



1859

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

***Carrera de Laboratorio Clínico***

**“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTE DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO DE MEDILAB”.**

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

**Autora:**

***Katheryne Daniela Mihquero Masache***

**Directora de tesis:**

***Lcda. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.***

**Loja, Ecuador**

**2018**

## CERTIFICACIÓN

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

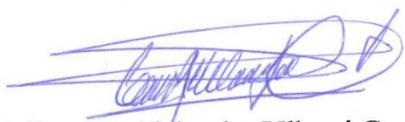
DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del trabajo investigativo titulado: **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTE DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO DE MEDILAB”** de autoría de la Srta. **Katheryne Daniela Mihquero Masache**, 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, 26 de Octubre del 2018

Atentamente:



Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

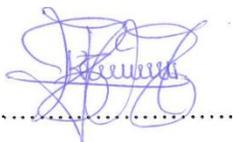
DIRECTORA DE TESIS

## AUTORÍA

Yo Katheryne Daniela Mihquero Masache con Cl. 1105752909 declaro ser autora del presente trabajo de tesis titulado “**SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE KLEBSIELLA SPP CAUSANTE DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO DE MEDILAB**”, como requisito para obtener el título de Licenciada en Laboratorio Clínico; 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 de la Biblioteca Virtual.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, 26 de Octubre del 2018.



**Firma:** .....

**Autora:** Katheryne Daniela Mihquero Masache

**Cedula:** 1105752909

**Correo electrónico:** kated\_dmm@yahoo.es / katheryne.mihquero@unl.edu.ec

**Dirección:** Manuel Cano Madrid y Manuel Vaca.

**Teléfono:** 0989006677

### Datos complementarios

**Directora de tesis:** Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

**Tribunal de tesis:**

**Presidenta:** Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta, Mg. Sc.

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

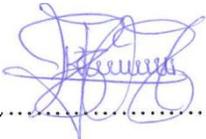
**Vocal:** Lic. Gladys Margoth Jumbo Chuquimarca, Mg. Sc

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Katheryne Daniela Mihquero Masache, declaro ser autora de la tesis titulada: **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTE DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO DE MEDILAB”** como requisito para optar el grado de: Licenciado en Laboratorio Clínico; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Digital Institucional, 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, 26 de Octubre del 2018

**Firma:**  .....

**Autora:** Katheryne Daniela Mihquero Masache

**Cédula:** 1105752909

**Dirección:** Manuel Cano Madrid y Manuel Vaca, N°80-06

**Teléfono:** 2 616-015. **Celular:** 0989006677.

**Correo electrónico:** kated\_dmm@yahoo.es / katheryne.mihquero@unl.edu.ec

### DATOS COMPLEMENTARIOS

**Directora de Tesis:** Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

**Tribunal de Grado:**

**Presidenta:** Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta, Mg. Sc.

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

**Vocal:** Lic. Gladys Margoth Jumbo Chuquimarca, Mg. Sc.

## DEDICATORIA

Dedico mi tesis primeramente a Dios, por darme la oportunidad de cumplir con otro reto en mi vida y siempre guiar mis pasos.

Dedico mi tesis a mi familia, a las personas más especiales de mi vida y que me han ayudado en todo momento; mis padres, por su esmero y esfuerzo por formarme con valores sólidos y con mucho cariño. A mis hermanos, sobrinos y amigos por siempre estar presentes apoyándome.

*Katheryne Daniela Mihquero Masache*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, por la oportunidad de culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mi familia, por estar apoyándome siempre y brindarme consejos para seguir adelante. A mis padres en especial por brindarme siempre muy buenos valores y ser mi razón de seguir adelante. A mis hermanos por su cariño y palabras de motivación.

A la Universidad Nacional de Loja, por la oportunidad estudiar en tan prestigiosa institución para alcanzar mi objetivo.

A mi directora de tesis Lic. Carmen Ullauri, por su dedicación y por ayudarme con su conocimiento en el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Sandra Freire por su ayuda y guía durante el desarrollo del proyecto.

A todos los docentes que me ayudaron en la formación académica durante el transcurso de la carrera, por brindarme sus conocimientos y consejos.

Al prestigioso Laboratorio Clínico de MEDILAB, por su ayuda y colaboración en la recolección de datos y envió de muestras.

A los usuarios partícipes del proyecto de la investigación por su buena predisposición y amabilidad.

*Katheryne Daniela Mihquero Masache*

## ÍNDICE

CARÁTULA .....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA .....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN .....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
1. Título .....	ix
2. Resumen .....	2
3. Introducción.....	4
4. Revisión de literatura.....	6
1. Infecciones de las vías urinarias .....	6
2. Enterobacterias .....	6
3. Diagnóstico de laboratorio .....	11
3.1. Procedimiento para toma de muestra de orina para análisis microbiológico .....	11
3.2. Susceptibilidad antimicrobiana .....	14
3.2.1. Antibióticos. ....	14
3.2.1.1. Mecanismos de acción de los antibióticos. ....	14
3.2.1.2. Espectro antimicrobiano y mecanismos de resistencia. ....	14
3.2.2. Selección de antimicrobianos. ....	15
3.2.3. Betalactámicos.....	15
3.2.4. Penicilinas.....	18
3.2.5. Cefalosporinas.....	21
3.2.6. Carbapenémicos.....	24
1.1.2. Aminoglucósidos.....	26

1.1.3. Monobactams.....	27
1.1.4. Quinolonas.....	28
1.1.5. Nitrofuranos.....	29
1.1.6. Sulfamidas.....	29
1.1.7. Fosfomicinas.....	30
1.1.8. Polimixinas.....	31
1.2. Medio de sensibilidad.....	31
1.2.1. Agar de Mueller-Hinton.....	31
1.3. Métodos de estudio de la sensibilidad a antimicrobianos.....	32
1.3.1.1. Sistema de micro-dilución en caldo.....	33
1.3.1.2. Método de micro-dilución en caldo.....	34
1.3.2. Métodos manuales.....	34
1.3.2.1. Método de Dilución.....	34
1.3.2.2. Dilución en agar.....	34
1.3.2.3. Dilución en caldo.....	35
1.3.3. Método de difusión en disco- placa Kirby Bauer.....	35
1.3.3.1. Método del medio de cultivo líquido.....	35
1.3.3.2. Método de la suspensión directa de colonias en placa.....	36
1.4. Puntos de interrupción y definiciones de categorías interpretativas.....	37
1.5. Método de Épsilon test (E-test).....	39
5. Materiales y métodos.....	40
6. Resultados.....	45
7. Discusión.....	51
8. Conclusiones.....	56
9. Recomendaciones.....	57

10. Bibliografía.....	58
11. Anexos.....	62
11.1. Anexo 1: Permiso para recolección de muestras y datos en el Laboratorio Clínico de MEDILAB .....	63
11.2. Anexo 2: Sistema de datos electrónico del Laboratorio Clínico de MEDILAB .....	64
11.3. Anexo 3: Protocolo de conservación y transporte de muestras de urocultivos positivos.....	65
11.4. Anexo 4: Protocolo de preparación de agar Mueller Hinton.....	67
11.5. Anexo 5: Protocolo de conservación y almacenamiento de cepas control.....	70
11.6. Anexo 6: Protocolo de siembra de Urocultivos.....	73
11.7. Anexo 7: Protocolo de identificación de bacilos gram negativos .....	77
11.8. Anexo 8: Protocolo de método de difusión en discos Kirby-Bauer / Antibiograma..	85
11.9. Anexo 9: Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), Amp-C y Carbapenemasas.....	90
11.10. Anexo 10: Tratamiento y eliminación de residuos microbiológicos .....	101
11.11. Anexo 11: Formato de procesamiento de muestras de MEDILAB.....	104
11.12. Anexo 12: Formato de confirmación de producción fenotípica de betalactamasas	105
11.13. Anexo 13: Certificado del procesamiento de muestras del proyecto de investigación por parte de la docente a cargo .....	106
11.14. Anexo 14: Certificado de ejecución del proyecto por parte de la encargada del Centro de Diagnóstico Médico de la Facultad de la Salud Humana de la UNL .....	107
11.15. Anexo 15: Certificado de la traducción del resumen .....	108
11.16. Anexo 16: Fotos del proyecto.....	109

## **1. Título**

“Susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella spp* causante de infecciones de vías urinarias en usuarios del Laboratorio Clínico de MEDILAB”

## 2. Resumen

La infección de vías urinarias consiste en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana. *Klebsiella pneumoniae* es clasificada como el segundo agente etiológico de importancia médica en los casos de infecciones urinarias de etiología bacteriana. La relación con la autoadministración de antibióticos sin ser prescritos por un profesional de la salud, afecta directamente para que este tipo de bacterias creen resistencias a los antibióticos y, se utilicen grupos específicos de antimicrobianos de uso infrecuente para su terapéutica. *Klebsiella pneumoniae* es considerada como superbacteria ya que presenta una gran capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de especies de *Klebsiella* aisladas en muestras de orina de los usuarios del Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; estudio de tipo descriptivo-transversal, con un número de 64 muestras de orina con solicitud de urocultivo. Los resultados obtenidos demuestran a *Klebsiella pneumoniae* como el segundo agente etiológico causante de infecciones de vías urinarias en el área local, con un perfil de susceptibilidad de mayor sensibilidad antimicrobiana a: amikacina (100 %), cefoxitina (83,3 %) y carbapenémicos (100 %); y resistencia a: ampicilina/sulbactam (50 %) y trimetropin sulfametozasol (66,7 %). Se detectó la producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) en pacientes con infección de vías urinarias mayores de 60 años, ambulatorios.

**PALABRAS CLAVES:** *Klebsiella pneumoniae*, susceptibilidad antimicrobiana, IVU, betalactamasas.

### Abstract

Urinary tract infections consist of colonization and microbial multiplication, usually bacterial. *Klebsiella pneumoniae* is classified as the second most medically important etiological agent in bacterial urinary infections. This bacteria's relationship to the self-administration of antibiotics, without being prescribed by a health professional, has direct effects, allowing it to build resistance to antibiotics. Specific groups of antimicrobials are infrequently used for treatment. *Klebsiella pneumoniae* is considered a superbacteria since it has a great capacity to acquire resistance to antibiotics. The objective of this work was to establish the profile of antimicrobial susceptibility of *Klebsiella* species isolated in urine samples taken from the users of the MEDILAB Clinical Laboratory, Loja. This was a descriptive-transversal study, using 64 urine samples sent for a urine culture test. The results obtained show *Klebsiella pneumoniae* as being the second most important etiological agent causing urinary tract infections in the local area, with a susceptibility profile of greater antimicrobial sensitivity to: amikacin (100 %), cefoxitin (83.3 %) and carbapenems (100 %); and resistance to: ampicillin / sulbactam (50 %) and trimethoprim sulfamethozasol (66.7 %). The production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) was detected in patients with urinary tract infections older than 60 years, ambulatory.

**KEYWORDS:** *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial susceptibility, IVU, beta-lactamases.

### 3. Introducción

La susceptibilidad antimicrobiana de bacterias se ve afectada debido al uso frecuente e inadecuado de antibióticos; incrementando la resistencia a determinados antimicrobianos de primera línea en la terapia de enfermedades infecciosas bacterianas. Las infecciones de vías urinarias (IVU) de origen bacteriano son producidas principalmente por *Escherichia coli* (*E. coli*) que es considerado como el uropatógeno prevalente en este tipo de infecciones; seguido de otros agentes etiológicos en orden variable como *Klebsiella pneumoniae*, (Organización Mundial de la Salud, 2014).

A nivel mundial han surgido a lo largo de los años microorganismos resistentes o multirresistentes a los distintos antimicrobianos entre ellos *Klebsiella pneumoniae*. Dicha resistencia puede ser natural, propia del género de este tipo de bacterias a antimicrobianos como la vancomicina, ampicilina o la penicilina; o puede tener un tipo de resistencia adquirida como consecuencia de mecanismos bioquímicos codificados a nivel cromosómico o por diversos elementos móviles en los plásmidos de la bacteria lo que favorece la aparición de brotes nosocomiales de patógenos panresistentes frente a los que prácticamente se agotan las posibilidades terapéuticas, (Paciel, Seija, Prieto, & Medina, 2011).

Las especies de *Klebsiella* con más reincidencia presentes en infecciones del tracto urinario son *Klebsiella pneumoniae* y en menor porcentaje *Klebsiella oxytoca*; pueden presentar resistencia a: trimetoprim sulfametoxazol, ampicilina-sulbactam, cefalotina y varias cefalosporinas; esto puede atribuirse al uso inapropiado de antibióticos creando resistencia adquirida ante estos microorganismos, (Orrego, Henao, & Cardona, 2014).

*Klebsiella pneumoniae* se ha convertido en un microorganismo con gran resistencia presente en infecciones intrahospitalarias en pacientes con el sistema inmune deprimido a nivel mundial; debido a su gran capacidad de adaptación en el medio ante condiciones

extremas y a sus mecanismos de resistencia ligados a su expresión génica lo cual contribuye con la reducción de las opciones terapéuticas ante este tipo de bacterias, (Tamayo & Córdova, 2016).

La frecuencia de infecciones causadas por bacterias productoras de betalactamasas ha ido aumentando progresivamente durante los últimos años, en Latinoamérica se han reportado cifras superiores al 32 % para *E. coli* y 58 % *Klebsiella pneumoniae*. En el Ecuador en el año 2009, el porcentaje de resistencia a cefalosporinas de tercera generación para *Klebsiella pneumoniae* tiene un porcentaje entre el 42 al 48 %, (Bueno, 2016).

Para describir la situación local en este aspecto se desarrolló el presente estudio de "Susceptibilidad antimicrobiana en *Klebsiella spp* causantes de infecciones de vías urinarias en usuarios del Laboratorio Clínico de MEDILAB", en el periodo de Marzo-Mayo del 2018; para identificar y clasificar las especies resistentes según edad, sexo y área de servicio.

## 4. Revisión de literatura

### 1. Infecciones de las vías urinarias

El término de infección en vías urinarias (IVU) se emplea para describir la infección de una parte del sistema urinario o la presencia de gran número de microbios en la orina. Las IVU son más comunes en mujeres debido a su estructura anatómica con presencia de una uretra más corta. Los síntomas incluyen ardor o dolor al orinar, micción urgente y frecuente, dolor lumbar. Las IVU comprenden uretritis (inflamación de la orina), cistitis (inflamación de la vejiga urinaria) y pielonefritis (inflamación de los riñones). Si estas enfermedad se hace crónica, se forma tejido cicatrizal en los riñones con daño grave, (Tortora & Grabowski, 2004).

Las infecciones del tracto urinario están causadas en su mayoría por bacterias de la flora intestinal que ascendiendo por la uretra, alcanzan la vejiga y en algunos casos progresan afectando a los uréteres y los riñones, (Prats, 2008).

### 2. Enterobacterias

Las Enterobacteriaceae 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). Algunos microorganismos entéricos, por ejemplo, *E. coli*, son parte de la microflora normal y en forma incidental producen enfermedad, en tanto que otros, las *Salmonellas* y las *Shigellas*, por lo regular son patógenos para el ser humano. Las Enterobacteriaceae son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia, (Jawetz, 2010: pág. 213).

Se han descrito 50 géneros y cientos de especies y subespecies. Estos géneros se han clasificado en función de sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación ADN-ADN y secuenciación del ARNr 16S. A pesar de la complejidad de esta familia, la mayoría de las infecciones humanas están causadas por relativamente pocas especies, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 258).

La familia de las Enterobacteriaceae tiene las siguientes características:

- Son bacilos gramnegativos, ya sea móviles con flagelos, peritricosos o no móviles;
- Se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros suplementos;
- Se multiplican bien en agar de MacConkey;
- Proliferan en medios aerobios y anaerobios (son anaerobios facultativos);
- Fermentan en vez de oxidar glucosa, a menudo produciendo gas;
- Son catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitrato a nitrito;
- Tienen un contenido de DNA de G + C de 39 a 59 %;
- Se observa una morfología característica en la multiplicación en medios sólidos in vitro, pero las características morfológicas son muy variables en especímenes clínicos. Las cápsulas son de gran tamaño y regulares en *Klebsiella*, menos en *Enterobacter* e infrecuentes en las demás especies;
- Se clasifican en más de 150 diferentes antígenos somáticos termolábiles O diferentes (lipopolisacáridos), más de 100 antígenos K (capsulares) termolábiles y más de 50 antígenos H (flagelares), (Jawetz, 2010: pág. 213).

Algunas bacterias entéricas como *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia*, *Citrobacter* y *Serratia*; también se encuentran como miembros de la microflora intestinal normal, pero son bastante menos frecuentes que *E. coli*. Las bacterias entéricas a

veces se detectan en pequeños números como parte de la microflora normal del sistema respiratorio alto y el aparato genital. Las bacterias entéricas por lo general no producen enfermedad y en el intestino pueden incluso contribuir a una función y nutrición normal, (Jawetz, 2010: pág. 213).

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación y son parte de la flora intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano. Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, que incluyen un tercio de todas las bacteriemias, más del 70 % de las infecciones del tracto urinario (ITU) y muchas infecciones intestinales. Algunos microorganismos (por ejemplo: *Salmonella* serotipo *Typhi*, *Shigella*, *Yersinia pestis*) se asocian siempre a enfermedad en el ser humano, mientras que otros (por ejemplo: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) forman parte de la microflora comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 258).

Mientras que muchas bacterias se pueden eliminar rápidamente de la sangre, los microorganismos virulentos que son capaces de producir infecciones sistémicas con frecuencia son resistentes a la acción bactericida del suero. La cápsula bacteriana puede proteger a los microorganismos de este efecto bactericida, así como otros factores que evitan la unión de los componentes del complemento a las bacterias y su eliminación posterior mediada por el complemento. Tan pronto como se introducen nuevos antibióticos, los microorganismos pueden desarrollar resistencias a los mismos. Esta resistencia puede estar codificada en plásmidos transferibles e intercambiarse entre especies, géneros e incluso familias de bacterias, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 261).

Cuando se presentan infecciones de importancia clínica, suelen deberse a *E. coli*, pero las demás bacterias entéricas son causa de infecciones hospitalarias y a veces producen

infecciones extra hospitalarias. Las bacterias se vuelven patógenas sólo cuando alcanzan a los tejidos fuera de sus zonas intestinales normales u otros sitios de microflora normal menos frecuente. Los lugares más frecuentes de infecciones de importancia clínica son el sistema urinario, las vías biliares y otras zonas en la cavidad abdominal, pero cualquier zona anatómica (por ejemplo: la circulación sanguínea, glándula prostática, pulmón, hueso, meninges) puede ser el lugar afectado por una enfermedad, (Jawetz, 2010: pág. 217).

Algunas de las bacterias entéricas son microorganismos patógenos oportunistas; es decir cuando las defensas normales del hospedador son inadecuadas, sobre todo en la lactancia o en la vejez, en las etapas terminales de otras enfermedades después de la inmunodepresión o en pacientes con catéteres venosos o sondas uretrales a permanencia, pueden presentarse infecciones importantes circunscritas y las bacterias pueden llegar al torrente sanguíneo y producir septicemia, (Jawetz, 2010: pág. 217).

### **2.1. *Klebsiella spp***

Este género incluye las especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella terrigen*. Las dos especies de mayor importancia clínica relacionadas con infecciones urinarias son la *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*; estas bacterias se localizan en el aparato respiratorio y digestivo, (Romero, 2008).

Los miembros de este género son bacilos gramnegativos no flagelados inmóviles; son aerobios o anaerobios facultativos, poseen una gran capsula que les caracteriza por poseer antígenos “O” y “K”, de estos antígenos K pueden se conocen 72 polisacáridos diferentes que conforman otros tantos tipos serológicos; además este tipo de bacterias fermentan la lactosa, son catalasa positivos, productores de gas, hidrolizan la urea y producen citrato positivo. Los factores de patogenicidad de estas bacterias son: la capsula que es un factor

antifagocitario y la endotoxina de pared que es un lipopolisacárido, (Romero, 2008).

La cápsula protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos, inhibiendo la activación del complemento, especialmente del C3b. Se han descrito algunos tipos capsulares más virulentos que otros, como por ejemplo los K1, K2, K4 y K5. La primera etapa en el proceso infeccioso es la adherencia del agente a las células del hospedero, función que en el caso de las enterobacterias es desempeñada por unas proyecciones filamentosas de la superficie bacteriana llamadas pilis, de las cuales existen dos tipos predominantes en *Klebsiella spp*: el tipo 1 y el tipo 3. El tipo 1 está asociado en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario, adhiriéndose a las células del túbulo proximal. Su adherencia a las células del tracto respiratorio afecta la resistencia a la colonización, lo cual conlleva a la proliferación de patógenos potenciales y puede conducir a neumonía, principalmente en pacientes con ventilación mecánica; el pili tipo 3 interviene en la adherencia a las células endoteliales y los epitelios del tracto respiratorio y urinario. El mecanismo exacto de la resistencia a la inmunidad de los llamados factores séricos, y en este caso el relacionado con la activación del complemento, es desconocido; una posible explicación es el enmascaramiento del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria por parte de la cápsula, de tal forma que exhibe una estructura que no activa el complemento. El hierro es un elemento vital para el desarrollo bacteriano, y su disponibilidad en el ambiente del hospedero es muy limitado, pero muchas bacterias lo obtienen produciendo agentes quelantes llamados sideróforos, que son capaces de tomarlo de las proteínas del hospedero. Existen varios tipos de sideróforos que se han reunido en dos grupos químicos diferentes, según produzcan enterobactinas y aerobactinas, las cuales, como se ha demostrado, son producidas por las especies del género *Klebsiella spp*; también se ha descrito la producción de citotoxinas, enterotoxinas y hemolisinas,

factores que en el caso de *Klebsiella spp* parecen jugar un papel menor en su patogenicidad, (López & Echeverri, 2010).

