



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

## **TÍTULO**

**“AGENTES BACTERIANOS CAUSANTES DE  
INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN  
MUJERES QUE ASISTEN AL LABORATORIO  
CLINICO MEDILAB-LOJA”**

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN  
LABORATORIO CLÍNICO

**AUTORA:**

*Sofía Janneth Soria Jumbo*

**DIRECTORA:**

*Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Mg. Sc.*

**LOJA - ECUADOR  
2018**

## CERTIFICACIÓN

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Mg. Sc.

### **DIRECTORA DE TESIS**

#### **CERTIFICO:**

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del trabajo investigativo titulado: “**AGENTES BACTERIANOS CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN MUJERES QUE ASISTEN AL LABORATORIO CLINICO MEDILAB - LOJA**” de autoría de **SOFIA JANNETH SORIA JUMBO**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección y en el marco del reglamento del régimen académico de la Universidad Nacional de Loja vigente.

Loja, 19 de Octubre del 2018

Atentamente,

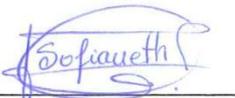
  
Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Mg. Sc.

**DIRECTORA DE TESIS**

## AUTORÍA

Yo, **SOFIA JANNETH SORIA JUMBO** con Cl. 1106022187 declaro ser autor del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional - Biblioteca Virtual.

*Firma:* 

*Autora:* **Sofía Janneth Soria Jumbo**

*Cédula:* 1106022187

*Fecha:* Loja, 19 de Octubre del 2018

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Sofía Janneth Soria Jumbo declaro ser autora de la tesis titulada: AGENTES BACTERIANOS CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN MUJERES QUE ASISTEN AL LABORATORIO CLÍNICO MEDILAB – LOJA, como requisito para optar el grado de Licenciada en Laboratorio Clínico: autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Digital Institucional de la siguiente manera:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en RDL, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad. La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización en la ciudad de Loja, a los 19 días del mes de octubre del dos mil dieciocho, firma la autora.

Firma: 

Autora: Sofía Janneth Soria Jumbo

Cedula: 1106022187

Dirección: La Pradera

E-mail: mirlysgold@hotmail.com

Celular: 0968845455

### DATOS COMPLEMENTARIOS

**Directora de tesis:** Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Mg.Sc.

**Tribunal de grado:**

**Presidenta de grado:** Lic. Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. Marlon Rolando Bravo Bonilla, Mg. Sc.

## **DEDICATORIA**

La presente tesis la dedico a Dios como parte fundamental, quien gracias a su inmenso amor y misericordia me ha dado la sabiduría y fortaleza para forjar un camino hacia el lado triunfal de la vida.

A mis padres, Rafael Soria y Janeth Jumbo, por el apoyo incondicional que día tras día me han dado, especialmente a mi madre por quien, he tenido la valentía que muchas veces necesitaba para seguir en pie de lucha cumpliendo esta meta propuesta que ahora se está haciendo realidad.

A mi esposo Cristian Jiménez por su amor y ayuda diaria, también a mis hijos Christiano Rafael y Christopher Samir, quienes me dieron fuerzas y amor día tras día para levantarme y terminar con todas mis metas propuestas para el bienestar de ellos más que la mía.

Gracias a todos, su presencia es muy valiosa para mí. Los amo

**Sofía Janneth**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco, profundamente, a la ilustre Universidad Nacional de Loja que me acogió dentro de sus aulas en las cuales me formé científica y humanísticamente durante cuatro años, terminando con éxito mi carrera universitaria.

Mi agradecimiento al Área de la Salud Humana y su carrera de Laboratorio Clínico por permitirme alcanzar mis metas personales y culminar mis estudios superiores.

A mi director de tesis, Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Mg. Sc., quien con su experiencia y firme asesoramiento supo guiarme en la realización, dirección y revisión del trabajo aquí expuesto. Así mismo al Laboratorio Clínico “MEDILAB”, que colaboró en el desarrollo de esta tesis.

Y sobre todo agradezco a mi familia, pilar fundamental de mi existencia, que me brindó su apoyo constante y me dio la oportunidad de realizarme profesionalmente

**Sofía Janneth**

## ÍNDICE

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción .....	4
4. Revisión de Literatura .....	6
4.1 Infecciones urinarias .....	6
4.2 Bacterias.....	7
4.3 Microorganismos patógenos de vías urinarias.....	10
4.4 Diagnóstico bacteriológico .....	16
4.5 Condiciones pre-analíticas .....	17
4.6 Fase Analítica .....	20
4.7 Identificación bacteriana.....	27
4.8 Control de Calidad .....	30
5. Materiales y Métodos .....	34
5.1. Tipo de estudio.....	34
5.2. Área de estudio .....	34
5.3. Universo.....	34
5.4. Muestra.....	34
5.5. Métodos, técnicas y procedimientos .....	36
5.6. Instrumentos de recolección de datos .....	37
6. Resultados .....	38
7. Discusión.....	44
8. Conclusiones .....	47
9. Recomendaciones.....	48
10. Bibliografía.....	49
11. Anexos.....	52

## **1. Título**

Agentes bacterianos causantes de infección de vías urinarias en mujeres usuarias del  
Laboratorio Clínico MEDILAB – Loja.

## 2. Resumen

Las infecciones de vías urinarias consisten en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del trayecto del tracto urinario. Convirtiéndose en uno de los problemas más comunes de la atención médica en mujeres de edad fértil, siendo el patógeno más frecuente aislado *Escherichia coli* con hasta 80% de casos en la mayoría de las investigaciones realizadas, seguidas de otras especies: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Pigrau, 2013). La presente investigación de tipo descriptivo y de corte transversal denominada “Agentes bacterianos causantes de infección de vías urinarias en mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB – Loja” durante el periodo Marzo a Junio del 2018, en un total de 118 mujeres; para su realización se tomó la muestra con crecimiento previamente sembrada en agar sangre y se las transportó en tubos Stuart al Centro de Diagnóstico Médico de la FSH de la UNL para su confirmación bacteriana. Del total de muestras en un 41% existió crecimiento bacteriano; se determinó que el 100% de casos obtenidos fueron gramnegativos. El 74% de bacterias fue *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella pneumoniae* 8%, presentándose con mayor frecuencia en mujeres adultas y adultas mayores con un 57% y 28% respectivamente. *Escherichia coli* fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia en todos los grupos etarios. El 91% de muestras fueron muestras ambulatorias y el 9% de hospitalización.

**PALABRAS CLAVE:** Agentes bacterianos, Infección de vías urinarias, Urocultivo.

## Abstract

Urinary tract infections consist of microbial colonization and multiplication habitually bacterial, along the way through the urinary tract. Becoming one of the most common problems of medical care for women of childbearing age, being the most frequent pathogen isolated *Escherichia coli* with up to 80% of cases in most of the investigations carried out, followed by other species: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* (Pigrau, 2013). The present investigation of a descriptive and cross-sectional type called "Bacterial agents causing urinary tract infection in women attending Laboratorio Clínico MEDILAB – Loja" during the period March to June 2018, in a total of 118 women; for its realization the samples were taken with previously seeded growth on blood agar and they were transported in Stuart tubes to the Medical Diagnostic Center of the FSL of the UNL for bacterial confirmation. Of the total samples in a 41% there was bacterial growth; It was determined that 100% of cases obtained were gram-negative. 74% of bacteria were *Escherichia coli*, followed by *Klebsiella pneumoniae* 8%, appearing more frequently in adult women and older adults with 57% and 28% respectively. *Escherichia coli* were the microorganism isolated most frequently in all age groups. 91% of samples were ambulatory samples and 9% of hospitalization.

**KEY WORDS:** Bacterial agents, Urinary tract infection, urine culture.

### 3. Introducción

Las infecciones de vías urinarias consisten en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del trayecto del tracto urinario, constituyendo una de las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial. Afectan principalmente a las mujeres, por las condiciones anatómicas, básicamente la menor longitud de la uretra y su proximidad al ano, así mismo otros factores como la gestación, anomalías anatómicas congénitas, cálculos del tracto urinario, trastornos neurológicos, diabetes mellitus, multiparidad, prolapso de órganos pélvicos y la actividad sexual (Mensa, 2012); se estima que entre 40 y 50% de las mujeres presenta ITU en algún momento de su vida, 11% tendrá al menos una infección por año siendo más frecuente en las mujeres con edad entre 20 y 56 años (Orrego, Mejia, & Cadorna., 2014)

Las infecciones del tracto urinario son una de las infecciones bacterianas más comunes en los seres humanos. En todo el mundo, 150 millones de personas son diagnosticadas con infecciones urinarias, lo que resulta en USD 6 mil millones de gastos en atención médica, además de convertirse en las infecciones más comunes encontradas por los médicos en los países en desarrollo (Mulugeta & Bayeh, 2014).

La mayoría de las infecciones de vías urinarias son causadas por bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Serratia spp*, y bacterias Gram-positivas tales como *Enterococcus spp* y *Staphylococcus spp* (Mulugeta & Bayeh, 2014).

Las infecciones de vías urinarias es uno de los problemas más comunes de la atención médica en pacientes de 20 a 50 años, siendo en las mujeres 50 veces más frecuente que en los hombres. Las bacterias causantes provienen del tracto intestinal en la mayoría de los casos, por consiguiente los gérmenes más frecuentes son las Enterobacterias, y dentro de ellas la principal, *Escherichia coli* ocupando un 80% de casos en todas las edades (Ojeda, 2013).

En lo referente América, datos de Estados Unidos indican que en el año 2013 estas infecciones ocuparon entre las causas de morbilidad el primer lugar, teniendo como agente causal *Escherichia coli* en más del 80%, de los casos; afectando a mujeres entre 18 a 40 años con vida sexual activa (Villamar & Cadena, 2014). Según el Boletín Epidemiológico

de la Secretaría de Salud de México 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 en cambio 749,755 (23%) se presentaron en hombres (Molina & Manjarrez, 2015).

A nivel nacional en nuestro país Ecuador, según datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador en el año 2009 las infecciones del tracto urinario son un problema de salud que se ubica en el séptimo puesto con relación a las diez principales causas de morbi-mortalidad con una tasa del 13.6% de casos en comparación con el resto de enfermedades (INEC, 2013). En la provincia de Loja en el año 2014 se reportaron 2.387 casos de mujeres embarazadas con infecciones de vías urinarias (MSP, 2016).

Las infecciones de vías urinarias están ubicadas en décimo quinto lugar en las líneas de investigación según el Ministerio de Salud Pública (MSP M. d., 2013), y de acuerdo la carrera de Laboratorio Clínico a la línea de investigación de enfermedades infecciosas.

La presente investigación denominada “Agentes bacterianos causantes de infección de vías urinarias en mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB – Loja” tiene como propósito conocer los distintos tipos de agentes bacterianos presentes comúnmente en las infecciones de vías urinarias en mujeres que asisten al laboratorio de MEDILAB -Loja. Representando no solo un problema clínico, sino que tienen además una gran repercusión económica por los costes sanitarios que representan.

Para el desarrollo y cumplimiento de la presente investigación se plantearon como objetivos determinar los agentes bacterianos causantes de infecciones de vías urinarias en mujeres usuarias del laboratorio Clínico de MEDILAB – Loja, identificar las bacterias gramnegativas aisladas en los urocultivos, identificar las bacterias grampositivas aisladas en los urocultivos y establecer la distribución de agentes causantes de infección de vías urinarias según edad de la usuaria y área de servicio de salud; este estudio se realizó durante el periodo Marzo a Junio del 2018 en todas las mujeres usuarias del laboratorio MEDILAB, con pedido de urocultivo, obteniendo un total de 118 mujeres de las cuales solo 47 cumplieron con los criterios de inclusión, obteniendo un 41% de casos positivos; determinándose que el 100% de casos fueron gramnegativos. La principal bacteria encontrada fue *Escherichia coli* con un 74%. Presentándose con mayor prevalencia en mujeres adultas con edades comprendidas entre 20-59 años y más de 60 años estando *E. coli* presente en mayor proporción en todos los grupos etarios.

## 4. Revisión de Literatura

### 4.1 Infecciones urinarias

**4.1.1 Definición.** Las infecciones de vías urinarias (IVU), se define como la invasión microbiana del aparato urinario que sobrepasa la capacidad de los mecanismos de defensa del huésped, produciendo alteraciones morfológicas o funcionales y una respuesta inmunológica no siempre evidenciable. Potencialmente todos los órganos y estructuras del aparato urinario, desde el meato uretral a la corteza renal, son susceptibles de ser afectados. La presencia de bacterias en la orina con crecimiento de 100 UFC/ml siempre que no sea una contaminación independientemente puede significar infección y mayormente en presencia de síntomas o presencia de leucocitos (piuria) (Rondón, Orence, & Guerra, 2007).

**4.1.2 Etiología.** Los gérmenes patógenos capaces de producir infecciones de vías urinarias son diversos: bacterias, hongos, virus y parásitos. La inmensa mayoría de las IVU son causadas por gérmenes que constituyen parte de la flora microbiana normal del intestino, se trata de gérmenes Gram negativos de la familia enterobacterias, representadas en primer lugar en las infecciones agudas comunitarias por la *Escherichia coli* (85%). Otros gérmenes frecuentes son: *Klebsiella sp.* *Proteus* que se divide en indolpositivo (*P. rettgeri*, *P. vulgaris*, y *P. morgani*) e indolnegativo (*P. mirabilis*). En mujeres sexualmente activas se aíslan *Staphylococcus*, especialmente el aureus. También es fácil conseguir IVU causadas por *Pseudomonas*. En las infecciones nosocomiales, la *Escherichia coli* es la causa del 50% de ellas, otros bacilos Gram negativos con menor frecuencia como *Citrobacter* y *Serratia* (Romero, 2007).

En pacientes hospitalizados con sonda vesical o que han recibido antibióticos de amplio espectro por tiempo prolongado se encuentran como patógenos causantes de la ITU *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus fecalis* (*enterococos*) y Cándidas (transplante renal) (Rondón, Orence, & Guerra, 2007).

## 4.2 Bacterias

**4.2.1 Definición.** Las bacterias son microorganismo pertenecientes al reino procariota, su tamaño oscila entre 1 a 6 micras pero existen bacterias que pueden llegar a medir hasta 50 micras como filamentos o espirilos. Son microorganismos unicelulares y contienen ADN y ARN, se reproducen por fisión binaria, la gran mayoría tiene una vida libre y otros deben parasitar organismos superiores. Solo son visibles al microscopio óptico o microscopio electrónico, tienen diversas formas entre ellas cocos (esferas), bacilos (barras), espirilos (hélices) y vibrios (coma). Para su estudio se las tiñe con diferentes colorantes el más usado comúnmente es la tinción de Gram (Romero, 2007).

**4.2.2 Estructura de las bacterias.** Las células bacterianas están conformadas por las siguientes estructuras:

- Nucleoide: Lugar de almacenar del DNA, puede observarse en la microscopia de luz en material teñido, es la mayor parte de las células bacterianas consiste en una molécula circular única y continua, que varía en tamaño de 0.58 a casi 10 millones de pares de bases.
- Estructura citoplásmica: Almacenan materiales de reserva en la forma de gránulos insolubles, o cuerpos de inclusión además constan de enzimas de transporte de electrones, pigmentos fotosintéticos, vesículas de membrana, ficobilinas o pigmentos accesorios utilizados para recolectar luz, proteínas similares a la actina y proteínas del citoesqueleto.
- Membrana celular: Es una unidad de membrana típica compuesta por fosfolípidos y hasta 200 diferentes tipos de proteínas. Las principales funciones de la membrana citoplásmica son la permeabilidad selectiva, transporte de solutos, electrones, enzimas y moléculas que participan en la biosíntesis de DNA, fosforilación oxidativa, excreción de exoenzimas hidrolíticas, portar receptores, proteínas quimiotácticas y otros sistemas sensoriales de transducción.
- La pared celular bacteriana: Le provee la rigidez estructural, le confiere forma a la bacteria y constituye una barrera física contra el medio exterior. El

componente rígido de la pared celular de las bacterias se compone de peptidoglucano compuesto de moléculas alternadas de N-acetilglucosamina y de ácido N-acetilmurámico y un grupo idéntico de enlaces peptídicos cruzados. En las bacterias Gram negativas forman el antígeno “O”.

- **Cápsula y Glucocáliz:** La cápsula es una capa gelatinosa varía de tamaño y composición y juega un papel muy importante en las bacterias patógenas, la cápsula puede estar presente o no en las bacterias. Constituye el soporte del antígeno “K”. El glucocáliz es el material que se encuentra fuera de la célula y que contiene polisacáridos participa en la adherencia bacteriana a las superficies en su entorno, lo que incluye células hospedadoras vegetales y animales.
- **Flagelos:** Son apéndices filamentosos largos que nacen de la membrana citoplasmática y se extienden a través de la pared celular hacia el medio circundante, estos son los responsables de la movilidad celular. Según las especies, pueden estar presentes en uno o ambos polos o en toda la superficie de la membrana. Constituye el soporte de los antígenos “H”.
- **Fimbrias (PILI):** Son apéndices pequeños presentes en la superficie de muchas bacterias sirven para la transferencia de ADN desde una célula a otra durante el proceso de conjugación (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

**4.2.3 Requerimientos para el metabolismo y crecimiento bacteriano.** El metabolismo bacteriano se clasifica en base a criterios importantes; según la fuente de carbono, las bacterias se pueden clasificar como:

- Heterótrofas, cuando usan compuestos orgánicos.
- Autótrofas, cuando el carbono celular se obtiene mediante la fijación del dióxido de carbono.

Según la fuente de energía, las bacterias pueden ser:

- Fotótrofas, cuando emplean la luz a través de la fotosíntesis.
- Quimiotrofas, cuando obtienen energía a partir de sustancias químicas que son oxidadas principalmente a expensas del oxígeno o de otros receptores de electrones alternativos (respiración aerobia/anaerobia).

Según la fuente de dióxido de carbono pueden ser:

- Bacterias fotolitótrofas, utilizan la energía lumínica.
- Bacterias quimiolitótrofas, obtienen energía a partir de la oxidación de moléculas inorgánicas.

Según la fuente de oxígeno se dividen en:

- Anaerobios, crecen sólo en condiciones de intensidad reductora elevada, para las cuales el oxígeno es tóxico.
- Aerobios, dependen del oxígeno para su crecimiento.

Y según la fuente de nitrógeno como aminoácidos, purinas, pirimidinas (Koneman, 2008).

**4.2.4 Clasificación, nomenclatura e identificación.** La clasificación, nomenclatura e identificación constituyen tres áreas distintas pero interrelacionadas de la taxonomía bacteriana. La clasificación se basa en catalogar a los organismos dentro de grupos taxonómicos, mediante técnicas tanto experimentales como de observación; la razón es que a menudo se requieren las propiedades bioquímicas, fisiológicas, genéticas y morfológicas. Una de los métodos de clasificación bacteriana más importantes está en su capacidad para retener colorantes en su pared celular de acuerdo a su composición. Estas se clasifican en dos grandes grupos bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

Las bacterias Gram positivas (+) son aquellas que se tiñen de color azul oscuro o violeta mediante una tinción de Gram y las bacterias Gram negativas (-) son las bacteria que se tiñen de color rosado. La nomenclatura se refiere al nombre asignado a un organismo según las reglas internacionales según sus características. Y la identificación se refiere a la aplicación práctica de un esquema de clasificación para aislar y distinguir a los organismos convenientes de los perjudiciales y propiedades especiales de un cultivo en un contexto clínico (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

### 4.3 Microorganismos patógenos de vías urinarias

**4.3.1 Definición.** La mayoría de las infecciones urinaria son producidas por microorganismos anaerobios facultativos, entre los cuales tenemos que más del 95% de los casos, un único microorganismo es el responsable de las infecciones de vías urinarias. El agente etiológico más frecuente de infecciones de vías urinarias 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* (Mejia, Cardona, & Orrego, 2012).

