



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO:

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA FRENTE A *Escherichia coli* AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro. 7 DE LA CIUDAD DE LOJA DURANTE EL PERÍODO MARZO-JULIO DEL 2015

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

AUTORA:

Irene del Rocío Suquilanda Espinosa

DIRECTORA:

Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg.Sc.

Loja – Ecuador

2016

CERTIFICACIÓN

Doctora

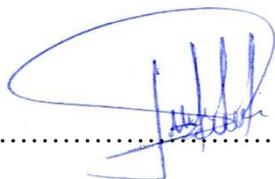
Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg.Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo previo a la obtención de Título de Licenciada en Laboratorio Clínico titulado: **“CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA FRENTE A *Escherichia coli* AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro. 7 DE LA CIUDAD DE LOJA DURANTE EL PERÍODO MARZO-JULIO DEL 2015”** elaborado por la postulante Irene del Rocío Suquilanda Espinosa, ha sido realizado bajo mi dirección por lo que se aprueba el mismo, pudiendo ser sometido a presentación pública y evaluación por parte del jurado calificador que se designe.

Loja, 16 de junio de 2016



Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo Irene del Rocío Suquilanda Espinosa, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Concentración mínima inhibitoria de ampicilina frente a *Escherichia coli* aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la Ciudad de Loja durante el período marzo-julio del 2015**; 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 de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Irene del Rocío Suquilanda Espinosa

Firma: .....

Cédula: 0705634632

Fecha: 01/12/2016

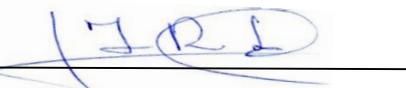
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

Yo Irene del Rocío Suquilanda Espinosa, declaro ser autora de tesis titulada “CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA FRENTE A *Escherichia coli* AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro. 7 DE LA CIUDAD DE LOJA DURANTE EL PERÍODO MARZO-JULIO DEL 2015” como requisito para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico: autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja la producción para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, el 01 de diciembre de 2016:

- Firma: 
- Autora: Irene del Rocío Suquilanda Espinosa
- Cedula: 0705634632
- Correo Electrónico: irse24@gmail.com
- Dirección: Loja- Ecuador
- Teléfono: 0980661133
- Datos complementarios:
- Directora de tesis: Dra. Paola Mercedes Benítez Castrillón, Mg. Sc.
- Tribunal de Grado: **-Presidenta:** Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg.Sc.
 - **Vocal:** Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Mg.Sc.
 - **Vocal:** Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta, Mg.Sc.

DEDICATORIA

Dedico este triunfo a mis padres que siempre han sido un apoyo incondicional y por siempre alentarme a seguir adelante a pesar de los tropiezos y caídas siempre estuvieron ahí brindándome su comprensión y sobretodo amor. A Jacinto Suquilanda, por todo el apoyo brindado y por las experiencias que me ha sabido impartir de su día a día y por siempre ser un hombre tan correcto y para mí un ejemplo a seguir; papito querido, estaré siguiendo siempre tus pasos; María Espinosa, quien siempre ha estado junto a mí con todo el amor del mundo con su cariño y atenciones desde que me llevó en su vientre y por estar hasta el día de hoy pendiente de mí alentándome en mis caídas y en mis triunfos. A ambos por el apoyo incondicional que me dieron a lo largo de la carrera y a lo largo de mi vida.

A mi querido esposo el Ing. Henry Campoverde, gracias por todo el apoyo que me has brindado y por siempre darme la mano y ayudarme cuando estaba desanimada y por compartir tu vida conmigo.

A mi pequeña hija Adriana Renata, por ser la razón que me impulsa a seguir adelante ya que con tus tiernas palabras y caricias siempre me has hecho volver a sonreír, te amo mi niña.

A mis queridos hermanos Noemí, Daniel, Mariana y Andrea para ustedes también va dedicado este triunfo por estar siempre a mi lado.

Y a todos mis compañeros y amigos por los buenos momentos vividos en las aulas y por estar siempre a mi lado y por regalarme siempre los mejores momentos de esta hermosa etapa universitaria.

Irene del Rocío Suquilanda Espinosa

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios, por darme la fuerza y la fe para creer en lo que yo podía alcanzar, pero ante todo agradezco por poner siempre a las personas indicadas en mi vida y que han aportado con un granito de arena para este logro.

A la Universidad Nacional de Loja especialmente al Área de la Salud Humana, que mediante sus autoridades y docentes me brindaron una sólida formación académica, aportando con ello conocimientos científicos, éticos y morales.

A la Dra. Paola Benítez, Directora de Tesis quien, durante todo este tiempo, me ha brindado su apoyo, guía y conocimientos, aportando significativamente en el presente trabajo, formando en mí una persona de bien y preparada profesionalmente para afrontar con buenos recursos mi vida profesional.

A el Dr. Luis Morocho por el apoyo incondicional que me ha brindado en todo el proceso del presente trabajo, por sus conocimientos brindados y sobre todo por su paciencia y su tiempo, mil gracias a usted.

A la Lic. Carmen Ullauri por aportar elocuentemente en el presente trabajo de titulación gracias por su acogida y asesoramiento, su apoyo en el presente trabajo fue de vital importancia.

Irene del Rocío Suquilanda Espinosa

a. TÍTULO

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA FRENTE A *Escherichia coli* AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro. 7 DE LA CIUDAD DE LOJA DURANTE EL PERÍODO MARZO-JULIO DEL 2015

b. RESUMEN

Las infecciones de vías urinarias (IVU) son un problema notable a nivel mundial, tanto por afectar a la salud de la población como a la economía de la misma; uno de los aspectos más preocupantes y que van conjuntamente con IVU es el desarrollo de las resistencias bacterianas a los antibióticos, en este caso a *Escherichia coli* que es el principal agente etiológico aislado constantemente de un 70 a 90 % en los laboratorios clínicos, debido a estos antecedentes se realizó el presente estudio con el propósito de evaluar la resistencia de *Escherichia coli* frente a ampicilina el cual fue empleado en pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja; se realizó un estudio de tipo descriptivo y de corte transversal, en el que se procesó un total de 106 urocultivos de los cuales 50 resultaron positivos pues tuvieron un crecimiento mayor a 100.000 UFC/ml, y de estos 34 cepas fueron positivas para *E coli* (68%); *Klebsiella pneumoniae* (12%); *Pseudomona aeruginosa* (8%); *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca* con un (4%). Todas las cepas fueron aisladas e identificadas y procesadas según los protocolos ya establecidos. Se realizó las pruebas de susceptibilidad por el método de macrodilución por triplicado; para cada muestra se utilizó control positivo y negativo; como referencia de este estudio se utilizó una cepa control ATCC 25922 para asegurar la calidad de los resultados en cuanto a la identificación de *E.coli*; además de la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).

Tomando como referencia el manual de la CLSI se concluyó que la resistencia de ampicilina frente a *E. Coli* fue del 100%.

Palabras clave: *Escherichia coli*, infección de vías urinarias, ampicilina, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida.

SUMMARY

The urinary tract infections (UTIs) are a notable global problem, because they affect the health of the population and the economy of the population; One of the most worrying aspects that go together with IVU is the development of bacterial resistance to antibiotics, in this case *Escherichia coli*, which is the main etiological agent constantly isolated from 70 to 90% in clinical laboratories, due to these antecedents were carried out in the present study with the purpose of evaluating the resistance of *Escherichia coli* to ampicillin, which was used in outpatient patients of the Military Hospital Brigade No. 7 of the city of Loja; A descriptive and cross-sectional study was carried out, in which a total of 106 urocultures were processed, of which 50 were positive because they had a growth rate greater than 100,000 CFU / ml and of these 34 strains were positive for *E. coli* (68%); *Klebsiella pneumoniae* (12%); *Pseudomonas aeruginosa* (8%); *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca* with a (4%). All strains were isolated and identified and processed according to established protocols. Susceptibility tests were performed by the triplicate macrodilution method; positive and negative controls were used for each sample; As reference of this study a control strain ATCC 25922 was used to assure the quality of the results regarding the identification of *E. coli*; In addition to the determination of the minimum bactericidal concentration (CMB).

Taking the CLSI manual as a reference, it was concluded that the resistance of ampicillin to *E. coli* was 100%.