*Klebsiella pneumoniae* está presente en el sistema respiratorio y en heces de casi 5 % de las personas sanas. Produce una pequeña proporción (alrededor de 1 %) de las neumonías bacterianas. *Klebsiella pneumoniae* puede producir una consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa. Produce infecciones urinarias y bacteriemia con lesiones focales en pacientes débiles o inmunodeprimidos. Las bacterias del género *Klebsiella* figuran entre las 10 principales bacterias patógenas que ocasionan infecciones hospitalarias, (Jawetz, 2010: pág. 219).

Cuando produce enfermedad se asocia con infección de vías urinarias, infección de quemaduras, diarrea en neonatos y neumonía que puede llegar a producir abscesos pulmonares. *Klebsiella ozaenae* y *Klebsiella rhinoscleromatis* son subespecies de *Klebsiella pneumoniae*; la primera produce rinitis atrófica y rinitis supurativa; la segunda provoca rinoscleroma. El tratamiento para infecciones por estas especies de bacterias por lo general se hace con antibióticos aminoglucósidos y tetraciclinas, (Romero, 2008).

### **3. Diagnóstico de laboratorio**

#### **3.1. Procedimiento para toma de muestra de orina para análisis microbiológico**

Para la realización del análisis y procesamiento microbiológico de muestras de orina se debe asegurar la obtención de muestras adecuadas mediante una correcta recolección asegurando su calidad; en especial cuando se necesita evaluar la presencia de bacterias causantes de infección de vías urinarias siendo indispensable evitar la contaminación de las muestras obtenidas, (Soto, 2013).

### **3.1.1. Procedimiento de recolección de la muestra.**

- Recolectar la muestra de orina; se debe dar instrucciones a cumplir el paciente antes de su recolección; en general el paciente no debe tomar antidiuréticos, no tomar antibióticos 7 días antes del examen, no tener el periodo en caso de mujeres, no tener relaciones sexuales antes de tomar la muestra hasta 6 horas antes de la toma de la muestra; debe tener un mínimo de 3 horas de retención urinaria;
- Recolectar la primera orina de la mañana, por ser de mayor concentración y, la segunda micción, para evitar contaminación de la primera porción de la uretra;
- Obtener la muestra en forma aséptica en tubo o frasco estéril o en tubo o envase para muestras de orina limpio y seco, después de un aseo prolijo con agua y jabón en zona genital;
- Enjuague con abundante agua. Se sigue un procedimiento de limpieza en paciente de género masculino, femenino y en paciente pediátricos, (Soto, 2013).

#### **3.1.1.1. Procedimiento de recolección de muestra de orina en lactantes y niños menores de 3 años.**

- Lavar sus manos con agua y jabón previa a la obtención de la muestra;
- Utilizar recolectores, los que se instalan luego de un aseo cuidadoso con agua limpia;
- No utilizar por un tiempo de 30 minutos o más un recolector de orina pediátrico (por riesgos de contaminación de la muestra), si sucede debe cambiarse por otro;
- Utilizar máximo 3 recolectores en un día en caso de necesidad, ya que el adhesivo puede causar daños en la piel. Si no se obtiene la muestra se debe citar al lactante o niño al día siguiente, (Rodríguez M. , 2012).

#### **3.1.1.2. Procedimiento de recolección de muestra de orina en mujeres.**

- Lavar sus manos con agua y jabón previa a la obtención de la muestra;

- Lavar los genitales, separando cuidadosamente los labios mayores, con un algodón embebido en agua jabonosa y limpiar de hacia atrás una sola vez. Elimine el algodón y repita el procedimiento con otro algodón. Enjuagar con agua eliminando totalmente el jabón y secar la zona con un paño seco y limpio;
- Evitar recolectar la muestra si la paciente está en su periodo menstrual, en caso contrario cubrir la zona vaginal con un tapón de algodón para evitar que la orina se contamine. Realizar un aseo genital, elimine el primer chorro de orina y sin cortar la micción recolectar el segundo chorro de orina en un frasco o tubo estériles para urocultivo. Llenar hasta la mitad, tapar el frasco y rotular para identificación de la muestra, (Soto, 2013).

**3.1.1.3.** *Procedimiento de recolección de muestra de orina en hombres.*

- Lavar sus manos con agua y jabón previa a la obtención de la muestra. Retraer el prepucio y lavar la zona con un algodón embebido en solución jabonosa. Enjuagar con agua eliminando totalmente el jabón y secar la zona con un paño seco y limpio;
- Realizar un aseo genital, elimine el primer chorro de orina y sin cortar la micción recolectar el segundo chorro de orina en un frasco o tubo estériles para urocultivo; Llenar hasta la mitad, tapar el frasco y rotular para identificación de la muestra, (Soto, 2013).

**3.1.2.** *Observaciones para tomas de muestra de orina para análisis microbiológico.*

- Si el envío al laboratorio demora más de una hora, la orina se debe mantener y transportar refrigerada entre 2°C a 8°C;
- Si la muestra va a ser tomada por el propio paciente, instruir al paciente en forma clara y precisa entregando además instructivos escritos, (Soto, 2013).

### **3.2. Susceptibilidad antimicrobiana**

Los anti bióticos son productos químicos que tienen acción destructiva o inhibidora sobre los microorganismos dentro de un huésped. El uso de antimicrobianos es un descubrimiento que puede describirse como extraordinario y parte del principio de un gran investigador de la microbiología Paul Erlich, (Romero, 2008).

Se manejan los términos como antibióticos bactericidas que se conoce como aquel fármaco que destruye a los microorganismos dentro de un huésped; y bacteriostáticos como aquel fármaco que inhibe el crecimiento de los microorganismos dentro de un individuo, (Jawetz, 2010: pág. 58).

#### **3.2.1. Antibióticos.**

Los antibióticos son sustancias antimicrobianas producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen o inhiben el crecimiento bacteriano, (Brunton, Lazo, & Parker, 2007).

##### **3.2.1.1. *Mecanismos de acción de los antibióticos.***

Los antibióticos cuya toxicidad se utilizan como agentes terapéuticos actúan sobre los microorganismos:

- Inhibiendo la síntesis de la pared celular y activando enzimas que destruyen dicha estructura;
- Aumentando la permeabilidad de la membrana celular;
- Por inhibición de las funciones de la membrana celular;
- Por inhibición de la síntesis de las proteínas, (Sánchez, 2010).

##### **3.2.1.2. *Espectro antimicrobiano y mecanismos de resistencia.***

Para cada familia, se mencionan los microorganismos más frecuentes en patología humana que habitualmente son sensibles. Los mecanismos involucrados en la resistencia

pueden clasificarse en 4 grupos:

- a) Producción de enzimas inactivantes;
- b) Disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana;
- c) Existencia de un sistema de expulsión activa del antibiótico;
- d) Cambios en la proteína diana, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

### **3.2.2. Selección de antimicrobianos.**

La selección de los agentes antimicrobianos más apropiados para probar e informar es la decisión que mejor toma cada laboratorio en consulta con los profesionales de las enfermedades infecciosas. Las recomendaciones para cada grupo de organismos incluyen agentes de eficacia demostrada que muestran una prueba in vitro aceptable actuación, (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

### **3.2.3. Betalactámicos.**

El principal componente estructural de la mayoría de las paredes celulares en las bacterias es la capa de peptidoglucano. La estructura básica es una cadena de 10 a 65 residuos disacáridos que constan de moléculas de N-acetilglucosamida y N-acetilmuranico. A continuación, estas cadenas se entrecruzan con puentes de peptídicos que crean una malla rígida que recubre la bacteria. La construcción de las cadenas y el entrecruzamiento están catalizados por enzimas específicas (transpeptidasas, transglucocidasas, carboxipeptidasas) que son miembros de una familia. Estas enzimas reguladoras reciben también la denominación de proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), porque son las dianas de los antibióticos betalactámicos. Cuando las bacterias en crecimiento quedan expuestas a estos antibióticos, el antibiótico se une a las PBP específicas de la pared celular e inhibe el ensamblaje de las cadenas de peptidoglucano; activando las autolisinas que degradan la

pared celular, lo que da lugar a la muerte de la célula bacteriana; actuando los antibióticos betalactámicos como bactericidas, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 165).

Las bacterias pueden hacerse resistentes a los antibióticos betalactámicos por tres mecanismos generales:

- La disminución de la concentración del antibiótico en la diana de la pared celular; este mecanismo se observa solo en bacterias gramnegativas; que poseen una membrana externa que recubre la capa de peptidoglucano. La penetración de los antibióticos betalactámicos en el interior de bacilos gramnegativos requiere el paso a través de poros presentes en la membrana externa. Los cambios en las proteínas (porinas) que forman las paredes de los poros pueden alterar el tamaño de orificio del poro o la carga de estos canales y dar lugar a la exclusión del antibiótico; además de un flujo o bombeo de salida activo del antibiótico puede disminuir la concentración en la célula, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 165).
- La disminución de la unión del antibiótico a la PBP (proteínas fijadoras de la penicilina). Esta modificación en la unión del antimicrobiano a las PBP puede estar mediada por una hiperproducción de PBP (fenómeno infrecuente); por la adquisición de una nueva PBP (ejemplo: resistencia a penicilina en *Streptococcus aureus*) o la modificación de una PBP existente por recombinación (resistencia a la penicilina en *Streptococcus pneumoniae*) o por mutación puntual (resistencia a penicilina en *Enterococcus faecium*) (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 165).
- La hidrólisis del antibiótico por enzimas bacterianas, betalactamasas. Las bacterias pueden producir betalactamasas que inactivan los antibióticos betalactámicos. Se han descrito más de 200 betalactamasas diferentes. Algunas son específicas de las

penicilinas (es decir, penicilinasas), cefalosporinas (es decir, cefalosporinasas) o carbapenémicos (es decir, carbapenemasas), mientras que otras tienen una amplia de gama de actividad, que incluyen algunas que son capaces de inactivar la mayoría de los antibióticos betalactámicos, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 166).

- Por medio de un esquema de clasificación, las betalactamasas han sido separadas en 4 clases:
  - a) *Clase A*, más comunes son las SHV-1 y TEM-1, penicilinasas que se encuentran en bacilos gramnegativos comunes (ejemplo: *E. coli*, *Klebsiella*), con una mínima actividad contra las cefalosporinas. Sencillas mutaciones puntuales en los genes que codifican estas enzimas han creado betalactamasas con actividad contra todas las penicilinas y cefalosporinas; estas betalactamasas reciben la denominación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y son particularmente, porque la mayoría son codificadas en plásmidos que pueden ser transferidos de un microorganismo a otro;
  - b) *Clase B*, son metalo-enzimas dependientes de zinc; poseen un amplio espectro de actividad contra todos los antimicrobianos betalactámicos, incluidas las cefamicinas y carbapenémicos;
  - c) *Clase C*, son principalmente cefalosporinasas que son codificadas en los cromosomas bacterianos. Por lo general la expresión de estas enzimas esta reprimida, aunque este hecho puede ser alterado por exposición a ciertos antibióticos betalactámicos inductores o por mutaciones en los genes que controlan la expresión de las enzimas. La expresión de esta clase de betalactamasas es particularmente problemática porque son activas contra las cefalosporinas de espectro expandido más potentes;

- d) *Clase D*, son penicilinas que se encuentran principalmente en bacilos gramnegativos, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 167).

### **3.2.4. Penicilinas.**

Son antibióticos muy eficaces con una toxicidad extraordinariamente baja. El compuesto básico es un ácido orgánico con un anillo betalactámico obtenido a partir del cultivo del hongo *Penicillium chrysogenum*. Si el hongo crece por un proceso de fermentación, se produce grandes cantidades del ácido 6-aminopenicilánico. La modificación bioquímica de este intermedio produce antibióticos que poseen una mayor resistencia a los ácidos del estómago, una mayoría absorción del tracto gastrointestinal, resistencia a la destrucción por la penicilinasas o un espectro de actividad más amplio que incluye bacterias gramnegativas. La ampicilina fue la primera penicilina de amplio espectro, aunque el espectro de actividad contra los bacilos gramnegativos se limitaba principalmente a especies de *E. coli*, *Proteus*, entre otros. Se han combinado penicilinas seleccionadas con inhibidores de las betalactamasas. Los inhibidores de las betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) son selectivamente inactivos por sí mismos, pero cuando se combinan con algunas penicilinas (ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina); son eficaces en el tratamiento de algunas infecciones causadas por bacterias productoras de betalactamasas. Los inhibidores se unen irreversiblemente a las betalactamasas de bacterias susceptibles y las inactivan (aunque no todas son fijadas por estos inhibidores), permite que el fármaco acompañante desestructure la síntesis de la pared celular bacteriana, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 167).

#### **3.2.4.1. Ampicilina.**

Es una aminopenicilina que presenta la fórmula química  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ , y un peso molecular de 349,4; cuenta con un amplio espectro de acción inhibiendo o eliminando la

actividad de varios grupos de bacterias, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 58).

Los microorganismos sensibles frente a este tipo de antimicrobiano son: bacilos grampositivos, cocos gramnegativos y grampositivos (*neumococo, estreptococos*), *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*; y los microorganismos resistentes son *Staphylococcus aureus*, *E. faecium*, bacilos gramnegativos no fermentadores y la mayoría de cepas de *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, (Whonet, 2016).

#### **3.2.4.2. Piperacilina.**

Es una ureidopenicilina con fórmula química de  $C_{23}H_{26}N_5NaO_7S$  y un peso molecular de 539,5. La piperacilina es activa frente a cocos grampositivos (excepto estafilococos resistentes a meticilina), *Enterobacterias*, *Neisseria*, *Haemophilus* y microorganismos anaerobios. La asociación con tazobactam amplía el espectro de la piperacilina a muchas bacterias que han desarrollado resistencia por producción de betalactamasas plasmídicas (*H. influenzae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella spp.*); y frente algunas bacterias que producen betalactamasas cromosómicas (*Klebsiella*, *Bacteroides* y *Prevotella*). La mayoría de cepas de *Pseudomona aeruginosa* resistentes a piperacilina lo son también a la asociación, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 159).

#### **3.2.4.3. Amoxicilina / Acido clavulánico.**

La asociación amoxicilina-clavulánico amplía el espectro de amoxicilina a muchas bacterias que han desarrollado resistencia por producción de betalactamasas plasmídicas (*Staphylococcus*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* y *Shigella*) y frente algunas bacterias que producen betalactamasas cromosómicas (*P. vulgaris*, *Klebsiella*, *Bacteroides* y *Prevotella*), excepto las productoras de betalactamasas cromosómicas inducibles como *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*,

*Morganella* y *P. aeruginosa*. El ácido clavulánico tiene cierta afinidad por la PBP de algunos microorganismos, pero la actividad antimicrobiana es insignificante, excepto frente a *L. pneumophila*, *N. gonorrhoeae* y *C. jejuni*, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 57,58).

#### **3.2.4.4. Ampicilina / Sulbactam.**

La asociación ampicilina-sulbactam amplía el espectro de ampicilina a muchas bacterias que han desarrollado resistencia por producción de betalactamasas plasmídicas (*Staphylococcus*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Salmonella* y *Shigella*) y frente algunas bacterias que producen betalactamasas cromosómicas (*P. vulgaris*, *Klebsiella*, *Bacteroides* y *Prevotella*). Es intrínsecamente activo frente a *Acinetobacter*, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 59).

#### **3.2.4.5. Avibactam**

Avibactam es antimicrobiano no betalactámico que actúa como inhibidor de betalactamasas; se encuentra disponible en combinación con ceftazidima (Avycaz o Zevincefta). Este compuesto fue probada su acción por la FDA (Food and Drug Administration o Administración de Medicamentos y Alimentos) el 25 de febrero de 2015 para el tratamiento de infecciones intraabdominales complicadas y el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario, incluyendo pielonefritis causada por patógenos resistentes a los antibióticos. Avycaz (ceftazidima-avibacta) en el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario incluyendo pielonefritis causada por los siguientes microorganismos susceptibles: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* El Avycaz debe reservarse exclusivamente para pacientes mayores de 18 años que tienen opciones de tratamiento limitadas o no alternativas, (DrugBank, 2018).

### 3.2.5. Cefalosporinas.

La eficacia clínica de las cefalosporinas se correlaciona con la obtención de una concentración de antibiótico libre de 4-5 veces superior a la CIM y la persistencia por encima de ésta durante el 60-70 % de intervalo entre dosis consecutivas (actividad tiempo-dependiente). Se clasifican generalmente en cuatro generaciones:

- *Primera generación:* cefalotina, cefapirina, cefazolina, cefalexina, cefadroxilo;
- *Segunda generación:* cefamandol, cefuroxima, cefonicida, ceforanida, cefaclor, cefoxitina, cefotetan, cefprozil, cefmetazo;
- *Tercera generación.* cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefoperazona, cefixima, cefpodoxima, ceftibutén, cefdinir;
- *Cuarta Generación.* Cefepima, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 9).

Las cefalosporinas poseen un anillo betalactámico y su mecanismo de acción es comparable con las penicilinas, sin embargo, su anillo betalactámico es menos sensible a la degradación por las betalactamasas. Las sucesivas generaciones de cefalosporinas tiene en general una actividad creciente sobre las enterobacterias, (Rodríguez & Vance, 2015).

#### 3.2.5.1. Cefalotina.

Es una cefalosporina de 1° generación; que presenta una fórmula química de  $C_{16}H_{15}N_2NaO_6S_2$  y un peso molecular de 418. El espectro de acción de este antimicrobiano y CIM son parecidos a los de cefazolina pero es más activa frente a *S. aureus* productor de penicilinas y tiene menor acción frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 74).

#### 3.2.5.2. Cefazolina.

Es una cefalosporina de 1° generación; este antimicrobiano posee una fórmula química de  $C_{14}H_{13}N_8NaO_4S_3$  y un peso molecular de 476. Es activa frente a cocos grampositivos

(excepto *enterococo* y *S. aureus* resistentes a meticilina); *Clostridium* (excepto *C. difficile*), *Neisseria*, *E. coli*, *Klebsiella*, *P. mirabilis* y bacilos gramnegativos anaerobios (*Fusobacterium* y *Bacteroides*, excepto *B. fragilis*), (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 75).

#### **3.2.5.3. Cefoxitina.**

Es una cefalosporina de segunda generación; que presenta una fórmula química de  $C_{16}H_{16}N_3NaO_7S_2$  y un peso molecular de 449. Es activa frente a cocos grampositivos (excepto *enterococo* y *estafilococos* resistentes a meticilina) con CIM de 2- 10 veces superior (menor actividad) que la de cefazolina. Activa frente a *Clostridium* (excepto *C. difficile*), *Neisseria* y algunas enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella* y *Proteus mirabilis*). Activa frente a bacilos gramnegativos anaerobios: *Fusobacterium* y *Bacteroides* incluyendo cerca del 80 % de *B. fragilis*. Es muy estable frente a las BLEEs, pero las cepas productoras de este tipo de betalactamasas fácilmente se hacen resistentes por pérdida de porinas, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 79).

#### **3.2.5.4. Cefuroxime.**

Es una cefalosporina de 2° generación que posee la siguiente fórmula química  $C_{16}H_{15}N_4NaO_8S$ , tiene un peso molecular de 446. El espectro de acción es semejante al de cefazolina, pero más estable que ésta frente a betalactamasas plasmídicas. cefuroxima axetilo no tiene actividad antibacteriana intrínseca, pero se hidroliza en la mucosa intestinal y en la sangre liberando cefuroxima, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 82,83).

#### **3.2.5.5. Cefotaxima.**

Es una cefalosporina de 3° generación; que presenta una fórmula química de  $C_{16}H_{16}N_5NaO_7S_2$  y un peso molecular de 477. Es activa frente a cocos grampositivos (excepto *enterococo* y *S. aureus* resistentes a meticilina) con CIM parecida a la de cefazolina

frente a *Staphylococcus* y menor que la de ambos frente a *Streptococcus*. *L. monocytogenes* y *C. jeikeium* son resistentes. Activa frente a *Neisseria*, *Clostridium* (excepto *C. difficile*), enterobacterias, *Haemophilus*, *B. pertussis*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *B. burgdorferi* y *Leptospira*. Muchas cepas de *Actinomyces* y de *N. asteroides* y la mayoría de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y *Chryseobacterium* son resistentes. Activa frente a microorganismos anaerobios, *Peptococcus*, *Fusobacterium* y *Bacteroides* excepto *B. fragilis*, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 78, 79).

#### **3.2.5.6. Cef tazidime.**

Es una cefalosporina de 3° generación cuya fórmula química es la siguiente:  $C_{22}H_{22}N_6O_7S_{25}H_2O$ , y posee un peso molecular de 636. Es la cefalosporina más activa frente a *P. aeruginosa* y *Acinetobacter*; siendo más activa que cefotaxima frente a *Acinetobacter*, *Serratia* y *P. penneri*, pero menos activa que ésta frente a la mayoría de enterobacterias, cocos grampositivos, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Clostridium* y microorganismos anaerobios, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 81).

#### **3.2.5.7. Cef tibus em.**

Es una cefalosporina de 3° generación; tiene la siguiente fórmula química  $C_{15}H_{14}N_4O_6S_2$  y presenta un peso molecular de 410,4. Es activo frente a la mayoría de enterobacterias con CIM90 2-4 veces inferior a la de cefpodoxima y 2 veces inferior a la de cefixima, pero algo menos activa que ambas frente a *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *Neisseria*. CIM90 de 4 mg/L frente a *S. pneumoniae* sensible a penicilina. Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina, *S. aureus*, *Enterococcus*, *P. aeruginosa* y *B. fragilis* son resistentes, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 81, 82).