**4.3.2 Enterobacterias.** Son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). Entre la principales enterobacterias causantes de infecciones urinarias tenemos:

**4.3.2.1 *Escherichia coli*.** Es la bacteria más constantemente encontrada en las materias fecales del hombre y de muchas especies animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño (Romero, 2007).

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, con una sola cadena espiral de ADN aerobio y aerobio facultativo, la mayoría forma fimbrias y pilis, muchas cepas producen una pequeña micro cápsula, y muy pocas elaboran macro cápsula, y no fabrican esporas. Tiene información genética en los plásmidos, que son responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos (Romero, 2007). Las enterocolitis producidas por *Escherichia coli* se deben a los siguientes mecanismos patógenos:

- 1) *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)
- 2) *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)
- 3) *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)
- 4) *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

5) *Escherichia coli enteroagregativa* (EAEC)

6) *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) (Romero, 2007).

La patogenicidad de *E. coli* es la especie de bacteria recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido y sistema orgánico humano. Es uno de los microorganismos más frecuentes involucrados en la sepsis por gramnegativos y en el shock inducido por endotoxinas. Las infecciones producidas por cepas de *E. coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse. Cuatro síndromes clínicos pueden resultar de la infección por cepas patogénicas: infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica. Algunas cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad (Romero, 2007).

Bacilo Gram negativo, de la microbiota fecal, no esporulado que se presenta aislado o en pares, fabrica expolisacáridos en algunas ocasiones que dan aspecto mucoso a la colonia. Expresa adhesinas manosa sensibles y manosa resistentes que reconocen receptores celulares de todos los epitelios del aparato urinario, la producción de leucocidinas, y la variabilidad antigénica la hacen especialmente capaz para invadir el tracto urinario (Romero, 2007).

**4.3.2.2** *Proteus spp.* Las especies de *Proteus* producen infecciones en el humano solo cuando la bacteria abandona el intestino. Se les encuentra en infecciones del aparato urinario y producen bacteriemia, neumonía e infecciones focales en pacientes debilitados o en quienes son tratados con infusiones intravenosas. Las especies de *Proteus* producen ureasa y, por consiguiente, hidrolizan con rapidez la urea con liberación de amonio. Así, en las infecciones del aparato urinario con *Proteus*, la orina se vuelve alcalina, lo cual promueve la formación de cálculos y es casi imposible acidificar la orina. La rápida motilidad de *Proteus* puede contribuir a su capacidad para invadir el aparato urinario (Romero, 2007).

Existen tres especies que causan infecciones oportunistas en el hombre: *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *P. penneri* causan infecciones urinarias (más del 10% de complicaciones del tracto urinario incluyendo cálculos y lesiones celulares del epitelio renal), enteritis (especialmente en niños), abscesos hepáticos,

meningitis, otitis media, neumonía con o sin empiema, entre otros. Es un frecuente invasor secundario de quemaduras y heridas, así como infecciones nosocomiales. La patogenicidad se asocia a la presencia de fimbrias, flagelos, proteínas de membrana externa específicas, lipopolisacárido, enzimas proteolíticas, incluyendo gelatinasas y proteasas, hemolisinas y sobre todo a la producción de ureasa (Romero, 2007).

Es un Bacilo Gram negativo aerobio facultativo de la microbiota fecal, muestra escasa actividad fermentadora de carbohidratos, expresa flagelos y adhesinas muco sensibles y muco resistentes, produce enzima ureasa, que es característica de su capacidad invasora. Su supervivencia en orina es limitada por la acción hidrolítica sobre la urea, produce iones amino que a ciertas concentraciones son tóxicos. Su crecimiento es por periodos migratorios cíclicos. Es un importante agente causal de infecciones del tracto urinario especialmente en pacientes con anomalías estructurales urinarias, ya que muestra predilección por el tracto urinario superior y causa daños renales graves (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

No se dispone de un tratamiento específico. Sulfonamidas, ampicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglicosidos muestran efectos antibacterianos notables contra los entéricos, pero es grande la variación en la susceptibilidad, y las pruebas del laboratorio para la susceptibilidad a los antibióticos son indispensables. La resistencia a múltiples fármacos es común y está bajo el control de plásmidos transmisibles (Romero, 2007).

**4.3.2.3** *Klebsiella spp.* Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos inmóviles que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, la *K. pneumonia* se encuentra en el aparato respiratorio y en las heces de casi 5% de las personas sanas. Produce una pequeña proporción (alrededor de 1%) de las neumonías bacterianas. La *K. pneumoniae* puede causar condensaciones necrosante hemorrágica extensa del pulmón. En ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de las lesiones focales en pacientes debilitados.

Se ha detectado *Klebsiella spp.* En pacientes de hospitales, estando la transmisión asociada con la manipulación frecuente de los pacientes (por

ejemplo, en las unidades de cuidados intensivos). Quienes se exponen a un riesgo mayor son las personas con sistemas inmunitarios poco activos, como las personas ancianas o muy jóvenes, los pacientes con quemaduras o heridas extensas, los que están siendo sometidos a tratamientos inmunodepresores o los infectados por el VIH. La colonización puede dar lugar a infecciones invasivas. En raras ocasiones, *Klebsiella spp.* y en particular, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, pueden causar infecciones graves, como neumonía destructiva.

*K. pneumoniae* es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonía, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

Es un bacilo Gram negativo corto, generalmente inmóvil y encapsulado especialmente *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. Tienen una actividad fermentativa de los azúcares. Su capacidad invasora proviene de la expresión de adhesinas mucosensibles y mucorresistentes, capaces de reconocer células uroepiteliales. Produce ureasa, y sintetiza expolisacáridos capsulares que impiden la acción de los anticuerpos, las células fagocitarias y los antibióticos (Romero, 2007).

**4.3.2.4** *Enterobacter*. Como muchas cepas del *enterobacter* producen gran cantidad de gas, *E. aerogenes* y *E. cloacae* son las especies halladas más a menudo en las muestras, clínicas, se distribuyen ampliamente en el agua, las aguas cloacales, el suelo y las verduras. Forman parte de la flora entérica comensal y se cree que no ocasionan diarrea, aunque se han aislado una cepa de *E. cloacae* productora de una toxina similar a Shiga de las heces de un lactante con síndrome urémico-hemolítico. También se asocian con distintas infecciones oportunistas que afectan las vías urinarias y respiratorias y las heridas cutáneas: en ocasiones, producen septicemia y meningitis (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011). Tales microorganismos son causa de una amplia gamma de infecciones hospitalarias como neumonía, infecciones urinarias, infecciones de heridas y dispositivos (Romero, 2007).

Estas bacterias fermentan lactosa, pueden contener cápsulas que producen colonias mucoides y son móviles. La mayor parte de las cepas poseen una lactamasa  $\beta$  cromosómica denominada AmpC que las vuelven intrínsecamente

resistentes a la ampicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generaciones (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

**4.3.2.5 *Citrobacter.***- El *Citrobacter* es un bacilo gramnegativo, móvil, anaerobio facultativo perteneciente a la división de enterobacteriaceas. El *Citrobacter Freundii* y diversos es diferenciado por la formación de sulfuro del hidrógeno, producción de Indol y fermentación de Adonitol y Malonato de Sodio. El *Citrobacter* está ampliamente diseminado en la naturaleza encontrándose en la tierra, en el agua y ocasionalmente habita en el tracto gastrointestinal del hombre, usualmente es saprofito, puede causar enfermedad en pacientes comprometidos y también ha sido asociado con epidemias esporádicas de gastroenteritis. Puede causar infecciones urinarias y septicemia (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

### **4.3.3 Bacilos no fermentadores**

**4.3.3.1 *Pseudomonas.*** Las *pseudomonas* son bacilos gramnegativos, móviles y aerobios, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles. Las *pseudomonas* tienen una amplia distribución en el suelo, el agua, las plantas y los animales. *Pseudomonas aeruginosa* a menudo está presente en pequeñas cantidades en la microflora intestinal normal y en la piel del ser humano y es el principal microorganismo patógeno del grupo (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

*P. aeruginosa* es móvil, tiene forma de bastón, mide casi  $0.6 \times 2 \mu\text{m}$ . Es gramnegativo y muestra una disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011), es patógena sólo cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales, cuando se utilizan catéteres intravenosos o sondas urinarias; o cuando hay neutropenia, como en el caso de quimioterapia antineoplásica. La bacteria se adhiere a las mucosas o la piel y las coloniza, produce invasión local y enfermedad sistémica. Estos procesos son favorecidos por las fimbrias, las enzimas y las toxinas antes descritas. El lipopolisacárido desempeña un papel directo en la producción de

fiebre, choque, oliguria, leucocitosis y leucopenia, coagulación intravascular diseminada y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

#### 4.3.4 Bacterias gram positivas

**4.3.4.1** *Staphylococcus aureus*.- Los estafilococos son células esféricas grampositivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso.

Algunos son miembros de la microflora normal de la piel y las mucosas del ser humano; otros producen supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Los estafilococos patógenos suelen producir hemólisis, coagular el plasma y producir diversas enzimas y toxinas extracelulares (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, dejando como los antibióticos más eficaces para combatirlos a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina (Koneman, 2008).

**4.3.4.2** *Staphylococcus saprophyticus*. La especie *S. saprophyticus*, coagulasa negativo merece una mención especial, porque se ha comprobado que este patógeno causa infecciones urinarias en mujeres jóvenes, sanas sexualmente activas. En las mujeres jóvenes y en las adolescentes, *S. saprophyticus* es la segunda causa más común de cistitis no complicada después de *Escherichia coli*. En muestras de orina de esas pacientes, el microorganismo suele estar presente en cantidades menores de 100.000 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, pero en muestras seriadas de pacientes infectadas de microorganismos se confirma. Es un coco Gram positivo, coagulasa negativo, anaerobio facultativo, no formador de cápsula, no formador de spora e inmóvil. Posee la enzima ureasa y es capaz

de adherirse a las células epiteliales del tracto urogenital Su hábitat normal no se conoce con exactitud (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

El *Staphylococcus saprophyticus* se adhiere significativamente mejor a las células uroepiteliales que el *S. aureus* y el *S. epidermidis* y no se adhiere a otros tipos celulares como piel y células mucosas bucales (Pigrau, 2013)

Es un importante agente causal de infecciones agudas del tracto urinario en mujeres ambulatorias en edad sexual activa y está considerado como el segundo agente más frecuente de cistitis después de *Escherichia coli*, en esta población. Las pacientes con esta infección habitualmente presentan disuria, piuria y hematuria, aunque han sido descritos algunos pocos casos de infecciones asintomáticas (Romero, 2007). Muchas cepas son resistentes a la penicilina, es sensible a la vancomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, oxacilina, norfloxacin, gentamicina, pero es resistente a la metilcilina en algunos casos (Koneman, 2008).

**4.3.4.3** *Enterococcus*. El género *Enterococcus* incluye a los miembros enterococos ya clasificados con los estreptococos del grupo D. Estos microorganismos son residentes normales del tubo digestivo y las vías biliares y, en menor cantidad, de la vagina y la uretra masculina. Su importancia como causantes de enfermedades humanas es cada vez mayor, en gran parte debido a su resistencia a los antibióticos a los cuales otros estreptococos suelen ser sensibles. Los enterococos constituyen la segunda causa en frecuencia de infecciones intrahospitalarias urinarias y de heridas y la tercera causa de bacteriemia intrahospitalaria. Debido a su resistencia a las penicilinas y a cefalosporinas de varias generaciones, la adquisición de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, y ahora el surgimiento de resistencia a la vancomicina, estas bacterias a menudo producen sobreinfecciones graves entre los pacientes que reciben tratamientos con antibióticos de amplio espectro (Koneman, 2008).

## **4.4 Diagnóstico bacteriológico**

**4.4.1 Definición.** Las técnicas utilizadas para el diagnóstico etiológico de las infecciones dependen en gran medida de las características biológicas de los microorganismos

que se pretende detectar. La mayoría se pueden visualizar a través del microscopio óptico, ya sea en fresco o tinciones bacteriológicas, como la tinción de Gram. Asimismo, muchas bacterias se multiplican en medios de cultivo artificiales de elaboración sencilla y posteriormente se identifican mediante pruebas bioquímicas que estudian sus características metabólicas (Koneman, 2008).

El diagnóstico microbiológico de las infecciones urinarias no siempre es fácil, por lo que debe sustentarse en tres pilares el urocultivo, el examen de los elementos formes de la orina y la sintomatología.

## **4.5 Condiciones pre-analíticas**

**4.5.1 Recolección de la muestra.** La orina en la vejiga es un líquido estéril. Sin embargo, es fácil su contaminación durante la micción a través de la uretra con microbiota del periné, uretra o vagina. Por ello es muy importante dar instrucciones claras al paciente para realizar una recogida adecuada de la muestra:

- No tomar antibióticos 7 días antes del examen
- No tener el período
- No tener relaciones sexuales antes de tomar la muestra
- Mínimo 3 horas de retención urinaria
- Lavar con agua y jabón los genitales y secarlos con toalla limpia
- Transportar la muestra, bien cerrada, en hielo al laboratorio (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).

- **Recogida de la orina por micción media espontánea.** Aunque clásicamente se ha insistido en la importancia de realizar una limpieza exhaustiva de los genitales externos antes de la recogida de la orina, se ha demostrado que en mujeres, con o sin síntomas de infección urinaria, este lavado no disminuye la contaminación de la muestra. También se ha comprobado que la limpieza de los genitales masculinos no mejora la detección de bacteriuria. Por ello, se deben dar al paciente las siguientes instrucciones:

- Las mujeres deben mantener los labios mayores separados mientras comienzan la micción. Deben desechar la primera parte de la micción (orina uretral) y recoger la micción media sin interrumpir el flujo de la orina, colocando el recipiente de forma adecuada para la recogida de la muestra (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).
  - Los varones deben mantener el prepucio retraído mientras comienzan la micción. Al igual que las mujeres, deben desechar la primera parte de la micción y recoger la micción media sin interrumpir el flujo de la orina, colocando el recipiente de forma adecuada (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).
  - La recogida de orina se debe realizar en un recipiente de plástico estéril, de boca ancha, sin fugas y el paciente debe cerrarlo correctamente. Nunca se debe recoger la orina de un recipiente, orinal o similar, donde el paciente haya realizado la micción previamente (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).
- **Recogida de la orina por sondaje vesical.** En algunas ocasiones, sobre todo en niños, es necesario realizar un sondaje vesical para la recogida de orina. En estos casos, la técnica debe ser realizada por personal entrenado y con métodos asépticos para evitar el riesgo de introducir microorganismos en la vejiga. Una vez introducida la sonda, desechar los 15-30 mL iniciales de orina y recoger el flujo siguiente. La orina se recoge en un tubo de plástico estéril o en un recipiente estéril de boca ancha (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).
  - **Recogida de la orina en pacientes con sonda permanente.** Desinfectar el cono de la sonda con etanol al 70%, recoger asépticamente 5-10 mL de orina utilizando una aguja y jeringuilla y transferirla a un tubo o recipiente estéril. Una forma alternativa es utilizar un colector de Vacutainer con aguja para recoger la muestra directamente en un tubo de vacío sin anticoagulante. Nunca se debe recoger orina de la bolsa de la sonda. El cultivo de la punta de la sonda debe ser rechazado; si se acepta, los resultados deben ser interpretados como control microbiológico de la microbiota uretral y no es posible realizar una cuantificación (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).

- **Recogida de la orina en bolsa adhesiva.** Este tipo de recogida de orina se utiliza sobre todo en niños pequeños, cuando se quiere descartar una infección urinaria, antes de utilizar método más agresivos. Para muchos autores solo tiene valor para descartar cultivos negativos, ya que con este método, los cultivos positivos son de difícil interpretación y es necesario confirmarlos utilizando otros método de recogida, como el sondaje vesical o la punción supra púbica. Se debe realizar un lavado cuidadoso de los genitales y el área perineal, una vez que se ha retraído el prepucio. Después se coloca la bolsa de plástico o colector estéril para la recogida de la orina (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010). Si la micción no se ha realizado en una hora, se repiten las indicaciones anteriores colocando una nueva bolsa. Una vez obtenida la orina hay que cortar la bolsa por la esquina de abajo y transferirla a un recipiente estéril o alternativamente, y para evitar posibles contaminaciones por la manipulación, introducirla en un recipiente de boca ancha y enviarla rápidamente al laboratorio.
- **Recogida de la orina por punción suprapúbica.** Este método es el preferible para el diagnóstico de certeza de infección urinaria en niños pequeños, cuando los resultados de los cultivos de orina obtenidos por otros métodos son de difícil interpretación o cuando se sospechan como causa de infección bacterias anaerobias. Este método siempre debe realizarlo personal entrenado. Antes de realizar la punción se debe asegurar de que la vejiga esté llena y se pueda palpar, después desinfectar la zona de la piel de forma correcta, proceder a la realización de la punción y aspiración con una aguja o jeringuilla. Transferir la orina a un tubo estéril (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).
- **Recogida de la orina en situaciones especiales.** En determinadas circunstancias, debido a situaciones clínico-quirúrgicas del paciente o a la necesidad de realizar un diagnóstico etiológico de una determinada entidad clínica, la muestra de orina debe ser recogida de forma especial.

- Prostatitis. El diagnóstico de la prostatitis bacteriana se confirma con cultivos cuantitativos y comparativos de diferentes fracciones de la orina y la secreción prostática o semen.
- Conducto ileal. Se debe quitar el dispositivo externo y limpiar el estoma con etanol al 70%, seguido de povidona yodada y eliminar ésta limpiando de nuevo con alcohol. Una vez limpio el estoma, introducir una sonda doble más allá de la fascia y recoger la orina. Transferir la orina a un tubo estéril.

**4.5.2 Transporte y conservación de la muestra.** El transporte de las orinas al laboratorio debe realizarse lo antes posible. Si no pueden ser enviadas al laboratorio en las 2 primeras horas de su recogida, pueden conservarse en nevera hasta 24 horas, pero nunca se deben congelar.

- Los tubos deben ir rellenos con al menos 3 mL de orina para evitar un efecto inhibitor en los microorganismos.
- No se deben utilizar tubos con conservante si la muestra se va a procesar para cultivo de micobacterias, virus, hongos o para detección de parásitos.
- Una vez procesadas las muestras, pueden conservarse en nevera un máximo de 48 horas para realizar, en caso que sea necesario, posibles confirmaciones de los resultados.

**4.5.3 Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de microbiología.** Las muestras de orina que llegan al laboratorio deben cumplir con las normas establecidas para la aceptación de muestras. Las orinas deben estar bien identificadas, acompañadas de su volante en papel o de su petición de solicitud electrónica, perfectamente cumplimentados. Además se debe comunicar al laboratorio el método de recogida de la orina y cualquier otra información que sea imprescindible para la interpretación de los resultados (**Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010**).