Key words: *Escherichia coli*, urinary tract infection, ampicillin, minimal inhibitory concentration, minimal bactericidal concentration.

c. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de vías urinarias suponen, una de las principales y más prevalentes enfermedades infecciosas y con una carga económica evidente para la sociedad, ya que afectan tanto a niños como adultos; en niños es un problema de salud frecuente, en embarazadas los riesgos perinatales sugieren una atención especial; todo debido a la ausencia de nuevas moléculas antimicrobianas y el incremento de resistencia bacteriana favorecida por el uso indiscriminado de antibióticos (Calderón-Jaimes, 2013);(Salas del C et al., 2012)(Merentes, Rizzi, Papartzikos, Rivero, & Oranges, 2012)

Aproximadamente 95% de las infecciones del tracto urinario son causadas por *Escherichia coli* la cual a su vez causa entre el 75 y el 90% de cistitis aguda no complicada, los microorganismos restantes que causan ITU son: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa* (González Monte, 2013)

La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que se moviliza a través de flagelos peritricos, no forma esporas y es capaz de fermentar glucosa y lactosa, además es la bacteria más frecuente encontrada en la materia fecal de los humanos y también de animales; su hábitat natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora normal intestinal sin causar daño, además de ser la especie predominante de la flora anaeróbica facultativa del colon humano. Las cepas patogénicas de esta bacteria pueden presentar cuatro cuadros clínicos principales: infecciones de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2011)

Escherichia coli es la causante de la mayoría de las infecciones de tracto urinario cuya patología es una de las más frecuente tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario, y es más incidente en las mujeres que en los hombres, en Ecuador según el INEC (Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social) se indica que en el 2011 las infecciones de vías urinarias representan notablemente un problema de salud pública con una ubicación en séptimo puesto, una tasa de 10.87 % en las mujeres con relación a las diez principales causas de morbi-mortalidad (Gonzalo & Alcívar, 2011).

Por su parte, la resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural, de modo que cada vez que se pone en uso un nuevo agente antimicrobiano (AAM) en la práctica clínica, el laboratorio de microbiología detecta cepas resistentes. Una cepa resistente se define como aquella que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas con dosis

terapéuticas. La resistencia a los antimicrobianos es un problema notable en la actualidad; la sensibilidad de un determinado microorganismo frente a un antibiótico puede ser determinado de modo cualitativo indicando de cierto modo su rango de susceptibilidad (sensible, intermedio o resistente); pero también puede determinarse de modo cuantitativo y esto se lo hace determinando el valor de la concentración inhibitoria mínima(CIM),la cual es la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo después de un tiempo de incubación que generalmente es de 24 horas. Este también se lo ha establecido como un método de referencia; es decir la prueba considerada como la mejor alternativa diagnóstica existente para determinar una enfermedad o evento de interés en este caso frente a diversos métodos que evalúan la sensibilidad antimicrobiana, y además se puede confirmar resistencias que pueden ser inusuales por otros métodos (Prats, 2006)

Para el tratamiento de este microorganismo son varios los antibióticos utilizados y también las técnicas para determinar la susceptibilidad de los mismos; pero en el presente estudio se determinó la concentración inhibitoria mínima de ampicilina mediante método de macrodilución. La ampicilina posee un amplio espectro con acción bactericida frente a gérmenes Gram negativos entre ellos *E. Coli* y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana (Koneman et al., 2008)

Por todo lo antes mencionado y considerando *E. Coli* es la causa más frecuente de infección urinaria en el medio extrahospitalario y hospitalario, y al ser un microorganismo que es capaz de desarrollar resistencia a los antibióticos que son utilizados en la práctica de laboratorio (Calderón-Jaimes, 2013) se realizó el presente estudio titulado **“CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA FRENTE A *Escherichia coli* AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro. 7 DE LA CIUDAD DE LOJA DURANTE EL PERÍODO MARZO-JULIO DEL 2015”** con el principal propósito de determinar el perfil de sensibilidad a ampicilina en aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos realizados a pacientes de consulta externa y además de corroborar la resistencia que presenta este antibiótico, que de acuerdo a múltiples estudios revisados es muy alta (Merentes et al., 2012)

El total de la población analizada fue de 106 urocultivos de los cuales 50 urocultivos resultaron positivos; todas las cepas, fueron aisladas e identificadas según las normas

convencionales del laboratorio en el que se procesaron, teniendo como principal microorganismo identificado a *Escherichia coli* con 34 cepas que corresponde al 68%.

Los resultados evidenciaron una resistencia al 100%, los datos obtenidos en el presente trabajo fueron debidamente socializados al personal de salud del Hospital Militar para con ello promover una administración adecuada de los antibióticos.

d. REVISIÓN DE LITERATURA

d.1. INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS

Se considera como infección del trato urinario a la presencia de microorganismo patógenos que puedan estar presentes con o sin síntomas, de ahí que las de origen bacteriano son las más frecuentes (Koneman et al., 2008);(Grabe et al., 2010).

d.1.1. Tipos

- **Infecciones del tracto urinario superior:** generalmente se originan en la vejiga y ascienden a través de los uréteres hasta los riñones, las infecciones de la pelvis renal (pielicitis) y del riñón (pielonefritis) son generalmente las complicaciones más frecuentes las cuales pueden ser agudas o recurrentes con daño con daño inflamatorio crónico de uno o ambos riñones (Koneman et al., 2008)
- **Infecciones del tracto urinario inferior:** comprenden la cistitis (infección de la vejiga) y también la uretritis (infección de la uretra). Esta es más frecuente en mujeres que en hombres (Koneman et al., 2008); (Grabe et al., 2010)

d.1.2. Agente etiológico

La invasión del aparato urinario sano está restringida a un grupo de microorganismos, conocidos como uropatógenos que son capaces de sobrepasar los mecanismos de defensa del huésped.

Los microorganismos que se aíslan de orina van a variar según las circunstancias del paciente y sus enfermedades de base. La etiología de las ITU se ve modificada por factores como la edad, la diabetes, la obstrucción del tracto urinario, las lesiones de médula espinal o la cateterización urinaria (Pigrau, 2013)

Más del 95% de las ITU están causadas por una única especie bacteriana *Escherichia coli* que causa entre el 75-95% de los episodios de cistitis aguda no complicada. *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* y enterococos son responsables de la gran mayoría de los episodios restantes. Los uropatógenos en la gran mayoría de las veces vienen de la propia microbiota intestinal (Pigrau, 2013)

En pielonefritis no complicada, los agentes etiológicos son similares a los que causan cistitis no complicada y también es similar su patrón de resistencia a los antibióticos. En más

del 80% de los casos de pielonefritis aguda el agente causal es *Escherichia coli* (Koneman et al., 2008)

d.1.3. Signos y síntomas

Entre las principales manifestaciones clínicas de las IVU altas tenemos: fiebre acompañada con escalofríos, este tipo de infección comparte algunos de los síntomas de las IVU bajas, así como también la disuria, la frecuencia de la micción e infección de la vejiga y uretra (Koneman et al., 2008)

Las IVU bajas por lo general comprometen a la vejiga o uretra y las manifestaciones clínicas usuales son la micción frecuente y sin dolor de pequeñas cantidades de orina turbia y malestar o dolor suprapúbico. En la mujer generalmente la vaginitis y en el varón la prostatitis pueden causar síntomas similares (Koneman et al., 2008)

d.1.4. Factores que predisponen al huésped

Las IVU varían con la edad y con el género del paciente y entre otras causas sobresalen las siguientes:

- **Edad:** es mayor la prevalencia en recién nacidos asociándose con mal formaciones congénitas y en adultos mayores en los cuales existen condiciones predisponentes como: uropatías obstructivas en la próstata, escaso vaciamiento de la vejiga por prolapso uterino, demencia, además de procedimiento que requieren instrumentación tanto en hombres como en mujeres (Koneman et al., 2008); (Brooks et al., 2011)
- **Sexo:** en los recién nacidos y en los lactantes es más común en los varones con una prevalencia global del 1%, en los niños en la edad escolar hay una mayor prevalencia en la mujeres relación que permanece constante hasta la adultez (Grabe et al., 2010)
- **Actividad sexual:** La mujer es más propensa a la colonización bacteriana debido a la proximidad que tienen el ano con la vagina y además a la longitud más corta que tiene la uretra con relación al hombre (Brooks et al., 2011)
- **Pacientes cateterizados:** un catéter urinario representa un cuerpo extraño y garantiza la colonización de bacterias a los cinco días de su colocación, lo cual puede ser un problema de forma crónica (Koneman et al., 2008).

Además de estos tenemos otros factores asociados a las infecciones de vías urinarias:

- Diabetes

- Incontinencia intestinal
- Cálculos renales
- Permanecer quieto (inmóvil) por un periodo largo de tiempo, por ejemplo, cuando se está recuperando de alguna fractura.
- Embarazo
- Cirugía u otro procedimiento que involucre las vías urinarias (Grabe et al., 2010)

d.2. ENTEROBACTERIAS

Son un grupo extenso de bacilos gramnegativos ya sean móviles con flagelos o no móviles y 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*, entre otros proliferan en medios aerobios y anaerobios, a menudo producen gas, son catalasa positivo, oxidasa negativa y reducen nitrito a nitrato (Brooks et al., 2011)

d.2.1. Escherichia coli

La *Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo, bacteria común que se encuentra en los intestinos de los animales y las personas y es la causa más frecuente de infección de vías urinarias y contribuye casi al 90% de las infecciones urinarias en mujeres jóvenes (Brooks et al., 2011)

d.2.1.1. Clasificación científica

Reino: Bacteria

Filo: Proteo bacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *E. coli* (Rivas, Deza, & Leotta, 2010)

d.2.1.2. Características morfológicas y tintoriales

- Es un bacilo gramnegativo
- No forma esporas

- Se moviliza a través de flagelos peritricos
- Mide de 0.5 micras de ancho por 3 micras de largo
- Catalasa positivos
- Oxidasa negativos
- Reducen nitritos a nitratos
- Producen vitamina B y K (Brooks et al., 2011);(Rivas et al., 2010).

d.2.1.3. Características nutricionales

- No es exigente
- Fermenta glucosa y lactosa con producción de gas
- Es un anaerobio facultativo (Rivas et al., 2010)

d.2.1.4. Características de las colonias

Las colonias de *E. Coli* en agar E.M.B. (eosina y azul de metileno) tienen de 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja.