#### **3.2.5.8. Cef triaxone.**

Es una cefalosporina de 3° generación, tiene la siguiente fórmula química

$C_{18}H_{16}N_8Na_2O_7S_3$ ; y posee un peso molecular de 598. Su mecanismo de acción es similar al de cefotaxima; pero este antibiótico es menos activo frente a *Neisseria* y *Proteus*, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 82).

### **3.2.5.9. Cefepime.**

Es una Cefalosporina de 4° generación, con formula química de  $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2$  y peso molecular de 480,6. Es activa frente a cocos grampositivos, con mayor actividad que cefazolina frente a *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, Activa frente a bacilos gramnegativos con CIM semejante a la de cefotaxima para *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*, e inferior para el resto de enterobacterias, *incluyendo Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Morganella, y Acinetobacter*. Los microorganismos productores de BLEE pueden ser resistentes, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 76).

### **3.2.6. Carbapenémicos.**

Son antibióticos de amplio espectro importantes, ampliamente prescritos, que son activos contra muchos grupos de microorganismos. En los últimos años, se ha vuelto problemática la resistencia a los carbapenémicos mediada por la producción de carbapenemasas. Se ha observado la presencia de carbapenemasas de clase:

- *Clase A*, en una gama de bacterias, como *Pseudomona* y enterobacterias (la más común es la carbapenemasa de *Klebsilla pneumoniae* o KPC), y hacen que los microorganismos productores de esta carbapenemasa sean resistentes a todos los betalactámico y solo se detectan fiablemente con métodos moleculares para detectar los genes de resistencia;
- *Clase B*, es una metalo- $\beta$ -lactamasa (requiere de zinc para ser activa), se halla ampliamente distribuida en bacterias gramnegativas y tampoco puede ser detectada

de modo fiable por las pruebas convencionales. Los microorganismos productores de carbapenemasas de clase B (la más común es la metalo- $\beta$ -lactamasa Nueva Delhi, NDM; nombrada por su origen) son resistentes a todos los antibióticos betalactámicos, con la posible excepción de aztreonam;

- *Clase D*, se encuentran principalmente en *Acinetobacter*, son detectadas por las pruebas de sensibilidad convencionales y codifican resistencia a todos los antibióticos betalactámicos, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 168).

#### **1.1.1.1. Imipenem.**

Es un carbapenem; con una fórmula química de  $C_{12}H_{17}N_3O_4S$ ,  $H_2O$ ; y un peso molecular de 317. Es activo frente a microorganismos grampositivos aerobios incluyendo *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y *E. faecalis*, pero no *E. faecium* y estafilococos resistentes a meticilina. *Listeria*, *Bacillus* y *Nocardia* son sensibles, en tanto que las cepas de *Corynebacterium* son resistentes. Son activos también frente a microorganismos anaerobios y gramnegativos aerobios incluyendo enterobacterias, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Brucella* y *Acinetobacter*. *Haemophilus influenzae*, *P. putida* y *P. aeruginosa* son sensibles. *Chryseobacterium meningosepticum*, *Stenotrophomonas* y algunas cepas de *Aeromonas* y de *B. cepacia* son resistentes, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 121, 122).

#### **1.1.1.2. Meropenem.**

Es un carbapenem, con una fórmula química de  $C_{17}H_{25}N_3O_5S$ ; y peso molécula de 383,5. Su espectro de acción es semejante al de imipenem. Algo menos activo frente a cocos grampositivos. Más activo frente a enterobacterias, *B. cepacia* y *Haemophilus influenzae*. Actividad ligeramente superior frente a *Neisseria* y *Pseudomonas aeruginosa*. Frente a microorganismos anaerobios la actividad es superponible a la de imipenem. Es algo menos activo que imipenem frente a *Acinetobacter*. Los estafilococos resistentes a meticilina,

*Enterococcus faecium*, *S. maltophilia* y *Chryseobacterium meningosepticum*, son resistentes. Es estable frente a la mayoría de betalactamasas incluidas las de espectro extendido. Tiene un efecto bactericida relativamente rápido, seguido de efecto postantibiótico. La CBM es muy cercana a la CIM y varía poco con cambios del tamaño del inóculo. A diferencia de imipenem, la actividad no disminuye en medio ácido, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 138, 139).

### **1.1.2. Aminoglucósidos.**

El mecanismo de acción de los aminoglucósidos se da cuando se unen a las subunidades 30S y 50S del ribosoma y bloquean la lectura del ARN mensajero en la fase inicial de la síntesis proteica. El mecanismo por el que este efecto resulta rápidamente bactericida no es del todo conocido, puesto que otros antibióticos que bloquean la actividad del ribosoma en general tienen una actividad bacteriostática. La lisis bacteriana provocada por los aminoglucósidos libera poca endotoxina, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 3,4).

Los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos incluyen: la aparición de enzimas que modifican la estructura del aminoglucósido; la disminución de la concentración intracelular del aminoglucósido por reducción de la permeabilidad o por efecto de una bomba de expulsión activa, y la modificación de proteínas del ribosoma, (Whonet, 2016).

#### **1.1.2.1. Amikacina.**

Es un aminoglucósido con fórmula química  $C_{22}H_{43}N_5O_{13} \cdot 2H_2SO_4$  y un peso molecular de 781,8. Los microorganismos sensibles son las *Enterobacterias*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y algunas especies de *Nocardia*. Los microorganismos resistentes a la amikacina son: *Acinetobacter spp*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Neisseria gonorrhoeae*, *neumococo*,

microorganismos anaerobios, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 54).

#### **1.1.2.2. Gentamicina.**

Es un aminoglucósido con fórmula química de  $C_{21-19}H_{39-43}N_{51}$  y peso molecular que va de 463 a 491. Los microorganismos sensibles son las *Enterobacterias*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* y *Listeria*. Los Microorganismos resistentes a la gentamicina son *Acinetobacter spp*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Neisseria gonorrhoeae*, neumococo y microorganismos anaerobios, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 119, 120).

#### **1.1.3. Monobactams.**

Son antibióticos de corto espectro que son activos solo contra bacterias gramnegativas aerobias. Las anaerobias y las bacterias grampositivas son resistentes. La ventaja de los antibióticos de corto espectro es que pueden emplearse para tratar infecciones causadas por microorganismos sensibles sin afectar la población bacteriana protectora normal del paciente; a pesar de esta ventaja este tipo de antibióticos no se emplean con frecuencia, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 168).

##### **1.1.3.1. Aztreonam.**

Es el único monobactámico de importancia clínica; tiene una fórmula química de  $C_{13}H_{17}N_5O_8S_2$  y un peso molecular de 435,4. Activo exclusivamente frente a bacterias gramnegativas aerobias incluyendo enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Yersinia*, *P. multocida*, *Capnocytophaga*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *H. influenzae* y *Neisseria*. Los microorganismos anaerobios y los grampositivos son resistentes. Las BLEEs, las carbapenemasas de clase A, C y D (serin betalactamasas) y la hiperproducción de betalactamasa AmpC inactivan aztreonam, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 67, 68).

#### 1.1.4. Quinolonas.

Tienen rápida actividad bactericida y tiene relación directa con la concentración de antibiótico en el medio. Las quinolonas son antimicrobianos que tienen efecto post-antibiótico de moderado a prolongado. Los mecanismos de resistencia que se asocian a las quinolonas son:

- Mutaciones cromosómicas en los genes que codifican la topoisomerasa II o DNA-girasa en bacilos gramnegativos y las topoisomerasas IV en bacilos grampositivos;
- La sobreexpresión de bombas de extracción de quinolonas solas o asociadas a pérdidas de porinas;
- Producción de resistencia a la quinolonas (quinolone resistance, qnr). Son proteínas que compiten con la quinolona por su unión con la topoisomerasa II;
- Producción de una enzima que acetila e inactiva la ciprofloxacina y norfloxacina, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 19, 20).

##### 1.1.4.1. Ácido nalidíxico.

El ácido nalidíxico es una quinolona de primera generación no fluorada; indicada únicamente en el tratamiento de las infecciones urinarias no complicadas producidas por gérmenes sensibles; presentando actividad moderada en bacilos gram negativos como: *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella spp* y *Proteus spp*, (Flores, 2014).

##### 1.1.4.2. Ciprofloxacina.

Es una quinolona de segunda generación, con una fórmula química de  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ; y peso molecular de 368. Es activo frente a la mayoría de enterobacterias y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. La mayoría de microorganismos grampositivos son moderadamente sensibles o resistentes (incluyendo cocos grampositivos, *Rhodococcus*,

*Corynebacterium*, *Listeria* y *Nocardia*). *Bacillus anthracis* y *Erysipelothrix* son sensibles, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 85).

#### **1.1.4.3. Levofloxacin.**

Es una quinolona de 3° generación, con fórmula química de  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ ; y peso molecular de 361,4. Frente a cocos grampositivos es algo más activo que ciprofloxacina para *S. pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina. Menos activo que ciprofloxacina frente a enterobacterias y *P. aeruginosa*, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 130).

#### **1.1.5. Nitrofuranos.**

Son antimicrobianos cuyo mecanismo de acción altera las síntesis proteica y provoca daños en el ácido nucleico de la bacteria, (Merida & Moreno, 2014).

##### **1.1.5.1. Nitrofurantoina.**

Es un nitrofurano, con fórmula de  $C_8H_6N_4O_5$ ; y un peso molecular de 238. Cuenta con un mecanismo de acción poco conocido. Bloquea la acetil-coenzima A e inhibe la síntesis proteica. Tiene actividad bacteriostática con CIM <10 mg/L frente a microorganismos grampositivos, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y enterococos, y frente a muchas enterobacterias, como la mayoría de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* y más del 50 % de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *P. aeruginosa* y *Serratia* son resistentes, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 150, 151).

#### **1.1.6. Sulfamidas.**

Las sulfonamidas poseen muy diversas actividades antimicrobianas contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Sin embargo, dado el constante aumento del número de cepas resistentes en los últimos años, la utilidad de los antimicrobianos se ha reducido. En

términos generales, las sulfonamidas ejercen sólo un efecto bacteriostático, y los mecanismos de defensa celular y humoral del hospedador son esenciales para erradicar finalmente la infección, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 172).

#### **1.1.6.1. Sulfamidas y trimetropina.**

Las sulfamidas son sustancias químicas que actúan como antimicrobianos; y tienen un mecanismo de acción que inhiben la conversión de paraaminobenzoico en dihidrofolato, a diferencia de la trimetropina en la que el mecanismo de acción del antimicrobiano es la inhibición del dihidrofolato reductasa, (Merida & Moreno, 2014).

#### **1.1.7. Fosfomicinas.**

Son antibióticos bactericidas e inhibidores de la piruviltransferasa, lo que inhibe finalmente las síntesis de peptidoglucanos. Los mecanismos de resistencia son muy frecuentes y se deben frecuentemente a mutaciones de genes estructurales o reguladores que codifican el transporte del antibiótico dentro de la bacteria o a la producción de enzimas inactivadoras mediadas por plásmidos, (Merida & Moreno, 2014).

##### **1.1.7.1. Fosfomicina.**

Es un derivado del ácido fosfórico; tiene una fórmula química de  $C_3H_7O_4P$  y un peso molecular de 138. El mecanismo de acción que tiene la fosfomicina es que bloquea la síntesis de los precursores del peptidoglucano; además ejerce efecto bactericida rápido sobre bacterias en fase de crecimiento. Es activa frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* incluyendo cepas productoras de betalactamasas y cepas meticilín-resistentes. Es menos activa frente a *S. saprophyticus* y *Streptococcus* (CIM90 64 mg/L) y en especial frente a *Enterococcus*. *Listeria monocytogenes* es resistente. Entre los microorganismos gramnegativos cepas de *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio* y *Aeromonas* son sensibles,

(Gatel, Garcia, & Letang, 2013: págs. 116, 117).

### **1.1.8. Polimixinas**

Las polimixinas actúan como detergentes catiónicos, atacando y destruyendo la membrana bacteriana. Son utilizadas en el tratamiento contra microorganismos gramnegativos. Existen 5 tipos de polimixinas; las más usadas actualmente son las polimixinas B y E, (Mendoza, 2008).

#### **1.1.8.1. Colistin**

Es un polipéptido perteneciente al grupo de las polimixinas E; tiene una fórmula química que es  $C_{53}H_{100}O_{13}N_{16}$ . Tiene un efecto bactericida rápido y el efecto post-antibiótico es reducido. La aparición de resistencia durante el tratamiento es rara. Es activa exclusivamente frente a bacilos gramnegativos aerobios, incluyendo enterobacterias, (Gatel, Garcia, & Letang, 2013: pág. 92).

La polimixina E actúa ejerciendo un efecto detergente sobre la membrana bacteriana irrumpiendo su permeabilidad y llevando a la fuga de contenidos celulares y a la muerte celular. Tiene un espectro exclusivo contra bacterias gramnegativas incluyendo bacilos gramnegativos multidrogaresistentes como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, (Camiro, Parada, Peschard, & Vera, 2017)

## **1.2. Medio de sensibilidad**

### **1.2.1. Agar de Mueller-Hinton.**

Se trata de un medio de cultivo que es recomendado para estudios convencionales de sensibilidad bacteriana. Presenta una composición bien definida que incluye extractos de ternera y caseína, sales, cationes divalentes y almidón soluble necesario para que los resultados sean reproducibles, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013: pág. 23).

En este medio crecen bien la mayoría de las bacterias patógenas, hay muy pocas diferencias entre los lotes comercializados, lo que favorece la estandarización y no contiene timina o timidina que inhiben las sulfamidas y trimetropin. El pH del medio debe estar entre 7,2-7,4 y almacenarse entre 2-8°C, aunque ha de estar a temperatura ambiente 2 horas antes de su utilización. Por su parte, los discos de antibióticos se deben guardar a 4°C y dejarlos a temperatura ambiente 1 hora antes de su utilización, (Jawetz, 2010 ).

- *Componentes:* Infusión da carne, aminoácidos, almidón, agar y agua destilada;
- *Utilidad:* medio ajustado para pruebas de antibiograma, (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

### **1.3. Métodos de estudio de la sensibilidad a antimicrobianos**

El aislamiento e identificación de un agente infeccioso a partir de una muestra clínica proveniente de un paciente, no es suficiente para impartir una terapia anti-infecciosa adecuada. Actualmente, numerosos microorganismos han desarrollado múltiples mecanismos que les permiten resistir a la acción de los más nuevos y potentes agentes antimicrobianos. En la actualidad se dispone de varios métodos para determinar el patrón de susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos, (Velasco, Araque, & Araugo, 2008).

El objetivo del estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado e indica su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o de una población bacteriana. En la actualidad, la manifestación cada vez más frecuente de resistencia a los antibióticos hace ineludible la determinación del antibiograma para la mayor parte de los aislamientos bacterianos que se manejan en el laboratorio, incluso en los que no se ha detectado resistencia, (Merida & Moreno, 2014).

## **Métodos automatizados para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos**

### ***1.3.1.1. Sistema de micro-dilución en caldo.***

En las pruebas de dilución se utilizan antibióticos diluidos en caldo que contiene un cultivo del microorganismo. La menor concentración del fármaco que impide el crecimiento visible después de 18 a 24 h de incubación se denomina concentración inhibidora mínima (CMI). Los sistemas automatizados también utilizan el método de dilución en caldo. Se mide la densidad óptica del cultivo en caldo en presencia del antibiótico. Si la densidad del cultivo excede a la densidad óptica umbral, ha ocurrido crecimiento a esa concentración del fármaco. La CMI es la concentración a la que la densidad óptica permanece por debajo del umbral, (Brunton, Lazo, & Parker, 2007).

Estos sistemas no requieren la intervención manual para obtener el resultado, una vez colocado el panel de prueba en el instrumento. Los sistemas que se exponen a un periodo de incubación por lo generalmente un periodo de 16 horas. Estos sistemas utilizan técnicas de micro-dilución en caldo, con soporte en tarjetas o galerías, que se incuban automáticamente, cuyo tiempo es variable según el sistema que se utiliza, hasta que se llega al punto final de crecimiento. Una vez alcanzado ese punto, estos sistemas leen el resultado de forma automática. Por lo tanto, disponen de un monitor computarizado y de una impresora que en caso de ser necesario junto con un sistema de análisis de datos genera los resultados y los datos para el informe, (Rodríguez M. , 2012).

Estos sistemas, galerías o tarjetas, proporciona información de una amplia gama de antibióticos y suelen estar sintetizados por la casa comercial con grupos específicos de gérmenes. Es importante la supervisión en la elección del panel y de los resultados que se obtienen, (por ejemplo; la contaminación o una elección inadecuada del panel puede informar de falsas resistencias o sensibilidades), (Rodríguez M. , 2012).

### **1.3.1.2. Método de micro-dilución en caldo.**

El sistema consiste en una microplaca de múltiples pocillos que contiene concentraciones crecientes de varios antimicrobianos; esta placa se inocula con una suspensión en un caldo de la bacteria anaerobia a estudiar. Tras 48 horas de incubación a 35°C en atmosfera anaerobia, se obtiene la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la menor concentración del antimicrobiano que inhibe un crecimiento visible. El medio de cultivo que se emplea para la microplaca es el caldo de Wilkings-Chalgren suplementado con vitamina K y hemina, y el medio de cultivo para preparar el inóculo el caldo de tioglicolato. La CMI es la concentración donde se observa un cambio marcado en la turbidez con respecto al medio de control, (Merida & Moreno, 2014).

### **1.3.2. Métodos manuales**

#### **1.3.2.1. Método de Dilución.**

Se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en concentraciones crecientes del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio. El número de antimicrobianos que se evalúan, así como los puntos de corte de CMI, son los que establecen organismos internacionales (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute), para información de interés clínico y epidemiológico, (Merida & Moreno, 2014).

#### **1.3.2.2. Dilución en agar.**

En este método, se incorpora el antimicrobiano que va a evaluar a un medio con agar cuando el medio esta todavía fundido (líquido). Se prepara una serie de placas cada una determinada concentración de antibiótico. En la mayoría de los casos, el medio de cultivo que se emplea es agar de Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos se puede recurrir a otros diferentes. La CMI es la menor concentración del antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano, (Merida & Moreno, 2014).

### **1.3.2.3. Dilución en caldo.**

El CLSI recomienda para la mayoría de los microorganismos el empleo de caldo de Mueller-Hinton, al que se añaden los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de microorganismos más exigentes. El medio debe tener un pH de 7,2 a 7,4 y estar ajustado con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , (Merida & Moreno, 2014).

- **Método de macro-dilución.** Se emplea por cada combinación de microorganismo-antimicrobiano una batería de tubos preparados habitualmente con tubos de 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero se añade 1 ml de la solución del antimicrobiano, esta es la concentración más alta que se estudia y luego las demás se diluyen progresivamente hasta las diluciones que se requieran, (Merida & Moreno, 2014).
- **Método de micro-dilución.** En este método cada uno de los pocillos de la placa de micro-titulación representa uno de los tubos del método de macro-dilución. Estas se pueden preparar en el laboratorio o comprar y almacenar. En la mayoría de los laboratorios se utilizan paneles comerciales semiautomáticos de incubación, lectura e interpretación, (Merida & Moreno, 2014).

### **1.3.3. Método de difusión en disco- placa Kirby Bauer.**

#### **1.3.3.1. Método del medio de cultivo líquido.**

Se toma de 3 a 5 colonias del mismo microorganismo de la placa del cultivo después de 18-24 horas y se siembran en 5ml de un medio líquido (por ejemplo: infusión cerebro y corazón [*brain heart infusion, BHI*], caldo de Todd-Hewitt, soja-tripticosa, etc) que se incuba a 35°C por un tiempo de 2-6 horas, hasta alcanzar la turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. Se recomienda utilizar este método en el cultivo con más de 24 horas de incubación, (Merida & Moreno, 2014).

### ***1.3.3.2. Método de la suspensión directa de colonias en placa.***

El método de Kirby Bauer consiste en el depósito en la superficie del agar, previamente inoculada con el microorganismo, de discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Cuando el disco se pone en contacto con la superficie del agar, el antibiótico se difunde por él, con lo que se obtiene un gradiente de concentración. Tras 18 a 24 horas de incubación, los discos se muestran rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre las bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la lectura directa de dicho valor. Existen diámetros de inhibición estandarizados expresados en milímetros para cada antimicrobiano. Este método es rápido, barato y fácil de usar. Se aplica en una variedad de bacterias, fundamentalmente aerobias no exigentes de crecimiento rápido, (Rodríguez M. , 2012).

#### *Procedimiento:*

- Tomar de una placa de cultivo de 18 a 24 horas varias colonias, y suspender en suero fisiológico hasta alcanzar una turbidez de 0,5 de McFarland;
- Ajustar el inóculo y antes de que transcurran 15 minutos introducir un hisopo dentro de la suspensión, rotar varias veces contra la pared para eliminar el exceso e inocular completamente las placas Mueller-Hinton en tres direcciones distintas para la siembra bacteriana asegurándose uniformidad en el inóculo;
- Secar las placas inoculadas de 3-5 minutos y proceder a colocar los discos. Los discos de cada antibiótico se deben colocar de forma manual con pinzas estériles y presionarlos ligeramente sobre la superficie del agar;
- Colocar de manera que no se superpongan los halos de inhibición entre ellos. Finalmente, se incuban las placas invertidas a 35°C en atmósfera aerobia durante 18 a 24 horas;

- Leer el diámetro de las zonas de inhibición completa luego de la incubación. Si se trata de la sensibilidad a meticilina (oxacilina), se debe examinar utilizando luz transmitida que pasa a través del medio para observar si hay colonias diminutas; (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

*Interpretación de resultados.* Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco comparando con las referencias oportunas publicadas por la NCCLS. Sigue las normas del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). El termino sensible indica que esa cepa se puede tratar de forma adecuada con dicho antimicrobiano. El termino intermedio indica que el antimicrobiano puede alcanzar las concentraciones idóneas en sangre y tejidos; y que se puede esperar eficacia clínica cuando se empleen dosis más elevadas de lo habitual. El termino resistente, por el contrario, se refiere a los microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habituales o en los que existen mecanismos de resistencia específicos, (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

Para llevar a cabo la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de suspensión directa de colonias, generalmente se utiliza agar de Mueller-Hinton; este medio de cultivo debe estar regulado en su concentración de iones bivalentes además de ser suplementado o enriquecido para obtener concentraciones fisiológicas y permitan el crecimiento de bacterias exigentes, (Jawetz, 2010).