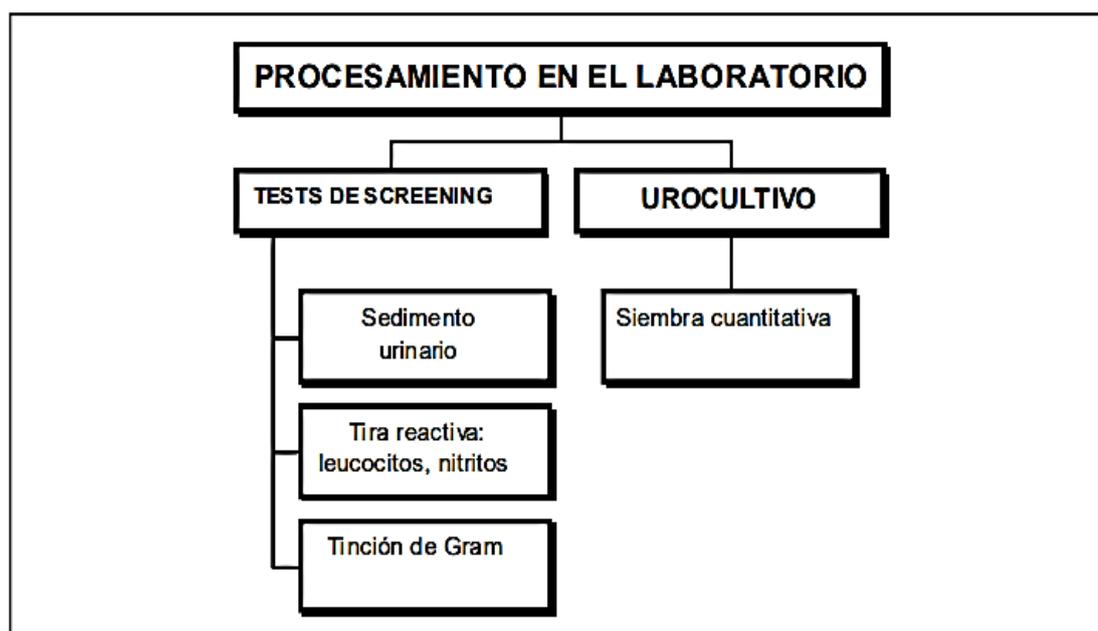
## **4.6 Fase Analítica**

Existen diversos procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la IVU. Clásicamente, el método de referencia es el urocultivo cuyo procesamiento demora 24 a 48 horas. Se recomienda guardar las muestras de orina refrigeradas después de ser procesadas, hasta obtener el resultado del cultivo. En caso de resultados discordantes se recurrirá a la muestra almacenada para repetir los análisis.

**4.6.1 Test de Screening.** Pruebas rápidas para el procesamiento de muestra de orina sospechosa de infección de vías urinarias.

- Examen microscópico del sedimento urinario. Sugiere infección urinaria, sin embargo, no es confirmatorio. Permite la aproximación correcta en más o menos 70% de las veces. La estandarización de los sedimentos urinarios y el uso de cámaras

Grafico N°2: **Procesamiento de las muestras en que se sospecha una infección urinaria.**



Fuente: Diagnóstico microbiológico de la infección urinaria - Comité de Microbiología Clínica (Lopardo, 2015).

de recuento (sistema KOVA®) han permitido uniformar variables como el volumen de la orina a centrifugar como el volumen de la orina a centrifugar, el volumen en el que se re suspende el sedimento y el tamaño de la gota que se observa al microscopio; sin embargo, el alto costo dificulta su

disponibilidad en la mayoría de los laboratorios. La recomendación es uniformar las variables susceptibles de controlar como el volumen de la orina a centrifugar (que debe ser idealmente de 10 a 12 ml), el tiempo de centrifugación (5 minutos) y la velocidad de centrifugación (400g).

Cuando existe infección, bacterias y neutrófilos se ven juntos formando placas de pus, las que son de utilidad en la orientación de infección urinaria pero inespecíficas. Una limitación del análisis del sedimento urinario es ser operador dependiente (Lopardo, 2015).

- **Tira reactiva de orina.** En general son dos los parámetros útiles a evaluar en la tira reactiva o examen químico de orina:
  - Presencia de leucocitos mediante la detección de su enzima: leucocito esterasa. Detecta leucociturias  $> 10$  leucocitos / $\mu$ l con una sensibilidad entre 53 y 95% 15,16.
  - Presencia de nitritos. La mayoría de las especies uropatógenas reducen nitratos a nitritos excepto *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus* sp.

Se requieren al menos 6 horas para producir niveles detectables de nitritos, por lo que debe realizarse en la primera micción matinal. La sensibilidad descrita es de alrededor del 80% en la primera micción matinal disminuyendo a 30% en otras muestras. Su especificidad es muy buena, cercana a 98% (Lopardo, 2015).

- **Tinción de Gram directa de la muestra.** Es un método rápido, económico, sensible y específico para detectar bacteriuria. Se recomienda realizarlo como respaldo frente a discordancias o hallazgos especiales más que como screening. Debe aplicarse a la muestra recién agitada sin centrifugar, con el mismo asa de 1 $\mu$ l (o de 10  $\mu$ l) empleado en la siembra del urocultivo, depositando este volumen en un portaobjetos. Estas se tiñen y pueden ser observadas cuando existen discordancias entre el urocultivo y el sedimento. La presencia de una bacteria/campo de inmersión tiene buena correlación con  $> 100.000$  ufc/ml en el 85% de los casos.

Sin embargo, no es una técnica bien estandarizada y existen diferentes criterios para considerar la prueba como positiva. Debido a lo anteriormente expuesto, no existe uniformidad en la literatura respecto a su utilidad (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).

**4.6.2 Urocultivo.** El urocultivo permite cuantificar e identificar los agentes causales y estudiar su sensibilidad a los antibióticos. Además, en crecimientos polimicrobianos, permite discernir si se trata de una mezcla de bacterias propias de la microbiota periuretral y vaginal, que indican mala recogida de la muestra, o de un predominio de bacilos gramnegativos propios de la infecciones urinarias complicada.

- **Siembra microbiológica.** Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento bacteriano. El método más usual para la siembra es la técnica de estría en la cual podemos obtener colonias aisladas en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies (Lopardo, 2015).

Una colonia bacteriana es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido; aunque varía de tamaño generalmente es visible a simple vista. Las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura y en algunos casos color característicos, que aunque puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, es constante bajo condiciones controladas y depende de la especie bacteriana que la forme.

Debido a que las características de las colonias ocurren en varios grados y combinaciones dependiendo de las bacterias y son a menudo muy uniformes, sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados. La morfología colonial es comparable a una estadística ya que se deriva de una célula individual pero es la característica de la masa celular. En una colonia pueden distinguirse varios aspectos como forma, elevación, borde, tamaño, color. (Lopardo, 2015).

**4.6.3 Tipos de medios de cultivo microbiológicos.** Los medios de cultivo empleados de forma rutinaria pueden ser de tres tipos: medios no selectivos asociados a medios selectivos de enterobacterias (agar sangre y agar MacConkey), medios diferenciales adaptados a la identificación de microorganismos causantes de infección urinaria como el CLED (medio cistina lactosa electrolito deficiente) y medios diferenciales no selectivos cromogénicos.

El empleo de un medio no selectivo como el agar sangre permite un buen crecimiento y discriminación de bacterias grampositivas y levaduras así como una mala diferenciación de bacterias gramnegativas. Debido a lo anterior, siempre se complementa con un agar selectivo MacConkey capaz de discriminar las bacterias gramnegativas según su capacidad de fermentar la lactosa y morfología. En ambos medios no se inhibe la formación de swarming por parte de *Proteus* spp.

- **Agar Sangre.** El agar sangre es una combinación de un agar base (agar nutritivo) con fuente proteica (digeridos trípticos, digeridos proteicos de soja) el cual tiene un agregado de 5 % de sangre ovina, (también puede usarse sangre humana, para cultivos en una placa de Agar) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales y cloruro sódico. El agar sangre aporta muchos factores de enriquecimiento. Se usa también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos (que es un factor de virulencia). Observando los halos hemolíticos alrededor de las colonias se determina el tipo de hemólisis que posee:
  1. Alfa: halos verdosos
  2. Beta: halos incoloros
  3. Gamma: inexistencia de halos
  
- **Agar Mac-Conkey (medio selectivo-diferencial).** Los microorganismos aislados de orina pueden ser fermentadores o no fermentadores de la lactosa. Se emplean medios diferenciales para distinguir unos de otros. El medio Mac-Conkey se utiliza para diferenciar los microorganismos intestinales fermentadores de la lactosa de los que no presentan esta propiedad. En el agar, los nutrientes básicos son el agar y la peptona. El taurocolato sódico

(sal biliar) inhibe la flora Gram positiva, mientras que la lactosa y el indicador (rojo neutro) diferencia los fermentadores de la lactosa de los que no tienen esta capacidad. Los microorganismos que fermentan la lactosa producen ácido láctico, que neutraliza la sal biliar y absorbe el colorante dando colonias rojizas. Los microorganismos que no fermentan la lactosa dan una reacción alcalina, no toman el rojo neutro y dan lugar a colonias incoloras.

**4.6.4 Condiciones de incubación de los cultivos.** Los cultivos de orina deben ser incubados a 35-37°C en atmósfera aeróbica antes de ser interpretados. La mayoría de bacterias causantes de infección urinaria se pueden poner en evidencia en 18-24 horas, en este contexto no tiene sentido prolongar la incubación más allá de las 24 horas. En casos determinados, bacterias exigentes, deficientes o cultivo negativo o cuando se documenta la presencia de bacterias en la tinción de Gram podría ser necesario extender el periodo de incubación a las 48 horas.

**4.6.5 Lectura de los cultivos.** Las placas deben ser examinadas para su valoración después del tiempo adecuado de incubación (este aspecto es importante para orinas sembradas durante la tarde o noche).

Cultivos sin crecimiento: si las placas no presentaran crecimiento después del tiempo adecuado de incubación, el cultivo debe considerarse como negativo, excepto: orinas obtenidas por punción supra púlica, cuando se haya especificado cultivo de levaduras, ya que no todas crecen bien en 24 horas, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos o cuando aparezcan colonias muy pequeñas. En todos estos casos se prolonga la incubación otras 24 o 48 horas (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).

Cultivos con crecimiento: es importante discriminar entre especies con capacidad uropatógena (*Enterobacteriaceae*, *P. Aeruginosa*, otros bacilos gramnegativos, *Enterococcus spp.*, estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, levaduras, *S. Aureus*, *S. Saprophyticus*, Etc., de aquellas especies que generalmente representan microbiota urogenital o cutánea (*Lactobacillus spp.*, difteroides distintos de *C. Urealyticum*, *Streptococcus* del grupo viridans distintos de *A. Urinae* y *Bacillus spp.*) Que no se consideraron valorables, aunque siempre debe considerarse en el contexto clínico del paciente.

Se deben valorar los posibles morfotipos presentes y realizar el recuento de colonias para cada una de las posibles especies, para ello debe multiplicarse el número de colonias por el factor de dilución empleado (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).

**4.6.6 Lectura de cultivo en UFC/ml.** Después de incubar las siembras a 37° durante 24 a 48 horas, se cuenta el número de colonias desarrolladas y el resultado se multiplica por 100, ya que el asa de platino contiene 0.01 ml. De orina. Los resultados del estudio cuantitativo se informan de la siguiente manera:

- No hubo desarrollo microbiano.
- Menos de 10 000 colonias por ml.
- Entre 10 000 y 100 000 colonias por ml.
- Más de 100 000 colonias por ml (Andreu, Cacho, Coira, & Lepe, 2010).

**4.6.7 Pruebas para diferenciación de Gram positivos.**

- **Prueba de la Catalasa.** El peróxido de hidrógeno se produce al utilizar la bacteria el azúcar por vía oxidativa. Al ser éste un compuesto muy oxidante las bacterias la eliminan mediante la producción de la enzima catalasa ( $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ ).

Procedimiento: Agregamos aproximadamente 5 ml. de peróxido de hidrógeno al 3% a un tubo de ensayo previamente esterilizado a continuación tomamos una muestra de la cepa del microorganismo a estudiar y la introducimos por el tubo de ensayo, la muestra solamente debe acercarse a la muestra de la solución líquida de peróxido de hidrogeno y debemos observar la reacción de esta. La prueba se considera como positiva si observamos burbujas de oxígeno.

Resultados:

- (+) Staphylococcus aureus
  - (-) Streptococcus spp.
- **Prueba de la Coagulasa.** La coagulasa es un enzima capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma. El objetivo es buscar en factor de aglutinación de los

microorganismos cuando estos se mezclan con el plasma. Esta prueba se utiliza para diferenciar microorganismos del genero Staphylococcus.

Procedimiento: Preparamos una mezcla de 0,1 ml. de CCC (caldo cerebro corazón) y 0,3 ml de plasma de conejo en un tubo de ensayo previamente esterilizado. La muestra ya contiene cepas de St. Aureus. Tapamos el tubo de ensayo con algodón hidrofílico y lo llevamos a baño María a 37° C durante una hora, observando la muestra cada 15 minutos. Al completa la hora, sacamos las muestras y observamos sus resultados.

Resultados: Estratificaremos los resultados en 4 distintos niveles:

- 1: pequeños coágulos no organizados
- 2: pequeños coágulos organizados
- 3: gran coágulo organizado
- 4: todo el contenido aparece coagulado y se mantiene cuando invierte el tubo.

Se consideran positivos los niveles 3 y 4.

- (+) Staphylococcus aureus
- (-) Staphylococcus epidermis.

## **4.7 Identificación bacteriana**

**4.7.1 Medios para pruebas bioquímicas.** Las pruebas bioquímicas son una serie de análisis clínicos que sirven a la Medicina como apoyo a la hora de diagnosticar infecciones por bacterias.

**4.7.1.1 Prueba TSI (Triple Sugar Iron ó Triple Azúcar Hierro).** El TSI es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la identificación de la producción de SH<sub>2</sub>. Esta es una prueba específica para la identificación a nivel de género en la familia Enterobacteriaceae, con objetivo de diferenciar entre:

- bacterias fermentadoras de la glucosa
- bacterias fermentadoras de la lactosa

- bacterias fermentadoras de sacarosa
- bacterias orogénicas
- bacterias productoras de SH<sub>2</sub> a partir de sustancias orgánicas que
- contengan azufre.

Procedimiento: Inocular los tubos de TSI con punta (alambre recto). Para eso introducir la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar el alambre del fondo, estriar el pico con un movimiento hacia uno y otro lado. Incubar a 35° durante 24 horas. Posteriormente se debe medir el pH de los cultivos.

Resultados:

- Pico alcalino/fondo alcalino: no hay fermentación de azúcares. Característica de bacterias no fermentadoras como *Pseudomona* spp.
- Pico alcalino/fondo ácido: Glucosa fermentada, lactosa ni sacarosa fermentadas. *Shigella* spp.
- Pico alcalino/fondo negro: Glucosa fermentada, ni lactosa ni sacarosa fermentada, producción de ácido sulfhídrico. *Salmonela* spp.
- Pico ácido/fondo ácido: Glucosa y lactosa y/o sacarosa fermentadas. Puede producirse SH<sub>2</sub> o no.

**4.7.1.2** *Agar Citrato*. La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. La utilización de citrato como única fuente de carbono se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7,6.

Procedimiento: Se inocula el agar inclinado en una sola estría en el pico. Utilizar un cultivo de 24 horas en un medio sólido y cuidando no arrastrar medio de cultivo, ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Incubar a 35°C durante 4 días. El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador al azul.

Resultados:

- (+) *Klebsiella* spp.

- (-) *Escherichia coli*

**4.7.1.3** *Prueba de la ureasa.* El CO<sub>2</sub> por acción de la enzima ureasa y formar carbonato de amonio. Alcalinizando el medio.

Interpretación de los resultados: Se considera positiva si el medio adquiere una tonalidad rosada y negativa si mantiene su coloración inicial.

**4.7.1.4** *Prueba de SIM.* Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrogeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol, en el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa.

Resultados:

- Cepas móviles: Producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Cepas inmóviles: El crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.
- Cepas H<sub>2</sub>S positivas: ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra en todo el medio.
- Cepas H<sub>2</sub>S negativas: el medio permanece sin cambio de color.
- Cepas Indol positivas: desarrollo de color rojo
- Cepas Indol negativas: sin cambio de color.

Motilidad: La movilidad es una característica importante al hacer una determinación bacteriana, pues indirectamente señala que el microorganismo posee flagelos, rasgo taxonómico que es difícil poner de manifiesto por otros métodos, incluidos los tutoriales.

Interpretación de los resultados: El test de movilidad se interpreta por un examen macroscópico del medio. Si el microorganismo es móvil se producirá una zona de difusión de crecimiento a los lados de la línea de inoculación, si la bacteria es inmóvil crecerá sobre línea de siembra.

**4.7.1.5 Producción de Indol.** La prueba de indol determina la capacidad de las bacterias de degradar el triptófano dando indol. Algunas bacterias, gracias a la enzima triptofanasa hidrolizan el aminoácido, dando Indol, ácido pirúvico y amoniacó. Interpretación de los resultados: Al añadir el reactivo de Kovacs se da la aparición de un anillo de color rojo en la superficie el medio indica producción de Indol. Si no se forma el anillo rojo, se considera la prueba negativa.

## 4.8 Control de Calidad

**4.8.1 Finalidad.** Los objetivos del control de calidad radica en supervisar la precisión y la exactitud de los medios de cultivo; los cuales constituyen la herramienta fundamental en los laboratorios de Microbiología para lo cual es necesario tomar todas las medidas que garanticen su correcta preparación y esterilización. Se debe controlar su calidad con el fin de comprobar si estos cumplen con sus especificaciones y si la metodología empleada en su preparación es satisfactoria (Clinical an Laboratory Standards Institute, 2006).

**Cepas de referencia para el control de calidad.** Para poder comprobar la calidad de los resultados de los medios de cultivo según el CLSI (2006); cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos cuyo comportamiento se conoce, tanto para reacciones positivas, como negativas. Para esto pueden utilizarse cepas bacterianas control de la ATCC (American Type Culture Collection). Guardando un registro de los resultados obtenidos:

- *Escherichia coli* ATCC 25922;
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603;

***Escherichia coli* ATCC 25922.** Es una cepa que se recomienda solo para control de combinaciones de las betalactamasas, como el ácido clavulánico, el sulbactam, o el tazobactam (CLSI, 2006).

**Klebsiella pneumoniae ATCC 700603.** Esta cepa se usa solo para control de las pruebas de BLEE (CLSI, 2006).

Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar (Herrera & Campos, 2015).

**4.8.2 Microorganismos utilizados en el control de calidad de pruebas bioquímicas.** El control de calidad de las pruebas bioquímicas exige la supervisión de los medios de cultivo de identificación y diferenciales, de los reactivos utilizados para poner de manifiesto la reacción desarrollada en estos medios (Indol, rojo de metilo, FeCl<sub>3</sub> etc.) y, de los reactivos que actúan directamente sobre los gérmenes (catalasa, oxidasa, etc.) (Yacatan, 2016).