- En agar MacConkey las colonias son rojas con halo turbio (Rivas et al., 2010)

d.2.1.5. Estructura antigénica

- Antígeno capsular (antígeno “K”)
- Antígeno somático (antígeno “O”)
- Antígeno flagelar (antígeno “H”)
- Antígenos menores como proteínas de membrana externa y fimbrias (Rivas et al., 2010)

d.2.1.6. Clasificación general:

- Se distinguen seis cepas según su poder patógeno, también se les puede llamar virotipos:

d.2.1.6.1. *Escherichia coli* entero patógena (ECEP)

Es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vías de desarrollo, e interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión

histopatológica característica conocida como adherencia o destrucción (Koneman et al., 2008)

d.2.1.6.2. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)

Se parece mucho a *V. cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se ven afectados (Koneman et al., 2008)

d.2.1.6.3. *Escherichia coli* entero invasiva (ECEI)

Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Es una de las *E. coli* que causa más daño debido a la invasión que produce en el epitelio intestinal (Koneman et al., 2008)

d.2.1.6.4. *Escherichia coli* entero hemorrágica o verotoxigénica (ECEH)

La convención internacional de nomenclatura de patógenos ha recomendado el uso de STEC (Shiga Toxin *Escherichia coli*) para este grupo, Esta cepa no fermenta el sorbitol y posee un fago, donde se encuentran codificadas las viro toxinas, también llamadas “Toxinas Shiga”, no posee una fimbria formadora de mechones, en vez de esto posee una fimbria polar larga que usa para adherencia (Koneman et al., 2008)

d.2.1.6.5. *Escherichia coli* entero agregativa (ECEA)

Los estudios realizados sobre la capacidad adherente de la *Escherichia coli* a células heterohaploides (HEp-2) muestran que, además de la adherencia localizada, existen otros dos mecanismos: uno llamado difuso, que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular, y otro agregativo, que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación.

La capacidad de las cepas de *Escherichia coli* entero agregativa (ECEAgg) para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiera explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas (Koneman et al., 2008)

d.2.1.6.6. *Escherichia coli* adherencia difusa (ECAD)

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos (Koneman et al., 2008)

d.3. RESISTENCIAS BACTERIANAS

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos.

Desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles. Los conceptos de sensibilidad y resistencia son absolutamente relativos y dependen tanto del valor de la localización de la infección como de la dosis y vías de administración del antibiótico (Fernández & López, 2009)(Salud, 2010)

d.3.1. Tipos de resistencia

Natural o intrínseca. Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos, los microorganismos que producen antibióticos son por definición resistentes. En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Fernández & López, 2009)

Adquirida. Constituye un problema en la clínica, se detectan pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles (Brooks et al., 2011)

La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extra cromosómico.

En el primer caso, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Brooks et al., 2011)

d.3.2. Mecanismo para resistir la acción de los antibióticos

d.3.2.1. Sistema de expulsión

Eliminación del antimicrobiano, a través de una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, antes de llegar al punto blanco (García et al., 2010) (Merentes et al., 2012)

d.3.2.2. Alteración de la permeabilidad

En las bacterias gramnegativas donde la membrana externa de la envoltura celular rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas. Existen algunas moléculas de antibióticos como penicilina y vancomicina, que por su tamaño son incapaces de pasar a través de las porinas de bacilos gramnegativos, disminuye el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico (García et al., 2010)

d.3.2.3. Liberación de enzimas de la bacteria.

Las betalactamasas gramnegativas son enzimas que hidrolizan los agentes antimicrobianos beta-lactámicos. Como resultado la célula es resistente a la acción de los medicamentos betalactámicos. En las bacterias gramnegativas los medicamentos beta lactámicos entran en la célula a través de las porinas y encuentran a las beta-lactamasas en el espacio periplásmico. Las betalactamasas destruyen las moléculas beta-lactámicas antes de que éstas tengan la oportunidad de alcanzar sus PBP blancos (Casellas, 2011).

d.3.2.4. Modificación del sitio blanco

Existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo. Destacaremos algunas como ser: modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico, como por ejemplo las alteraciones en las PBP de Streptococcus que confiere resistencia a penicilina. Las PBPs tanto en bacterias grampositivas y gramnegativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los beta-lactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto la célula es resistente a los agentes antimicrobianos (Merentes et al., 2012)

d.3.2.5. Mutación.

La resistencia cromosómica se desarrolla como resultado de una mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a un determinado agente antimicrobiano. La mutación espontánea ocurre con una frecuencia relativamente baja, pero cuando las bacterias son expuestas a los agentes antimicrobianos, solo las células mutantes sobreviven. Entonces éstas se multiplican y resultan en la aparición de una población resistente (García et al., 2010) (Merentes et al., 2012)

d.3.2.6. Conjugación

Cuando dos células bacterianas se encuentran cerca, una estructura similar a un puente conocida como pilus se puede formar entre ellas. Esto permite que una copia del plásmido se replique y transfiera de una célula a la otra. El resultado es una bacteria que expresa la resistencia antimicrobiana codificada en el plásmido (García et al., 2010)

d.3.2.7. Transformación.

Las bacterias podrían encontrar fragmentos desnudos de ADN que transportan genes de resistencia antimicrobiana. Estos fragmentos son introducidos en la célula mediante un proceso denominado transformación. El fragmento de ADN es incorporado en el cromosoma de la célula huésped por recombinación y la célula resultante es resistente (Merentes et al., 2012)

d.3.2.8. Transducción.

Cuando los virus bacterianos (bacteriófagos) se están multiplicando en el citoplasma de una bacteria, fragmentos de ADN de plásmidos o cromosomas podrían por casualidad

empacarse en una cápsula viral y entrar en otra célula huésped. Cuando los fragmentos contienen genes de resistencia a un agente antimicrobiano estos pueden traspasar la resistencia a la nueva célula huésped (Casellas, 2011)

d.3.2.9. Transposición.

Los transposones son secuencias genéticas especializadas “móviles” tienen la capacidad de moverse de un área del cromosoma bacteriano a otra o entre cromosomas y plásmidos o ADN de bacteriófagos. Los transposones de ADN pueden estar incorporados a plásmidos y de esa manera transportar genes de resistencia antimicrobiana. Algunos transposones son capaces de moverse de una bacteria a otra sin incorporarse a un cromosoma, un plásmido o un bacteriófago (García et al., 2010)

d.4. ANTIBIÓTICOS.

Es un compuesto químico producido por bacterias hongos o actinomicetos, capaz de inhibir el crecimiento o capaz de destruir a otros microorganismos. Los agentes antimicrobianos se comportan de diversas maneras: como bactericidas y como bacteriostáticos.

d.4.1. Bacteriostático

Inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse. El hecho de que un agente sea bactericida o bacteriostático depende de su mecanismo de acción y por tanto, de su estructura, pero también contribuyen otros factores:

- ❖ Concentración alcanzada en el sitio de la infección.
- ❖ Tipo de germen.
- ❖ Tiempo de acción
- ❖ Fase de crecimiento de la bacteria

d.4.2. Bactericidas.

Producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los antibióticos penicilinas, cefalosporinas aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, fosfomicina, quinolonas (Isaza, 2014)

d.4.3. Penicilinas

Las penicilinas son antibióticos naturales o semisintéticos, producidos por, o derivados de algunas especies del hongo *Penicillium*. Poseen en su estructura un anillo beta-lactámico que da nombre al grupo terapéutico y su núcleo, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) es común a todas ellas; del mismo se han derivado numerosos compuestos por adición de cadenas laterales (Moreno, 2010)

d.4.3.1. Mecanismo de acción

Las penicilinas son antibióticos bactericidas, esto es, no simplemente interrumpen la proliferación de las bacterias sino que las destruyen. Lo hacen interfiriendo con la actividad de las enzimas (por ejemplo transpeptidasa), la cual convierte las moléculas de glucopéptidos de la pared celular en monómeros estables.