#### **1.4. Puntos de interrupción y definiciones de categorías interpretativas**

*Punto de ruptura.* La prueba de susceptibilidad se puede interpretar basándose en puntos de interrupción establecidos por un laboratorio de referencia, (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

##### ***Categoría interpretativa***

- ***Susceptible (S).*** Una categoría definida por un punto de interrupción que implica que los

aislamientos con una MIC en o por debajo, o diámetros de zona en o por encima del punto de ruptura susceptible; se inhiben por las concentraciones usualmente alcanzables de agente antimicrobiano cuando la dosis recomendado para tratar el sitio de la infección se utiliza, resultando en la probable eficacia clínica;

- ***Susceptible dependiente de dosis (SDD)***. una categoría definida por un punto de interpretación que implica que la susceptibilidad de un aislado es dependiente en el régimen de dosificación que se utiliza en el paciente. Con el fin de alcanzar niveles que probablemente sean clínicamente eficaces contra aislamientos para los cuales los resultados de las pruebas de susceptibilidad están en la categoría SDD, es necesario usar un régimen de dosificación (es decir, dosis más altas, dosis más frecuentes, o ambas) que exposición de la dosis que se utilizó para establecer el punto de ruptura susceptible. Esta categoría es aplicable únicamente al antibiótico cefepime;
- ***Intermedio (I)***. Una categoría definida por un punto de ruptura que incluye aislamientos con MICs, los niveles de sangre y tejidos generalmente alcanzables y para los cuales las tasas de respuesta pueden ser inferiores a los de aislamientos susceptibles;
- ***Resistente (R)***. Una categoría definida por un punto de interrupción que implica que los aislamientos con una MIC igual o superior a la concentración de antibiótico establecido o los diámetros de los halos de inhibición en la zona, estén en el límite o por debajo del punto de ruptura resistente no están inhibidos por las concentraciones usualmente alcanzables del agente con los esquemas de dosificación normales; o que demuestran MICs que caen en el rango de los mecanismos específicos de resistencia microbiana, y la eficacia clínica del agente contra el aislamiento no se ha demostrado de manera fiable en los estudios de tratamiento, (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: pág. 4).

### **1.5. Método de Épsilon test (E-test)**

Consiste en determinar la CMI mediante la lectura directa. Consiste en una tira de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que posee un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para la preparación del inóculo es el mismo que el método de difusión disco-placa. En este caso, se coloca la tira sobre la superficie tras inocular la placa. Luego de la incubación, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La CMI corresponde al valor que se obtiene en el punto del extremo de inhibición interseccionada con la tira. Se utiliza generalmente agar Muller-Hinton o en su efecto el medio apropiado para la especie bacteriana que se desea estudiar. Las tiras deben almacenarse a 20°C y deben estar protegidas de la humedad. La dispensación de las tiras se realiza, igual que los discos estériles y las placas se incuban a la temperatura y atmósfera ajustadas para cada tipo de microorganismo, (Merida & Moreno, 2014).

## 5. Materiales y métodos

### **Tipo de estudio**

El presente estudio fue de tipo descriptivo y transversal.

### **Área de estudio**

El presente estudio se desarrolló en pacientes que acudieron a las instalaciones de la Clínica MEDILAB; ubicada en el centro de la ciudad de Loja y prestan diversidad de servicios a los usuarios, con un equipo de profesionales que promueve condiciones de vida saludables a la población de la región sur del país. MEDILAB cuenta con un Laboratorio Clínico; ubicado en las calles Manuel Montero y Alfredo Mora en la ciudad de Loja; esta entidad privada tiene diversidad de servicios en las áreas de Hematología, Química Sanguínea, Citología, Alérgenos, Toxicológico, Endocrinología, Coprológica, Uroanálisis y Microbiología para los usuarios ambulatorios y de hospitalización de la Clínica MEDILAB; prestando atención de calidad, con planes de control de calidad externos e internos; además de contar con un personal altamente capacitado para ofrecer un servicio oportuno y de calidad. MEDILAB cuenta con el Sistema de Gestión de Calidad y Programa de Control de Calidad Interno, con el cual garantiza la confiabilidad de los resultados.

La investigación fue aplicada a los todos usuarios (ambulatorios y de hospitalización) que acudieron con pedido de urocultivo al Laboratorio Clínico del MEDILAB, Loja; durante el periodo de Marzo-Mayo del 2018.

### **Grupo de estudio**

**Universo:** 172 usuarios que asistieron al Laboratorio Clínico MEDILAB, Loja; con pedido de urocultivo, durante el periodo de Marzo-Mayo del 2018.

**Muestra:** 64 muestras de orina que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión. Del total de las 172 muestras; 92 muestras no presentaron crecimiento bacteriano,

13 muestras contaminadas (con presencia de flora mixta), 3 muestras no ameritaron cultivo.

### **Cálculo**

Se tomó el número de usuarios que acudieron al Laboratorio Clínico MEDILAB a realizarse un análisis de urocultivo en el mismo periodo de Marzo-Mayo en el año 2017.

### **Datos:**

N= tamaño de la muestra (205)

Z<sub>2a</sub>= nivel de confianza del 95 % (1.96)

P: 0.5

q: 0.5

e: error seleccionado de 3% = 0.03

### **Fórmula:**

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

$$n = \frac{1.96^2 \times 205 \times 0.5 \times 0.5}{0.03^2 (205 - 1) + 1.96^2 \times 0.5 \times 0.5}$$

$$n = \frac{3.8416 \times 205 \times 0.25}{0.0009 \times (204) + 3.8416 \times 0.25}$$

$$n = \frac{196.8}{0.1836 + 0.9604}$$

$$n = \frac{196.8}{1.144}$$

$$n = 172 //$$

***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).

***Criterios de exclusión.***

- Pacientes que ya hayan sido muestreados durante este estudio.
- Más de dos patógenos aislados.

**Técnicas e Instrumentos de recolección de datos:****Fase pre analítica.**

1. Permiso para recolección de muestras y datos de muestras del Laboratorio Clínico de MEDILAB, oficio de autorización (Anexo 1).
2. Obtención de información de cada muestra de urocultivo mediante el sistema de datos electrónico del Laboratorio Clínico de MEDILAB, (Anexo 2).
3. Transporte de muestras, en medio Stuart al Centro de Diagnóstico Médico de la Universidad Nacional de Loja, (Anexo 3).
4. Preparación de material y medios para el procesamiento de muestras, (Anexo 4).

**Fase analítica**

- Control de calidad, mediante: control positivo cepa ATTC 700603 *Klebsiella pneumoniae* y control negativo cepa ATTC 25922 *E. coli*, (Anexo 5).

Objetivo 1: Identificar especies de *Klebsiella* en muestras de orina de usuarios del Laboratorio Clínico de MEDILAB-Loja

1. Siembra de muestras con pedido de urocultivo, (Anexo 6).

2. Identificación bacteriana por bacteriología convencional con las pruebas bioquímicas: lisina, urea, citrato, TSI y SIM, (Anexo 7).

Objetivo 2: Determinar el perfil de susceptibilidad de las especies de *Klebsiella* aisladas.

1. Antibiograma, por método de difusión Kirby Bauer, (Anexo 8).
2. Tamizaje y confirmación fenotípica de mecanismos enzimáticos de resistencia a betalactámicos. Se utilizó como criterios de sospecha de resistencia bacteriana los puntos de corte de: ceftazidime  $\leq 22$  mm; considerando como sospechoso de BLEE. Las pruebas fenotípicas confirmatorias fueron: sinergia de discos (amoxicilina/ácido clavulánico), ceftazidime (CAZ), cefotaxima (CTX); y método de discos combinados con los antibióticos de: ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ-CLA) y cefotaxima/ácido clavulánico (CXT-CLA); ceftazidime (CAZ) y cefotaxima (CTX), (Anexo 9).

### **Fase post-analítica**

- Eliminación de residuos microbiológico, (Anexo 10).

Objetivo 3: Clasificar las especies resistentes de *Klebsiella* según edad, sexo y área de servicio.

1. Registros de resultados, formato de registros (Anexo 11 y 12)
2. Organización y reporte de resultados obtenidos para tabulación.

### **Tabulación, análisis e interpretación de datos**

Los resultados obtenidos en el instrumento de recolección de datos se tabularon en el programa Microsoft Excel en función a los objetivos establecidos. Los resultados serán presentados mediante tablas y figuras con los resultados organizados según: edad, sexo, procedencia, perfil de susceptibilidad y resistencia de especies de *Klebsiella*.

**Consideraciones éticas**

- Permiso de autorización del Laboratorio Clínico de MEDILAB de Loja (Anexo 1).
- Solicitud de examen para urocultivo de los usuarios participantes.
- El proyecto de investigación garantizó los derechos de autonomía y confidencialidad de cada usuario; protegiendo su identidad en el desarrollo del mismo.

## 6. Resultados

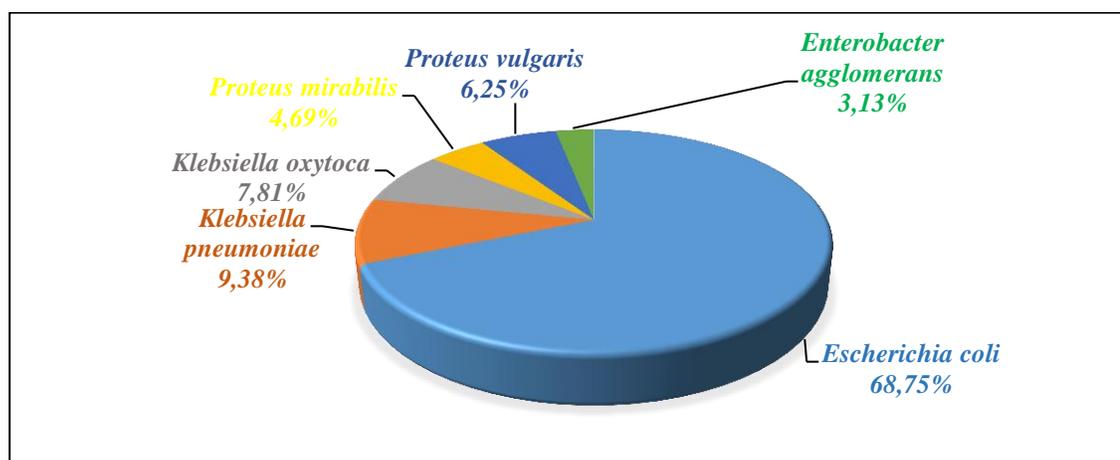
**Tabla Nro.1: Identificación de bacterias presentes en urocultivos procedentes del Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo 2018.**

<b>Urocultivos</b>	<b>F</b>	<b>(%)</b>
<i>Escherichia coli</i>	44	68,75 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	9,38 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	7,81 %
<i>Proteus mirabilis</i>	3	4,69 %
<i>Proteus vulgaris</i>	4	6,25 %
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	3,13 %
<b>TOTAL</b>	<b>64</b>	<b>100 %</b>

**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Kathyryne Daniela Mihquero Masache

**Figura Nro.1: Identificación de *Klebsiella spp* presentes en urocultivos procedentes del Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.**



**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Kathyryne Daniela Mihquero Masache

### Interpretación:

Del total de muestras positivas de urocultivos, *Klebsiella pneumoniae* se sitúa como segundo agente etiológico causante de IVU con una frecuencia del 9,38 %, (Marrero, Leyva, & Castellanos, 2015).

**Tabla Nro. 2: Perfil de susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* presentes en urocultivos procedentes del Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.**

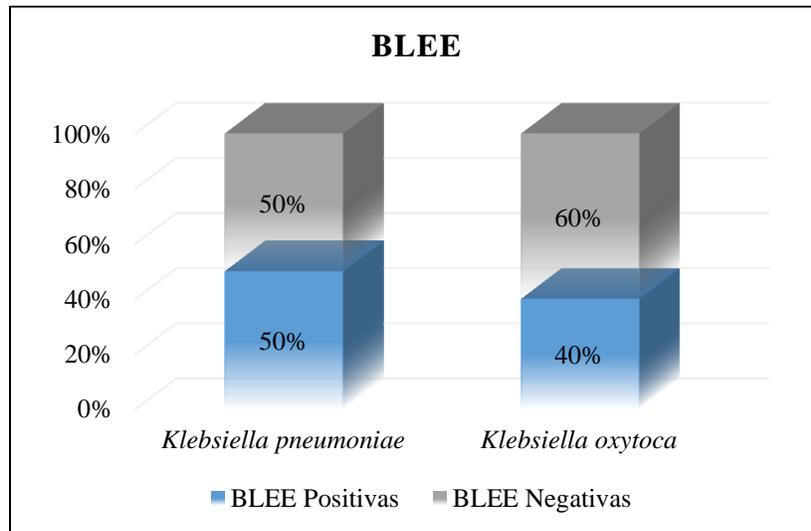
Perfil de susceptibilidad <i>Klebsiella spp</i>	SAM			AK			CAZ			FEP			FOX			CIP			CN			F			SXT			IMP/MER			TOTAL
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	SDD	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	f/%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1	3	6	0	0	4	0	2	3	1	2	5	1	0	3	1	2	5	0	1	1	1	4	2	0	4	6	0	0	6
	33,3%	16,7%	50%	100%	0%	0%	66,7%	0%	33,3%	50%	16,7%	33,3%	83,3%	16,7%	0%	50%	16,7%	33,3%	83,3%	0%	16,7%	16,7%	16,7%	66,6%	33,3%	0%	66,7%	100%	0%	0%	100%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	3	5	0	0	4	0	1	3	0	2	4	0	1	0	0	5	1	1	3	1	0	4	2	0	3	5	0	0	5
	20%	20%	60%	100%	0%	0%	80%	0%	20%	60%	0%	40%	80%	0%	20%	0%	0%	100%	20%	20%	60%	20%	0%	80%	40%	0%	60%	100%	0%	0%	100%

**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Katherlyne Daniela Mihquero Masache

**Interpretación:** de los resultados obtenidos, se encontró que *Klebsiella pneumoniae* presenta mayor resistencia a: trimetropin/sulfametoxazol (66,7 %), ampicilina/sulbactam (50 %) y nitrofurantoina (66,6 %); a diferencia de las cepas de *Klebsiella oxytoca* 100 % resistentes a ciprofloxacina. *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* presentaron 100 % de sensibilidad a: amikacina y carbapenémicos, (Arias, 2011).

**Figura Nro. 2:** Tipo de betalactamasa producida por especies de *Klebsiella* en muestras de urocultivo de pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.



\***BLEE:** Betalactamasa de espectro extendido.

**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Katheryne Daniela Mihquero Masache

**Interpretación:** del total de muestras de especies de *Klebsiella*, el mayor porcentaje de cepas productoras de betalactamasas de espectro entendido fue en *Klebsiella pneumoniae*, (Velázquez, Cornejo, & Volkow, 2016).

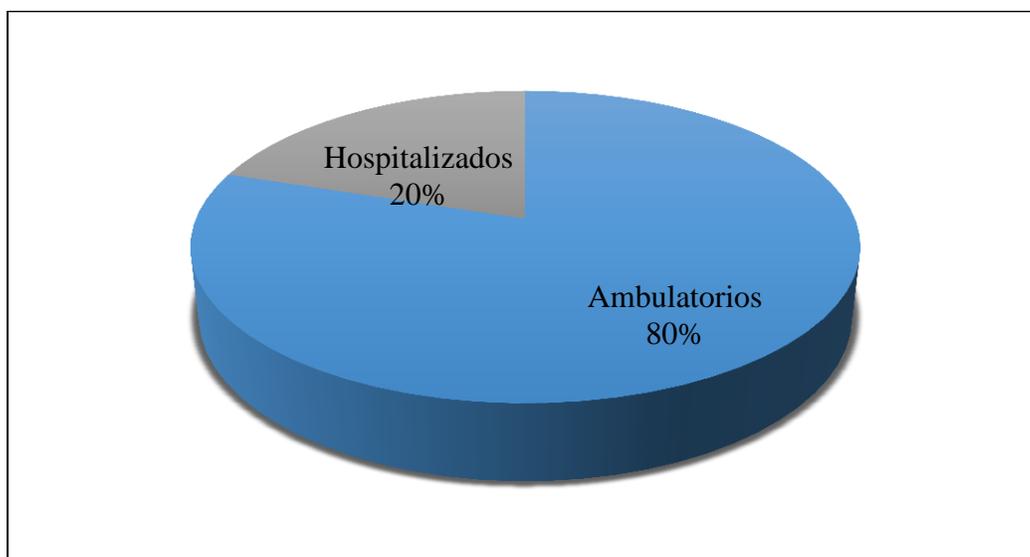
**Tabla Nro. 3:** *Distribución del tipo de resistencia BLEE en especies de Klebsiella; en relación al área de servicio en el Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.*

PROCEDENCIA					
Ambulatorios		Hospitalizados		TOTAL	
<i>f</i>	%	<i>f</i>	%	<i>f</i>	%
4	80 %	1	20 %	5	100 %

**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Kathyryne Daniela Mihquero Masache

**Figura Nro. 3:** *Tipo de resistencia BLEE en especies de Klebsiella; en relación al área de servicio en el Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.*



**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Kathyryne Daniela Mihquero Masache

**Interpretación:** Las muestras que presentaron resistencia antimicrobiana de tipo betalactamasa de espectro extendido en las especies de *Klebsiella* identificadas tuvieron predominancia en muestras de pacientes ambulatorios, (Velázquez, Cornejo, & Volkow, 2016).

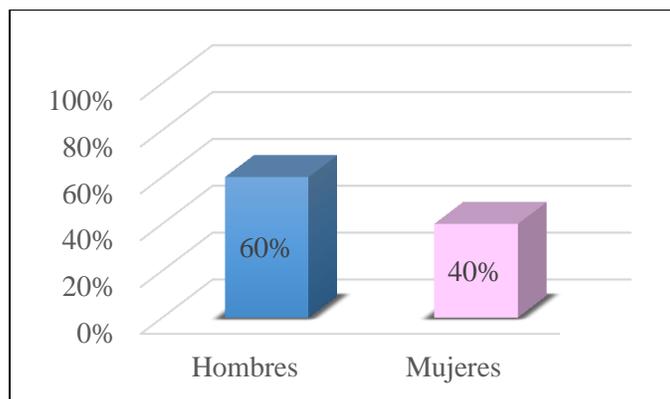
**Tabla Nro. 4:** *Tipo de resistencia betalactamasas de espectro extendido en especies de Klebsiella; en relación al sexo; en el Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.*

Sexo					
Hombres		Mujeres		TOTAL	
<i>f</i>	%	<i>f</i>	%	<i>f</i>	%
3	60 %	2	40 %	5	100 %

**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Kathyryne Daniela Mihquero Masache

**Figura Nro. 4:** *Tipo de resistencia betalactamasas de espectro extendido en especies de Klebsiella; en relación al sexo; en el Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.*



**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Kathyryne Daniela Mihquero Masache

**Interpretación:** Las muestras que presentaron resistencia antimicrobiana de tipo betalactamasa de espectro extendido en las especies de *Klebsiella* identificadas tuvieron predominancia en muestras de pacientes hombres, (Orrego, Henao, & Cardona, 2014).

**Tabla Nro. 5: Distribución del tipo de resistencia BLEE en especies de *Klebsiella*; en relación a la edad; en el Laboratorio Clínico de MEDILAB, Loja; Marzo-Mayo del 2018.**

<i>Edad</i>	<i>f</i>	<i>%</i>
Neonatos y lactantes (0 días a 24 meses)	0	0 %
Niños y adolescentes (25 meses a 19 años)	0	0 %
Adultos (20 a 59 años)	0	0 %
Adulto Mayor (más de 60 años)	5	100 %
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>100 %</b>

**Fuente:** Registro de datos de las muestras procesadas Marzo-Mayo del 2018.

**Elaborado por:** Kathyne Daniela Mihquero Masache

**Interpretación:** En la resistencia antimicrobiana de tipo betalactamasa de espectro extendido (BLEE) en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*; la totalidad de los casos se presentaron en pacientes con edad mayor a los 60 años, (Orrego, Henao, & Cardona, 2014).

## 7. Discusión

La presente investigación se la realizó con un total de 172 urocultivos de usuarios provenientes de consulta externa y hospitalización que acudieron al Laboratorio Clínico MEDILAB, Loja; durante el periodo de Marzo-Mayo del 2018, las muestras positivas de urocultivos que presentaron crecimiento fueron 64 muestras; obteniendo del total de muestras positivas de urocultivos procesadas el predominio del aislamiento de *E. coli* con un porcentaje de 68,75 %, seguido de *Klebsiella pneumoniae* con un 9,38 % (clasificándose como segundo agente etiológico causante de IVU), *Klebsiella oxytoca* (7,81 %); y 14,06 % que corresponde a otros agentes bacterianos de la familia de *Enterobacterias*. En la investigación realizada en la ciudad de Medellín, Colombia a las instituciones prestadoras del servicio de salud; en el año 2014 elaboran un acta médica de "Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana" se logra identificar datos similares, en donde los principales agentes etiológicos identificados fueron *E. coli* (69 %) seguido por *Klebsiella spp* (8 %); identificándose en las especies de *Klebsiella*: 33 casos para *Klebsiella pneumoniae* y 5 casos para *Klebsiella oxytoca* (Orrego, Henao, & Cardona, 2014).

