIA 19
3.1 TIPO DE ESTUDIO 19
3.2 ÁREA DE ESTUDIO 19
3.3 PERIODO DE ESTUDIO 20
3.4 POBLACIÓN 20
3.5 MUESTRA 20
3.6 Criterios de inclusión y exclusión 20
3.6.1 Criterios de Inclusión: 20
3.6.2 Criterios de Exclusión: 20
3.7 Métodos, técnicas y procedimientos de la investigación 20

3.7.1 Desarrollo de la fase pre-analítica 21
3.7.2 Desarrollo de la fase analítica 21
3.7.3 Desarrollo de la fase post-analítica 22
3.8 Plan de tabulación y análisis de los resultados 22
4. RESULTADOS 22
5. DISCUSIÓN 25
6. CONCLUSIONES: 29
7. RECOMENDACIONES: 30
8. BIBLIOGRAFÍA 31
9. ANEXOS 35
ÍNDICE 89