Los organismos gramnegativos, que están envueltos en una fuerte capa lipopolisacárida, son menos dependientes que los grampositivos de la integridad de la molécula glucopéptida para resistir la lisis osmótica; correspondientemente, son menos susceptibles a la acción de las penicilinas que las bacterias grampositivas. Las cepas sensibles muestran diferentes grados de inhibición por los diferentes análogos de las penicilinas; las razones no son claras. Sin embargo, puede demostrarse una correlación con la solubilidad en lípidos del antibiótico en particular (Castillo, 2009), (Moreno, 2010).

d.4.3.2. Clasificación

Las penicilinas actualmente disponibles se pueden dividir en cuatro grandes grupos a partir principalmente a su espectro de actividad: penicilinas naturales, resistentes a penicilinasas, penicilinas de espectro ampliado y penicilinas asociadas a inhibidores de las betalactamasas.

d.4.3.2.1. Penicilinas naturales

- Penicilina G (bencil)
- Penicilina G procaína
- Penicilina G benzatina
- Penicilina V

d.4.3.2.2. Penicilinas resistentes a la penicilinasa

- Meticilina
- Nafcilina
- Cloxacilina
- Dicloxacilina
- Oxacilina

d.4.3.2.3. Penicilinas de espectro ampliado

d.4.3.2.3.1. De espectro medio: Aminopenicilinas:

- Ampicilina
- Amoxicilina
- Bacampicilina

d.4.3.2.3.2. De amplio espectro: Carboxipenicilinas:

- Carbenicilina
- Ticarcilina
- Ureidopenicilinas
- Mezlocilina
- Azlocilina
- Piperacilina

d.4.3.2.4. Penicilinas asociadas a inhibidores de las betalactamasas.

- Ampicilina-sulbactam
- Amoxicilina-ácido clavulánico
- Amoxicilina-sulbactam
- Ticarcilina-ácido clavulánico
- Piperacilina-tozabactam (Moreno, 2010)

d.4.4. Ampicilina

La ampicilina es una penicilina semisintética derivada del núcleo 6-aminopenicilánico, de acción bactericida, que actúa durante el período de multiplicación bacteriana, inhibiendo la biosíntesis del mucopéptido de la pared celular. Se absorbe un 80% administrada por vía intramuscular (Vademecum, 2011), (Moreno, 2010)

Las dosis usuales producen concentraciones terapéuticas en suero y diversos líquidos del organismo, que fundamentan su utilización en las indicaciones que se señalan. Penetra en el líquido cefalorraquídeo cuando las meninges están inflamadas. Se elimina por la orina y bilis en altas concentraciones, en forma biológicamente activa. Se une a las proteínas plasmáticas en un 20% (Vademecum, 2011)

Posee un amplio espectro de actividad antibacteriana frente a gérmenes gram-positivos y gram-negativos, habiéndose comprobado su actividad "in vitro" entre otros, frente a los microorganismos siguientes:

- Gram-positivos: *Streptococcus* sp, *Diplococcus pneumoniae* y *Staphylococcus* no productores de penicilinas.
- Gram-negativos: *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (Koneman et al., 2008)

d.4.4.1. Farmacocinética

La ampicilina se puede administrar oral y parenteralmente. Aproximadamente el 30-55% de la dosis se absorbe, una cantidad mucho menor que la de la amoxicilina. Las concentraciones máximas se obtienen a las 1-2 horas después de una dosis i.m. Los alimentos inhiben la absorción de la ampicilina, por lo que el antibiótico se debe administrar una hora antes o dos horas después de las comidas. La ampicilina se une a las proteínas del plasma en un 14-20%. Se distribuye ampliamente, encontrándose concentraciones bactericidas en hígado, pulmones, orina, próstata, vejiga, vesícula biliar, efusiones del oído medio, secreciones bronquiales, etc. Es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, obteniéndose concentraciones terapéuticas en líquido cefalorraquídeo cuando las meninges están inflamadas.

La ampicilina no cruza la barrera placentaria.

Aproximadamente el 10% de la dosis de ampicilina es metabolizada a productos inactivos que son eliminados sobre todo en la orina, conjuntamente con el antibiótico sin metabolizar. En los pacientes con la función renal normal, la semi-vida de eliminación es de 1-1.5 horas. En los pacientes con insuficiencia renal, las dosis de ampicilina deben ser reajustadas convenientemente.(Vademecum, 2011)

d.4.4.2. Farmacodinamia

La ampicilina es una penicilina semisintética de amplio espectro con acción bactericida que actúa a nivel de la pared celular de las bacterias. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de peptidoglicano de la pared bacteriana.

Esta inhibición depende de la habilidad de la penicilina de llegar y ligarse a las proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) localizadas en la membrana interna de la pared bacteriana. Las PBPs (que incluyen transpeptidasas, carboxilasas y endopeptidasas) son enzimas que están involucradas en los estadios finales del ensamblaje de la pared bacteriana y en el remodelamiento de ésta durante su crecimiento y división. Las penicilinas se ligan e inactivan las PBPs, resultando en un debilitamiento y lisis de la pared bacteriana (Koneman et al., 2008), (Moreno, 2010)

d.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Un diagnóstico de laboratorio oportuno y eficaz será un contribuyente esencial para el tratamiento de IVU para lo cual se debe hacer una recolección de la muestra de la manera más adecuada posible.

El aparato urinario normal no suele contener bacterias con excepción de la mucosa uretral que presenta microflora. La orina puede contaminarse fácilmente con bacterias del conducto vaginal y del perineo o con la flora bacteriana propia de la uretra (Koneman et al., 2008)

d.5.1. EMO.

Estudio elemental microscópico de orina (EMO). Esto se hace para observar células, cristales urinarios, moco y otras sustancias, al igual que para identificar cualquier tipo de bacterias u otros microorganismos que pudieran estar presentes, y que permita orientar la selección del medio de cultivo adecuado (Rivas et al., 2010)

d.5.2. Urocultivo

El urocultivo es imprescindible para el diagnóstico de IVU, en su interpretación es indispensable rescatar los falsos positivos y los falsos negativos para lograr un diagnóstico acertado. Los falsos positivos pueden encontrarse en orinas contaminadas con deposiciones o secreciones vaginales o por recolectores colocados por más de 30 o 40 minutos (Salas del C et al., 2012)

d.5.3. Tinción de GRAM.

Se utiliza tanto para referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana.

La tinción de Gram es usada para clasificar bacterias sobre la base de sus formas, tamaños, morfologías celulares y reacción Gram (color). A nivel del laboratorio es útil como test para un rápido diagnóstico presuntivo de agentes infecciosos, tanto en muestras como en cultivos en crecimiento, y adicionalmente sirve para valorar la calidad de la muestra clínica. Las bacterias se tiñen gram positivas (+), gram negativas (-) o no se tiñen debido a sus diferencias en la composición de su pared y arquitectura celular.

Las bacterias gram (+) tienen una gruesa capa de péptidoglucano y gran cantidad de ácidos teicóicos que no son afectados por la decoloración con alcohol y/o acetona, reteniendo el colorante inicial acompañado con iodo y visualizándose en distintos grados de tonos desde el violeta al azul claro, dependiendo de si la naturaleza de su pared celular está intacta o dañada.

Las bacterias gram (-) tienen en su pared celular una delgada capa de peptidoglucano ligada a una membrana externa por moléculas de lipopolisacáridos. Esta membrana externa es dañada por el alcohol y/o cetona de la decoloración, permitiendo que el primer colorante acompañado sea reemplazado por el contracolorante.

Clásicamente los reactivos utilizados para la realización de la tinción de Gram han sido el cristal violeta como colorante inicial, la solución de lugol para acompañar a éste, el alcohol y/o acetona para la decoloración y la safranina o fucsina básica como contracolorante (Koneman et al., 2008) (Cardona, Rojas, & Salcedo, 2008)

d.5.4. Medios de cultivo.

Es el proceso de crecimiento de microorganismos en un medio, después de la obtención de bacterias de un sitio de infección. Lo cual exige que se cumplan los requerimientos nutricionales y ambientales de los patógenos bacterianos además permite la visualización de colonias (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2009).

Los medios de cultivo tienen tres propósitos principalmente.

- Facilitar el crecimiento y el aislamiento de todas las bacterias presentes en una muestra clínica
- Determinar que bacterias entre las que se desarrollan tienen más probabilidades de ser las causantes de la infección.
- Obtener un desarrollo suficiente de las bacterias de importancia clínica para permitir su identificación y su caracterización.

d.5.4.1. Agar sangre.

La mayor parte de las muestras para bacteriología se inoculan en placas de agar sangre de carnero porque este método favorece el desarrollo de todas las bacterias de importancia clínica excepto las que presentan requerimiento más especiales de cultivo, el medio consiste en una base que contiene una fuente de proteínas digerido proteico de soya (que contiene una cierta cantidad de hidratos de carbono natural) cloruro de sodio y sangre de cordero al 5%. Ciertas bacterias producen enzimas extracelulares que lisan los eritrocitos en el agar (hemólisis) y puede producir una eliminación completa de los eritrocitos alrededor de la colonia bacteriana (beta hemólisis) o solo una lisis parcial de las células para provocar manchas de color verdoso alrededor de la colonia (alfa hemólisis) (Merentes et al., 2012)

d.5.4.2. Agar MacConkey.

Es el agar primario selectivo y diferencial es utilizado con mayor frecuencia. Este medio contiene el colorante violeta cristal que inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas y de los hongos y que permite el desarrollo de muchos tipos de bacilos gramnegativos. El indicador de pH, rojo neutro, le otorga a este medio su propiedad diferencial. La fermentación bacteriana de la lactosa determina la formación de ácido, lo

que disminuye el pH del medio y hace que el indicador rojo neutro le confiera a las colonias bacterianas un color rosado a rojo (Koneman et al., 2008)

d.5.4.3. Mueller Hinton.