En el capítulo del Libro denominado "Infección urinaria causada por Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido", Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla; el autor hace referencia acerca de la resistencia antimicrobiana como un problema de salud pública mundial; debido a la rapidez en la aparición y diseminación de resistencias a diversos antimicrobianos siendo particularmente importante en el caso de las enterobacterias, dado que estos microorganismos son causa frecuente de infecciones tanto comunitaria como nosocomial; evidenciándose la diseminación de resistencias a penicilinas, inhibidores de

betalactamasas, cefalosporinas, quinolonas, aminoglucósidos y, últimamente, a carbapenémicos aunque de frecuencia mayor o menor en función de la zona geográfica y del ámbito epidemiológico; (Rodríguez & Pigrau, 2013).

De los resultados obtenidos, se encontró que las muestras de urocultivos procesados positivas para especies de *Klebsiella* presentan mayor sensibilidad a los antibióticos: cefoxitin (83,3 % *Klebsiella pneumoniae* y 80 % *Klebsiella oxytoca*), amikacina (100 %) y a los carbapenémicos (100 %). Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* presentaron resistencia a los antibióticos: ampicilina/sulbactam (50 %), nitrofurantoína (66,6 %) y trimetropin sulfametoazol (66,7 %). Las cepas de *Klebsiella oxytoca* además de presentar resistencia en un porcentaje similar a los antibióticos empleados en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, presentaron 100 % de resistencia a ciprofloxacina. En proyecto investigativo realizado en la ciudad de Bogotá, Colombia; denominado “Características clínicas y frecuencia de betalactamasas de espectro extendido en aislamientos de enterobacterias causantes de IVU de origen comunitario en pacientes adultos de siete Hospitales pertenecientes a la red GREBO 2009-2010”; cuyos resultados demuestran que las IVU por *Klebsiella spp.* fueron 19 casos, de los cuales *K. pneumoniae* fue la causa de 15 infecciones y 4 *K. oxytoca*; presentándose porcentaje de resistencia a: ampicilina (73,3 %) y gentamicina (26,7 %) en *K. pneumoniae*, resistencia a cefalosporinas de tercera generación fue de 6,7 % y a cefoxitina 13,3 %; y presencia de sensibilidad a los carbapenémicos siendo activos en 93,3 % de los aislamientos en *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* (Arias, 2011).

Esto es debido a que la mayor parte de cepas de *Klebsiella pneumoniae* son con frecuencia resistentes a múltiples antimicrobianos; debido a la presencia de resistencia natural a determinados antibióticos; como es a la ampicilina, mediada por producción de betalactamasas y la resistencia adquirida a través de plásmidos que ha llevado a la aparición

de resistencia a otros antibióticos incluyendo: aminoglucósidos y cefalosporinas; además el rápido incremento de resistencia a los antimicrobianos de amplio espectro (ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona), (Echeverri, Rueda, Maya, Agudelo, & Ospina, 2012).

Entre estos múltiples mecanismos de resistencia, se destacan en bacterias Gram negativas, como *K. pneumoniae* la producción de enzimas de la clase  $\beta$ -lactamasa con la pérdida o modificación de porinas, lo que lleva a la disminución y permeabilidad de la membrana externa bacteriana, hace que este tipo de bacterias presenten resistencia a los antibióticos betalactámicos que actúan como potentes bactericidas, y de gran importancia debido ya que son los antibióticos prescritos frecuentemente en todo el mundo para el tratamiento de IVU, (Echeverri, Atehortúa, & Robledo, 2009)

De los resultados obtenidos del total de muestras de *Klebsiella spp*, el mayor porcentaje de cepas productoras de betalactamasas de espectro entendido fue en *Klebsiella pneumoniae*; con predominancia en muestras de pacientes ambulatorios; al igual en la investigación realizada por Consuelo Velázquez Acosta, en el Instituto Nacional de Cancerología en el año 2016; de "Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años"; *K. pneumoniae* se identificó en 705 cultivos (4,8 %); 115 fueron cepas productoras de BLEE (16,3 %): 75 en muestras comunitarias y 40 en muestras nosocomiales; debido al tratamiento con antibióticos de uso infrecuente en infecciones que no lo requieren, falta de higiene, saneamiento deficiente, automedicación, o al incumplimiento del tratamiento son las causas que frecuentemente contribuyen a la presencia de resistencias bacterianas, (Velázquez, Cornejo, & Volkow, 2016).

En la investigación realizada las muestras de *Klebsiella spp* que presentaron resistencia antimicrobiana de tipo BLEE; el 60 % de las muestras pertenecían a pacientes de género masculino y un 40 % de cepas resistentes corresponden a pacientes mujeres. Además del

total de muestras procesadas de *Klebsiella spp* existe mayor predominancia en muestras de Urocultivos procesados en pacientes con mayor de 60 años de edad; presentándose el tipo de resistencia BLEE en 100 % de los casos en este grupo de edad. En la investigación de "Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana"; realizada en la ciudad de Medellín, Colombia; en el año 2014, la comparación de la prevalencia de infección según sexo; en este estudio las especies de *Klebsiella* tuvieron mayor número de casos en pacientes mujeres con un total de 26 casos (2,5 %) y en hombres un total de 10 casos (2,0 %). La comparación de la prevalencia de infección según grupo etario; las *Klebsiella spp* tuvieron mayor incidencia de los casos en adultos mayores (>60años) con un porcentaje de 3,1 % con 26 casos (Orrego, Henao, & Cardona, 2014).

En la mujer, debido su estructura anatómica permite la presencia de bacterias frecuentemente; mientras que, en el varón, su diferente anatomía hace que las vías de infección sean más importantes y que incluso se registren mecanismos múltiples, por lo que las IVU en varones suelen ser de tipo complicado, debido a que en su origen frecuentemente están implicadas alteraciones estructurales del tracto urinario. Las infecciones urinarias en adultos mayores se asocian a los cambios fisiológicos provocados por el envejecimiento; por lo general existen cambios en el sistema inmunológico debilitándose presentándose en su mayoría las IVU de forma asintomática y es necesario el diagnostico de laboratorio para su tratamiento, además la orina que presenta cierta actividad antibacteriana, que pierde importancia en edad avanzada, también existen cambios en las mujeres como el descenso del nivel de estrógenos tras la menopausia, la ausencia de lactobacilos provoca el aumento del pH vaginal y un descenso del peróxido de hidrógeno, lo favorece la colonización bacteriana; en los hombres la actividad bactericida de las

secreciones prostáticas se encuentra disminuida y puede haber mayor capacidad de adherencia de bacterias al urotelio, (Elsevier.es, 2009).

Se ha encontrado en múltiples estudios que *K. pneumoniae* es un microorganismo oportunista adaptado al ambiente hospitalario y puede sobrevivir durante mucho tiempo en las manos del personal de salud, lo que facilita su transmisión entre personas; debido a diferentes propiedades y características que posee esta bacteria, entre los que se encuentran su capacidad para resistir a la desecación en el medio y sobrevivir en la piel debido a su cápsula hidrofílica, además de la presencia de adhesinas y fimbrias que le permite adherirse a las superficies; es así que la oportuna y correcta detección es indispensable para que el paciente reciba un adecuado tratamiento y permitir establecer medidas de control para evitar la diseminación de este microorganismo a nivel hospitalario o en la comunidad, (Echeverri, Atehortúa, & Robledo, 2009).

Otro de los factores que sin duda contribuye al aumento de la resistencia a fármacos en la comunidad es el empleo suplementos de antibióticos en los alimentos para animales; la adición de niveles bajos de antibióticos al alimento del ganado aumenta la eficiencia y la tasa de ganancia de peso en el ganado bovino, porcino y en los pollos, aumentando también la cantidad de bacterias resistentes a los antibióticos en el tubo digestivo de los animales, (Pérez, Brito, Guzmán, & Carmona, 2001).

Es importante destacar que la relación con la autoadministración de antibióticos sin ser prescritos por un profesional de la salud afecta directamente para que este tipo de bacterias creen resistencias a los antibióticos y se utilicen grupos específicos de antimicrobianos de uso infrecuente para su terapéutica; de ahí la importancia del estudio que dará evidencia de los resultados de manera clara para que los datos puedan ayudar a promover la concientización del uso correcto de antibióticos y evitar la presencia de bacterias resistentes o multiresistentes (Velázquez, Cornejo, & Volkow, 2016).

## 8. Conclusiones

Se identificó las especies de *Klebsiella* causantes de infección de vías urinarias; *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*; ubicándose como el segundo agente etiológico causante de infección de vías urinarias; existiendo mayor predominancia con un 9,38 % de *Klebsiella pneumonniae* como causante de infecciones de vías urinarias.

En la investigación se logró identificar que *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* tienen un perfil de susceptibilidad similar en ambas especies; presentándose mayor porcentaje de sensibilidad en los antibióticos: amikacina, cefoxitina y carbapenémicos; y presencia de resistencia al trimetropin sulfametoxazol, ampicilina/ácido clavulánico y nitrofurantoína.

En las cepas productoras de betalactamasas se logró identificar resistencia antimicrobiana a la cefalosporina empleada (ceftazidime) y aminoglucósidos, pero aún conservan la sensibilidad a la familia de los carbapenémicos empleados (imipenem y meropenem).

En las cepas productoras de betalactamasas en *Klebsiella pneumoniae* fueron provenientes de usuarios del género masculino de procedencia ambulatorio y hospitalización; y en *Klebsiella oxytoca* tuvieron un porcentaje igual en el aislamiento bacteriano de muestras de hombres y mujeres de procedencia ambulatorio. Todos los casos de resistencia antimicrobiana de tipo betalactamasa de espectro extendido en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* se presentaron en pacientes con edad mayor a 60 años.

## **9. Recomendaciones**

Se recomienda elaborar campañas de prevención en la comunidad desde la academia, acerca del uso inadecuado de antibióticos; debido a que las bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos como un mecanismo natural de supervivencia y adaptación; creando bacterias multiresistentes que pueden transmitirse en centros sanitarios o en la comunidad.

Promover la capacitación del personal de salud sobre la importancia de la correcta toma de muestras microbiológicas, su procesamiento y la eliminación de dichas muestras para evitar la diseminación de bacterias multiresistentes.

## 10. Bibliografía

- Arias, G. (2011). “Características clínicas y frecuencia de Betalactamasas de espectro extendido en aislamientos de Enterobacterias causantes de IVU de origen comunitario en pacientes adultos de siete Hospitales pertenecientes a la red GREBO 2009-2010. En *Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá (GREBO)*. Bogotá, Colombia: Obtenido de: <https://bit.ly/2OpzGk6>.
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2007). *Las Bases Farmacológica de la Terapéutica*. Colombia: Undécima Edición, McGrawHill Interamericana. ISBN: 9701057392.
- Bueno, I. M. (2016). *Frecuencia de resistencia microbiana por  $\beta$ -lactamasas en Enterobacterias en pacientes hospitalizados. Hospital Vicente Corral Moscoso. Cuenca. 2014 - 2015*. Obtenido de Universidad de Cuenca; Repositorio Institucional (Tesis pregrado): <https://bit.ly/2xJMfgM>
- Camiro, A., Parada, M., Peschard, V., & Vera, C. (2017). Polimixinas: Polimixina E. En *Guía APS, Atención Primaria en la Salud*. Intersistemas.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). En M. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. M100, 28th Edición. ISBN 9701057392.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018, Febrero). *CLSI, Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana; M100, 28th ed.* 28° Edición. ISBN 9701057392.
- DrugBank. (Enero de 2018). *Ceftazidime/Avibactam*. Obtenido de DRUGBANK: <https://bit.ly/2R5B9e5>
- Echeverri, L., Atehortúa, S., & Robledo, J. (2009). *K. pneumoniae y betalactamasas. Un problema creciente*. Obtenido de Medicina U.P.B; Tomo 28, N.º 2. Medellín: <https://bit.ly/2Qnuriq>
- Echeverri, L., Rueda, Z., Maya, W., Agudelo, Y., & Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia*. Obtenido de Scielo: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-1018201200020000>

- Elsevier.es. (Julio-Agosto de 2009). *Infección urinaria en el anciano: Clínica y tratamiento*. Obtenido de Farmacia Geriátrica, Vol. 23. : <https://bit.ly/2NT0sBT>
- Flores, J. (2014). Quinolonas: Ácido Nalidíxico. En *Farmacología humana* (págs. 1027-1032). Elsevier Masson, 6ª Edición. ISBN: 9788445825235.
- Gatel, J., Garcia, J., & Letang, E. (2013). *Guía Terapéutica Antimicrobiana*. Editorial Antares. Barcelona- España. ISBN: 9788488825117.
- Hontangas, L., & Castillo, S. (16 de Mayo de 2016). *Técnicas de Identificación*. Obtenido de MEDIA AXON Web site: <https://bit.ly/2M0DBOW>
- Jawetz, M. (2010). Microbiología médica. En *25ª Edición, Capítulo 15* (págs. 213-226). México, D.F.: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. ISBN: 9780071624961.
- Lopardo, H. (26 de Enero de 2015). *Volumen III: Urocultivo, procesamiento, criterios de interpretación e informe*. Obtenido de BritaniaLab: <https://bit.ly/2oGpgy4>
- López, J., & Echeverri, L. (Junio de 2010). *K. pneumoniae: ¿la nueva “superbacteria”?* *Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. IATREIA; VOL 23, No. 2*. Obtenido de <https://bit.ly/2Oj0T7Z>
- Marrero, J., Leyva, M., & Castellanos, J. (2015). Infección del tracto urinario y resistencia antimicrobiana en la comunidad. En *Revista Cubana de Medicina General Integral*. Cuba: <https://bit.ly/2OWF2Al>.
- Mendoza, N. (2008). Polimixinas. En *Farmacología médica*. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 9789687988443.
- Merida, J., & Moreno, E. (2014). *Manual para técnico superior de Laboratorio Clínico y Biomédico*. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 9788498354232.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). Microbiología Médica. En *Séptima Edición* (págs. 258-272). Barcelona, España: Elsevier España, S.L. ISBN: 9788490224205

- Organización Mundial de la Salud. (2014). OMS: El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibioticos pone en manifiesto una grava amenaza para la salud pública en todo el país.
- Orrego, C., Henao, C., & Cardona, J. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatogenos y perfil de suceptibilidad antimicrobiana. En *Acta Médica Colombiana*. Medellín, Colombia. Obtenido de: <https://bit.ly/2xLKzmT>.
- Paciel, D., Seija, V., Prieto, R., & Medina, E. (Noviembre de 2011). *Enterobacterias productoras de KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemasa)*. Obtenido de *Tendencias en Medicina*: <https://bit.ly/2y0SaNy>
- Pérez, M., Brito, A., Guzmán, M., & Carmona, O. (2001). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Resistencia de Klebsiella pneumoniae a los antimicrobianos en Venezuela: Análisis de una década*. Obtenido de <https://bit.ly/2Rc4fZj>
- Prats, G. (2008). *Microbiología Clínica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Rodriguez, H., & Vance, C. (2015). *Vandemecun Farmacoterapéutico del Ecuador*. ISBN: 9789942857217.
- Rodríguez, J., & Pigrau, C. (2013). Infección Urinaria causada por Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla. Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla.: Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología.
- Rodríguez, M. (2012). *Manual de procedimientos para toma de muestras. Edicion N°1*. Obtenido de <https://bit.ly/2NSLuw1>
- Romero, R. (2008). *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Editorial médica Panamericana. 3° Edición. ISBN: 9789687988481.
- Sánchez, D. (2010). *Caracterizar y determinar la resistencia de Proteus, Pseudomona, Enterobacter y Klebsiella en cultivos primarios de los Hospitales Vicente Corral*

- Moscoso y José Carrasco Arteaga de la ciudad de Cuenca. Obtenido de <https://bit.ly/2N8yvAT>
- Santambrosio, E. (2009). *Universidad Tecnológica Nacional; Facultad del Rosario, Departamento de Ingeniería Química. Siembra y recuento de microorganismos*. Obtenido de <https://bit.ly/2nK6Dve>
- Soto, C. (2013). *Manual de toma de muestras, Unidad de Laboratorio Clínico*. Obtenido de <https://bit.ly/2H5jMZs>
- Tamayo, R., & Córdova, D. (2016). Expansión clonal de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen blaKPC en el Ecuador. *Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Obtenido de: <https://bit.ly/2QiBit5>.
- Tortora, G., & Grabowski, S. (2004). *Anatomía y Fisiología. Transtornos de desequilibrio Homeostáticos del sistema urinario*. Mexico: Oxford University. Novena Edición. ISBN: 9706135707.
- Velasco, J., Araque, M., & Araugo, E. (2008). *Manual práctico de Bacteriología Clínica. Colección textos universitarios*. Primera Edición. Obtenido de: <https://bit.ly/2rouuzv>.
- Velázquez, C., Cornejo, P., & Volkow, P. (2016). Resistencia bacteriana de cultivos de orina en un hospital oncológico: seguimiento a diez años. Obtenido de <https://bit.ly/2Itma9K>.
- Whonet. (2016). *Protocolo de trabajo red Whonet Argentina. XVII Taller WHONET-Argentina*. Obtenido de: <https://bit.ly/2xQtQ1I>.

## **11. Anexos**



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

*Anexo 1*

**Permiso para recolección de muestras y datos en el Laboratorio Clínico de MEDILAB**



Loja, 10 de Marzo del 2018

Dra. Sandra Freire  
RESPONSABLE DE LABORATORIO CLÍNICO MEDILAB DE LOJA.

Por medio del presente, autorizo el permiso correspondiente para la obtención de datos y muestras con solicitud de urocultivos a la Srta. Katheryne Daniela Mihquero Masache, portadora de la cédula de identidad número 1105752909, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, para la realización del proyecto titulado "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTE DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLINICO DE MEDILAB", previo a la obtención del título de licenciado en Laboratorio Clínico; cabe recalcar que los datos obtenidos serán tratados cuidadosamente, guardando la confidencialidad correspondiente.

Atentamente.

GEVASCOP S.A.  
AUTORIZADO

10 MAR 2018

Ing. Ixania Azanza Troncos  
GERENTE

  
Dra. Sandra Freire

Responsable de Laboratorio Clínico MEDILAB de Loja.

  
Dra. Sandra Freire  
DIRECTOR LABORATORIO CLÍNICO

ATENCIÓN **24 HORAS**

Laboratorio: Manuel Montero y Alfredo Mora esq. • Telf. 2581 404 / 2580 515  
Clínica: Rocafuerte 15-22 y Sucre • Telf. 2587 636 / 2577 056  
Correo: medilabloja@hotmail.com • Loja - Ecuador

[www.medilab.com.ec](http://www.medilab.com.ec)



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

*Anexo 2*

**Sistema de datos electrónico del Laboratorio Clínico de MEDILAB**

Orden: 113904  
Fecha muestra: Desde: 00/00/0000 00:00 Hasta: 00/00/0000 00:00  
Origen: (Todos)  
D.: H.: Planilla: (Todos)

Análisis: (F2) Cod. Paciente: Nombre de Paciente: Tipo de Análisis: (Todos) Estados-> (Todos) Petición: (Todos) Resultado: (Todos)

Verificados  URG / Prio  Fuera normal  Fuera crítico Fecha orden-> Desde: 00/00/0000 Hasta: 00/00/0000

**113904** LOG [Redacted]  
Subido a Internet PREV [Redacted]  
SGC 22/may/2018 Femenino 20 A DRA. [Redacted]

**MICROBIOLOGIA**

587 CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO) 04/05/18 16:16 Impreso

✓ CULTIVO DE ORINA (URO)	[ ]	Impreso	24/05/18 10:24	. ^ / IM	---
✓ Sensible	[ ]	Impreso	24/05/18 10:25	. ^ / IM	---
✗ Intermedio	[ ]	Impreso	22/05/18 13:14	{vacío} / IM	---
✓ Resistente	[ ]	Impreso	24/05/18 10:26	. ^ / IM	---

Final de Orden : 113904 / [Redacted]

(A entregar vie 25/may/2018 14:00) **ML-052**

MT DE MUESTRA: 203  
TIPO DE MUESTRA: ORINA  
CONCENTRACION BACTERIANA: MENOS A 100.000 UFC/ML



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

*Anexo 3*

 <b>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana</b>	<b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de conservación y transporte de muestras de urocultivos positivos.</i>	<b>Código: CT Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: 20/03/2018 Página: 1/2</b>
--	---	--

**Protocolo de conservación y transporte de muestras de urocultivos positivos**

**1. Introducción:**

Las muestras biológicas deben ser tomadas, transportadas y conservadas adecuadamente para poder obtener resultados de calidad; siendo un punto fundamental en la investigación. Para mantener la integridad de cada una de las muestras se deberá tener en cuenta los pasos adecuados para la obtención, transporte, condiciones de conservación, destino final y periodo de conservación de las muestras hasta su procesamiento. El control de estos proporcionará valor a las muestras asegurando la calidad y estabilidad para obtener resultados confiables y oportunos.

**2. Objetivo:**

- Identificar las correctas condiciones de transportar y conservación de especímenes microbiológicos en muestras de orina.

**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:**

**Estudiantes:** elaboración del procedimiento.

**Docentes/investigadores:** validación del procedimiento.

**Colaboradores instituciones participantes:** aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

**5. Equipos y materiales:**

- Guantes y mascarilla
- Lápiz graso o rotulador
- 1 Contenedor de transporte (cooler)
- 1 Medio de transporte Stuart Aimes por muestra de orina.

**6. Procedimiento:**

- Se rotula el medio de Stuart con el código del paciente de cada una de las muestras positivas de urocultivo, identificar con la fecha de recolección.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de conservación y transporte de muestras de urocultivos positivos.</i></p>	<p><b>Código: CT</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/2</b></p>
---	---	---

- Colocar cuidadosamente las muestras de urocultivo positivo (colonias bacterianas) en el medio de transporte Stuart; evitando tocar los bordes externos con el hisopo para evitar la contaminación de las muestras y superficie del vial de transporte.
- Colocar los medios de transporte Stuart que contienen las muestras de urocultivos en un contenedor estándar para transporte (cooler).