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Características de cultivo</b>	<b>Reacción</b>
TSI	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	Acido fondo y superficie
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	24 hrs. aerobiosis	Alcalino fondo y superficie
Citrate de Simmons	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	No cultiva. Verde(-)
	<i>Klebsiella</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. Azul (+)
	<i>Pneumoniae</i>		
LIA Lissina y Hierro	<i>Salmonella</i>	24 hrs. aerobiosis	Púrpura fondo y superficie. H <sub>2</sub> S (+)
	<i>Typhimurium</i>		
	<i>Proteus mirabilis</i>	24 hrs. aerobiosis	Rojo fondo, amarillo superficie.
Movilidad (Agar semi-sólido)	<i>Proteus mirabilis</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. Desplazamiento lateral.
	<i>Klebsiella</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. No desplaza.
	<i>Pneumoniae</i>		

Indol (Kovac)	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. Da color rojo.
	<i>Klebsiella</i>		Cultiva. Da incoloro.
	<i>Pneumoniae</i>		
Urea de christensen	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva pero no da color.
	<i>Proteus mirabilis</i>	24 hrs. aerobiosis	Todo el medio rosado.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 hrs. aerobiosis	Solo el fondo rosa.
Rojo de metilo	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. Color rojo
	<i>Enterobacter spp</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. Color Amarillo
Voges Proskauer	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. No da color
	<i>Enterobacter cloacae</i>	24 hrs. aerobiosis	Cultiva. Da color rojo
Urea caldo	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	No cambia
	<i>Proteus mirabilis</i>	24 hrs. aerobiosis	Color púrpura.
Oxidasa	<i>Escherichia coli</i>	24 hrs. aerobiosis	No cambia.
	<i>Pseudomona a.</i>	24 hrs. aerobiosis	Color purpura.
Catalasa	<i>S.aureus</i>	24 hrs. aerobiosis	Forma burbujas.
	<i>Streptococcus</i>	24 hrs. aerobiosis	No forma burbujas.
Coagulasa	<i>S. aureus</i>	24 hrs. aerobiosis	Coágulo. Positivo
	<i>S. epidermidis</i>	24 hrs. aerobiosis	No coágulo.
CAMP	<i>S. agalactiae</i>	24 hrs. aerobiosis	Positivo. Flecha.
	<i>Streptococcus spp.</i>	24 hrs. aerobiosis	Negativo.

**4.8.3 Conservación y evaluación de las cepas del control de calidad.** Para la Conservación y evaluación de las cepas del control de calidad el CLSI (2006) recomienda:

- Probar las cepas empleadas para el control de calidad por el procedimiento normalizado de difusión con discos, empleando los métodos y materiales para examinar los aislados clínicos.

- Para almacenamientos prolongados, mantener las reservas de las cepas a temperatura de -20 °C o inferiores en un estabilizador apropiado (leche 51 descremada) o liofilizadas sin que haya riesgo significativo de alterar su sensibilidad a los antimicrobianos.
- Mantener las cepas de control usadas en el trabajo diario en medios de agar de triptosa y soya o en medio inclinado de agar chocolate enriquecido de 2 a 8 °C y resembrar cada semana durante no más de tres semanas sucesivas. Preparar nuevos cultivos de trabajo al menos mensualmente a partir de las cepas congeladas, liofilizadas o cepas comerciales.
- Antes de realizar las pruebas, se deben resembrar las cepas en placas de agar para obtener colonias aisladas.
- Cultivar los microorganismos y preparar suspensiones directas de colonias según el procedimiento de preparación del inóculo recomendado (Herrera & Campos, 2015).

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Tipo de estudio

El presente investigación es de tipo descriptivo de corte transversal.

### 5.2. Área de estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio Clínico MEDILAB, ubicado en la ciudad de Loja, parroquia Sucre, en las calles Manuel Montero y Alfredo Mora (esq.).

### 5.3. Universo.

El universo de la investigación estuvo representado por 145 muestras de orina de mujeres que asistieron al Laboratorio Clínico MEDILAB, en el periodo de Marzo a Mayo del 2017.

### 5.4. Muestra.

Estuvo conformado por 118 muestras de orina de mujeres que asistieron al Laboratorio Clínico MEDILAB.

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

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 N \times p \times q}{e^2(N - 1) + Z_{\alpha}^2 \times p \times q}$$

Dónde:

n= tamaño de la muestra

N= 145 mujeres

Z $\alpha$  = 1.96 Nivel de confianza del 95%

p: 0.5

q= 0.5

e= error seleccionado de 4% = 0.04

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 N \times p \times q}{e^2(N - 1) + Z_{\alpha}^2 \times p \times q}$$

$$n = \frac{1.96^2 \ 145 \times 0.5 \times 0.5}{0.04^2(144) + 1.96^2 \times 0.5 \times 0.5}$$

$$n = \frac{3.8416 \times 145 \times 0.25}{0.0016 \times (144) + 3.8416 \times 0.25}$$

$$n = \frac{139.258}{0.2304 + 0.9604}$$

$$n = \frac{139.258}{1.1908}$$

$$n = 117.02$$

#### 5.4.1. Criterios de inclusión:

- Pacientes con solicitud de urocultivo.
- Cultivos primarios con crecimiento  $\geq 1\ 000$  UFC/ml (pacientes inmunodeprimidos, síndrome uretral femenino, punción suprapúbica o renal percutánea) o  $\geq 100\ 000$  UFC/ml (pacientes inmunocompetentes).

#### 5.4.2. Criterios de exclusión:

- Pacientes que hayan recibido terapia antibiótica por lo menos 7 días antes.
- Pacientes que ya hayan sido muestreados durante este estudio (no pueden haber dos muestras de un mismo paciente, genera sesgo de muestreo).

- Muestras contaminadas con espermatozoides, con sangre de origen menstrual o secreción vaginal.
- Más de dos patógenos aislados.

### 5.5. Métodos, técnicas y procedimientos

- **Fase pre - analítica**

- Aprobación del tema del proyecto en la Universidad Nacional de Loja.
- Permiso para el desarrollo de campo en el Laboratorio MEDILAB (Anexo1).
- Llenar un registro de recolección de muestras participantes del proyecto (Anexo 2).
- Transportar la muestra del laboratorio MEDILAB al Centro de Diagnóstico Médico de la Facultad (Anexo 3).
- Llenar formato de registro de laboratorio (Anexo 4).
- Adquisición de cajas de agar sangre y controles de calidad (Anexo 5).

- **Fase analítica**

- Preparación de agar Mac-Conkey y EMB (Anexo 6).
- Preparación de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias gram negativas (Anexo 7).
- Preparación de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias gram positivas (Anexo 8).
- Realizar la siembra de urocultivo en Agar Sangre, Mac-Conkey y EMB (anexo 8)
- Realizar tinción de Gram de las colonias aisladas (Anexo 7).
- Identificar el género y especie de bacteria presente mediante las pruebas bioquímicas.
- Hacer alícuotas de los controles de calidad (anexo 11).
- Realizar la siembra de urocultivo en Agar Sangre, Mac-Conkey y EMB de los controles de calidad (anexo 11).
- Realizar la tinción de Gram de las colonias aisladas (anexo 11)

- **Fase post analítica**

- Interpretación de los resultados (Anexo 10).
- Validar los resultados obtenidos mediante controles de calidad (Anexo 11), medidas de bioseguridad, así como seguimiento de la Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, docente tutora de la tesis.

## **5.6. Instrumentos de recolección de datos**

Para obtener la información necesaria y requerida de los pacientes con diagnóstico presuntivo de infección de vías urinarias se aplicará un formato de registro de recolección de datos (Anexo 4) la cual deberá contener información general y específica requerida para la investigación.

## **5.7. Plan de tabulación y análisis de resultados**

- La tabulación de los datos obtenidos se expresará en frecuencia y porcentaje utilizando el programa MicrosoftExcel 2013.
- Los resultados obtenidos se presentan calculando frecuencias y porcentajes, en gráficos de barras estadísticas.

## 6. Resultados

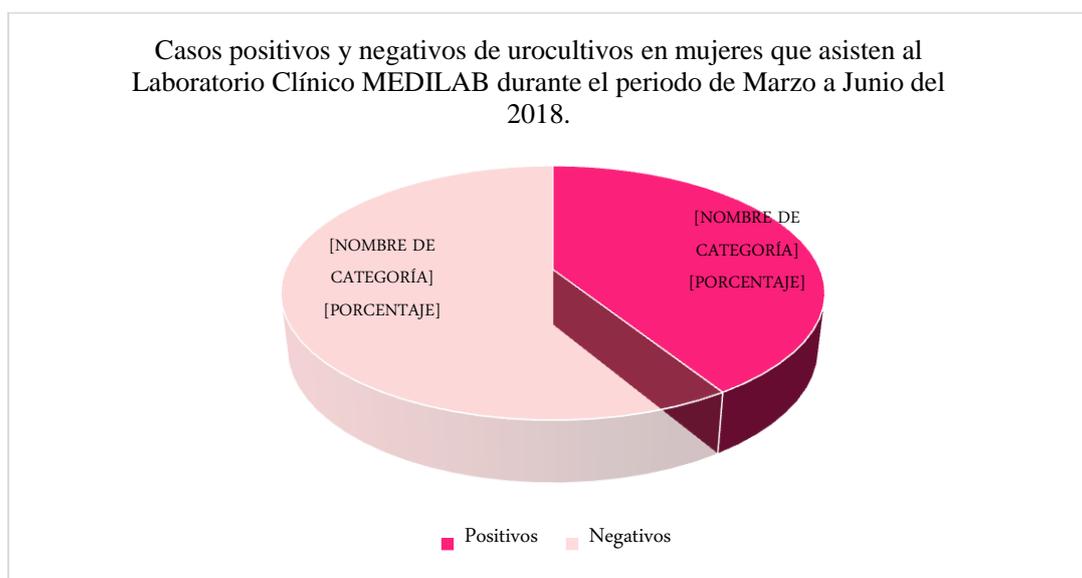
**Tabla N°1.-** Casos positivos y negativos de urocultivos en mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.

CASOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
POSITIVOS	47	41%
NEGATIVOS	71	59%
TOTAL	118	100%

**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**Grafico N°1.-** Casos positivos y negativos de urocultivos en mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.



**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**INTERPRETACIÓN:** De todo el universo se logró obtener un 41% de muestras con crecimiento bacteriano y un 59% sin crecimiento bacteriano. Este alto porcentaje de infecciones presentes podría deberse a la poca exigencia de pedidos de urocultivo en clínicas privadas.

**Tabla N°2.-** Agentes bacterianos grampositivos y gramnegativos aislados en urocultivos de mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.

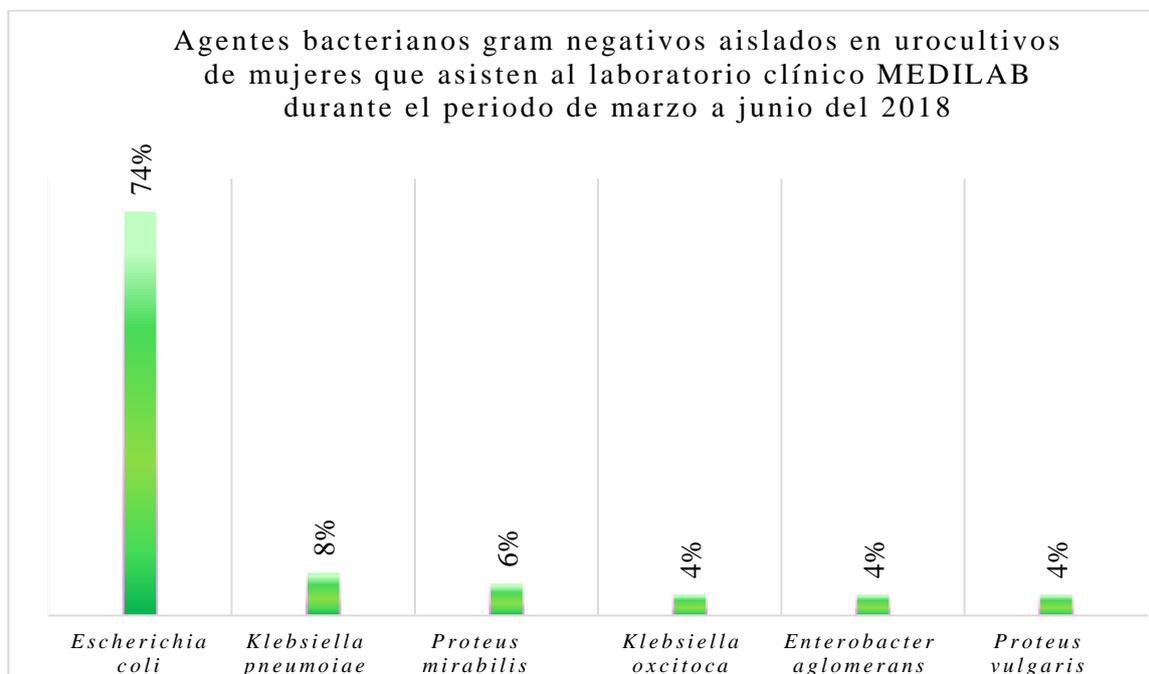
AGENTES BACTERIANOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
GRAMPOSITIVOS	0	0%
GRAMNEGATIVOS	47	100%
TOTAL	47	100%

**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**INTERPRETACIÓN:** Del total de muestras con crecimiento bacteriano, se encontró que el 100% fueron bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, puesto que la inmensa mayoría de las IVU en mujeres son causadas por gérmenes que constituyen parte de la flora microbiana normal del intestino, debido a las condiciones anatómicas, básicamente la menor longitud de la uretra y su proximidad al ano.

**Grafico N°3.-** Agentes bacterianos gramnegativos aislados en urocultivos de mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.



**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**INTERPRETACIÓN:** Las infecciones de vías urinarias son mayormente causadas por Enterobacterias de estas, la principal bacteria aislada fue *Escherichia coli* aislada en un 74% de los casos, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* con un 8% y 6% respectivamente; ya que la inmensa mayoría de las IVU son causadas por gérmenes que constituyen parte de la flora microbiana normal del intestino, gérmenes Gram negativos de la familia enterobacterias, representadas en primer lugar en las infecciones agudas comunitarias por la *Escherichia coli*

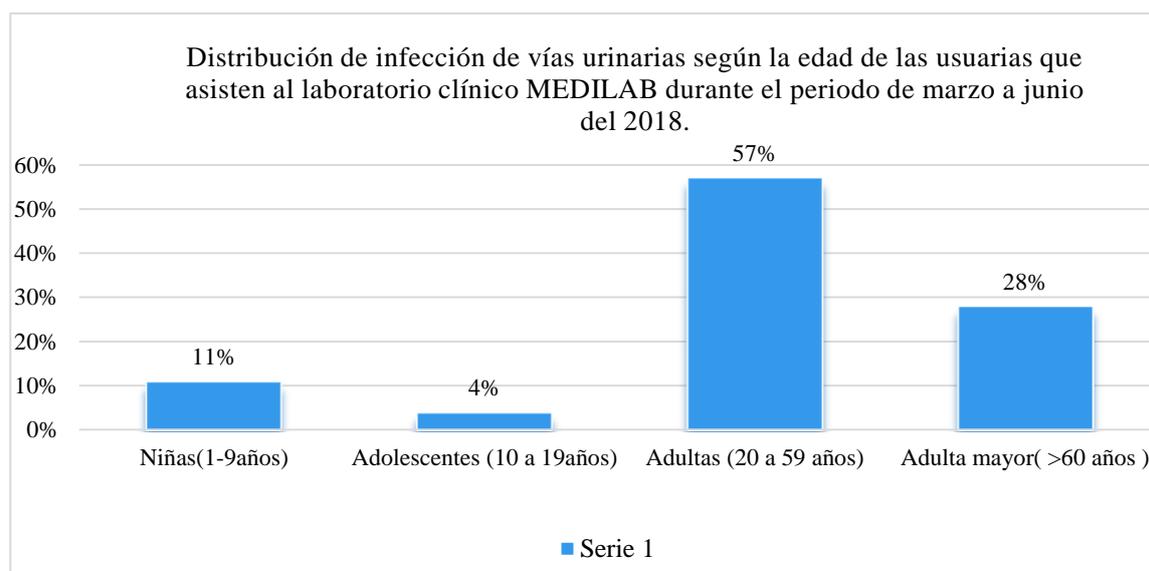
**Tabla N°4.-** Distribución de infección de vías urinarias según la edad de las usuarias que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.

<b>EDAD</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Niñas (12 meses a 9 años)</b>	5	11%
<b>Adolescentes (10 a 19años)</b>	2	4%
<b>Adultas (20 a 59 años)</b>	27	57%
<b>Adulta Mayor ( &gt;60 años)</b>	13	28%
<b>TOTAL</b>	47	100%

**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**Grafico N°4.-** Distribución de infección de vías urinarias según la edad de las usuarias que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.



**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**INTERPRETACIÓN:** El grupo etario mayormente afectado por IVU es el de mujeres adultas en un 57%, seguido del grupo de adultas mayores en un 28%. Estos datos se correlacionan con la literatura debido a que las mujeres adultas son más propensas a tener infecciones de vías urinarias en edad fértil y por la actividad sexual.

A pesar de no existir muestras, también se consideró las usuarias desde el primer día de nacidas hasta los 12 meses.

**Tabla N°5.-** Distribución de los agentes bacterianos causantes de infección de vías urinarias según la edad de las usuarias que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.

EDAD	<i>Bacterias Gram-negativas</i>												TOTAL de CASOS	
	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoiae</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>K. oxcitoca</i>		<i>E.aglomerans</i>		<i>P. vulgaris</i>		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Niños (1 a 9 años)	3	6%	1	2%	0	0%	0	0%	0	0%	1	2%	5	11%
Adolescentes (10 a 19 años)	2	4%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	4%
Adultos (20 a 59 años)	19	41%	1	2%	3	6%	1	2%	2	4%	1	2%	27	57%
Adulto Mayor (más de 60 años)	10	23%	2	4%	0	0%	1	2%	0	0%	0	0%	13	28%
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>	<b>74%</b>	<b>4</b>	<b>8%</b>	<b>3</b>	<b>6%</b>	<b>2</b>	<b>4%</b>	<b>2</b>	<b>4%</b>	<b>2</b>	<b>4%</b>	<b>47</b>	<b>100%</b>

**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**INTERPRETACIÓN:** En los 5 casos del grupo de 1 a 9 años de edad el microorganismo más frecuente fue *Escherichia coli* con 3 casos (6%), seguido de *K. pneumoiae* y *P. vulgaris* con 1(2%) caso cada uno. En los 2 casos del grupo de 10 a 19 años de edad el germen que se aisló fue *E. Coli* en el 100%.

En los 27 casos del grupo de 20 a 59 años de edad el germen más frecuente fue *Escherichia coli* con 19 casos (41%), seguido de *P. mirabilis* con 3 (6%) casos, *E. aglomerans* con 2(4%) casos y *K. pneumoiae*, *K. Oxcitoca* y *P. vulgaris* con 1(2%) caso cada uno.

En los 13 casos del grupo de más de 60 años de edad el germen más frecuente fue *Escherichia coli* con 10 casos (23%), seguido de *K. pneumoiae* 2(4%) y *K. Oxcitoca* con 1(2%) caso.