Medio nutritivo adecuado para facilitar el crecimiento de numerosos microorganismos. Al igual que su presentación en forma de agar, el caldo Mueller Hinton muestra buena reproducibilidad de los resultados lote a lote, tiene un bajo contenido de inhibidores especialmente para sulfamidas, trimetoprima y tetraciclina. Puede ser suplementado para el crecimiento de bacterias exigentes y con ciertos cationes para el antibiograma de *Pseudomonas* frente a aminoglucósidos (Mogrovejo, 2010)(Cavaliere et al., 2009)

d.5.5. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son la forma más convincente del diagnóstico de las enfermedades infecciosas, mediante este proceso se determinan el género y las especies bacterianas de interés. Cada tipo bacteriano tiene un cuadro de reacciones específicas donde se comprueba el resultado de las reacciones y son la base de la identificación de los diferentes agentes bacterianos

d.5.5.1. Agar TSI:

Es un medio de cultivo diferencial basado en la capacidad de los bacilos gram negativos de fermentar carbohidratos, de producir H₂S y producir gas. Se observa en el tubo el pico y el fondo ácido, hay 1% de positividad para la producción de H₂S en cepas de *E. coli* (Alors, 2009)

d.5.5.2. SIM medio (motilidad, indol, sulfuro de hidrógeno).

Permite detectar la producción del sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso. Permite detectar la producción de indol, producto de la degradación metabólica del aminoácido triptófano; las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. Observando la formación un complejo de color rojo en el medio al añadir cinco gotas de reactivo de KOVACS. La presencia de

motilidad (móvil) del microorganismo por migración a partir del lugar de siembra se disemina provocando turbidez en el medio (Alors, 2009).

d.5.5.3. Citrato

Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento; da 1% de positividad para cepas de *E. coli* (Mogrovejo, 2010)

d.5.5.4. Ureasa

Los microorganismos que hidrolizan la urea a través de la enzima ureasa, liberan amoníaco lo cual produce un cambio de color rojo en el medio. El agar urea de Christensen permite la detección de menores cantidades de amoníaco para aquellos microorganismos que producen menores cantidades de ureasa se evalúan con este método y da 1% de positividad para esta prueba en *E. coli* (Mogrovejo, 2010)

d.5.5.5. Lisina, Hierro, Agar (LIA)

Detecta la capacidad de un microorganismo de descarboxilar la lisina. Las descarboxilasas son un grupo de enzimas capaces de actuar sobre los grupos carboxilo de los aminoácidos produciendo aminas, de reacción alcalina. Cada una de las descarboxilasas es específica para un aminoácido. La lisina puede ser descarboxilada transformándose en cadaverina. Esto produce un viraje del indicador púrpura de bromocresol al violeta. Como la descarboxilación sólo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6), es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo, por fermentación de la glucosa. Por este motivo este medio de cultivo sólo debe utilizar para la diferenciación de cultivos que fermentan la glucosa. Los microorganismos que no producen lisina descarboxilasa pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje del medio al amarillo. La incubación de 24 horas ocasiona una alcalinización en la superficie del medio de cultivo y consecuentemente un viraje del pico al color violeta. Las cepas *Proteus* y *Providencia*, con excepción de algunas cepas de *Morganella morganii*, desaminan la lisina y producen ácido alfa-ceto-carbónico. Este último, con la sal de hierro y por la influencia de oxígeno forma combinaciones pardo-rojizas en la región superficial del medio de cultivo. Permite detectar la producción del sulfuro de

hidrógeno por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso (Prats, 2006)

d.5.5.6. Oxidasa.

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. La prueba oxidasa, diseñada originalmente para identificar todas las especies de *Neisseria*, y para distinguir los miembros de la familia *Pseudomona* de los miembros de la familia enterobacteriaceae oxidas negativa (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010)

d.6. MÉTODOS DE SUCEPTIBILIDAD BACTERIANA

d.6.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Es la base de la medida de la susceptibilidad de una bacteria a un determinado antimicrobiano. Se define como la menor concentración de una gama de diluciones del antimicrobiano que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antimicrobiano frente a las bacterianas (Suchini, Lee, López, & Quan, 2015)

d.6.2. Concentración mínima bactericida (MBC)

Es la concentración más baja del antimicrobiano que es capaz de matar el 99.9% del inóculo original en un periodo de tiempo determinado (Suchini et al., 2015)

d.6.3. Clasificación de los métodos de susceptibilidad bacteriana

d.6.3.1. Cualitativos

Son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente.

d.6.3.1.1. La difusión en disco.

A medida que fueron apareciendo más agentes antimicrobianos para tratar las infecciones bacterianas las limitaciones del método de macrodilución en caldo se

tornaron evidentes, se necesitaba un método más práctico y conveniente para probar varios agentes antimicrobianos, debido a esta necesidad se desarrolló la prueba de difusión con discos realizado por Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, ellos publicaron su estudio describiendo la prueba que se usa en la actualidad. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), adoptó los pasos básicos del procedimiento en el estudio de Bauer como el método de referencia para difusión por disco. Estos pasos deben seguirse en forma minuciosa para obtener resultados precisos. La ventaja de difusión en disco figura la conveniencia y la facilidad de su empleo. Es posible probar hasta 12 antimicrobianos contra un aislamiento antimicrobiano con uso mínimo de materiales y dispositivos. La desventaja es la imposibilidad de proporcionar datos más precisos, informa las categorías con respecto al nivel de resistente, intermedio y sensible (Forbes et al., 2009)

d.6.3.2. Métodos cuantitativos.

Son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). La dilución en caldo es una técnica en la que se incorporan cantidades escalonadas de antimicrobianos a un medio bacteriológico líquido por lo general se utiliza diluciones del doble de las sustancias antimicrobianas. Posteriormente estos medios son inoculados con bacterias y se incuban, el criterio de valoración corresponde a la cantidad de sustancia antimicrobiana necesaria para inhibir la proliferación de la bacteria. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 ml (Macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución), la macrodilución ha sido remplazada por la microdilución.

La ventaja de este método en dilución en caldo es que permiten obtener un resultado cuantitativo, indicando la cantidad necesaria de determinado fármaco para inhibir al microorganismo investigado. Además permite la opción de proporcionar resultados cualitativos que es la interpretación por categorías como es .Sensible, Intermedio y Resistente. La desventaja es un método muy costoso (Brooks et al., 2011)

d.6.3.2.1. Macrodilución en caldo

Se realiza en tubos de ensayo con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo.

Consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CMI (Malbran, 2012)

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con caldo MH suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano (Malbran, 2012)(Merentes et al., 2012)

Lectura e interpretación de la CMI: La CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CMI se expresa en $\mu\text{g/ml}$. Luego se debe recurrir, teniendo en cuenta el valor de CMI obtenido para esa cepa, a las tablas para definir según los valores de CMI (Malbran, 2012)

d.6.3.2.2. Microdilución en caldo

La prueba de microdilución en caldo de CIM se realiza en una placa de poliestireno que contiene aproximadamente 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos. Una celdilla sirve como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirve como control negativo (sólo caldo). La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1 ml en cada celdilla. Para probar cepas aisladas de orina, algunos laboratorios tienen un tipo diferente de placa que contiene medicamentos apropiados para tratar infecciones de las vías urinarias bajas. Para probar bacterias fastidiosas se requieren paneles con medios especiales

Leer las Placas de CIM por microdilución. Revise el crecimiento en la celdilla de control positivo. Se debe encontrar turbidez o un punto de crecimiento > 2 mm lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de CIM. Se debe revisar el pozo de control negativo. Esta debe estar claro, sin turbidez, y lea el punto final CIM como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el

crecimiento del microorganismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico (Malbran, 2012)

d.6.3.2.3. Método de E test

La prueba E test determina la susceptibilidad de forma cuantitativa mediante un gradiente de concentración del antimicrobiano, se basa en el uso de unas tiras o "epsilómetros" (AB Biodisk, Sweden) con una escala interpretativa. El gradiente de antibiótico cubre un amplio rango de concentraciones correspondientes aproximadamente a 15 diluciones dobles de CIM. Estas concentraciones están diseñadas para corresponder con los puntos de corte correspondientes a cada antimicrobiano. El procedimiento es exactamente igual al usado en el método de difusión en disco pero en vez de observar una zona circular de inhibición, se observa una zona elíptica. La CIM del antibiótico se determina en el punto donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de concentración de la tira (Koneman et al., 2008)

- Medio de cultivo: El medio debe tener una profundidad de 4 mm. Un pH de $7,3\pm 0,1$. El uso de suplemento en el medio de cultivo depende del microorganismo a probar.
- Turbidez del inóculo: El inóculo del microorganismo es ajustado al 0.5 McFarland para la mayoría de los microorganismos a excepción de los gérmenes anaerobios que se ajusta al 1 de McFarland.
- Tiras de E test .El inóculo debe ser extendido sobre el agar, la superficie debe estar completamente seca antes de colocar las tiras del antimicrobiano.
- Incubación: Las placas deben ser incubadas invertidas y no se debe apilar más de 5 cajas. La atmósfera de incubación depende del microorganismo a probar.