### 7. Observaciones.

Recomendaciones para el transporte y almacenamiento de las muestras:

- El transporte al laboratorio se debe realizar de forma inmediata al laboratorio para su procesamiento.
- Identificar cada muestra mediante un código numérico, fecha y los datos pertinentes para el estudio de cada una de las muestras.
- Aplicar las correctas normas de bioseguridad; mediante el uso de; traje protector, mandil, guantes y mascarilla dentro del área de microbiología para proteger la integridad de las muestras y persona de realiza los procedimientos.

### 8. Bibliografía

- Rodríguez, T. (2013). Cursep. Obtenido de <https://bit.ly/2Q5umjQ>

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Katheryne Mihquero Masache.</li> </ul>	Lcda. Carmen Ullauri González, Mg. Sc.



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

*Anexo 4*

 <p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana</p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de preparación de agar Mueller Hinton</i></p>	<p><b>Código: MHM6</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 1/3</b></p>
---	--	---

**Protocolo de preparación de agar Mueller Hinton**

**1. Introducción**

Se trata de un medio recomendado para estudios convencionales de sensibilidad bacteriana. Su composición está bien definida e incluye extractos de ternera y caseína, sales, cationes divalentes y almidón soluble necesario para que los resultados sean reproducibles.

**2. Objetivo**

- Establecer el correcto procedimiento de preparación de agar Mueller Hinton.

**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:**

**Estudiantes:** elaboración del procedimiento.

**Docentes/investigadores:** validación del procedimiento.

**Colaboradores instituciones participantes:** aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

**5. Materiales**

**Equipos**

- Autoclave
- Incubadora

**Instrumentos**

- 1 Probeta de 500ml
- Matraz de 500ml
- Jeringas estériles de 50ml
- 65 Cajas monopetri

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de preparación de agar Mueller Hinton</i></p>	<p><b>Código: MHM6</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/3</b></p>
---	--	---

#### Insumos

- Lápiz graso
- Algodón
- Cinta testigo para autoclave

#### Sustancias y reactivos

- Agar Mueller Hinton de 500gr.
- Agua destilada

#### 6. Procedimiento:

- Medir la cantidad de agua destilada requerida según el número de muestras a procesar.
- Pesar el agar Mueller Hinton en la balanza, refiriéndose a la etiqueta del envase para las cantidades y volúmenes de agua requeridos.

Numero de muestras	Agar Mueller Hinton (500g)	Volumen de agua destilada (13.1 litros)
10	5,73	150
15	7,63	200
20	9,54	250
25	11,45	300

- Luego disolver el agar pesado en el agua destilada, mezclando cuidadosamente.
- Hacer hervir en la hornilla eléctrica durante unos minutos disolviendo todo el agar hasta que la preparación sea de un aspecto transparente.
- Colocar un tapón o corcho de algodón en el matraz; y la cinta testigo para autoclavar la preparación.
- Esterilizar en la autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y dispensar en la cabina de bioseguridad previamente realizando una limpieza de la zona de trabajo del equipo para evitar la contaminación del agar. Se dispensa con las jeringas estériles en las cajas monopetri la cantidad aproximada de 13ml por caja evitando la formación de burbujas en el agar; para asegurar el grosor adecuado en cada caja Petri (4mm).
- Dejar enfriar las cajas con agar hasta que se solidifiquen y guardar en el refrigerador en fundas plásticas indicando la fecha de elaboración y la cantidad del material.

#### 7. Observaciones.

- Se recomienda dejar una caja de cada lote de agares preparados en la incubadora para control de calidad.
- El material preparado debe ser de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar; debido a que los agares son viables hasta los 7 días de preparación.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de preparación de agar Mueller Hinton</i></p>	<p><b>Código: MHM6</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 3/3</b></p>
---	--	---

## 8. Bibliografía

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

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Katheryne Mihquero Masache.</li> </ul>	<p>Lcda. Carmen Ullauri González, Mg. Sc.</p>



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

*Anexo 5*

 <p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana</p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de conservación y almacenamiento de cepas control</i></p>	<p><b>Código: CC</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 1/3</b></p>
---	--	---

**Protocolo de conservación y almacenamiento de cepas control**

**1. Introducción**

Las cepas para el control de calidad recomendadas por el CLSI han sido seleccionadas en base a la susceptibilidad o resistencia a un agente antimicrobiano en particular y su desempeño confiable cuando se prueban utilizando los estándares de esa misma organización y que son los que se utilizan en el Laboratorio de Referencia de Bacteriología del Instituto de Salud Pública.

**2. Objetivo**

- Establecer el correcto procedimiento para almacenar y procesar las cepas control ATTC 700603 Y 25922.

**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:**

**Estudiantes:** elaboración del procedimiento.

**Docentes/investigadores:** validación del procedimiento.

**Colaboradores instituciones participantes:** aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

**5. Materiales**

**Equipos**

- Cabina de seguridad biológica
- Incubadora

**Instrumentos**

- Tubos de ensayo
- Viales plásticos
- Gradilla
- Hisopos estériles

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de conservación y almacenamiento de cepas control</i></p>	<p><b>Código: CC</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/3</b></p>
---	--	---

#### **Insumos**

- Lápiz graso

#### **Sustancias y reactivos**

- Tioglicolato
- Glicerina
- Agua destilada

#### **6. Procedimiento:**

Cada laboratorio debe mantener una colección de cepas de referencia ATCC para el Control de Calidad Interno (CCI) apropiado de acuerdo a sus necesidades. Estas cepas deben almacenarse en forma adecuada para preservar sus características y tener registro de su origen, número de copia y almacenamiento. Para almacenamiento a largo plazo, se recomienda utilizar una de las siguientes alternativas:

- Almacenar las cepas ATCC en un medio estabilizador apropiado, como caldo de soya tripticasa con 15- 20 % de glicerol a temperatura de - 20°C o menos.
- Almacenar en estado liofilizado, si es posible. Para trabajar con cepas originales congeladas (de mantención), se recomienda que idealmente una vez al mes se realice lo siguiente:
  - a) Subcultive del medio congelado a un medio sólido, como agar sangre u otros sin inhibidores.
  - b) A continuación, subcultive 4-5 colonias aisladas del subcultivo anterior a un tubo de tapa rosca con agar inclinado o en agar en profundidad e incube de 18 a 24 horas. Este subcultivo le permitirá obtener las copias necesarias para la rutina del CCI.
  - c) El subcultivo en tubo debe ser conservado a temperatura ambiente durante el mes. Evite realizar subcultivos repetidos de más de un mes, ya que las cepas ATCC pueden perder características que permiten su uso en el control de calidad como por ejemplo pérdida de plásmidos que confieren resistencia antimicrobiana.

#### **7. Observaciones**

- Utilizar el equipo de protección y aplicar las normas de bioseguridad en todos los procedimientos realizados en las distintas áreas del laboratorio.
- La frecuencia de control de calidad interno se debe realizar cada día con el grupo de pruebas procesadas; con la cepa ATCC definida como control positivo (ATTC 700603, *Klebsiella pneumoniae*) y control negativo (ATTC 25922, *E. coli*).
- Las cepas ATTC deben ser procesadas cuidadosamente sin contaminar los viales de reserva; debido a que la cepa ATTC 700603 (*Klebsiella pneumoniae*) tienen la capacidad de presentar mutaciones en los genes OMPK35 y OMPK37.



**Universidad Nacional de Loja**  
**Facultad de la Salud Humana**

**Nombre del protocolo:**  
*Protocolo de conservación y  
almacenamiento de cepas  
control*

**Código: CC**  
**Revisión: 1**  
**Edición: 1**  
**Fecha: 20/03/2018**  
**Página: 3/3**

Utilizar la tabla de referencia 4-A2 del M100 CLSI, que resume la frecuencia de CCI para método de difusión en disco para las cepas utilizadas.

Table 4A-2. Disk Diffusion QC Ranges for Nonfastidious Organisms and  $\beta$ -Lactam Combination Agents\*

Antimicrobial Agent	Disk Content	QC Organisms and Characteristics							
		<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603 <sup>b,c</sup>	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 <sup>b,c</sup>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705™ <sup>b,c</sup>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-2814™
		$\beta$ -lactamase negative	Inducible AmpC	$\beta$ -lactamase negative, <i>mecA</i> negative	TEM-1	SHV-18 OXA-2 Mutations in <i>OmpK35</i> and <i>OmpK37</i> TEM-1	CTX-M-15	KPC-2 SHV	KPC-3 SHV-11 TEM-1
		MIC QC ranges, mm							
Amoxicillin-clavulanate (2:1)	20/10 $\mu$ g	18–24	–	28–36	17–22	–	–	–	–
Ampicillin	10 $\mu$ g	15–22	–	27–35	6	–	–	–	–
Ampicillin-sulbactam (2:1)	10/10 $\mu$ g	19–24	–	29–37	13–19	–	–	–	–
Aztreonam	30 $\mu$ g	28–36	23–29	–	31–38	10–16	–	–	–
Aztreonam-avibactam	30/20 $\mu$ g	32–38	24–30	–	31–38	26–32 <sup>e</sup>	–	–	–
Cefepime	30 $\mu$ g	31–37	25–31	23–29	–	–	–	–	–
Cefepime-tazobactam <sup>d</sup>	30/20 $\mu$ g	32–37	27–31	24–30	–	25–30 <sup>e</sup>	27–31	–	–
Cefotaxime	30 $\mu$ g	29–35	18–22	25–31	–	17–25	–	–	–
Cefpodoxime	10 $\mu$ g	23–28	–	19–25	–	9–16	–	–	–
Ceftaroline	30 $\mu$ g	26–34	–	26–35	–	–	–	–	–
Ceftaroline-avibactam	30/15 $\mu$ g	27–34	17–26	25–34	27–35	21–27 <sup>e</sup>	–	–	–
Ceftazidime	30 $\mu$ g	25–32	22–29	16–20	–	10–18	–	–	–
Ceftazidime-avibactam	30/15 $\mu$ g	27–35	25–31	16–22	28–35	21–27 <sup>e</sup>	–	–	–
Ceftolozane-tazobactam	30/10 $\mu$ g	24–32	25–31	10–18	25–31	17–25	–	–	–
Ceftriaxone	30 $\mu$ g	29–35	17–23	22–28	–	16–24	–	–	–
Meropenem	10 $\mu$ g	28–35	27–33	29–37	–	–	–	11–18*	6*
Meropenem-vaborbactam <sup>d</sup>	20/10 $\mu$ g	31–37	29–35	32–38	–	29–35	–	21–27	16–20
Piperacillin	100 $\mu$ g	24–30	25–33	–	12–18	–	–	–	–
Piperacillin-tazobactam	100/10 $\mu$ g	24–30	25–33	27–36	24–30	–	–	–	–
Ticarclillin	75 $\mu$ g	24–30	21–27	–	6	–	–	–	–
Ticarcillin-clavulanate	75/10 $\mu$ g	24–30	20–28	29–37	21–25	–	–	–	–

\* Unsupplemented Mueller-Hinton medium. See Table 4A-1 for QC ranges for combination agents from other drug classes.

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; MIC, minimal inhibitory concentration; N/A, not applicable; NCTC, National Collection of Type Cultures; QC, quality control.

## 6. Bibliografía

- CLSI, C. a. (2018). *Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 28ª ed.* Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100.
- Jawetz, M. (2010). *Microbiología médica.* En 25º Edición (págs. 148). México, D.F.: McGRAW-HILL
- Merida, J., & Moreno, E. (2014). *Manual para técnico superior de Laboratorio Clínico y Biomédico.*

ELABORADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Katheryne Mihquero Masache.</li> </ul>	Lcda. Carmen Ullauri González, Mg. Sc.



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

*Anexo 6*

 <b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b>	<b>Nombre del protocolo:</b>  <i>Protocolo de siembra de Urocultivos</i>	<b>Código: SU</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 1/4</b>
--	--	--

**Protocolo de siembra de Urocultivos**

**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 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. (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, 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 las siembras 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 100000 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. (Lopardo, 2015).

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de siembra de Urocultivos</i></p>	<p><b>Código: SU</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/4</b></p>
---	--	---

## 2. Objetivo

- Definir los pasos necesarios que garantice el procedimiento para siembra de muestras de orina en medios de cultivo.

## 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:

**Estudiantes:** elaboración del procedimiento.

**Docentes/investigadores:** validación del procedimiento.

**Colaboradores instituciones participantes:** aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

## 5. Materiales

### Equipos

- Mechero 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
- Mascarilla

### Sustancias y reactivos

- Muestra a estudiar

## 6. Procedimiento

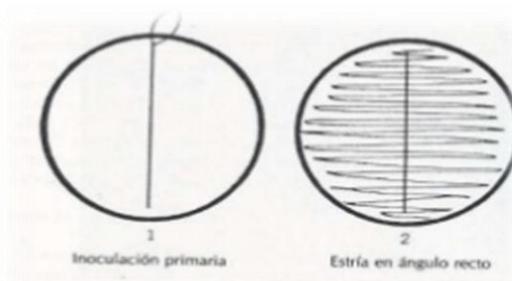
Para realizar un cultivo bacteriano es necesario:

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).

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de siembra de Urocultivos</i></p>	<p><b>Código: SU</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 3/4</b></p>
---	---	---

4. Se inocula la placa de agar MacConkey, Mueller y EMB 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.

#### **7. 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.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de siembra de Urocultivos</i></p>	<p><b>Código: SU</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 4/4</b></p>
---	---	---

## 8. Bibliografía

- Lopardo, D. H. (26 de Enero de 2015). Obtenido de BritaniaLab.com: <https://bit.ly/2oGpgy4>.

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• María de los Ángeles Ucho.</li> </ul>	<p>Dra. Sandra Freire Cuesta.</p>



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

*Anexo 7*

 <b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b>	<b>Nombre del protocolo:</b>  <i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i>	<b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 1/8</b>
--	--	--

**Protocolo de identificación de bacilos gram negativos**

### 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).

#### **Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias gram negativas**

- **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.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i></p>	<p><b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/8</b></p>
---	--	---

- **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 35<sup>a</sup> 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.

## 2. Objetivo

- Identificar mediante la siembra de colonias aisladas las especies de Klebsiella de los agentes etiológicos de los urocultivos.

## 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

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i></p>	<p><b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 3/8</b></p>
---	--	---

- 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.
- Agar: Mueller Hinton (M6), MacConkey, EMB.
- Lápiz grasa
- Guantes
- Mascarilla

#### **Sustancias y reactivos**

- Reactivo de Kovacs.
- Muestra a estudiar
- Cepas control de Enterobacterias: ATTC 25229, ATTC 700603.

## **6. Procedimiento**

### **6.1. Identificación de características de colonias**

#### **6.1.1. Procedimiento de siembra en Agar Mueller Hinton, MacConkey y EMB**

- Procedimiento
  1. Realizar el inculo con la muestra de urocultivo del medio de transporte Stuart que contiene la muestra.
  2. Rotular las muestras en las cajas de siembra.
  3. Estriar el inculo con el asa mediante la técnica de agotamiento.
  4. Incubar de 35 a 37 °C durante 24 horas.

#### **- Interpretación:**

#### **Agar Mueller Hinton**

Se identificarán las características de las colonias:

- Bordes: entero, ondulado, lobulado.
- Forma: puntiforme, circular/redonda, rizoide, fusiforme, irregular.
- Elevación: plana, convexa, cóncava.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i></p>	<p><b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 4/8</b></p>
---	---	---

- Superficie: lisa, rugosa.
  - Consistencia: cremosa, mucoide.
- Cambio de color del agar Mueller Hinton  
*Pseudomona spp* → color verde

### **Agar MacConkey**

Se identificarán las colonias de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de lactosa  
Lactosa positiva: coloración rosácea al medio; presente en bacilos fermentadores como: *E. coli*, *Klebsiella spp*.  
Lactosa negativa: presente en bacilos no fermentadores como: *Proteus spp*, *Pseudomona*, *Acinetobacter*.

### **Agar EMB**

Se identificarán las características de las colonias:  
**Reacción positiva:** Presencia de brillo metálico en *E. coli*.  
**Reacción negativa:** Ausencia de brillo metálico. Presente en los bacilos no fermentadores y otros bacilos como *Klebsiella spp* y *Enterobacter*.

## **6.2. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias gram negativas**

### **6.2.1. 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.

### **6.2.2. 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

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i></p>	<p><b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 5/8</b></p>
---	---	---

- 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.

### 6.2.3. 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.

### 6.2.4. 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

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i></p>	<p><b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 6/8</b></p>
---	---	---

- Interpretación:

Las bacterias que hidrolizan rápidamente la úrea lo pueden hacer dentro de 1–2 horas, 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.

#### 6.2.5. 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.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> Facultad de la Salud Humana</p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i></p>	<p><b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 7/8</b></p>
--	--	---

- 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

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de identificación de bacilos gram negativos</i></p>	<p><b>Código: IB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 8/8</b></p>
---	---	---

## 7. Bibliografía

- CLSI, C. a. (2018). *Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 28<sup>a</sup> ed.* Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.
- Hontangas, L., & Castillo, S. (16 de Mayo de 2016). *Técnicas de Identificación: MEDIA AXON*. Obtenido de MEDIA AXON Web site: <https://bit.ly/2M0DBOW>
- Lopardo, D. H. (26 de Enero de 2015). Obtenido de BritaniaLab.com: <http://www.laensenadacorp.com/documentos/ApunteIII-UROCULTIVO.pdf>
- Rodriguez, T. (2013). *Cursep*. Obtenido de <https://bit.ly/2Q5umjQ>
- Santambrosio, I. E. (2009). *Universidad Tecnológica Nacional* . Obtenido de <https://bit.ly/2nK6Dve>

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Katheryne Mihquero Masache.</li> </ul>	Lcda. Carmen Ullauri González, Mg. Sc.



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

Anexo 8

 <p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana</p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de método de difusión en discos Kirby-Bauer/ Antibiograma</i></p>	<p><b>Código: MDKB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 1/5</b></p>
---	---	---

**Protocolo de método de difusión en discos Kirby-Bauer / Antibiograma**

**1. Introducción**

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

**2. Objetivo**

- Determinar mediante el método de Kirby Bauer la susceptibilidad bacteriana de especies de *Klebsiella* a determinados antibióticos.

**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:**

- Estudiantes:** elaboración del procedimiento.
- Docentes/investigadores:** validación del procedimiento.
- Colaboradores, instituciones participantes:** aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

**5. Materiales**

**Equipos**

- Cabina de bioseguridad

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de método de difusión en discos Kirby-Bauer/ Antibiograma</i></p>	<p><b>Código: MDKB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/5</b></p>
---	---	---

- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol con alcohol al 70 %
- Pinza metálica
- Incubadora
- Densitómetro
- Agitador vortex

#### **Insumos**

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

#### **Sustancias y reactivos**

- Muestra a estudiar
- Solución salina estéril
- Discos de antibioticos: ceftazidime, cefoxitin, cefepime, ampicilina/sulbactam, imipenem, ciprofloxacina, gentamicina, amikacina, trimetropin/sulfametoxazol, nitrofurantoína.
- Cepas control ATTC: *E. coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 700603.

## **6. Procedimiento**

### **Antibiograma por difusión método de Kirby Bauer:**

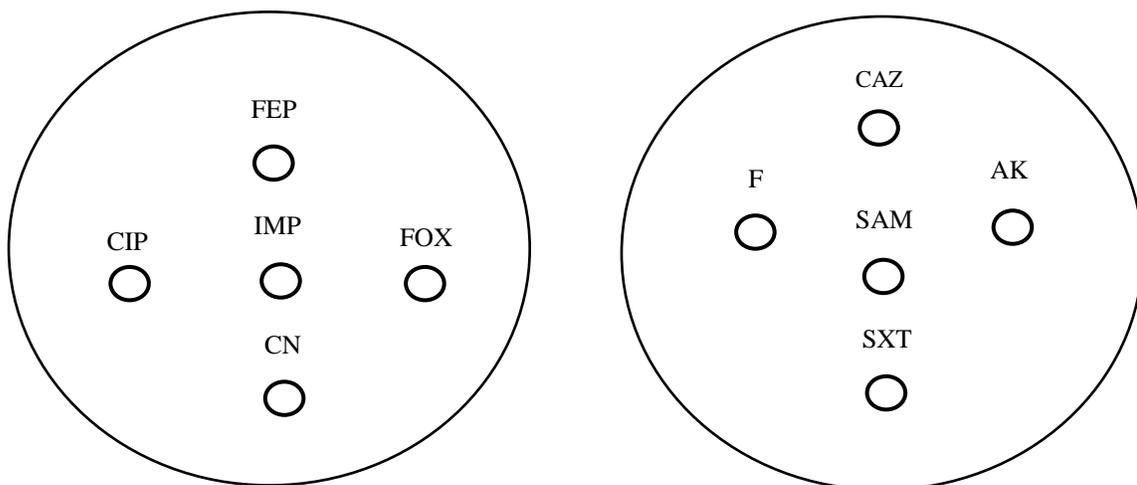
Para poder realizar esta prueba debe seguirse el siguiente procedimiento:

1. Tomar varias colonias de un cultivo de 24 o 48 horas con un hisopo estéril y ajustar el inóculo a una turbidez equivalente a 0,5 de la escala Mac Farland en el tubo con 3 ml de solución salina, agitar en un vortex por 15 a 20 segundos.  
Si utiliza densitómetro la densidad debe ser igual a 0.5 unidades Mac Farland y si usa espectrofotómetro ajustarlo a una longitud de onda de 625 nm y la medida de absorbancia debe ser de 0.08 a 0.1.
2. Con una torunda estéril introducir en el inóculo y antes de retirarla rotar varias veces sobre las paredes del tubo por encima del nivel del líquido para eliminar el exceso y garantizar la concentración del inóculo.
3. Inocular las placas de Mueller Hinton, previamente rotuladas sin dejar zona libre para lo que se necesitará deslizar la torunda en 3 direcciones rotando la placa 60°C cada vez.
4. Dejar secar por 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de método de difusión en discos Kirby-Bauer/ Antibiograma</i></p>	<p><b>Código: MDKB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 3/5</b></p>
---	---	---

1. Colocar los discos presionando ligeramente el agar y flameando la pinza cada vez que se vaya a colocar otro disco.
2. Los discos deben ser distribuidos de forma de manera que los halos de inhibición no se superpongan en placas de 100 mm no se debe colocar más de 6 discos y en placas de 150 mm hasta 10 discos.
3. Incubar las placas invertidas en incubadora por 18 a 24 horas a 35°C en atmósfera aeróbica para microorganismos no fastidiosos y para bacterias anaerobias facultativas incubar en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>.
4. Leer el diámetro de inhibición con una regla milimetrada, en medios transparentes se miden por el reverso de la placa y en los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar.
5. Comparar las mediciones con las tablas aprobadas por el CLSI.  
Según el criterio del CLSI y sus tablas rigen tres criterios de reporte:
  - ✓ Sensibles: las bacterias que en dosis habituales del respectivo antimicrobiano son inhibidas
  - ✓ Sensibilidad intermedia: cuando puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones que se alcanzan concentraciones altas del antimicrobiano o cuando se elevan dosis más elevadas de lo habitual.
  - ✓ Resistente: cuando las bacterias no se inhiben por las concentraciones adecuadas habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del antimicrobiano.