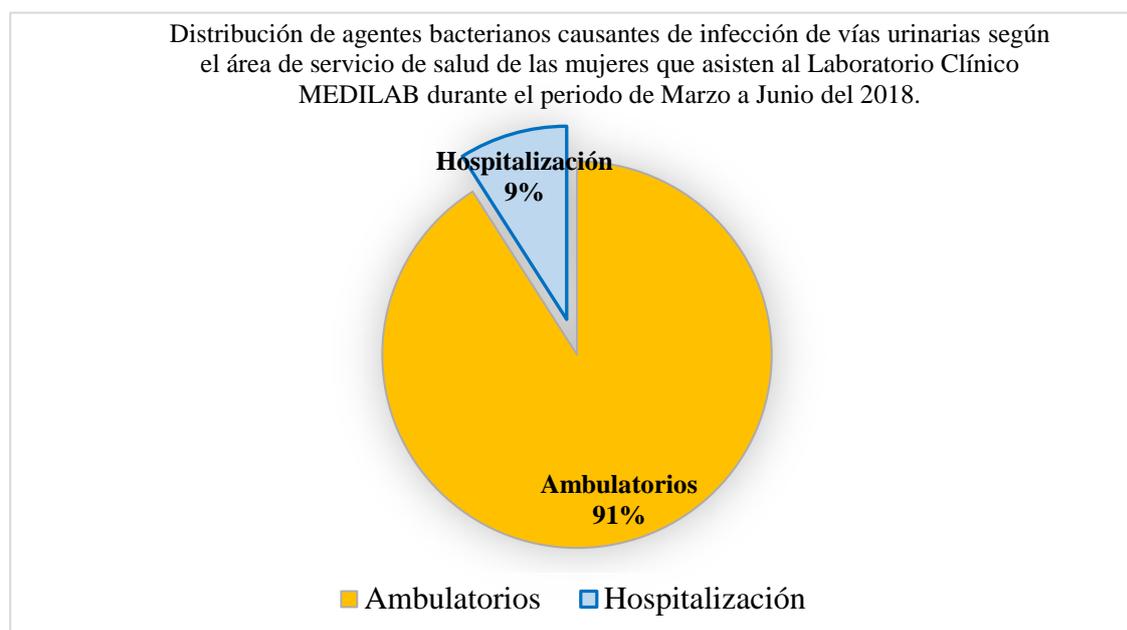
**Tabla N°6.-** Distribución de infección de vías urinarias según el área de servicio de salud de las mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.

<i>Área de servicio</i>		<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Ambulatorios</i>	<i>Consulta externa Demanda espontánea</i>	43	91%
	<i>Hospitalización</i>	4	9%
<b>TOTAL</b>		47	100%

Fuente: Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**Grafico N°6.-** Distribución de agentes bacterianos causantes de infección de vías urinarias según el área de servicio de salud de las mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB durante el periodo de Marzo a Junio del 2018.



**Fuente:** Registro de resultados obtenidos en el estudio.

**Autora:** Sofía Janneth Soria Jumbo.

**INTERPRETACIÓN:** Según el área de servicio del Laboratorio Clínico MEDILAB, el 91% de muestras fueron obtenidas de pacientes ambulatorios, este alto porcentaje podría ser por lo que se realiza exámenes de urocultivo a cualquier paciente sin exigencia de una solicitud prescrita por un médico y el 9% de hospitalización.

## 7. Discusión

Las infecciones de vías urinarias consisten en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del trayecto del tracto urinario, constituyendo una de las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial. Afectan principalmente a las mujeres, por las condiciones anatómicas, básicamente la menor longitud de la uretra y su proximidad al ano (Mensa, 2012); se estima que entre 40 y 50% de las mujeres presenta infecciones de vías urinarias en algún momento de su vida, 11% tendrá al menos una infección por año siendo más frecuente en las mujeres con edad entre 20 y 56 años (Orrego, Mejia, & Cadorna., 2014).

Las bacterias causantes provienen del tracto intestinal en la mayoría de los casos, por consiguiente los gérmenes más frecuentes son las Enterobacterias, y dentro de ellas la principal, *Escherichia coli* ocupando un 80% de casos en todas las edades (Ojeda, 2013).

En la presente investigación titulada: Agentes bacterianos causantes de infección de vías urinarias en mujeres que asisten al Laboratorio Clínico MEDILAB – Loja; se obtuvieron como resultados un total de 118 muestras de orina de las cuales en 47 casos existió cultivo positivo, que representan el 41%; determinándose que el 100% de casos fueron Gramnegativos, de las cuales el 74% de bacterias fue *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella pneumoniae* 8%, *Proteus mirabilis* 6%, *Klebsiella oxitoca* 4%, *Enterobacter agglomerans* 4%, y *Proteus vulgaris* con el 4%. Presentándose con mayor prevalencia en mujeres adultas y adultas mayores con un 57% y 28% respectivamente, estando *E. coli* presente en mayor proporción en todos los grupos etarios. El 91% de muestras fueron procedentes de consulta externa y el 9% de hospitalización.

Los datos obtenidos sobre los principales agentes bacterianos en nuestra investigación se asemejan a estudios realizados en Durango, México en el año 2013 en el hospital Nuevo Sanatorio Durango, en 138 mujeres mediante el análisis de urocultivo, determinó que la bacteria predominante fue *Escherichia coli* (91.5%) seguido de *K. pneumoniae* (2.1%) (Páramo, Tovar, & Mario, 2013), en Argentina en la ciudad de Buenos Aires en el año 2017, en el Hospital Interzonal de Agudos, en mujeres edad entre 15 años y premenopausia; de 114 episodios, en 97 se aisló *Escherichia coli* como patógeno responsable (82%), en 10 *Proteus* spp. (9%), en 5 *Klebsiella* spp. (6%), en

1 *Enterococcus* spp.(2%) y en 1 *Pseudomonas* spp. (1%) (Bertoni, Pessacq, & Guerrini, 2017).

En nuestra ciudad se realizaron investigaciones que se asemejan a este estudio de agentes bacterianos causantes de infecciones de vías urinarias en mujeres mediante la técnica convencional de urocultivo; uno de ellos realizado en Centro de Salud N° 1 en el año 2014, donde se encontró 53 casos positivos en donde el principal agente causal es *Escherichia coli* con el 77%, *Proteus mirabilis* con el 13% y *Klebsiella pneumoniae* con un 9% (López & Zhuni, 2014); en parroquia Buenavista cantón Chaguarpamba en el año 2013, analizaron 118 muestras en mujeres asintomáticas, de las cuales 39 pacientes (46%) presentaron infección de vías urinarias verificadas con uroanálisis y urocultivo, identificando los agentes causales en orden de frecuencia: *Escherichia Coli* 59%, *Enterobacter spp* 28%, *Staphylococcus saprophyticus* 7%, *Proteus Vulgaris* 3%, *Citrobacter freundii* 3% (Coello & Peralta, 2013); así mismo, el estudio realizado en barrio Pasallal de la parroquia Sanguillín del cantón Calvas en mujeres de 12 a 60 años, las principales bacterias que se encontraron fueron, *Escherichia coli* en un 39% de los casos, *Klebsiella oxytoca* en un 22%, *Proteus vulgaris* en un 17%, *Proteus mirabilis* en un 11% (Carrion & Ojeda, 2013).

Con respecto al grupo etario, existe una gran similitud con otras investigaciones en que mujeres de edad fértil son más propensas a presentar infecciones de vías urinarias, para ello se comparó con estudios realizados en nuestro país Ecuador en la ciudad de Ambato en el año 2015, en mujeres con edades comprendidas entre 14 – 55 años, del total de pacientes atendidas en el servicio de medicina interna con diagnóstico de infección de vías urinarias, la mayor parte corresponde a pacientes entre 22 a 29 años con un 43%, seguido de pacientes de entre 30 a 37 años lo que corresponde el 33%, en menor incidencia pacientes entre 14 a 21 años y 38 a 45 años lo que corresponde al 12% respectivamente, siendo *E coli* el patógeno más frecuente en todos los grupos etario (Chicaiza, 2015); Así mismo; se comparó la similitud con otro estudio realizados en Perú en la ciudad de Puno en el año 2017 en mujeres en edad fértil del hospital Guillermo Díaz de la Vega, la mayor frecuencia de la infección urinaria fue en el grupo de 18 a 29 años de edad con 54%, el germen más frecuente fue *E. Coli* con 65 casos (92%) (Bedoya, 2016), a pesar de las limitaciones encontradas en la edad de las mujeres existe una semejanza en que las mujeres de edad fértil son las más propensas a presentar infecciones de vías urinaria.

Según el área de servicio en Armenia, Colombia de enero a junio del 2014, en el Hospital Universitario del Quinde San Juan de Dios en un total de 467 muestras analizadas tanto de hombres (41%) y mujeres (59%) mediante urocultivo, de los cuales prácticamente la mitad se identificaron en el servicio de urgencias adultos (48,2%), seguido de urgencias pediatría y consulta externa con un 7.3% y 6.4% respectivamente (Villareal & Arango, HOSPITIUM, 2014), al comparar este estudio realizado en un hospital de servicio público con mayor cantidad de tiempo y en ambos sexos con los datos obtenidos en nuestra investigación, se puede concluir que existe una gran diferencia de casos según el área de servicio, esto puede deberse a que en el presente estudio se realizó en una clínica privada, solo en mujeres y con 3 meses de muestreo.

En estas comparaciones con otros estudios internacionales, nacionales y locales se puede concluir que a pesar de las limitaciones de datos encontrados en el género femenino, el rango de edad y el área de servicio, se puede concluir que la principal bacteria presente en mujeres causante de infecciones de vías urinarias es *Escherichia coli*, encontrándose mayores casos en etapas de fertilidad.

## 8. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en la presente investigación fueron las siguientes:

- Los agentes bacterianos gramnegativos son los responsables de las infecciones de vías urinarias en un 100% de las mujeres que asisten al Laboratorio clínico MEDILAB, durante el periodo de Marzo – Junio del 2018.
- Los principales agentes bacterianos causantes de IVU en mujeres que asisten a MEDILAB, fueron *Escherichia coli* con el 74%, seguido de *Klebsiella pneumoiae* (8%), *Proteus mirabilis* (6%), *Klebsiella oxcitoca* (4%), *Enterobacter aglomerans* (4%), y *Proteus vulgaris* con el (4%).
- El grupo etario más afectado por IVU, fue las mujeres adultas (30-59 años) y adultas mayores (>65 años) con un 45% y 26% respectivamente, encontrándose *E. coli* con mayor frecuencia en todos los grupos etarios.
- El área de servicio de donde provinieron la mayor parte de muestras fue de consulta externa en un 91% y solamente un 9% de hospitalización.

## 9. Recomendaciones

- A los profesionales que laboran en MEDILAB, tener siempre el criterio al realizar un urocultivo que este tenga previamente pedido médico, con el fin de evitar la automedicación en los pacientes y las resistencias bacterianas.
- Un adecuado control a las mujeres de edad fértil, ya que tienen una mayor predisposición a presentar infecciones de vías urinarias y si no existe un tratamiento estas podrían llegar a ser muy recurrentes y resistentes.
- Realizar controles de calidad de los medios de crecimiento para obtener un buen desarrollo y reconocimiento de las bacterias.
- Tener en cuenta las normas de bioseguridad en el desarrollo de cada uno de los procedimientos realizados.

## 10. Bibliografía

- Andreu, A., Alos, J., & Gobernado, M. (2013). *Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico*. Obtenido de <https://doi.org/10.1157/13070401>
- Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., & Lepe, J. (2010). *Cercenado y Rafael Cantón*. España: ISBN-978-84-614-3491-6.
- Astete, S., & Flores, F. (2013). *scielo*. Obtenido de Sensibilidad antibiótica de los urocultivos realizados en pacientes ambulatorios del Hospital: <http://n9.cl/xV7E>
- Bedoya, A. (2016). *Perfil microbiológico y sensibilidad antimicrobiana en infección urinaria en mujeres en edad fértil del Hospital Guillermo Díaz de la Vega de Abancay*.
- Bertoni, G., Pessacq, P., & Guerrini, M. (2017). *Scielo*. Obtenido de Etiología y resistencia a antimicrobianos de la infección no complicada del tracto urinario: <http://ref.scielo.org/mh2s6s>
- Carrion, T., & Ojeda, A. (2013). *Identificación de agentes bacterianos causantes de infecciones de vías urinarias en mujeres de 12 a 60 años del barrio Pasallal de la parroquia Sanguillín del cantón Calvas*.
- Chávez, S. (2015). *Dspace*. Obtenido de Estudio de agentes etiológicos y resistencia bacteriana en urocultivos por el método de Bauer-Kirby en mujeres que acuden a la clínica de la mujer periodo Julio – diciembre 2015: <http://n9.cl/C3dM>
- Chicaiza, C. (2015). *Infección de vías urinarias en mujeres de edad fértil en el hospital Jose Maria velasco Ibarra de la ciudad de Tena 2015*. Tena- Ecuador: Repositorio UTA.
- Chindembele, J., Alvarez, B., Jala, M., Resto, G., & Rojas. (06 de Junio de 2015). *Evaluación de la resistencia antimicrobiana de cepas de Escherichia coli causantes de infecciones urinarias en la provincia de Huambo, Angola*. Obtenido de <http://n9.cl/Q2Y>
- CLSI, C. a. (2017). *Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 27ª ed.* Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.

- Coello, J., & Peralta, K. (2013). *Determinación de infecciones de vías urinarias y su relación con los factores desencadenantes en mujeres de edad fértil de la Parroquia Buenavista Cantón Chaguarpamba*.
- Criollo, A., Gutierrez, E., & Duran, E. (2015). *Infeccion de vias Urinarias, determinacion de agentes etiologicos y sensibilidad antimicrobiana*. Repositorio de la Universidad de Cuenca.
- Herrera, M., & Campos, M. (Enero de 2015). *Scielo*. Obtenido de Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología: <http://ref.scielo.org/938nfj>
- Hontangas, L., & Castillo, S. (16 de Mayo de 2016). *Tecnicas de Identificacion: MEDIA AXON*. Obtenido de MEDIA AXON Web site: <http://n9.cl/u2cX>
- INEC. (Octubre de 2013). *Instituto nacional de estadisticas y censos*. Obtenido de Indicadores basicos de salud Ecuador.
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2011). *Microbiologia medica*. McGraw-hill Interamericana Editores.
- Koneman. (2008). *Diagnostico Microbiologico*. Editorial medica panamericana.
- Laboratory, C. S. (2012). *Molecular Clning: A laboratory Manual*. Obtenido de <http://n9.cl/Ix8f>
- Lopardo, D. H. (26 de Enero de 2015). *BritaniaLab.com*. Obtenido de <http://n9.cl/xGX2>
- López, M., & Zhuni, L. (Marzo de 2014). Agentes bacterianos y su relación con factores de riesgo para infecciones del tracto urinario en embarazadas que acuden al Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja, febrero-marzo 2014. Loja: Repositorio Digital UNL.
- Mejia, C., Cardona, J., & Orrego, P. (2012). *Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana*. Obtenido de <http://ref.scielo.org/yvxhfn>
- Mensa, J. (2012). *Libro de la salud del hospital clinic de Barcelona y la fundacion BBVA*. Obtenido de <http://n9.cl/alQN>
- Molina, & Manjarrez, D. (07 de enero de 2015). *Departamento de microbiologia y parasitologia*. Obtenido de <http://n9.cl/HST>
- MSP. (2016). *MSP*. Obtenido de <http://n9.cl/Lp8t>
- Mulugeta, K., & Bayeh, A. (Febrero de 2014). *ELSEVIER*. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60226-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60226-4)

- Ojeda, Y. (2013). *Identificación de agentes bacterianos causantes de infecciones de vías urinarias en mujeres*. Obtenido de <http://n9.cl/06D>
- Orrego, M., Mejía, H., & Cadorna, &. (Octubre de 2014). *Redalyc*. Obtenido de Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana.: <http://n9.cl/rlw>
- Páramo, F., Tovar, A., & Mario, E. (2013). *medigraphic*. Obtenido de Resistencia antimicrobiana en pacientes con infección de vías urinarias hospitalizados en el servicio de Medicina Interna del Nuevo Sanatorio Durango, de enero a diciembre de 2013: <http://n9.cl/YLP>
- Pigrau, C. (2013). *Infección del tracto urinario*. Madrid: SALVAT.
- Pons, L., Cabrales, M., & Prats, M. (2015). *Incidencia de infecciones urinarias por bacterias coliformes en el municipio de Yara, 2015*. Obtenido de <http://n9.cl/qS9R>
- Prats, G. (2008). *Microbiología Clínica*. Editorial medica panamericana.
- Rodríguez, M. (2012). *Manual de procedimientos para toma de muestras*. Obtenido de <http://n9.cl/OSD>
- Rodriguez, P., & Román, M. (2012). *Incidencias de infecciones urinarias causadas por bacterias entericas gramnegativas en mujeres embarazadas del Hospital Regional Isidro Ayora*. dspace.
- Romero, C. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. Editorial Medica Panamericana.
- Rondón, M., Orence, O., & Guerra, A. (2007). *Infección del tracto urinario*. CODEPRE.
- Santambrosio, I. E. (2009). *Incidencia de infecciones de vías urinarias en mujeres de edad fértil en el Hospital Jose Maria Velasco de Ibarra de la ciudad de Tena*. Obtenido de Universidad Tecnológica Nacional: <http://n9.cl/F4G>
- Soto, C. (2013). *Manual de toma de muestras*. Obtenido de <http://n9.cl/JfOn>
- Villamar, & Cadena, C. A. (2014). *Prevalencia de infecciones de vías urinarias en mujeres que laboran en la corporación mariscos del Ecuador S.A., de la parroquia El Cambio*. repositorioutmachala.
- Villareal, A., & Arango, A. (30 de 06 de 2015). *HOSPITIUM*. Obtenido de Uropatogenos y susceptibilidad antimicrobiana en el hospital universitario del Quindío San Juan De Dios (HUSJD), ARMENIA, COLOMBIA: <http://n9.cl/Jh4P>
- Yacatan, U. (2016). *ccba*. Obtenido de Manual del Control de Calidad: <http://n9.cl/3XYn>

## 11. Anexos



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

**ANEXO 1.-** Solicitud para el desarrollo de campo en el Laboratorio MEDILAB

Loja, 10 de Marzo del 2018

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

De mi consideración,

Yo, Sofia Janneth Soria Jumbo, portadora de la cédula de identidad número 1106022187, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo muy respetuosamente, deseándole un cordial saludo, y a la vez solicitarle muy comedidamente por su intermedio se me autorice el permiso correspondiente para la obtención de datos y muestras con solicitud de urocultivos para la realización del proyecto titulado "AGENTES BACTERIANOS CAUSANTES DE INFECCIONES DE VIAS URINARIAS EN MUJERES USUARIAS DEL LABORATORIO CLINICO DE MEDILAB", cabe recalcar que los datos obtenidos serán tratados cuidadosamente, guardando la confidencialidad correspondiente.

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

Atentamente.



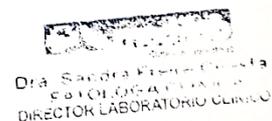
Sofia Janneth Soria Jumbo  
Estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico

**CEVASCOP S.A.**  
**AUTORIZADO S.A.**

10 JUL 2018

Ing. Ixania Azanza Troncos  
GERENTE

*Autorizado  
Sofia J  
10-03-2018*



Dra. Sandra Freire Freire  
PATÓLOGA CLÍNICA  
DIRECTOR LABORATORIO CLÍNICO



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

**ANEXO 2.-** Registro de recolección de datos de las Usuarias del Laboratorio de MEDILAB.



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

## 1. INTRODUCCION

La obtención y el transporte de muestras son etapas fundamentales en el diagnóstico clínico y en la investigación. Para mantener la integridad de las muestras se deberá tener en cuenta los procedimientos de obtención, transporte, condiciones de conservación, destino final y bioseguridad.

El control de estos proporcionará valor a las muestras asegurando la calidad y estabilidad para obtener resultados confiables y oportunos.