Lectura de CMI por el método de E test: Se lee el valor de la CIM, donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de concentración de la tira. No se debe leer la placa si hay un cultivo contaminado o poco crecimiento. Existe una guía para la lectura de los diferentes patrones de inhibición/crecimiento (Salud, 2010)

d.6.4. Interpretación de las pruebas de sensibilidad

Estos criterios están basados en la respuesta in vitro de un microorganismo aun agente antimicrobiano con niveles alcanzados en sangre o tejidos del antimicrobiano

dosificado. Los puntos de corte y su interpretación se generan teniendo en cuenta los criterios microbiológicos, criterios de farmacocinética/farmacodinamia y clínicos. Los siguientes son los criterios de interpretación indicados:

d.6.4.1. Sensible

Cuando el microorganismo es inhibido por las concentraciones alcanzadas por el agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada es usada para el sitio de la infección (Salas del C et al., 2012), (Koneman et al., 2008)

d.6.4.2. Intermedio

Cuando el microorganismo presenta una CIM del agente antimicrobiano cercano a los niveles de antibiótico usualmente alcanzados en sangre o tejidos y para los cuales la respuesta puede ser más baja que para los aislamientos susceptibles. La categoría intermedia implica la eficacia clínica en sitios del cuerpo donde el fármaco es concentrado fisiológicamente o cuando se puede utilizar una dosis más alta de lo normal (Koneman et al., 2008)

d.6.4.3. Resistente

Cuando el aislamiento no es inhibido por las concentraciones séricas del antimicrobiano normalmente alcanzadas a dosis normales (Koneman et al., 2008)

e. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

La presente investigación es de tipo descriptivo y de corte transversal

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Militar Brigada Nro.7 de la ciudad de Loja ubicado en la calle Colón entre Bolívar y Bernardo Valdivieso

Universo

El universo está constituido por todas las muestras de orina de pacientes de consulta externa con petición de urocultivo del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la Ciudad de Loja

Muestra

34 urocultivos positivos para *Escherichia coli*

Criterios de inclusión

- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado y acepten formar parte de este estudio.
- Pacientes con solicitud de urocultivo atendidos en consulta externa.
- Urocultivos que presenten más de 100.000 UFC.
- Pacientes que recolecten la muestra siguiendo protocolo de toma de muestra.

Criterios de exclusión

- Pacientes que estén en tratamiento con antibacterianos, al momento de la recepción de la muestra.
- Urocultivos que no tengan crecimiento durante las 24 horas de incubación.

Procedimientos éticos

Durante el desarrollo del trabajo investigativo se cumplieron tres fases:

MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.

Fase Pre – Analítica.

- Oficio dirigido al Director del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja, para solicitar la autorización de recogida de las muestras de orina con pedido de urocultivo para desarrollar el presente trabajo investigativo (**Anexo 1**).

- Oficio dirigido a la Directora del Área de la Salud de la Universidad Nacional de Loja, Lic. Mg. Rosa Rojas, para solicitar la autorización pertinente para realizar el procesamiento de las muestras en el Centro de Diagnóstico Médico (**Anexo2**).
- Se aplicó el consentimiento informado a todos los pacientes de consulta externa con pedido de urocultivo (**Anexo 3**).
- Aplicación de Protocolo para toma de muestras de orina (**Anexo 4**).
- Aplicación de protocolo para transporte y conservación de las muestras (**Anexo 5**).
- Se aplicó formato para registro de datos del paciente (**Anexo 6**).
- Preparación de medios de cultivo: Agar Sangre, Agar MacConkey, Caldo Müeller Hinton (**Anexo 7, 8,9**).
- Preparación de medios para pruebas bioquímicas: Citrato, SIM, UREA, LIA, TSI (**Anexo 10, 11, 12, 13,14**).

Fase Analítica.

- Validación de metodología y control de calidad: Cepa control de *E. coli* ATCC 25922 (**Anexo 15**).
- Preparación de urocultivo (**Anexo 16**).
- Tinción de Gram (**Anexo 17**).
- Aplicación de la prueba oxidasa a todas las cepas que presentaron más de 100.000 UFC/ml (**Anexo18**).
- Pruebas bioquímicas para identificación *E. coli* : Citrato, SIM, UREA, LIA, TSI (**Anexo 19**).
- Técnica por el método de macrodilución (**Anexo 20**).

Desarrollo de la Fase Post Analítica

- Registro de resultados urocultivo y pruebas bioquímicas (**Anexo 21**).
- Registro de resultados de la CMI de ampicilina frente a *E. coli* por triplicado (**Anexo22**).
- Certificado de cumplimiento de haber realizado el muestreo respectivo en el área de Laboratorio Clínico (**Anexo23**).
- Oficio dirigido al Sr.Crnl. Edison Moreno Director del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja para poder realizar la difusión de resultados y tríptico entregado al personal de salud (**Anexo24**).
- Fotografías de los procedimientos realizados (**Anexo 25**).

f. RESULTADOS

RESULTADOS DEL PRIMER OBJETIVO: Realizar urocultivo a partir de muestras de orina de pacientes que acuden a consulta externa que tengan petición en el Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja.

TABLA Nro. 1

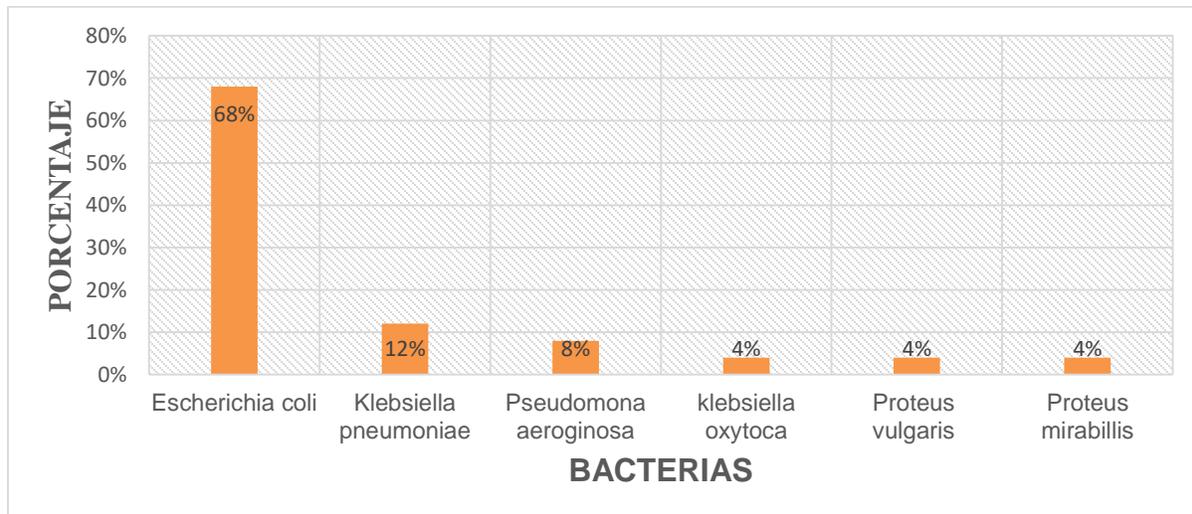
Microorganismos identificados en urocultivos de pacientes de consulta externa en el Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja.

Bacterias	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	34	68
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	12
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4	8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	4
<i>Proteus vulgaris</i>	2	4
<i>Proteus mirabilis</i>	2	4
Total	50	100

Fuente: Registro de resultados de la identificación de *Escherichia coli*.

Autor: Irene Suquilanda

GRAFICO Nro.1



INTERPRETACION: De un total de 106 muestras de orina procesadas en el Centro de Diagnóstico Médico, 50 tuvieron crecimiento bacteriano de las cuales 34 cultivos dieron positivos para *E. coli* representando un 68%.

RESULTADOS DEL SEGUNDO OBJETIVO: Determinar la concentración mínima inhibitoria de ampicilina en urocultivos de *Escherichia coli* en muestras de orina de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja mediante la técnica de macrodilución.