#### DISCOS PARA ANTIBIOGRAMA EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS



 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de método de difusión en discos Kirby-Bauer/ Antibiograma</i></p>	<p><b>Código: MDKB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 4/5</b></p>
---	---	---

**Tabla:** Puntos de cohorte de discos antibióticos, según el CLSI M100-S28

ANTIBIOTICO	Medida de halo de inhibición			
	(mm)			
	S	I	SDD	R
<b>Imipenem (IMP) ó meropenem (MER)</b>	>23	20-22	-	<19
<b>Cefoxitin (FOX)</b>	>18	15-17	-	<14
<b>Cefepime (FEP)</b>	>25	-	19-24	<18
<b>Ciprofloxacina (CIP)</b>	>21	16-20	-	<15
<b>Ampicilina / Sulbactam (SAM)</b>	>15	12-14	-	<11
<b>Ceftazidime (CAZ)</b>	>21	18-20	-	<17
<b>Amikacina (AK)</b>	>17	15-16	-	<14
<b>Gentamicina (CN)</b>	>15	13-14	-	<12
<b>Trimetropin/Sulfametoxazol (SXT)</b>	>16	11-15	-	<10
<b>Nitrofurantoína (F)</b>	>17	15-16	-	<14

(Nota: puntos de cohorte utilizados para Enterobacterias).

*Fuente:* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

## 7. Observaciones

- A pesar de que el medio de Agar Mueller Hinton el cual contiene infusión de carne 2; hidrolizado de caseína 17,5; almidón 1,5; agar-agar 13; pH 7,2-7,3; tiene buena reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad, se debe tener precauciones en el momento de la preparación para poder garantizar que la difusión de los antibióticos y la densidad del inóculo sean estandarizados. Así los parámetros importantes que se deben observar en este medio son: el pH, el grosor del medio, la humedad, el efecto de la timina y timidina y la variación de la composición de los cationes divalentes.
- pH: debe ser de 7,2 o 7,3 a temperatura ambiente. Con pH bajo antibióticos como los aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activas (halos más pequeños y posibles falsas resistencias) y la tetraciclina puede tener mayor actividad

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de método de difusión en discos Kirby-Bauer/ Antibiograma</i></p>	<p><b>Código: MDKB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 5/5</b></p>
---	---	---

(halos grandes = falsas sensibilidades) y de lo contrario con pH alto se espera el efecto opuesto.

- Grosor del medio: el grosor del medio adecuado es de 4 mm, si el medio es muy pequeño la difusión de los antibióticos será mayor y si es muy grueso será menor, por lo que en el primer caso esperamos halos más grandes provocando una lectura de falsas sensibilidades y en el segundo los halos serán menores reportando falsas resistencias.
- Humedad: las placas no deben tener exceso de humedad si esto ocurre se deben colocar en una cabina de flujo laminar por 10 a 30 minutos hasta que no tengan gotas de condensación. Si la superficie de la placa está demasiado húmeda los antibióticos de los discos difundirán en todo el medio y se podrá observar halos inespecíficos y solapados o por el contrario muy pequeños por la acción sinérgica o antagonica de los antibióticos, respectivamente. Efecto de la timina y timidina: los medios con exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos de las sulfonamidas y trimetropina produciendo zonas de inhibición más pequeñas, menos nítidas o sin halo lo que es equiparable a falsas resistencias. Esto lo garantiza la composición del medio de cultivo de la casa proveedora con la estandarización M6 del agar.
- Variación de cationes divalentes: la variación de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  afectan los resultados de la actividad de los aminoglucósidos y tetraciclina. Un alto contenido de cationes genera reducción de los halos de inhibición y poca cantidad de cationes ocasiona una zona de inhibición falsamente mayor. El efecto está garantizado con el agar M6.
- Conservar los discos de antibióticos a una temperatura de  $-20^{\circ}C$  para periodos prolongados o de  $2$  a  $8^{\circ}C$  los discos de antibióticos prolongados o entre  $2$  y  $8^{\circ}C$  si se utilizan en el plazo de una semana.

## 8. Bibliografía

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

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kathyryne Mihquero Masache.</li> </ul>	Lcda. Carmen Ullauri González, Mg. Sc.



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

*Anexo 9*

 <b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b>	<b>Nombre del protocolo:</b>  <i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i>	<b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 1/11</b>
--	---	--

**Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana:  
Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), Amp-C y Carbapenemasas.**

### 1. Introducción

Las betalactamasas de espectro extendido son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, los bacilos Gram negativos tienen gran capacidad de producirlas; pertenecen al grupo A de Ambler y sus representantes principales son las de tipo CTX –M, PER ½, TEM ½, SHV. Son capaces de hidrolizar la mayoría de betalactámicos, monobactams, sin embargo, no afectan a carbapenémicos. Su detección puede hacerse por medios fenotípicos y moleculares, se considerarán el método de sinergia de discos y discos combinados usando controles de calidad internos y externos.

Betalactamasas Amp C: Son enzimas que cuando algunas bacterias las portan o producen generan resistencia a ciertos antibióticos betalactámicos hasta las cefalosporinas de amplio espectro, pueden ser constitutivas o plasmídicas en cuyo caso tienen más potencial de diseminación, pertenecen al grupo C de Ambler y entre las más importantes tenemos a CIT, DHA, FOX, CMY, MIR. Las Amp C cromosómicas inducibles están presentes en enterobacterias como: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp*, *Providencia spp*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, bacterias en las que cuando está presente el mecanismo de resistencia de pérdida de permeabilidad puede confundir el patrón con una BLEE. Se realizará la detección con el uso de sinergia de discos.

Las carbapenemasas son enzimas que confieren resistencia a todos los antibióticos betalactámicos, las enterobacterias que las producen constituyen una emergencia ya que el tratamiento se restringe a muy pocas y tóxicas opciones terapéuticas.

Pueden ser serin betalactamasas o metalobetalactamasas según tengan en su sitio activo serina o zinc; pertenecen al grupo A, B y D de Ambler y sus principales representantes son KPC – IMI –SME, VIM, IMP, NDM y OXA respectivamente. Se considerarán para su detección método de sinergia de discos, discos combinados, inactivación de carbapenémicos y método colorimétrico.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/11</b></p>
---	--	---

## 2. Objetivos:

- Identificar por los distintos métodos de sinergia de discos y discos combinados la presencia de resistencias bacterianas BLEE, Amp-C y Carbapenemasas bacterias Gram negativas aisladas de muestras de orina.

## 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:

**Estudiantes:** elaboración del procedimiento.

**Docentes/investigadores:** validación del procedimiento.

**Colaboradores, instituciones participantes:** aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

## 5. Materiales:

### Equipos

- Densitómetro
- Agitador vortex
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora

### Instrumentos

- Pinzas metálicas
- Tubos de Ensayo con 3 ml de suero fisiológico estéril
- Gasas
- Gradilla
- Lámpara de alcohol
- Hisopos estériles
- Contenedores para desechos cortopunzantes, especiales, comunes e infecciosos.

### Sustancias y reactivos

- Cultivo de bacterias
- Agar Mueller – Hinton
- Discos de antibióticos:

#### **BLEE**

- a) Sinergia de discos: cefotaxime, ceftazidime, cefepime, amoxicilina-ácido clavulánico.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 3/11</b></p>
---	--	---

- b) Discos combinados: ceftazidime 30 ug, ceftazidime + ácido clavulánico 30/10 ug, cefotaxime, cefotaxime + ácido clavulánico 30/10 ug.

**AMP-C**

- a) Sinergia de discos: cefotaxima (30ug), ceftazidima (30ug), ácido fenilborónico (400µg).

**CARBAPENEMASAS**

- a) Discos combinados con inhibidor: meropenem (10 µg), meropenem/ácido borónico (10/600 µg), meropenem/EDTA (10/1000 µg), meropenem/cloxacilina (10/500-750 µg).

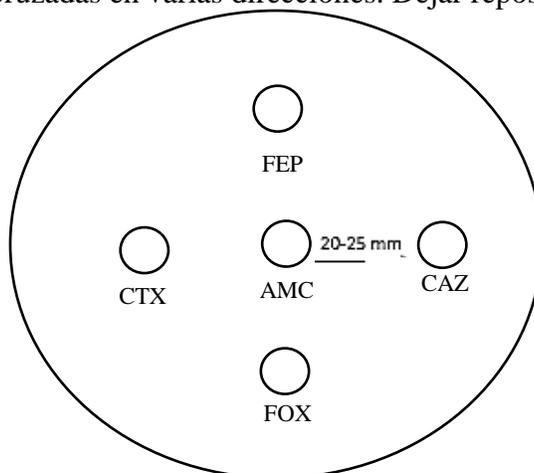
- b) Sinergia de doble disco: meropenem (10 µg), EDTA (1000 µg), ácido fenilborónico (350).

**6. Procedimiento:**

**BLEE**

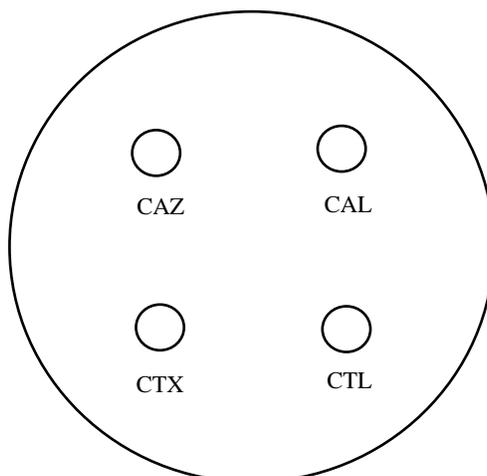
**a) -Sinergia de Discos:**

- Preparar los materiales que se van a utilizar.
- Rotular los tubos y la caja Petri con Agar Mueller – Hinton a utilizar.
- Tomar con un hisopo estéril una colonia del cultivo y suspenderla en solución salina.
- Medir en el densitómetro la turbidez del inóculo, que debe ser equivalente a 0,5 en la escala McFarland, tener precaución de limpiar con gasa estéril el fondo del tubo.
- En caso de ser menor a 0,5 McFarland se procederá a tomar otra colonia y disolver hasta llegar a la escala indicada.
- En caso de ser mayor a 0,5 McFarland se procederá a agregar solución salina estéril al inóculo.
- Impregnar el hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.



 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 4/11</b></p>
---	--	---

- A continuación, se colocan los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría y colocar los discos de cefotaxime, ceftazidime, cefepime, cefoxitina y amoxicilina / ácido clavulánico; a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina-ácido clavulánico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa. En este sentido solo para *Proteus mirabilis* se recomienda una distancia de 40-45 mm.
  - Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C y se realiza la lectura dentro de las 16-20 horas siguientes.
  - Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.
- b) Discos combinados:**
- Preparar los materiales que se van a utilizar
  - Rotular el tubo de ensayo y la caja Petri con Agar Mueller – Hinton a utilizar
  - Dispensar 3ml de solución salina en un tubo de ensayo
  - Tomar con un hisopo estéril una colonia del cultivo y suspenderla en solución salina.
  - Medir en el densitómetro la turbidez del inóculo, que debe ser equivalente a 0,5 en la escala McFarland, tener precaución de limpiar con gasa estéril el fondo del tubo
  - En caso de ser menor a 0,5 McFarland se procederá a tomar otra colonia y disolver hasta llegar a la escala indicada.
  - En caso de ser mayor a 0,5 McFarland se procederá a agregar solución salina al inóculo.
  - Impregnar el hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
  - A continuación, se colocan los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría y colocar los discos de Ceftazidime 30 ug, Ceftazidime + Ác.Clavulánico 30/10 ug, Cefotaxime, Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug.

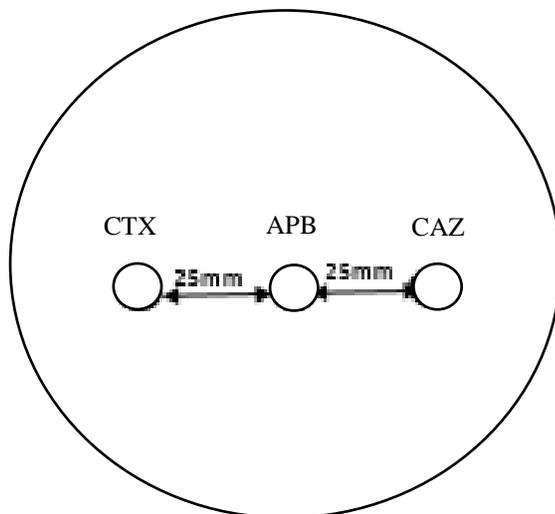


 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 5/11</b></p>
---	--	---

- Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C +/- 2°C y se realiza la lectura dentro de las 10 a 18 horas.
- Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.

### AMP-C

- Rotular con el número de muestra un tubo con 3 ml de suero fisiológico o agua destilada estéril por cada cepa en cultivo puro al que se le vaya a realizar la determinación.
- Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de suero fisiológico con una colonia del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 MacFarland, ajustar si es necesario.
- Impregnar un hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.



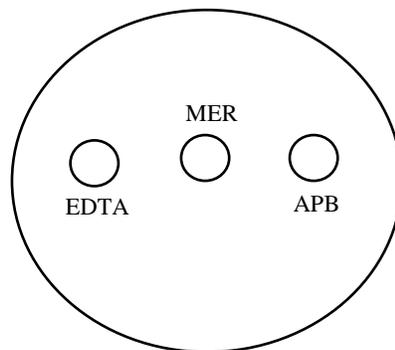
- Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías situar un disco con cefotaxima y un disco con ceftazidima a una distancia de 20 - 25 mm (centro a centro) de un disco con cloxacilina y ácido borónico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.
- Incubar de 35-37°C durante 16-20 horas (Ardanuy, Cercenado, Morosini, & Torres, 2011).

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 6/11</b></p>
---	--	---

## CARBAPENEMASAS

### a) Método de sinergia de doble disco:

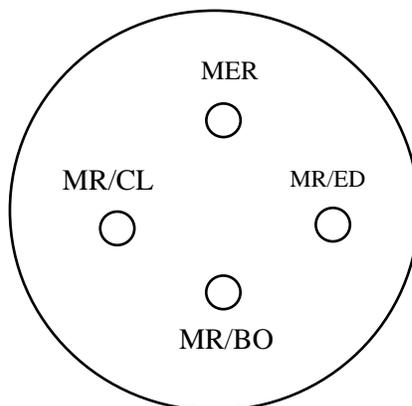
- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con Muller-Hinton.
- Tomar con un hisopo estéril de 2 a 3 colonias de un cultivo puro de la muestra problema.
- Transferir las colonias al tubo de ensayo que contiene la solución salina estéril y suspender las colonias en esta solución
- Ajustar la turbidez de la suspensión en el densitómetro al 0,5 McFarland.
- Sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, elimine el exceso de líquido presionando firmemente contra las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido.
- Inocular antes de 15 minutos después de haber ajustado la suspensión.
- Tomar la caja de Petri por la base e inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril.
- Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo.
- Finalmente, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.
- Dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos.
- Esterilizar una pinza a la llama de la lámpara de alcohol.
- Tomar con la pinza estéril el disco de meropenem y colocarlo en la superficie del agar ya inoculado.
- Nuevamente se esteriliza la pinza y se toma un disco con inhibidor EDTA y se lo coloca a una distancia de 1 o 2 cm (margen a margen) del disco de meropenem.
- Repetir la esterilización de la pinza y realizar el mismo proceso para colocar el disco con inhibidor que contiene ácido fenilborónico.
- Incubar a temperatura de  $35 \pm 2$  °C, durante 16-20 horas. Realizar el protocolo con las cepas control positivo y negativo.



 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 7/11</b></p>
---	--	---

**b) Método de discos combinados con inhibidor**

- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con Muller-Hinton.
- Tomar con un hisopo estéril de 2 a 3 colonias de un cultivo puro de la muestra problema.
- Transferir las colonias al tubo de ensayo que contiene la solución salina estéril y suspender las colonias en esta solución
- Ajustar la turbidez de la suspensión en el densitómetro al 0,5 McFarland.
- Sumergir un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, elimine el exceso de líquido presionando firmemente contra las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido.
- Inocular antes de 15 minutos después de haber ajustado la suspensión.
- Tomar la caja de Petri por la base e inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril.
- Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo.
- Finalmente, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.
- Dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos.
- Esterilizar una pinza a la llama de la lámpara de alcohol.
- Tomar con la pinza estéril el disco de meropenem y colocarlo en la superficie del agar ya inoculado.
- Repetir la esterilización de la pinza y se toma un disco de meropenem/cloxacilina, meropenem/ácido fenilborónico y meropenem/EDTA
- Incubar a temperatura de  $35 \pm 2$  °C, durante 16-20 horas.



 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 8/11</b></p>
---	--	---

## 7. Interpretación

### Interpretación de resultados para BLEE

- a) **Sinergia de Discos:** Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:
- **Negativo.** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, O cefepime ni presencia de "zona fantasma".
  - **Positivo.** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas y el inhibidor. Usualmente el halo se deforma adquiriendo formas ovaladas o con cola de pescado.
- b) **Discos combinados:**
- Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completas (incluyendo el diámetro del disco). Los resultados se interpretan de la siguiente manera:
- **Positivo.** Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime o cefotaxime en presencia de ácido clavulánico  $\geq 5$  mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico.
  - **Negativo.** No incremento o diferencia  $< 5$  mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con ácido clavulánico respecto a los de las cefalosporinas correspondientes sin ácido clavulánico.

### Interpretación de resultados para AMP-C

- a) **Prueba de sinergia de doble discos:** examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición.
- **Positivo:** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en la zona próxima al disco con ácido borónico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas y el inhibidor. El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpC.
  - **Negativo:** No ampliación de los halos de inhibición de las cefalosporinas ni presencia de "zona fantasma".

### Interpretación de resultados para Carbapenemasas

- a) **Prueba de sinergia de doble disco:**
- **Positivo:** ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre el carbapenémico y el inhibidor.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 9/11</b></p>
---	--	---

- **Negativo:** No ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de “zona fantasma”.

<b>Resultado</b>	<b>Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia</b>
Sinergia carbapenémico-ácido borónico	<b>Carbapenemasa de Clase A Serincarbapenemas:</b> KPC, SME, NMC-A, IMI, PER, GES, SFO, SFC, IB y/o <b>Hiperproducción de AmpC</b>
Sinergia carbapenémico-ácido dipicolínico o Sinergia carbapenémico-EDTA	<b>Carbapenemasa de Clase B</b> <b>Metalo β-lactamasas:</b> VIM, GIM, SIM, NDM, IMP y SPM.

#### **Reporte de resultados:**

- **SME/NMC:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (1ra y 2da generación) y carbapenemes independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): amoxicilina/clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, y monobactames (demostrar ausencia de BLEE asociada) y agentes no betalactámicos.
- **KPC:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones), monobactames y carbapenemes independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): amoxicilina/clavulánico, piperacilina-tazobactam, y agentes no betalactámicos.
- **MBL:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones), monobactames y carbapenemes independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): monobactames, piperacilina-tazobactam, y agentes no betalactámicos.  
(**Nota.** Para todos las carbapenemasas, se recomienda aislamiento del paciente.)

#### **b) Método de discos combinados con inhibidor:**

**Obtención y expresión de resultados:** Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) con un pie de rey. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- **Positivo:** Incremento  $\geq 5$  mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.
- **Negativo:** No hay diferencia o incremento  $< 5$  mm en el halo de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 10/11</b></p>
---	--	--

Los resultados positivos se interpretan según la tabla siguiente:

<b>Resultado</b>	<b>Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia</b>
CAR+BOR $\geq$ 5mm CAR y CAR+CLO < 5mm CAR	Carbapenemasa de Clase A: KPC, SME, NMC-A, IMI, PER, GES, SFO, SFC, IB
CAR+DPA $\geq$ 5mm CAR CAR+EDTA $\geq$ 5mm CAR	Carbapenemasa de Clase B: VIM, GIM, SIM, NDM, IMP y SPM.
CAR+BOR y CAR+CLO $\geq$ 5mm CAR	Hiperproducción de AmpC o Hiperproducción de AmpC + Carbapenemasa de Clase A

### 8. Observaciones:

- Para todas las cepas productoras de ESBL confirmadas; reportar el nombre de la bacteria más productora de BLEE; ya que se usan los puntos de corte actuales de cefalosporina y aztreonam; por lo tanto, la interpretación de la prueba debe informarse como resistente para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.
- Los métodos basados en la utilización de ácido borónico pueden presentar baja especificidad y pueden producirse resultados falsos positivos debido a la hiperproducción de enzimas de tipo AmpC ya que también es un inhibidor de estas enzimas. Adicionalmente, los métodos fenotípicos resultan inadecuados para la detección de las carbapenemasas tipo OXA.