El transporte de muestras biológicas tiene importancia a nivel mundial ya que un manejo incorrecto de sustancias con agentes infecciosos puede ocasionar morbilidad y mortalidad (Rodriguez, 2013).

## 2. OBJETIVO

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

## 3. ALCANCE

Este procedimiento forma parte del proyecto “Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y Solca Loja” que garantizará el correcto transporte de muestras de urocultivo del Hospital Isidro Ayora y Solca hacia el CDM para su análisis posterior

## 4. RESPONSABLES:

- 4.1. ESTUDIANTES: transporte de muestras.
- 4.2. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.

## 5. MATERIALES:

- 5.1. Cooler hermético
- 5.2. Medio de transporte Stuart
- 5.3. Medios de cultivo Agar Sangre

## 6. PROCEDIMIENTO:

- 6.1. Transporte en el Hospital Isidro Ayora:

6.1.1. Una vez analizada la muestra e identificado el germen, y en el caso de que el equipo reporte un resistencia BLEE, procedemos a tomar un medio de transporte Stuart retiramos el hisopo y recolectamos dos colonias representativas del cultivo para llevar a confirmar BLEE.

6.1.2. Se rotula el medio de Stuart con el código del paciente de cada una de las muestras que nos reportaron sospechosas de BLEE, se las guardas en el cooler hermético sin hielo y se las transporta al CDM.

## 6.2 Transporte del Hospital SOLCA:

6.2.1 Luego de la recepción de las muestra a cada una se la sembrara en un medio de cultivo Agar Sangre previamente rotulado con el código del paciente.

6.2.2 Los medios se guardaran en el cooler hermético y serán transportados al Hospital Isidro Ayora para ser analizado en el Equipo VITEK 2 para la identificación de la bacteria.

6.2.3 En el caso de que el urocultivo nos dé como resultado sospechoso resistencia de BLEE procedemos a tomar un medio de transporte Stuart retiramos el hisopo y recolectamos dos colonias representativas del cultivo para llevar a confirmar BLEE.

6.2.4 Se rotula el medio de Stuart con el código del paciente de cada una de las muestras que nos reportaron sospechosas de BLEE, se las guardas en el cooler hermético sin hielo y se las transporta al CDM.

## 7. OBSERVACIONES

7.1. Debe ser transportada por personal capacitado en recipientes de material sólido, impermeable y de fácil limpieza.

7.2. El contenedor debe tener papel absorbente en el fondo para eventuales derrames

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

ELABORADO POR: Andrea del Cisne Quezada López	REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
--	---



## ANEXO 4.- Formato de registro de laboratorio.

HOJA DE REGISTROS DE DATOS DE LABORATORIO "CDM"																	
FECHA	CÓDIGO	PROVENIENCIA		SEXO		EDAD	BACTERIA AISLADA	CARACTERÍSTICAS			PRUEBAS BIOQUÍMICAS						
		CONSULTA EXTERNA	HOSPITALIZACIÓN	MASCULINO	FEMENINO			AGAR SANGRE	EMB	McConkey	GRAM	CITRATO	UREA	LISINA	TSI	GA S	H2S
17/03/2018	109852	X			X	73	KLEBSIELLA OXYTOXA	Colonias planas, blanquecinas, alfa hemolis	No Reacción	Fermentadora de lactosa		+	+	+	A/A	++	-
17/03/2018	109871	X			X	21											
17/03/2018	109874	X			X	73											
17/03/2018	109900	X			X	48	PROTEUS MIRABILIS	Colonias planas, blanquecinas, gamma hemo	No Reacción	no fermentadora de lactosa	Cocos grampositivos: r	-	+	-	A/A	++	-
17/03/2018	109901	X			X	1											
17/03/2018	109903	X		X		3											
17/03/2018	109924	X		X		87											
18/03/2018	109930	X			X	75	ESCHERICHIA COLI	Colonias planas, blanquecinas, gamma hemo	debil Reacción	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	++	-
18/03/2018	109980	X			X	29	ESCHERICHIA COLI	Colonias planas, blanquecinas, gamma hemo	No Reacción	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	+	-
20/03/2018	110078	X			X	58	ITEROBACTER AGLOMERATA	Colonias planas, blanquecinas, gamma hemo	No Reacción	no fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	-	-	A/A	+	-
21/03/2018	110141	X			X	29											
21/03/2018	110146	X			X	49											
22/03/2018	110226	X			X	42											
22/03/2018	110244	X			X	81											
22/03/2018	110249	X		X		82	ESCHERICHIA COLI	Colonias planas, blanquecinas, gamma hemo	No Reacción	Fermentadora de lactosa		-	-	+	A/A	+	-
22/03/2018	110261	X			X	73											
22/03/2018	110275	X			X	62	ESCHERICHIA COLI	Colonias redondeadas, planas y grises	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	++	-
22/03/2018	110277	X			X	34											
22/03/2018	110279	X		X		3											
22/03/2018	110284	X			X	3	ESCHERICHIA COLI	Colonias redondeadas, blanquecinas, alfa hemolis	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa		-	-	+	A/A	+	-
23/03/2018	110317	X			X	29											
23/03/2018	110324	X			X	92											
23/03/2018	110328	X			X	30	ESCHERICHIA COLI	Colonias redondas, grises. Pequeñas	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa	bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	+	-
23/03/2018	110341	X			X	51											
23/03/2018	110343	X			X	44											
23/03/2018	110356	X			X	23											
24/03/2018	110393	X		X		72	ESCHERICHIA COLI	Colonias redondas, blanquecinas, beta hemolis	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa		-	-	+	A/A	++	-
25/03/2018	110422	X			X	92											
26/03/2018	110482	X		X		66											
27/03/2018	110508	X		X		58	ESCHERICHIA COLI	Colonias grises, redondeadas, cremosas	Debil Reacción	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	++	-
27/03/2018	110510	X		X		59											
27/03/2018	110538	X			X	19											
27/03/2018	110546	X	X	X		87											
27/03/2018	110566	X			X	48											
27/03/2018	110578	X			X	38											
28/03/2018	110856	X			X	85	ESCHERICHIA COLI	Colonias redondas convexas, ovoides, grises y irreg	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	++	-
29/03/2018	110709	X			X	54	KLEBSIELLA PNEUMONIAE	Colonias mucosas blanquecinas, redondas e irreg	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	+	+	+	A/A	+++	-
29/03/2018	110733	X		X		3											
29/03/2018	110757	X			X	59											
29/03/2018	110768	X			X	1	PROTEUS VULGARIS	Colonias cremosas, grises y redondeadas	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	++	-	A/A	++	+
29/03/2018	110774	X	X	X		100	ESCHERICHIA COLI	Colonias cremosas, grises y redondeadas	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	+	+	+	A/A	++	-
01/04/2018	110821	X			X	95	KLEBSIELLA PNEUMONIAE	Colonias redondeadas, irregulares y cremosas, pe	No Reacción	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	+	+	+	A/A	+	-
02/04/2018	110855	X			X	22											
02/04/2018	110825	X		X		68	ESCHERICHIA COLI	Colonias redondeadas, grises, regulares pequ	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	-	-
03/04/2018	110916	X		X		58	ESCHERICHIA COLI				Bacilos gramnegativos	-	-	+	A/A	++	-
03/04/2018	110926	X			X	60											
03/04/2018	110984	X			X	22	ITEROBACTER AGLOMERATA	Colonias redondas, grisáceas, beta hemolis	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa		-	+	-	A/A	+++	-
04/04/2018	111050	X		X		70	KLEBSIELLA PNEUMONIAE	Colonias mucosas, grises, convexas, mucoides, gam	No Reacción	Fermentadora de lactosa		+	+	+	A/A	+++	-
05/04/2018	111083	X		X		61											
06/04/2018	111124	X			X	51	ESCHERICHIA COLI	Colonias redondas, blanquecina, beta hemolis	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa		-	-	+	A/A	++	-
06/04/2018	111125	X	X		X	70											
06/04/2018	111127	X			X	40											
06/04/2018	111154	X			X	10											
06/04/2018	111177	X			X	25											
07/04/2018	111225	X	X	X		46											
07/04/2018	111238	X			X	72											
08/04/2018	111328	X			X	29											
10/04/2018	111383	X	X	X		85	KLEBSIELLA PNEUMONIAE	Colonias mucoides, grisáceas, medianas e irreg	No Reacción	Fermentadora de lactosa	Bacilos gramnegativos	+	+	+	A/A	+++	-
11/04/2018	111428	X			X	51											
11/04/2018	111447	X			X	21											
12/04/2018	111430	X			X	4	ESCHERICHIA COLI	Colonias planas, grisáceas, gamma hemolis	No Reacción	Fermentadora de lactosa		-	-	+	A/A	++	-
12/04/2018	111530	X			X	35											
13/04/2018	111538	X	X	X		81	ESCHERICHIA COLI	Colonias medianas, redondas, convexas, regulares	Reacción, brillo metálico	Fermentadora de lactosa		-	-	+	A/A G	+	-
13/04/2018	111563	X			X	40											
13/04/2018	111588	X	X	X		27											
14/04/2018	111621	X			X	88											
14/04/2018	111622	X			X	60											
14/04/2018	111643	X			X	32											
15/04/2018	111653	X	X		X	41	ESCHERICHIA COLI	Colonias pequeñas, redondas, convexas, crem	No Reacción	Lactosa positiva		-	-	+	A/A	+	-
16/04/2018	111671	X			X	33	PROTEUS MIRABILIS	Colonias pequeñas, convexas, regulares, crem	No Reacción	Lactosa negativo		+	+	-	K/A	++	+
16/04/2018	111694	X			X	27											
16/04/2018	111713	X			X	49											
16/04/2018	111716	X	X		X	41											
17/04/2018	111765	X		X		74											
17/04/2018	111788	X			X	33											



ANEXO 5: Factura de obtención de Agar Sangre.

Cliente: **JARA TAMAYO EDGAR JAVIER**  
 Dirección: **EL CAPULI, VIA A MALACATOS, LOJA.**  
 R.U.C. / C.C.: **1104870256**  
 Teléfono: **2547116**  
 Guía de Remisión:  
 Orden de Compra:

Asesor Comercial: **VICT**  
 Fecha de Emisión: **08/03/18**  
 Fecha de Vencimiento: **09/03/18**  
 Orden de Pedido: **22.569**

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

MEDIBAC

Innovación, Calidad y Servicio

FORMA DE PAGO: **OTROS**      **165,28**      SUMAN \$

Son: **Ciento Sesenta Y Cinco Y 28 / 100 Dólares Americanos**      Dólares      DESCUENTO

MEDIBAC INC S.A.      Firma Autorizada      Firma Cliente

FAVOR EMITIR CHEQUE CRUZADO A NOMBRE DE MEDIBAC INC. S.A. DEBO Y PAGARÉ a la orden de MEDIBAC INC S.A. Declaro recibir la mercadería de esta FACTURA a mi entera conformidad; por lo tanto, DEBO Y PAGARÉ a la orden de MEDIBAC INC S.A. Esta factura de encontrarse vencida, al siguiente día devengará el máximo de INTERES POR MORA autorizado por la LEY, más todos los gastos de cobranzas ocasionados. En caso de juicio me sujetaré a los jueces competentes de la ciudad de Guayaquil y a la acción ejecutiva para el cobro de la deuda. ORIGINAL: ADQUIRIENTE



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

## ANEXO 6: Protocolo para la preparación de Mac-Conkey y EMB.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	Preparación de Medios de cultivo en el Laboratorio de la Facultad de la Salud Humana: CDM	<b>CÓDIGO</b> : PB05 <b>REVISIÓN</b> : 1 <b>EDICIÓN</b> : 1 <b>FECHA</b> : <b>PÁGINA</b> : 1/4
---	---	---	---

### PROCEDIMIENTOS DE MEDIO DE CULTIVO MC CONKEY

- a. Definición.-** El Agar Mac-Conkey es un medio de cultivo usado para el aislamiento selectivo de entero bacterias, se caracteriza por contener lactosa y un indicador de cambio de pH que detecta la actividad fermentadora sobre este azúcar, que vira al rojo ladrillo en medio ácido.
- b. Objetivo:** Preparar el medio de Cultivo Agar MacConkey para el aislamiento de bacterias gramnegativas.
- c. Equipos y materiales:**
- 1 balanza
  - 1 cocineta
  - 1 refrigeradora
  - 1 matraz Erlenmeyer
  - 1 caja de fósforo
  - 1 mechero de Bunsen
  - 1 espátula
  - 1 luna de reloj
  - Cajas Petri
  - Agua destilada
  - Agar MacConkey
- d. Procedimientos:**
1. Leer el envase del polvo para la preparación de Agar Mac-Conkey, según la cual se debe suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada.
  2. Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar.
  3. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación.
  4. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer.
  5. Añadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido.
  6. Resolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.

7. Disolver la mezcla del matraz mediante una fuente de calor o cocineta. Cuando la solución esté homogénea, se retira de la fuente de calor.
8. Tapar el matraz con gaza, teniendo cuidado de dejar compacto.
9. Colocar papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico.
10. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 o C.
11. Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Ya sólidas, se cierran adecuadamente.
12. Almacenar y conservar las placas a una temperatura de 2-8 o C.

**e. Observaciones:**

- Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando del 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35 o -37 o C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.

**PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE AGAR EMB (eosina, azul de metileno, “eosin-methylen blue”, Agar de Levine)**

- a. Definición:** Es un medio diferencial y selectivo para aislar y detectar enterobacterias en muestras mixtas. Los colorantes de anilina (eosina y azul de metileno) inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y a las Gram negativas exigentes. También se combinan precipitando a pH ácido, actuando como indicadores de producción de ácidos. El medio incluye lactosa, lo que permite la diferenciación de los fermentadores de lactosa de los no fermentadores. Los fermentadores fuertes de lactosa, sobre todo *Escherichia coli*, producen colonias de color negro verdoso con brillo metálico. Los productores más débiles de ácidos, forman colonias de color violeta. Los no fermentadores de lactosa forman colonias transparentes.
- b. Objetivo:** Preparar el medio de Cultivo Agar EMB para la diferenciación de bacterias presentes en orina.
- c. Equipos y materiales:**
- 1 balanza
  - 1 cocineta
  - 1 refrigeradora
  - 1 matraz Erlenmeyer
  - 1 caja de fósforo
  - 1 mechero de Bunsen
  - 1 espátula
  - 1 luna de reloj

- Cajas Petri
- Agua destilada
- Agar EMB

**d. Procedimientos:**

1. Leer el envase del polvo para la preparación de Agar EMB, según la cual se debe suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Colocar una luna de reloj de vidrio sobre la balanza y tarar.
3. Pesar la cantidad necesaria de polvo de preparación.
4. Colocar el polvo del agar, ya pesado en el matraz Erlenmeyer.
5. Añadir el agua destilada necesaria para completar el volumen requerido.
6. Resolver la mezcla utilizando la varilla de agitación tratando de no dejar grumos.
7. Disolver la mezcla del matraz mediante una fuente de calor o cocineta. Cuando la solución esté homogénea, se retira de la fuente de calor.
8. Tapar el matraz con gaza, teniendo cuidado de dejar compacto.
9. Colocar papel aluminio sobre la boca del matraz y ajustar con un elástico.
10. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 o C.
11. Distribuir el medio en las cajas de Petri estériles siguiendo la técnica aséptica. Ya sólidas, se cierran adecuadamente.
12. Almacenar y conservar las placas a una temperatura de 2-8 o C.

**e. Observaciones:**

Realizar el control de calidad de los medios de cultivo, retirando del 1 al 5% de la partida y colocando en incubación con una temperatura de 35 o -37 o C durante 48 horas; si aparecen contaminantes en el medio, se debe adquirir una partida nueva.

ELABORADO POR: Sofia Janneth Soria Jumbo	REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
---	---



## CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

**ANEXO 7.-** Protocolo de preparación de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias Gram negativas.

 <b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b>	<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS</b>	<b>Recepción de la muestra:</b>
		<b>Código: PIBC-04</b> <b>Revisión: 1      Edición: 1</b> <b>Fecha:</b> <b>Página: 62/6</b>

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

#### 1. INTRODUCCIÓN

La identificación de una bacteria sospechosa de ser la causa de una infección es uno de los instrumentos principales del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas. Diferenciar un microorganismo patógeno de ser potencialmente patógeno o contaminante, y deducir sus posibles mecanismos de resistencia, facilita el tratamiento de la enfermedad infecciosa con la mayor eficacia. Para poder ser clínicamente útil, la identificación de un microorganismo debe ser lo más rápida posible.

Una vez aislado el microorganismo de la muestra, se procede a su identificación, es decir, a clasificarlo dentro de un grupo o taxón ya establecido, con el que tenga la mayor semejanza. La complejidad de este proceso depende del nivel de precisión o discriminación que se pretende conseguir.

Existen varias pruebas de bacteriología convencional de realización fácil y rápida sobre colonias aisladas a partir de medios de cultivo que permiten la diferenciación entre grupos de microorganismos o entre especies bacterianas. Para la identificación de los bacilos gram-negativos (BGN) aerobios, del tipo de las enterobacterias, se realiza una batería de pruebas bioquímicas con la que se identifica a los que se aíslan más frecuentemente en nuestro medio. Además de conocer el fenotipo de sensibilidad antibiótica de una determinada especie ayuda de forma determinante a la identificación final. (Hontangas & Castillo, 2016).

- **PRUEBA DE OXIDASA**

El fundamento de esta prueba se basa en la producción bacteriana de la enzima oxidasa, esta reacción se da gracias al sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, que es el aceptor de electrones de la cadena respiratoria, dicho sistema está presente en microorganismos aerobios o microaerófilos y anaerobios facultativos, pero no en anaerobios obligados.

- **PRUEBA DE CITRATO**

Sirve para determinar la capacidad de la bacteria para obtener energía como única fuente de carbono, el medio incluye citrato de sodio, fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y debe carecer de hidratos de carbono y proteínas. Las bacterias que utilizan el citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de fosfato produciendo amoníaco lo que alcaliniza el medio.

- **PRUEBA DE LA DESCARBOXILACIÓN LISINA**

Existen bacterias que tienen la capacidad de descarboxilar la lisina por acción de la enzima lisina descarboxilasa, removiendo una molécula de COOH del aminoácido, también se puede observar la producción de sulfuro de hidrógeno, gracias a la composición del agar.

- **PRUEBA DEL TRIPLE AZÚCAR HIERRO**

Se basa en la fermentación de azúcares del medio (lactosa, glucosa y sacarosa), después de 18 – 24 horas de incubación a 35ª C, además se puede observar la producción de gas sulfhídrico y de CO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>; determinando la capacidad de las bacterias de utilizar 1, 2 o 3 hidratos de carbono presentes en el medio y la posible producción de gases como producto de la actividad bacteriana.

- **PRUEBA DE LA UREASA**

La úrea es una diamida del ácido carbónico que puede hidrolizarse fácilmente, con liberación de amoníaco y CO<sub>2</sub>, así esta prueba se basa en la capacidad que tiene una bacteria de hidrolizar la úrea en los compuestos antes mencionado por actividad o presencia de la enzima ureasa para reaccionar formando carbonato de amonio, alcalinizando el medio.

- **PRUEBA DEL SIM**

Con este medio se puede ver la capacidad de las bacterias para producir sulfuro de hidrógeno, gracias a la liberación de azufre por la acción de la enzima tiosulfato reductasa y la cisteína desulfhidrasa.