TABLA Nro.2

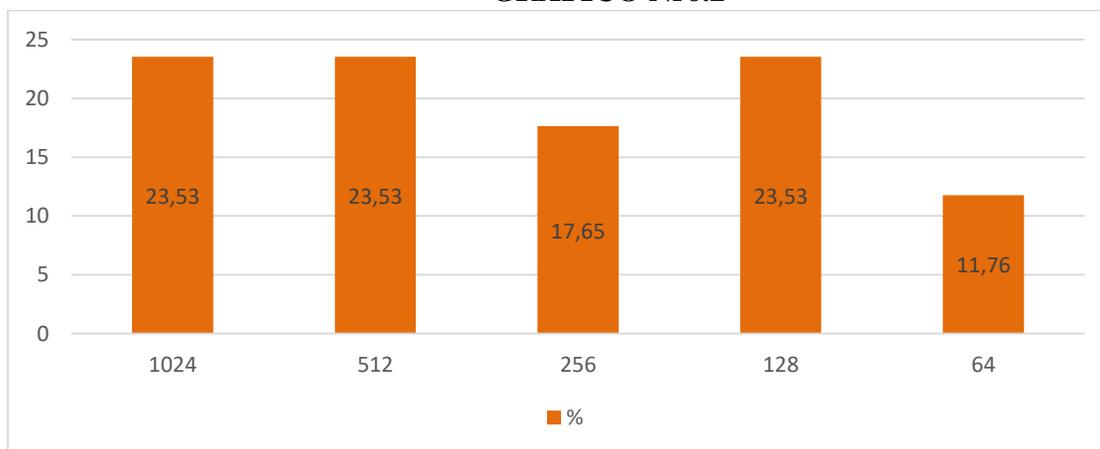
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA FRENTE A *Escherichia coli*

CMI (µg/ml de ampicilina)	Frecuencia	%	SUCEPTIBILIDAD		
			≤ 8 µg/ml Sensible	16 µg/ml Intermedio	≥ 32 µg/ml Resistente
1024 µg/ml	8	23,53			R
512 µg/ml	8	23,53			R
256 µg/ml	6	17,65			R
128 µg/ml	8	23,53			R
64 µg/ml	4	11,76			R
Total	34	100			

Fuente: Registro de resultados de la concentración mínima inhibitoria de ampicilina frente a *Escherichia coli*.

Autor: Irene Suquilanda.

GRÁFICO Nro.2



INTERPRETACIÓN: se evidenció la resistencia a ampicilina al 100%, lo cual indica que ya no se lo debería emplear debido a que las concentraciones en las que inhibe el crecimiento bacteriano no son terapéuticamente recomendadas.

RESULTADOS DEL TERCER OBJETIVO: Difundir los resultados al personal médico del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja.

Todos los resultados obtenidos se dieron a conocer al personal de salud del Hospital Militar en donde se contó con la presencia de médicos y personal de Laboratorio Clínico.

g. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana es en la actualidad un problema que va en ascenso, asociado indudablemente al uso indiscriminado de antibióticos lo que trae como consecuencia mutación en las bacterias; las cuales desarrollan diferentes mecanismos para contrarrestar los efectos de los antibióticos suministrados.

El presente estudio tuvo como propósito determinar la concentración mínima inhibitoria de ampicilina frente a *Escherichia coli* en pacientes de consulta externa del Hospital Militar de la Ciudad de Loja; en donde se logró determinar que de 50 urocultivos positivos 34 correspondían a *Escherichia coli* lo cual fue la cantidad más representativa y equivalía a un 68%, 12% a *Klebsiella pneumoniae*, 8% a *Pseudomona aeruginosa*, 4 % a *Klebsiella oxytoca*, 4% a *Proteus vulgaris* y 4% a *Proteus mirabilis*. Se estableció que la bacteria es resistente en un 100%, tomando como referencia las concentraciones del Antimicrobiano para *Enterobacterias* según la CLSI.

Tucto, Mercado y Hurtado en el año 2013, en un estudio realizado en Perú mediante método de microdilución demostró que las cepas de *Escherichia coli* desde el año 2010 hasta el 2013 han incrementado su resistencia de un 81% a un 87% con una CMI mayor a 32 ug/ml con respecto a ampicilina. Al comparar nuestro estudio que fue realizado mediante método de macrodilución podemos observar que *Escherichia coli* tiene una resistencia del 100% frente al antibiótico ensayado, igualmente con una CMI mayor a 32 ug/ml. La resistencia observada en nuestro estudio es mayor, pudiendo atribuirse a la diferencia de los años en los que se lo realizó ya que haciendo una análisis comparativo en el estudio realizado desde el año 2010 hasta el 2013 tuvo un incremento gradual en la resistencia, dando anotar que la resistencia aumenta año a año.(Tucto, Hurtado, & Mercado, 2014)

Guajardo, González y Ayala en el año 2009, realizaron un estudio en México en el cual identificaron la bacteria *Escherichia coli* y determinaron la susceptibilidad a los siguientes antibióticos; ampicilina, trimetropim-sulfametoxazol, cefazolina y ciprofloxacino mediante método automatizado de microdilución en el cual se analizaron 652 urocultivos. Las cepas aisladas fueron resistentes a ampicilina en 67.2% en cuanto a los demás antibióticos el porcentaje fue menor. Dejando en evidencia que ampicilina sigue siendo uno de los antibióticos a los que

más resistencia presenta la bacteria *E. Coli*, algunos estudios indican que se debe a que es considerado de elección en el manejo empírico de las infecciones de vías urinarias adquiridas en la comunidad, pero el punto de referencia principal sería la diferencia de años en los que se realizó el estudio lo cual demuestra que a través de los años la resistencia va en aumento (Guajardo, González, & Ayala, 2012)

Bueno J. en el año 2015 realizó un estudio en el cual se procesaron un total de 20.093 cepas de Enterobacterias procedentes de muestras de orina aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Todos los aislamientos fueron procesados para el estudio de su sensibilidad “in vitro” a los antimicrobianos con la misma metodología, consistente en la determinación de las CIM mediante un sistema semiautomático de microdilución en caldo; en el cual se seleccionaron al azar un total de 47 aislados. Las 47 cepas seleccionadas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales; de las cuales se puede evidenciar que *Escherichia coli* sigue siendo el principal agente patógeno causal de las infecciones de vías urinarias en un 70% las cuales fueron resistentes a ampicilina en un 100%. Lo que nos muestra una muy significativa similitud con nuestro estudio ya que los dos estudios fueron realizados durante el mismo año (Bueno, 2015)

h. CONCLUSIONES

- Se identificó *E. coli* como el principal agente etiológico causante de infección de vías urinarias con una frecuencia del 68%.
- Durante la determinación de la susceptibilidad de ampicilina de las cepas aisladas de *E. coli* se evidenció un 100% de resistencia en las muestras ensayadas.
- Se dió a conocer los resultados obtenidos al personal de salud del Hospital Militar con la finalidad de dar cumplimiento al tercer objetivo planteado.

i. RECOMENDACIONES

- Es necesario que el personal de salud se actualice continuamente sobre las resistencias bacterianas que se están desarrollando en cuanto a los diferentes antibióticos usados con más frecuencia, además de continuar realizando este tipo de estudios lo cual ayuda al monitoreo y permitirá contar con datos estadísticos que pueden apoyar con información eficaz ya que como nos hemos podido dar cuenta según nuestro estudio y otros estudios la resistencia incrementa a través de los años.
- Es preciso recomendar a los usuarios no automedicarse, asistir a las casas de salud cuando sientan alguna afección y seguir las indicaciones de los galenos ya que solo haciendo un uso correcto de los antibióticos podemos contrarrestar las resistencias de los microorganismos, ya que cuando se suspende el tratamiento las bacterias pueden volver a recuperarse y multiplicarse.

j. BIBLIOGRAFÍA

- Alors, R. (2009). Estudio microbiológico de la orina: urocultivo. Retrieved from http://www.csi-csif.es/andalucia/modules/mod_ense/revista/pdf/Numero_14/ROSARIO_ALORS_2.pdf
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg: Microbiología médica. Microbiología médica* (McGraw-Hil).
- Bueno, J. (2015). EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE CARBAPENEMASAS. Retrieved from <https://zagan.unizar.es/record/47451/files/TAZ-TFM-2015-161.pdf>
- Calderón-Jaimes, E. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín Médico Del ...*, 70(1), 3–10. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-11462013000100003&script=sci_arttext
- Cardona, N., Rojas, C., & Salcedo, L. (2008). ARTICULO ORIGINAL Leucocituria y tinción de gram para el diagnóstico de infección urinaria Leukocytes in urine and gram tint for the diagnose of urinary infection, 47(2), 81–85.
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*, 30(6), 519–528. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200004>
- Castillo, M. (2009). Revision sobre penicilinas segunda parte, 167–177. Retrieved from <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v1no1/art1.pdf>
- Cavaliere, S. J., Harberk, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., ... Spiegel, C. a. (2009). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Manual+de+Pruebas+de+Susceptibilidad+Antimicrobiana#0>
- Fernández, F., & López, J. (2009). Resistencia bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina*, 57(10), 1129–1140. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200008>
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010).

Metodos de Identificacion Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>

Forbes, B., Sahn, D., & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico* (12th ed.). Medical Panamericana.

García, J., Miguel, S., Lerma, Á., Barcelona, F., Cardenal, A., & Barcelona, J. (2010). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Uso prudente de los antimicrobianos* (Vol. 28). Retrieved from http://www.sefh.es/fichadjuntos/EIMC_Antimicrobianos.pdf

González Monte, E. (2013). Infección del tracto urinario. *Nefrología Grupo Editorial Agenda*, (Figura 1), 5. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.2010.pub1.ed80.chapter1830>

Gonzalo, D., & Alcívar. (2011). INEC: Anuario de Estadísticas Vitales. Retrieved from http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Nacimientos_Defunciones/Publicaciones/Anuario_Nacimientos_y_Defunciones_2011.pdf

Grabe, M., Johansen, T. E. B., Botto, H., Çek, M., Naber, K. G., Tenke, P., & Wagenlehner, F. (2010). Guía clínica sobre las infecciones urológicas. *European Association of Urology*, 1290–1423.