### 9. Bibliografía:

- CLSI, C. a. (2018). Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 27<sup>a</sup> ed. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.
- Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M., & Torres, C. (2011). *Deteccion Fenotipica de Mecanismos de Resistencia en Gram Negativos* . Obtenido de <https://bit.ly/2NXxZqQ>
- SEIMC. (2015). *Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes*. Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <https://bit.ly/2DMGzI9>

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b></p> <p><i>Protocolo de confirmación de resistencia bacteriana: BLEE, Amp-C y Carbapenemasas.</i></p>	<p><b>Código: CRB</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 11/11</b></p>
---	--	--

- Bou, G., Chávez, F., Oliver, A., & Jesús, O. (2015). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Obtenido de <https://bit.ly/2CoioiH>

ELABORADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edgar Jara</li> <li>• Evelyn Atancuri</li> <li>• María Cisneros</li> <li>• Alex Ontaneda</li> <li>• Gina Barrionuevo</li> <li>• Stefany Torres</li> <li>• Diana Ramón</li> </ul>	<p>Lcda. Carmen Ullauri González, Mg. Sc.</p>



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

*Anexo 10*

 <b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b>	<b>Nombre del protocolo:</b> <i>Tratamiento y eliminación de residuos microbiológicos</i>	<b>Código: TERM</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 1/3</b>
--	--	--

**Tratamiento y eliminación de residuos microbiológicos**

**1. Introducción**

En el laboratorio se manejan gran cantidad de productos y se efectúan diversas operaciones que conllevan la generación de residuos ya sean de tipo químico o de riesgo biológico; en la mayoría de los casos peligrosos para la salud o para el medio ambiente. En los laboratorios de microbiología se acostumbra a trabajar con especímenes contaminados y cultivos; por lo tanto, la adecuada descripción de los procedimientos habituales que incluyen las medidas de precaución de bioseguridad universales deben considerarse fundamentalmente para la protección de los trabajadores dentro del laboratorio considerando toda muestra biológica como potencialmente infecciosa. Se deben tener precauciones especiales cuando se inoculen medios de cultivo o se realicen preparaciones para observación en el microscopio; y tenerse en consideración que las preparaciones que no han sido fijadas todavía pueden contener material potencialmente infeccioso (Merida & Moreno, 2014).

**2. Objetivo**

- Establecer el correcto procedimiento para eliminación del material contaminado en el área microbiológica.

**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:**

**Estudiantes:** elaboración del procedimiento.

**Docentes/investigadores:** validación del procedimiento.

**Colaboradores instituciones participantes:** aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

**5. Materiales:**

**Equipos**

- Autoclave

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Tratamiento y eliminación de residuos microbiológicos</i></p>	<p><b>Código: TERM</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 2/3</b></p>
---	--	---

### **Instrumentos**

- Botella plástica
- Cinta testigo
- Cinta aislante
- Pesa
- Fundas plásticas: rojas, negra
- Contenedores para desechos cortopunzantes, especiales, comunes e infecciosos.

### **Sustancias y reactivos**

- Hipoclorito de sodio al 1 %
- Agua destilada para autoclave

## **6. Procedimiento:**

### *Tratamiento de residuos biológicos*

Los residuos biológicos son aquellos que contienen o pueden contener agentes patógenos en concentraciones o cantidades suficientes para causar enfermedad a un huésped susceptible. En esta categoría se incluyen los siguientes residuos de cultivos y muestras almacenadas; estos residuos derivan de la producción de material biológico; placas de cultivo y mecanismos para transferir, inocular o mezclar cultivos; medios de cultivos; muestras almacenadas de agentes infecciosos y productos biológicos asociados (cepas control de agentes infecciosos).

Los residuos microbiológicos deben ser eliminados de forma tal que se asegure su descontaminación; se utiliza generalmente una autoclave para la eliminación de residuos microbiológicos (medios de cultivo). Todo tipo de medio de cultivo debe desactivarse ya sea por métodos de esterilización físicos o químicos. La eliminación de cepas y medios de cultivos se realiza mediante la eliminación de residuos sólidos previamente esterilizados en bolsa roja.

El lavado y esterilización de material en el caso de tubos de vidrio o material termo-resistentes en horno de esterilización o estufa.

Los residuos corto punzantes contaminados deben eliminarse en contenedores que sean rígidos o semirrígidos y resistentes al corte y la punción.

Deben utilizarse cajas de eliminación de material corto punzante contaminados. Las cajas selladas con la identificación de residuos biológico; deberán marcar el tipo de residuos que contendrá y la fecha.

Generalmente se agrega un desinfectante químico como el Hipoclorito de Na al 1% durante una hora para inactivación de posibles agentes bacterianos en el material residual.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b></p>	<p><b>Nombre del protocolo:</b> <i>Tratamiento y eliminación de residuos microbiológicos</i></p>	<p><b>Código: TERM</b> <b>Revisión: 1</b> <b>Edición: 1</b> <b>Fecha: 20/03/2018</b> <b>Página: 3/3</b></p>
---	--	---

## 7. Bibliografía

- Merida, J., & Moreno, E. (2014). Manual para técnico superior de Laboratorio Clínico y Biomédico.

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Katheryne Mihquero Masache.</li> </ul>	Lcda. Carmen Ullauri González, Mg. Sc.







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

*Anexo 13*

Loja, 09 de Julio del 2018

Dra. Sandra Freire

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

A petición verbal del interesado, CERTIFICO:

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

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

Atentamente.

Dra. Sandra Freire

Docente de la carrera de Laboratorio Clínico





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

*Anexo 14*

Loja, 09 de Julio del 2018

Ing. María Jiménez

**Responsable del Centro de Diagnóstico Médico de la UNL.**

A petición verbal del interesado, CERTIFICO:

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

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

Atentamente.

Ing. María Jiménez

Responsable del Centro de Diagnóstico Médico de la UNL.



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

*Anexo 15*



## THE CANADIAN HOUSE CENTER

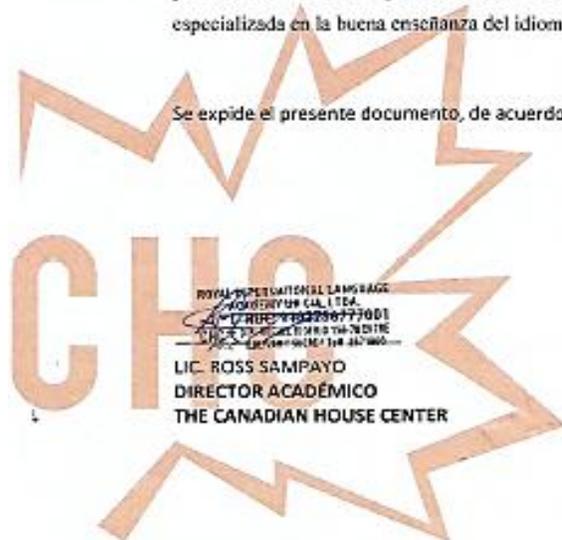
El que suscribe, en representación del THE CANADIAN HOUSE CENTER con RUC N° 1191756777001, el cual está aprobado por el Ministerio de Educación del Ecuador según resolución ministerial N° 320 – 15 y con registro N° SETEC-OCR-00001757 de la Secretaría Técnica del Sistema Nacional de Cualificaciones Profesionales.

**CERTIFICA.-**

Que el resumen de tesis titulada “SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTE DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLINICO DE MEDILAB”, realizado por la Srta. MIHIQUERO MASACHE KATHIERYNE DANIELA, con número de cédula, 1105752909, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA, ha sido debidamente traducido por el Lic. Ross Sampayo, Director Académico de nuestra prestigiosa entidad especializada en la buena enseñanza del idioma inglés.

Se expide el presente documento, de acuerdo a la ley, para los fines necesarios.

Loja, 14 de Septiembre del 2018

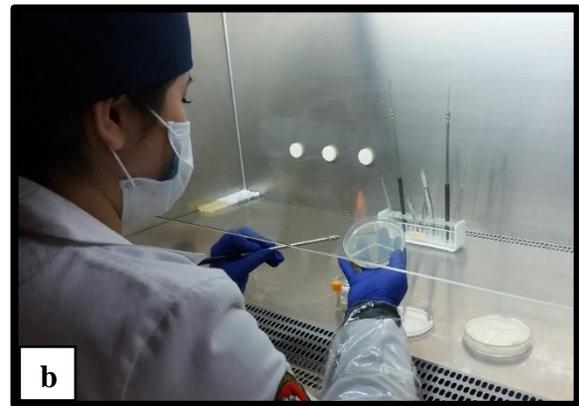


*Anexo 16*

**EVIDENCIA FOTOGRAFICA**



**a.** Materiales para el procesamiento de muestras de urocultivos positivos  
(Discos antibióticos, asas de siembra, tubos con solución salina estéril, lámpara de alcohol, cepas control, muestras de urocultivos, agar Mueller Hinton)



**b.** Siembra de cepas control.



**c.** Esterilización de la pinza metálica y elección de discos de sensibilidad utilizados en el antibiograma.



**d.** Realización de antibiograma, colocación de los discos de sensibilidad en la placa de agar Mueller Hinton.

## CEPAS CONTROL

**MEDIBAC - INC.S.A.**  
 MATRIZ: Quito - Enrique Ortega Moreno (Av. Las Aguas) 1111  
 1105704165  
 Teléfono: (05) 226 1414 / 226 8997 - 226 1487  
 Celular: (05) 8574 8292  
 BUCURRAL: MANUFACTURERA OLIVAGUAIL  
 Victor Emilio Domínguez # 9118 d Ramas 15 (Riata Central)  
 Tel: 041 84020 403776-402289-401228  
 BUCURRAL QUITO  
 Av. Francisco de O. Calderón 104 309 d. Vía Central  
 Cumbuco Rosero, Pluma Brava, Oficinas 4 y 5  
 Teléfono: (02) 226 1474 / 246 6316  
 BUCURRAL POR TOYOTEJO  
 Cda. La Virgen c/da. Finca Cumbuco #. Barrio Alto y Manuel Andrade,  
 Písa 1. Tel: (05) 226 5192 Celular: 099 5893 3213

R.U.C. 0992401494001  
**FACTURA**  
 001-001- 000053616  
 Autorización S.R.L. 1121363800  
 FECHA DE AUTORIZACIÓN: 1º SEPTIEMBRE 2017

CLIENTE: CELLY CAMPOVERDE TAYRON ALBERTO  
 Dirección: SECTOR CELI-ROMAN, BENJAMIN PEREIRA Y ALFREDO  
 R.U.C. / C.C.: 1105704165 Asesor Comercial: VICTOR V  
 Teléfono: 2584366 Fecha de Emisión: 31/10/2017  
 Fecha de Remisión: 01/11/2017  
 Orden de Compra: Orden de Pedido: 19.648

CANT.	CÓDIGO	MARCA	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1	9335P-S		E. COLI ATCC 25922 (DUOPACK)	135,00	135,00
1	91809P-S		K. PNEUMONIAE ATCC BAA-1796	165,00	165,00
1	91803P-S		K. PNEUMONIAE ATCC BAA-1795	165,00	165,00
1	9704P-S		K. PNEUMONIAE ATCC 700603	145,00	145,00

FORMA DE PAGO: OTROS 693,20 SUMAN \$ 610,00  
 Descuentos Ochenta y Tres y 20 / 100 Dólares Americano Dólares  
 DESCUENTO BASE 0 0,00  
 BASE 610,00

d. Factura de cepas control



e. Cepas control: control positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) y control negativo (*E. coli* ATCC 25922)



f. Alícuotas de cepas control



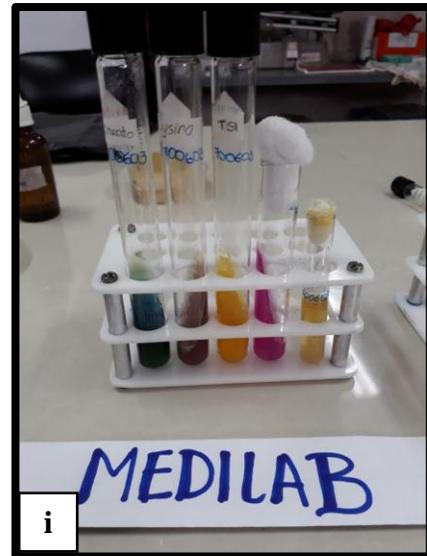
g. Alícuotas de cepas control, cada vial con identificación de la cepa control y fecha de recuperación.

**Control positivo: *Klebsiella pneumoniae* 700603**



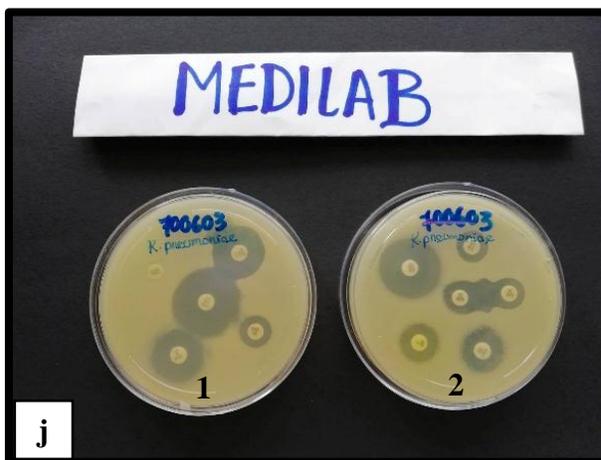
h

h. Crecimiento de colonias: En agar Mueller Hinton (colonias mucoides, medianas e irregulares), MacConkey (lactosa positiva) y EMB (reacción negativa).



i

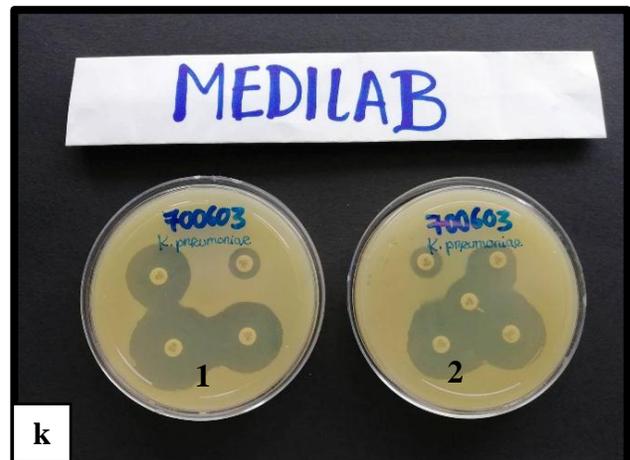
i. Pruebas bioquímicas: Observamos en las pruebas bioquímicas el citrato, lisina y urea positivos, TSI K/K, indol y motilidad negativa.



j

j. Antibiograma:

1. Se observa la sensibilidad al antibiótico imipenem; resistencia intermedia a: ciprofloxacina, SDD en cefepime y resistencia a: cefazolina y cefoxitin
2. Se observa la sensibilidad del disco de amikacina, además presenta una sinergia entre los discos ampicilina/sulbactam y ceftazidime.



k

k. Confirmación de BLEE:

1. En la placa del lado izquierdo se observa la diferencia entre halos de discos combinados y solos de CAZ y CTX.
2. En la placa del lado derecho se observa la sinergia de discos de antibióticos positivo para BLEE.

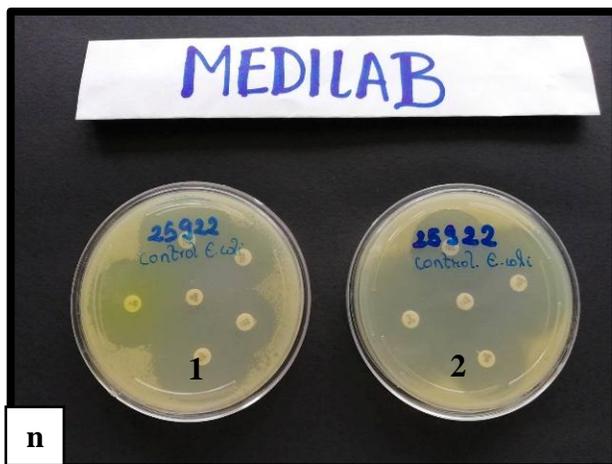
**Control negativo: *E. coli* 25922**



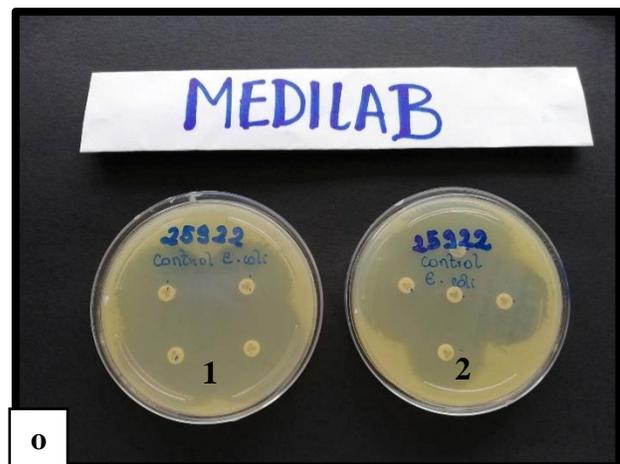
l. Crecimiento de colonias: En agar Mueller Hinton (colonias cremosas, pequeñas y regulares), MacConkey (lactosa positiva) y EMB (reacción positiva brillo metálico).



m. Pruebas bioquímicas: Observamos en las pruebas bioquímicas el citrato y urea negativo, lisina positiva, TSI A/A, indol positivo y motilidad positiva.

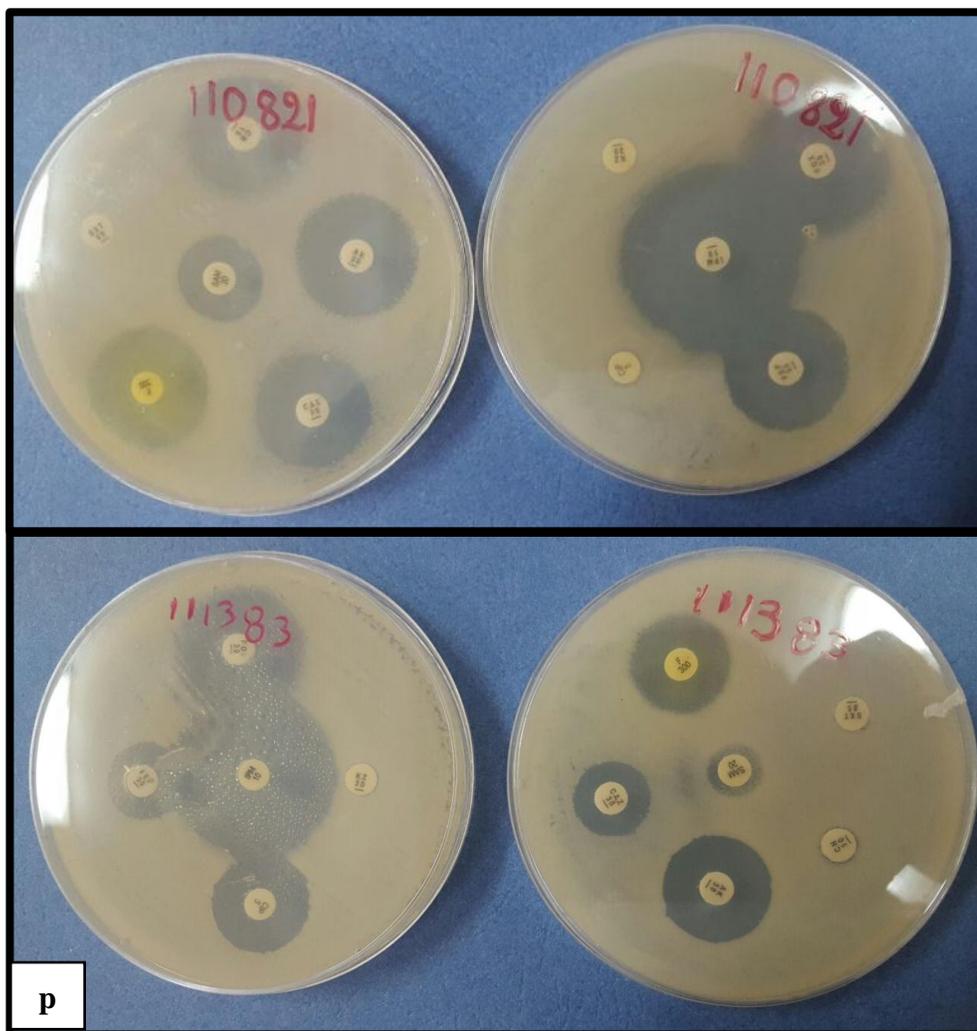


n. Antibiograma: en las placas 1 y 2 se observa la sensibilidad a todos los antibióticos empleados (cepa multisensible)



o. Confirmación de BLEE:

1. En la placa del lado izquierdo se observa sensibilidad en los discos solos y combinados de CAZ y CTX.
2. En la placa del lado derecho se observa la sinergia de discos de antibióticos negativa para BLEE.



p. Antibiogramas de muestras de urocultivos positivos de los usuarios que acudieron al Laboratorio Clínico de MEDILAB-Loja