La presencia de la enzima triptofanasa permite a las bacterias oxidar el triptófano en tres metabolitos el indol, escatol y ácido indolacético y la movilidad de las bacterias inoculadas que poseen flagelos y las que carecen de los mismos.

- **PRUEBA DE LA CATALASA**

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen la enzima catalasa con excepción de los Estreptococos.

- **TINCIÓN GRAM**

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias grampositivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias gramnegativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella.

## 2. OBJETIVO

Definir los pasos necesarios que garantice el procedimiento para identificación por bacteriología convencional en las pruebas de Lisina, Citrato, Urea, TSI y SIM.

### 3. ALCANCE

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

### 4. RESPONSABLES:

4.1. ESTUDIANTES: elaboración del procedimiento.

4.2. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.

4.3. COLABORADORES, INSTITUCIONES PARTICIPANTES: aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

### 5. MATERIALES

#### Equipos

- Cabina de bioseguridad
- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol con alcohol al 70%
- Incubadora

#### Instrumentos

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

#### Insumos

- Tubos con medio de cultivo elaborado.
- Pruebas bioquímicas para bacteriología convencional: Lisina, Citrato, Urea, TSI, SIM.
- Lápiz graso
- Guantes
- Mascarilla

#### Sustancias y reactivos

- Reactivo de Kovacs.
- Muestra a estudiar

### 6. PROCEDIMIENTO

#### 6.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

##### 6.1.1. PRUEBA DE OXIDASA

##### - Procedimiento:

1. Añadir unas gotas de reactivo (solución de diclorhidrato de tetrametil p - fenilendiamina al 1%), a una tira de papel filtro.

2. Frotar sobre este una colonia aislada de un cultivo de 18 – 24 horas, la reacción positiva se produce a los 10 segundos.

- **Interpretación**

Para leer la reacción se toma en cuenta que es oxidasa positiva si se presenta una coloración morada o púrpura en el sitio de inoculación y negativa si no se produce cambio de color. Las Enterobacterias son negativas y otros géneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Neisseria*, *Campilobacter* y *Pasteurella* son positivas. En esta prueba hay que tener especial cuidado en el medio del que se coge la colonia a probar, no se debe usar colonias procedentes de medios que contengan azúcares ya que su fermentación acidificará el medio y por tanto inhibirá la actividad de la citocromo oxidasa.

### 6.1.2.PRUEBA DE CITRATO

- **Procedimiento:**

1. Tomar una colonia aislada de una caja de agar con un asa de punta e inocular en el pico de flauta del agar.
2. Incubar por 24 horas a 35<sup>a</sup> C

- **Interpretación**

La lectura de la prueba incluye un resultado positivo cuando existe un crecimiento bacteriano y cambio de color del medio de verde a azul, o un desarrollo bacteriano visible en la estría sin cambio de color, en este caso se debe dejar 24 horas más para confirmar la positividad con el cambio de color. Y el resultado es negativo cuando no existe crecimiento ni cambio de color.

### 6.1.3.PRUEBA DE LA DESCARBOXILACIÓN LISINA

- **Procedimiento:**

1. Tomar con un asa de punta una colonia aislada y estriar en la superficie inclinada y picar en la capa profunda sin tocar el fondo del tubo.
2. Se incuba 24 horas a 35<sup>a</sup>C

- **Interpretación**

Para leer la prueba se consideran que la prueba es positiva cuando el pico de flauta se mantiene violeta (alcalino) y el fondo violeta.

El resultado es negativo cuando el pico de flauta es violeta (alcalino) y el fondo amarillo (ácido), es decir se ha fermentado glucosa.

La producción de sulfuro de hidrógeno se observa con un ennegrecimiento en el fondo del tubo o un precipitado negro.

### 6.1.4.PRUEBA DEL TRIPLE AZÚCAR HIERRO

- **Procedimiento:**

1. El agar debe solidificarse en forma de pico de flauta en un tubo con una profundidad de por lo menos 3 cm y por lo menos 2 cm de pico de agar.
2. Tomar una colonia bien aislada de una caja de agar con un asa de aguja.
3. Inocular en el medio TSI picando en la capa profunda hasta de unos 3-5 mm del fondo del tubo, se retira el asa delicadamente y se estría l superficie inclinada con un movimiento de ida y vuelta.

4. Incubar por 18 – 24 horas a una temperatura de 35 a 37°C.

- **Interpretación**

Para la interpretación de los resultados existen varias posibilidades descritas:

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

A = ácido; K = alcalino.

A/A= fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa

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

A/A, SH<sub>2</sub> = fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa + producción de gas sulfhídrico.

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

K/A (g) = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa + producción de CO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>.

K/A, SH<sub>2</sub> = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa + producción de SH<sub>2</sub>.

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

#### 6.1.5.PRUEBA DE LA UREASA

- **Procedimiento:**

1. Se debe solidificar le medio en forma de pico de flauta.
2. Estriar en la superficie inclinada del agar el inóculo bacteriano.
3. Incubar por 18-24 horas de 35 -37°C

- **Interpretación:**

Las bacterias que hidrolizan rápidamente la úrea lo pueden hacer dentro de 1 – 2 h, las especies menos activas pueden requerir hasta 3 días para hacerlo.

Entonces se para poder decir que hay una reacción positiva se observa un color rojo intenso o fucsia en el pico de flauta y en el fondo o sólo en el pico de flauta.

Y negativo cuando no hay cambio de color, el medio permanece de color amarillo.

#### 6.1.6.PRUEBA DEL SIM

- **Procedimiento:**

1. Inocular colonias bacterianas provenientes de un cultivo puro en el agar sulfuro, indol movilidad en la profundidad del medio, teniendo cuidado de no tocar el fondo del tubo ni mover el asa durante la siembra.
2. Incubar por 18 – 24 horas en atmósfera aerobia en 35 a 37°C.
3. Realizar la interpretación o lectura de la prueba.

- **Interpretación:**

Para realizar la interpretación de la producción de sulfuro de hidrógeno debe observarse un precipitado negro en el tubo o cualquier ennegrecimiento en cualquier parte del medio para considerar el resultado positivo, la ausencia de este ennegrecimiento se interpretará como un resultado negativo.

La presencia de la enzima triptofanasa se lee después de añadir unas gotas de reactivo de Kovacs o de Erlich en la superficie del medio, la formación de un anillo de color rojo indica la positividad de la prueba y si se mantiene la coloración amarillenta del reactivo la prueba será negativa.

La presencia de flagelos o no se interpreta como movilidad positiva cuando los microorganismos migran desde la línea de siembra y difunden en el medio lo que produce turbidez y se consideran bacterias inmóviles si el crecimiento bacteriano se acentúa a lo largo de la punción de siembra.

#### 6.1.7. PRUEBA DE LA CATALASA

##### - Procedimiento:

1. Con un palillo de madera transferir una colonia aislada a la superficie de un portaobjetos.
2. Agregar una o dos gotas de reactivo (peróxido de hidrógeno) y observar la formación de burbujas.

##### - Interpretación:

La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva. La observación de unas pocas burbujas diminutas a los 20 o 30 segundos no se considera una prueba positiva. Se debe tener la precaución de no tomar nada de trazas del medio de agar sangre ya que los eritrocitos poseen catalasa y se pueden obtener resultados falsos positivos.

#### 6.1.8. TINCIÓN GRAM:

##### PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE GRAM

##### a. Procedimiento:

1. Tomar una colonia del medio y se realiza un frotis en un portaobjetos, fijarlo con calor.
2. Colocar en el frotis violeta de genciana sobre el frotis fijado por 1 minuto, lavar con agua de la llave.
3. Colocar por 1 minuto lugol y lavar.
4. Decolorar con alcohol cetona por 30 segundos y lavar.
5. Colocar safranina diluida 1:10 por 1 minuto, lavar y dejar secar.
6. Observar en el microscopio óptico con lente de 100x (utilizar aceite de inmersión).

##### b. Interpretación:

Un resultado positivo a la tinción de Gram se acompaña de una descripción de lo que se ha observado al microscopio. En el informe típicamente se informa:

- Si las bacterias son Gram positivas (color púrpura) o Gram negativas (color rosado)
- Forma que presentan -redondeadas (cocos) o en forma de bastoncillo (bacilos)
- Si se observan bacterias en el interior de otras células (intracelulares)
- Presencia de hematíes o leucocitos
- A veces se informa de la presencia de hongos (en forma de levaduras o mohos).

## 7. OBSERVACIONES

### - TABLA DE INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

BACTERIA	TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	Cit*	Urea	Mov**	Indol	Lis***
----------	-----	-----	------------------	------	------	-------	-------	--------

<i>Escherichia coli</i>	a/a	+	-	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	a/a	++	-	+	-	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	a/a	++	-	+	+/-	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	a/a	++	-	+	+	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	a/a	++	-	+	+	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	k/a	+/-	+	-/+	++	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	k/a	+	+	+/-	++	+	-	-
<i>Proteus penneri</i>	k/a	+/-	-	+/-	++	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	a/a o k/a	+	+	+	+/-	+	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	k/a	+	-	+	+/-	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	k/a	+	-	+	-	+	-	+
<i>Morganella morganii</i>	k/a	+	-	-	++	+	+	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	k/a	-/+	-	+/-	-/+	+	-/+	-
<i>Providencia rettgeri</i>	k/a	-	-	+	++	+	+	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	k/a	+	+	-	-	+	+	+
<i>Alkalescens dispar</i>	k/a	-	-	-	-	-	+	-/+
<i>Salmonella typhi</i>	k/a	-	+	-	-	+	-	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	k/a	-	-	-	-	+	-	-
<i>Salmonella spp</i>	k/a	+	+	+	-	+	-	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	k/k	-	-	+	-	+	-	

\*Citrato

\*\*Movilidad

\*\*\*Lisina

ELABORADO POR:  
Sofia Janneth Soria Jumbo

REVISADO Y APROBADO POR:  
Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta



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

**ANEXO 7.-** Protocolo de preparación de pruebas bioquímicas para identificación de bacterias Gram positivas.

 <p style="text-align: center;"><b>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Recepción de la muestra:</b></p> <p><b>Código: PIBC-04</b>  <b>Revisión: 1      Edición: 1</b>  <b>Fecha:</b>  <b>Página: 69/6</b></p>
--	---	--

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

### 1. Introducción

- **PRUEBA DE LA CATALASA**

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen la enzima catalasa con excepción de los *Streptococos*.

- **PRUEBA DE LA COAGULASA**

La coagulasa es una proteína con actividad similar a la protrombina, puede reaccionar con los factores plasmáticos y formar una sustancia similar a la trombina, que convierte el fibrinógeno en fibrina lo que da como resultado la formación de un coágulo; se utiliza para diferenciar al *Staphylococcus aureus* de otras especies de *Staphylococcus*.

La coagulasa puede presentarse en dos formas unida o ligada a la célula y la coagulasa libre, la primera se puede realizar en un procedimiento rápido en portaobjetos, y se la conoce como factor de agrupación que se encuentra unido a la pared bacteriana y la segunda que se identifica en una prueba en tubo en el que se forma un complejo que reacciona con el fibrinógeno del plasma para formar un coágulo de fibrina visible.

- **FERMENTACIÓN DEL MANITOL**

La capacidad del *S. aureus* para fermentar el manitol faculta usar el medio de manitol sal para confirmar la presencia de esta bacteria.

- **PRUEBA DE LA NOVOBIOCINA**

Los estafilococos coagulasa negativos pueden dividirse según sean o no sensibles a la novobiocina, entre las especies resistentes el *Staphylococcus saprophyticus* es el único que suele aislarse de muestras humanas, los otros estafilococos coagulasa negativa y patógenos humanos son sensibles.

- **PRUEBA DE LA OPTOQUINA**

El clorhidrato de etildihidrocupreina inhibe de forma selectiva el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* en muy bajas concentraciones (5ug/ml) al igual que puede inhibir a otros *Streptococcus del Grupo Viridans* pero en concentraciones mucho más altas, por lo tanto permite con una sensibilidad del 95% detectar la presencia de esta bacteria.

- **PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA Y SXT**

La sensibilidad a bajas concentraciones del antibiótico bacitracina y a la combinación de sulfometoxazol trimetropin proporciona un método sencillo para la identificación presuntiva de los estreptococos beta hemolíticos de los grupos A y B.

- **PRUEBA DE LA BILIS ESCULINA**

Esta prueba se realiza para investigar la presencia de *Streptococcus del Grupo D o Enterococcus*, quienes en presencia de bilis tienen la capacidad de hidrolizar la esculina., es decir que estas bacterias son capaces de desarrollarse en presencia de sales biliares, el ennegrecimiento que se forma ante una prueba positiva se debe a la reacción de la esculina formada por la hidrólisis de la esculina, con los iones férricos que son componentes del medio (CLSI, Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 27ª ed, 2017).

## 2. **Objetivo**

Definir los pasos necesarios que garantice el procedimiento para identificación por bacteriología convencional en las pruebas de Catalasa, Coagulasa, Manitol, Novobiocina, Optoquina, Sensibilidad a la bacitracina y STX, y Bilis esculina.

## 3. **Alcance**

Este procedimiento forma parte del proyecto “Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes del Laboratorio Clínico de MEDILAB” y garantizará la identificación de bacterias Gram Positivas.

## 4. **Responsables**

**4.1. ESTUDIANTES:** Elaboración del procedimiento.

**4.2. DOCENTES/INVESTIGADORES:** Validación del procedimiento.

**4.3. COLABORADORES INSTITUCIONES PARTICIPANTES:** Aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

## **5. Materiales**

### **5.1. Equipos**

- Cabina de bioseguridad
- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol con alcohol al 70%
- Incubadora

### **5.2. Instrumentos**

- Puntas de siembre de platino
- Hisopos estériles
- Porta objetos
- Tubos de vidrio
- Soportes para las puntas de siembre de platino.

### **5.3. Insumos**

- Cajas Petri con medio de cultivo elaborado.
- Lápiz graso.
- Guantes.
- Mascarilla.

### **5.4. Sustancias y reactivos**

- Muestra a estudiar
- Peróxido de hidrógeno
- Plasma con EDTA

## **6. Procedimiento**

### **6.1. PRUEBA DE LA CATALASA**

3. Con un palillo de madera transferir una colonia aislada a la superficie de un portaobjetos.
4. Agregar una o dos gotas de reactivo (peróxido de hidrógeno) y observar la formación de burbujas.

### **6.2. PRUEBA DE LA COAGULASA**

1. Emulsionar una pequeña cantidad de colonias puras de una placa de agar en un tubo con 0.5 ml de plasma con EDTA.
2. Incubar el tubo por 4 horas a 35°C y observar si se ha producido un coágulo inclinando ligeramente el tubo,
3. Si la prueba es negativa, reincubar a temperatura ambiente y leer nuevamente a las 18 horas.

### **6.3. FERMENTACIÓN DEL MANITOL**

1. Realizar un pase de la colonia sospechosa al medio de manitol sal.
2. Incubar en atmósfera aerobia por 18 a 24 horas a 35°C.

### **6.4. PRUEBA DE LA NOVOBIOCINA**

1. Preparar una suspensión de la bacteria sospechosa en suero fisiológico estéril con una turbidez equivalente a la escala 0.5 Mac Farland.
2. Con este inóculo estriar una caja de agar sangre.
3. Colocar u disco de novobiocina en el lugar sembrado.
4. Incubar la caja por 18 a 24 horas en aerobiosis a 35°C.

### **6.5. PRUEBA DE LA OPTOQUINA**

1. Escoger 3 a 4 colonias bien aisladas de la bacteria sospechosa y sembrar en una placa de agar sangre en una superficie de por lo menos 3 cm<sup>2</sup>.
2. Colocar un disco de optoquina de la concentración adecuada sobre la zona sembrada.
3. Incubar la placa por 18 a 24 horas a 35°C en una jarra de anaerobiosis por extinción con una vela o en estufa con 5 7% de CO<sub>2</sub>.

### **6.6. PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA Y SXT**

1. Tomar 3 o 4 colonias puras de estreptococos beta hemolíticos con un asa de inoculación y estriar el inóculo en el centro de una placa de agar sangre y sembrar por punción en la profundidad del medio para observar la hemólisis.
2. Diseminar el inóculo con un hisopo estéril sobre la caja
3. Colocar un disco de Bacitracina de 0,04 U y uno de SXT de 1,25 ug/23,75 ug, en forma equidistante sobre el área sembrada.
4. Presionar con suavidad los disco para que se adhieran al agar.
5. Incubar la placa en una estufa por 18 - 24 horas a 35°C.

### **6.7. PRUEBA DE LA BILIS ESCULINA**

1. Tomar dos a tres colonias de la bacteria sospechosa con un ansa de siembra y sembrar en el pico de flauta del medio de bilis esculina.
2. Incubar en aerobiosis por 24 – 48 horas a 35°C

## 7. Observaciones

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 7.1. PRUEBA DE LA CATALASA

La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva. La observación de unas pocas burbujas diminutas a los 20 o 30 segundos no se considera una prueba positiva. Se debe tener la precaución de no tomar nada de trazas del medio de agar sangre ya que los eritrocitos poseen catalasa y se pueden obtener resultados falsos positivos.

#### 7.2. PRUEBA DE LA COAGULASA

La prueba es positiva cuando se observa cualquier grado de formación de un coágulo, inclinando el tubo con suavidad y no se debe agitar, si son negativos es decir no se observan coágulos debe reincubarse a temperatura ambiente.

#### 7.3. FERMENTACIÓN DEL MANITOL

Si la bacteria en estudio es *S. aureus* las colonias serán de color amarillo y se producirá un viraje de color rosado a amarillo en el lugar por donde ha crecido la bacteria, si las colonias y el medio son de color rosado o incoloras se trata de otro tipo de *Staphylococcus*.

#### 7.4. PRUEBA DE LA NOVOBIOCINA

El *S. saprophyticus* es resistente y presentará halos menores de 12 mm, otros estafilococos incluido el *S. aureus* presentará halos mayores.

#### 7.5. PRUEBA DE LA OPTOQUINA

Se deberá medir el halo de inhibición si el disco tiene un diámetro de 6 mm un halo de 14 mm o más se considera sensible y esta bacteria será identificada como *Streptococcus* del grupo *Viridans* y si el disco es de 10 mm de diámetro el halo que se interpreta como sensible debe ser de 16 mm.

Si el halo es menor a estos según corresponda por el diámetro del disco 14 o 16 mm se sospecha de la presencia del *Streptococcus pneumoniae* y en este caso deberá confirmarse con la solubilidad en bilis.

#### **7.6. PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD A LA BACITRACINA Y SXT**

Los estreptococos del grupo A son sensibles a concentraciones relativamente bajas de Bacitracina y resistentes al SXT y los del grupo B son resistentes a ambos antibióticos. Otros estreptococos presentan sensibilidad variable a la bacitracina pero son sensibles a la SXT.

Se interpreta la sensibilidad en ambos antimicrobianos con la presencia de cualquier halo de inhibición alrededor de cualquiera de los discos. Y resistente al crecimiento alrededor de los discos.

#### **7.7. PRUEBA DE LA BILIS ESCULINA**

Observar el ennegrecimiento del medio, o del pico de flauta, si este aparece difuso se considera positivo y significa que se ha hidrolizado la esculina y son por lo tanto *Streptococcus del grupo D*.

### **8. Bibliografía**

CLSI, C. a. (2017). *Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 27ª ed.* Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.

ELABORADO POR: Sofia Janneth Soria Jumbo	REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
---	---



## ANEXO 9.- Protocolo de siembra de muestra y conteo de colonias.

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Siembra de muestra y conteo de colonias</p>	<p>CÓDIGO: PB03 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 1/3</p>
---	--	--

### 1. Introducción

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incubaba a una temperatura adecuada para el crecimiento bacteriano. El método más usual para la siembra es la técnica de estría en la cual podemos obtener colonias aisladas en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies. (Santambrosio, 2009)

Una colonia bacteriana es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido; aunque varía de tamaño generalmente es visible a simple vista. Las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura y en algunos casos color característicos, que aunque puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, es constante bajo condiciones controladas y depende de la especie bacteriana que la forme.

Debido a que las características de las colonias ocurren en varios grados y combinaciones dependiendo de las bacterias y son a menudo muy uniformes, sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados. La morfología colonial es comparable a una estadística ya que se deriva de una célula individual pero es la característica de la masa celular. En una colonia pueden distinguirse varios aspectos como forma, elevación, borde, tamaño, color.

Para el conteo de colonias se usan varios métodos cuantitativos, en este caso utilizaremos el método de asa calibrada, el cual consiste contar el número de colonias desarrolladas después de incubar la siembra a 37<sup>a</sup> C durante 24 horas, el resultado se multiplica por 100 ya que el asa de platino contiene 0,01 ml de orina.

Cuando se obtienen dos recuentos sucesivos con más de 100 000 colonias por ml., la probabilidad de infección es de 80%, cifra que se eleva a 95% si el mismo resultado se logra en tres recuentos sucesivos.

Por lo general, las muestras contaminadas tienden a mostrar cuentas inferiores a 10 000 colonias/ml. Cuando el recuento revela valores intermedios, entre 10 000 y 100 000 colonias/ml, el examen debe repetirse. Conviene advertir que pueden pasar inadvertidas infecciones urinarias verdaderas, si no se toman en cuenta cuentas inferiores a 100 000 colonias por ml, ya que existen diversos factores que pueden explicar recuentos bajos en infecciones urinarias verdaderas, diuresis acentuada, obstrucción uretral, infecciones crónicas e infecciones por cocos grampositivos. (DrH15)

### 3. Objetivo

- a. Definir los pasos necesarios que garantice el procedimiento para siembra de muestras de orina en medios de cultivo de forma que se logre el aislamiento de bacterias y así poder diferenciar el fenómeno de hemólisis en agar sangre e identificar las características de las colonias.

### 4. Alcance

Este procedimiento forma parte del macroproyecto “Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y Solca Loja” y garantizará el aislamiento e identificación de bacterias.

### 5. Responsables:

- a. ESTUDIANTES: elaboración del procedimiento.
- b. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.
- c. COLABORADORES INSTITUCIONES PARTICIPANTES: aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

### 6. Materiales

#### Equipos

- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol con alcohol al 70%
- Incubadora

#### Instrumentos

- Asas de platino
- Hisopos estériles
- Soportes para las asas de platino

#### Insumos

- Cajas Petri con medio de cultivo elaborado
- Lápiz graso
- Guantes

#### Sustancias y reactivos

- Muestra a estudiar

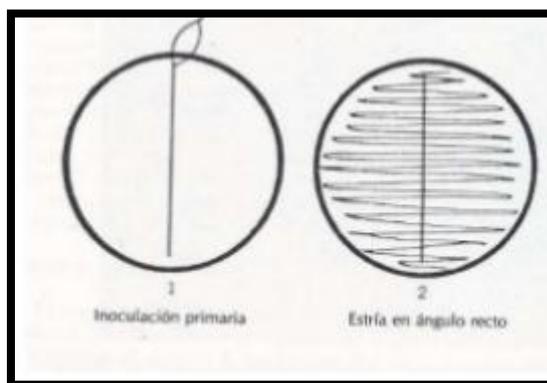
### 7. Procedimiento

Para realizar un cultivo bacteriano es necesario:

1. Tomar el asa calibrada e introducirla al fuego para que se esterilice, dejar enfriar unos segundos y tomar la muestra que se va a estudiar,
2. La orina se mezcla bien, no se centrifuga.
3. Se usa asa calibrada de platino o de plástico (0.01 ml).
4. Se inocula la placa de agar MacConkey por estría primaria y secundaria.

5. Se incuba a 35°C, por 24 horas.
6. Se anotan las características de las colonias y el número de colonias diferentes.
7. Se cuantifican las colonias para obtener las UFC/ml. Se deben anotar todas estas características

### Técnica de estría



### Lectura de cultivo en UFC/ml

- Después de incubar las siembras a 37° durante 24 a 48 horas, se cuenta el número de colonias desarrolladas y el resultado se multiplica por 100, ya que el asa de platino contiene 0.01 ml. de orina.
- Los resultados del estudio cuantitativo se informan de la siguiente manera:
  - ❖ No hubo desarrollo microbiano.
  - ❖ Menos (<) de 10 000 colonias por ml.
  - ❖ Entre 10 000 y 100 000 colonias por ml.
  - ❖ Más de (>) 100 000 colonias por ml.

### Observaciones

- La siembra debe realizarse de la orina sin centrifugar con un asa calibrada, lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo microbiano.
- Marcar las cajas antes de empezar a trabajar
- No hablar durante la siembra
- Flamear el asa antes de realizar la serie de estrías y enfriar en una orilla.
- Las placas no se descartan si no hay crecimiento a las 24 horas, se vuelven a incubar hasta por 72 horas (observando cada 24 horas), si transcurrido el tiempo no hay crecimiento, si se descartan

ELABORADO POR:  
María de los Ángeles Ucho.

REVISADO Y APROBADO:  
Dra. Sandra Freire Cuesta.



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

**ANEXO 10.-** Lectura e interpretar los resultados, identificando el tipo de bacteria presente en los medios.

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Células	Diagnóstico
Leucocitos: 0, Bacterias: $< 10^5$ UFC/ml	Ausencia de ITU
Leucocitos: 0, Bacterias: $> 10^5$ UFC/ml	Contaminación* (repetir)  Pacientes con ureterosigmoidostomía uni o bilateral
Leucocitos: $> 10^4$ /ml, Bacterias: $\geq 10^5$ UFC/ml	Infeción
Leucocitos: $> 10^4$ /ml, Bacterias: $< 10^5$ UFC/ml	ITU tratada  Tuberculosis renal  Bacterias diluidas (infección genital o diuresis abundante)  Bacterias no multiplicadas (pH orina ácido, recolección menos de 4 horas)  Bacterias de multiplicación lenta  Bacterias en grupos = bacilo piocéanico

**- TABLA DE INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS**

<b>BACTERIA</b>	<b>TSI</b>	<b>GAS</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Cit*</b>	<b>Urea</b>	<b>Mov**</b>	<b>Indol</b>	<b>Lis***</b>
<i>Escherichia coli</i>	a/a	+	-	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	a/a	++	-	+	-	+	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	a/a	++	-	+	+/-	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	a/a	++	-	+	+	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	a/a	++	-	+	+	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	k/a	+/-	+	-/+	++	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	k/a	+	+	+/-	++	+	-	-
<i>Proteus penneri</i>	k/a	+/-	-	+/-	++	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	a/a o k/a	+	+	+	+/-	+	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	k/a	+	-	+	+/-	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	k/a	+	-	+	-	+	-	+
<i>Morganella morganii</i>	k/a	+	-	-	++	+	+	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	k/a	-/+	-	+/-	-/+	+	-/+	-
<i>Providencia rettgeri</i>	k/a	-	-	+	++	+	+	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	k/a	+	+	-	-	+	+	+
<i>Alkalescens dispar</i>	k/a	-	-	-	-	-	+	-/+
<i>Salmonella typhi</i>	k/a	-	+	-	-	+	-	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	k/a	-	-	-	-	+	-	-
<i>Salmonella spp</i>	k/a	+	+	+	-	+	-	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	k/k	-	-	+	-	+	-	

\*Citrato

\*\*Movilidad

\*\*\*Lisina



## ANEXO 11.- Control de Calidad

Para los controles de calidad se realizó la compra de dos cepas control, (ATCC 25922) Cepa control de *Escherichia coli*, y la (ATCC 700603) Cepa control de *Klebsiella pneumoniae*.

- **Escherichia coli ATCC 25922.** Es una cepa que se recomienda solo para control de combinaciones de las betalactamasas, como el ácido clavulánico, el sulbactam, o el tazobactam.
- **Klebsiella pneumoniae ATCC 700603.** Esta cepa se usa solo para control de las pruebas de BLEE.

Los controles de calidad se manejaron con los mismos protocolos que se elaboraron para para el manejo de las muestras de la presente investigación.

## RESPALDO DE FOTOS.

### 1. ADQUISICION DE LA CEPAS

MEDIBAC		MEDIBAC - INC S.A.		R.U.C. 0992401494001	
IMPORTADOR - DISTRIBUIDOR Proveedor Integral para Laboratorios ESTABLECIDOS EN 1991		MEDIBAC S.A. - INC S.A. CALLE 10 N° 1000 - ZONA INDUSTRIAL - GUAYAMA, P.R. TEL: (787) 498-2000		<b>FACTURA</b> 001-001- 000053616	
Cuenta Categorizada: NO		CALLE 10 N° 1000 - ZONA INDUSTRIAL - GUAYAMA, P.R. TEL: (787) 498-2000		Autorización S.R.I. 1121383800 FECHA DE AUTORIZACION: 11 SEPTIEMBRE 2017	
Cliente: CELLY CAMPOVERDE TAYRON ALBERTO		Asesor Comercial: VICTOR V			
Dirección: SECTOR CELLI-ROMAN, BENJAMIN PEREIRA Y ALFREDO		Fecha de Emisión: 33/10/2017			
I.U.C. / C.C.: 1105704165		Fecha de Vencimiento: 01/11/2017			
Teléfono: 2584360		Orden de Pedido: 19.648			
Fecha de Remisión:					
Orden de Compra:					
CANT.	CODIGO	MARCA	DESCRIPCION	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1	0339P-S		E. COLI ATCC 25922 (BIOPAC)	136,00	136,00
1	0100P-S		K. PNEUMONAE ATCC BAA-1796	165,00	165,00
1	0100P-S		K. PNEUMONAE ATCC BAA-1795	165,00	165,00
1	0700P-S		K. PNEUMONAE ATCC 700603	145,00	145,00
FORMA DE PAGO			OTROS	693,70	SUMAN \$ 610,00
Total			Selecciones Ochoenta y Tres y 70 / 100 Dólares Americano		DESCUENTO BASE 0 0,00

### 2. CEPAS CONTROL



### 3. INSERTO DE LA CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 25922.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli <b>Catalog Number:</b> 0335 <b>Lot Number:</b> 335-219 <b>Reference Number:</b> ATCC® 25922™* <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2018/11/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2017/1/23
--	--

<b>Macroscopic Features:</b> 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)
--	--

<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	---

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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



TESTING CERT #2655.01

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

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

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



## Meaning of Score Values

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

## Meaning of Consistency Categories (A - C)

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

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

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

## Comments:

closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment

**MEDIBAC-INC S.A.**

Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICOS

Registro Sanitario AD-541-04-13

#### 4. INSERTO DE LA CEPA DE *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

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

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

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

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



TESTING CERT #2655.01

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

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



## Meaning of Score Values

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

## Meaning of Consistency Categories (A - C)

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

Sample Name: Klebsiella pneumoniae  
 Sample Description: 01005  
 Sample ID: 1005-22  
 Sample Creation Date/Time: 2017-07-13T12:15:26.004 MB  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
C12 (+++)(A)	1005-22	Klebsiella pneumoniae	2.36

Comments:

N/A

**MEDIBAC-INC S.A.**

Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICOS

Registro Sanitario AD 541-04-13

25922 (E coli) \*

Fermentadora de lactosa

Reacción en EMB, brillo metálico

Colonia blanquecina, convexa, redondas, beta hemólisis

TSI: A/A H<sub>2</sub>S: N GAS: Positivo

citrato: neg

Urea: neg

SIM: Motilidad +

Indol: +

Lisina: +

CIP: 33mm -S

FEP: 28mm -S

FOX: 19mm

IMP: 38mm -S

GM: 12mm -R

SAM: 15mm -S

SXT: 23mm -S

F: 20mm -S

CAZ: 23mm -S

AK: 20mm -S

700603 (K. pneumoniae) \*

Fermentadora de lactosa

No reacción en CMB.

Colonias grisáceas, cremosas, redondas, convexas, gamma hemólisis.

TSI: A/A H<sub>2</sub>S: - GAS: +

citrato: +

Urea: ++

SIM: Motilidad: -

Indol: -

Lisina: +

GM: 16mm -S

F: 20mm -S

SAM: 8mm -R

AK: 29mm -S

SXT: 38mm -S

CAZ: 18mm -I

FEP: 26mm -S

IMP: 44mm -S

Fox: 18mm -S

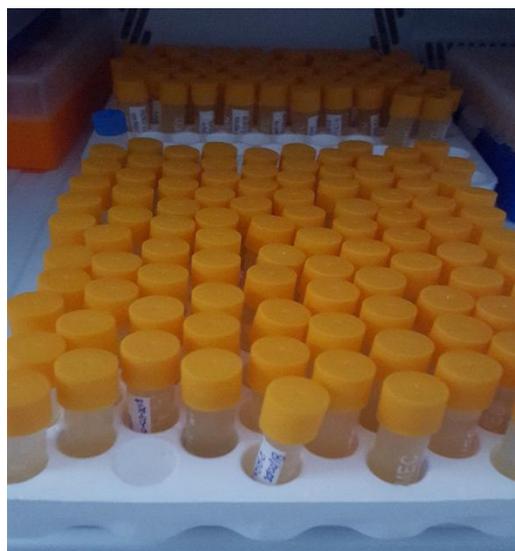
CIP: 31mm -S

## 6. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS CONTROL

**Preparación de viales de control**



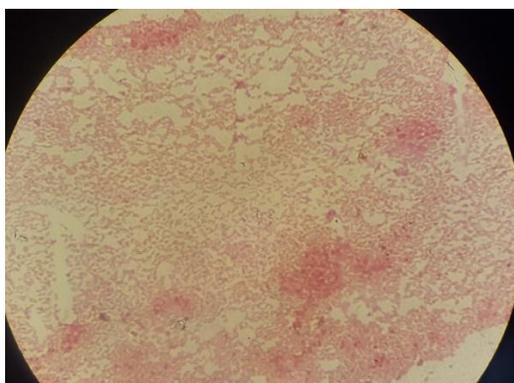
**Viales de control de calidad**



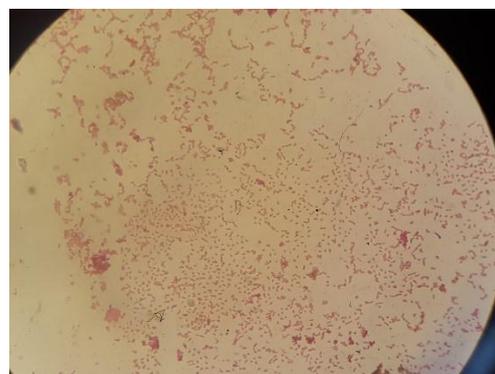
## **7. OBSERVACIÓN DE LOS RESULTADOS**

### **TINCION DE GRAM**

**E. COLI ATCC 25922**



**K. PNEUMONIAE 700603**



### **OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA**

**E. COLI ATCC 25922**

**K. PNEUMONIAE 700603**

**PRUEBAS BIOQUÍMICAS**



**MEDIOS DIFERENCIALES AGAR MAC-CONKEY Y EMB**





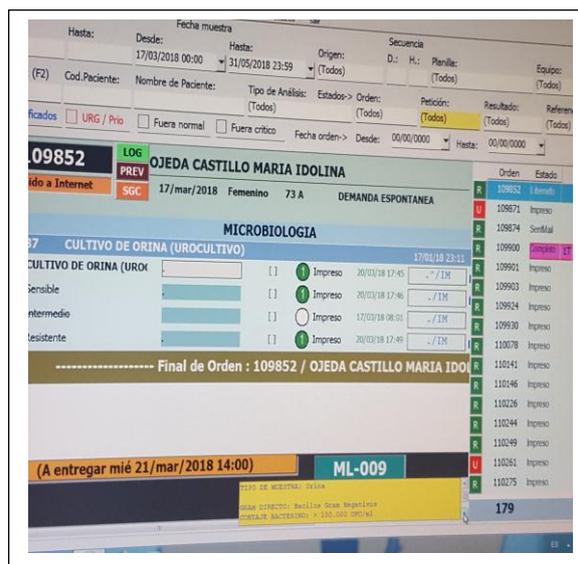
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
FACULTAD DE SALUD HUMANA  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

## ANEXO 10.- FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO DE CAMPO

### CLÍNICA & LABORATORIO “MEDILAB”



### SISTEMA OPERATIVO DE DATOS “MEDILAB”



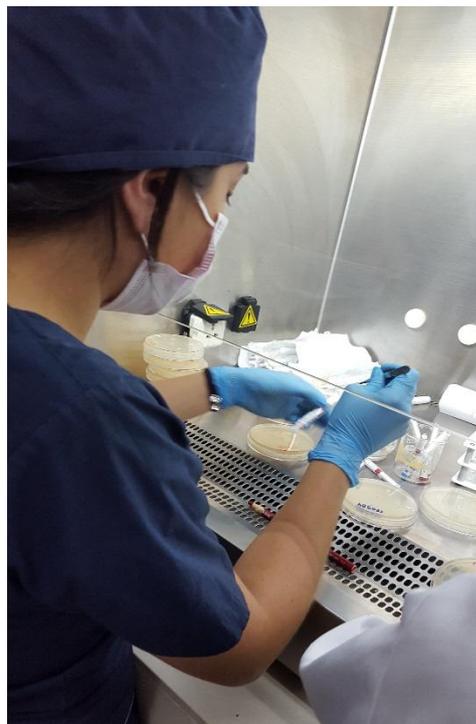
## PREPARACIÓN DE MEDIOS Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS



## ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL PREPARADO



### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

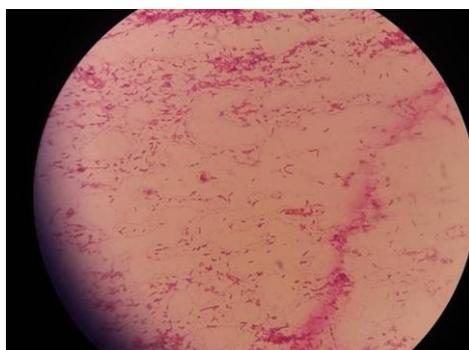


### LECTURA DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS



**OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS (TINCION DE GRAM)**

*Escherichia coli* Cod. 113039

**OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS**

*Escherichia coli* Cod. 113039

Medios Diferenciales Agar Mac-Conkey,  
EMB y Mueller-Hinton

Pruebas Bioquímicas



# English Speak Up Center

Nosotros "*English Speak Up Center*"

## CERTIFICAMOS que

La traducción del documento adjunto solicitada por la señorita **SOFIA JANNETH SORIA JUMBO** con cédula de ciudadanía número **1106022187** cuyo tema de investigación se titula: **"AGENTES BACTERIANOS CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN MUJERES QUE ASISTEN AL LABORATORIO CLINICO MEDILAB-LOJA "**, ha sido realizada por el Centro Particular de Enseñanza de Idiomas "*English Speak Up Center*".

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

Loja, 17 de Octubre de 2018

*Elizabeth Sánchez de Velasco*  
Mgs. Elizabeth Sánchez Burneo

DIRECTORA ACADÉMICA