Guajardo, C., González, P., & Ayala, J. (2012). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections. What antimicrobial to use? *Salud Pública de México*, 51(2), 155–159. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000200012>

Isaza, C. (2014). *Fundamentos De Farmacología En Terapéutica* (Sexta Edic). Médica Celsus.

Koneman, E., Allen, S., Dowell, V. R., Janda, W., Sommers, H., & Winn, W. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana.

Malbran, C. (2012). Metodo de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución, 32(2).

Merentes, A., Rizzi, A., Papaptzikos, J., Rivero, N., & Oranges, C. (2012). Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias gramnegativas aisladas de infecciones del tracto urinario en Venezuela: Resultados del estudio SMART 2009-2012, 639–648. Retrieved

from <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v32n6/art05.pdf>

Mogrovejo, U. C. S. T. de. (2010). Pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias, 24. Retrieved from <https://microinmuno.files.wordpress.com/2011/05/11-pruebas-bioqu3admicas-de-identificac3b3n-de-enterobacterias.pdf>

Moreno, J. (2010). clasificación de las penicilinas, 264–269.

Pigrau, C. (2013). *Infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. SALVAT* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1157/13091442>

Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. BOOK, Editorial Médica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=TdsoWPEYaoUC>

Rivas, M., Deza, N., & Leotta, G. A. (2010). DIAGNOSTICO DEL AGENTE ETIOLOGICO, RESERVORIOS Y VIAS DE TRANSMISION, 66, 27–32.

Salas del C, P., Barrera B, P., González C, C., Zambrano O, P., Salgado D, I., Quiroz, L., ... Cavagnaro SM, F. (2012). Actualización en el diagnóstico y manejo de la Infección Urinaria en pediatría. *Revista Chilena de Pediatría*. JOUR, scielocl. Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062012000300009&lng=es&tlng=es.10.4067/S0370-41062012000300009.

Salud, S. D. de. (2010). S Ecretaria Manual De Actualizacion En Resistencia Bacteriana Y Normas Clsi M100 – S20. *Control*, 1–78.

Suchini, S., Lee, P., López, M., & Quan, S. (2015). PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIMICROBIANOS ANTIBIOGRAMA.

Tucto, S., Hurtado, P., & Mercado, T. (2014). Resistencia Bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II, 2(1). Retrieved from <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/643>

Vademecum. (2011). Ampicilina. Retrieved from <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a052.htm>

k. ANEXOS

ANEXO 1



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

Of. N° 007-2015-LAMY-CLC-UNL

Loja, 28 de febrero de 2015

Coronel
Édison Moreno.
GERENTE GENERAL DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N° 7
Ciudad.

Ref.: Autorización para colecta de muestras para urocultivo en proyecto de tesis.

De mi consideración:

Con un cordial saludo me dirijo a su autoridad para solicitar comedidamente su colaboración para el desarrollo del proyecto de tesis "Concentración Mínima Inhibitoria de **ampicilina** frente a *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada N°7 de la ciudad de Loja durante el periodo marzo-julio del 2015 " presentado por Irene del Rocío Suquilanda Espinosa, estudiante de octavo módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

La colaboración se refiere exclusivamente a brindar las facilidades para que la mencionada estudiante pueda coleccionar muestras de orina de pacientes con prescripción médica para urocultivo y que acuden a esa casa de salud durante los meses de marzo - abril de 2015.

Por la atención que sepa dar a la presente le anticipo mis agradecimientos.

De Ud. muy atentamente,

Dr. Luis Morocho Yaguana, Mg. Sc.
Docente-Investigador Carrera Lab.
Clínico-UNL
Director de Tesis



SECCION: P-1
FECHA: 02/03/2015
HOP: 121-06
AS: Autorización para continuación con laborator

ANEXO 2

20150106

Loja, 06 febrero de 2015

Dra. Rosa Rojas

DIRECTORA DEL ÁREA DE LA SALUD HUMANA
Ciudad.-

*Secret. Dir
Autorizado, para
lo cual debe coord
nar con la Lic.
Carmen Ullauri G, J
Informe Rosa Rojas
09.02.2015*

De mis consideraciones.-

Yo, IRENE DEL ROCIO SUQUILANDA, portadora de la cedula de ciudadanía Nro. 0705634632, estudiante del séptimo módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo muy respetuosamente a Ud. para extenderle un fraterno saludo y desearte éxitos en sus funciones a la vez me permito solicitarle comedidamente autorice a quien corresponda el permiso para poder realizar el procesamiento de las muestras de orina en el **Centro de Diagnóstico Médico** mi proyecto de tesis denominado: **DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA DE AMPICILINA FRENTE A ESCHERICHIA COLI EN PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DURANTE EL PERIODO MARZO-JUNIO 2015**, además se me facilite el permiso correspondiente para poder hacer uso de las instalaciones y equipos a fin de realizar los análisis respectivos.

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

Atentamente

IRENE DEL ROCIO SUQUILANDA

Nro. 0705634632

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DEPARTAMENTO DE ARCHIVO
AREA DE LA SALUD HUMANA

RECIBIDO POR: *Freddy N. de la Cruz*

FECHA: *06-02-2015*

HORA: *17:30*

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

RECIBIDO 09 FEB 2015

ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO.



FECHA:.....

Yo.....*identificado con la cédula de ciudadanía Nro..... declaro que he sido informado de los siguientes aspectos concernientes al estudio “CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA FRENTE A Escherichia coli AISLADA EN UROCULTIVO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro. 7 DE LA CIUDAD DE LOJA”* en el que participaré voluntariamente como sujeto:

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

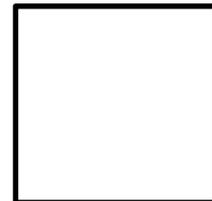
Yo.....**como sujeto del estudio me comprometo a que toda la información que brinde será ajustada a la verdad.**

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

Nombre:..... Firma.....

Cédula de Ciudadanía N^{ro}. Fecha:

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



ANEXO 4

INSTRUCCIONES PARA UNA CORRECTA TOMA DE MUESTRA DE ORINA PARA UROCULTIVO

- De ser posible, recolecte la muestra cuando la orina haya estado en su vejiga durante 2 a 3 horas.
- Usted usará un equipo especial para recolectar la orina, el cual muy probablemente tendrá un recipiente con una tapa y toallitas desinfectantes.
- Lávese las manos con jabón y agua caliente.

Niñas y mujeres

Las niñas y las mujeres necesitan lavarse el área entre los "labios" de la vagina.

- Siéntese en el inodoro con las piernas separadas. Use dos dedos para separar y abrir los labios.
- Use la primera toallita para limpiar los pliegues internos de los labios. Limpie de adelante hacia atrás.
- Use una segunda toallita para limpiar por encima de la abertura por donde sale la orina (uretra), justo sobre la abertura de la vagina.

Para recolectar la muestra de orina:

- Manteniendo los labios separados y abiertos, orine una cantidad pequeña en la taza del inodoro y luego detenga el flujo de orina.
- Sostenga el recipiente de la orina a unas cuantas pulgadas de la uretra y orine hasta que el recipiente esté medio lleno.
- Usted puede terminar de orinar en la taza del inodoro.

Niños y hombres

- Limpie la cabeza del pene con una toallita estéril. Si no está circuncidado, necesitará retraer primero el prepucio.
- Orine una cantidad pequeña en la taza del inodoro y luego detenga el flujo de orina.
- Después, recolecte una muestra de orina dentro del recipiente limpio o estéril, hasta que esté medio lleno.
- Puede terminar de orinar en la taza del inodoro.

Bebés

Se le hará en una bolsa especial para recolectar la orina. Será una bolsa plástica con una tira adhesiva en un extremo, hecha para encajar sobre el área genital de su bebé.

Si la recolección de orina se está tomando de un bebé, puede necesitar bolsas recolectoras adicionales.

Lave bien el área con agua y jabón y séquela. Abra y ponga la bolsa sobre su bebé.

- Para los niños, se puede colocar todo el pene dentro de la bolsa.
- Para las niñas, ponga la bolsa sobre los labios.
- Puede poner un pañal sobre la bolsa.

Revise con frecuencia al bebé y retire la bolsa después de que la orina se acumule. Los bebés activos pueden desplazar la bolsa, de manera que posiblemente se necesite hacer más de un intento. Vierta la orina en el recipiente que le entregaron y devuélvasela al médico de acuerdo con las instrucciones

Fuente.

- Bailey & Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Medica Panamericana .S.A.
- Álvarez, Bouquet I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A.
- Mirón, M., González V. (2008). Obtención, transporte y conservación de muestras biológica. enero12, 2015, de Sociedad Española de Medicina Interna Sitio web:<http://www.fesemi.org/documentos/1354119963/publicaciones/protocolos/tade/capitulo-10.pdf>

ANEXO 5

PROTOCOLO PARA EL TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE ORINA

Una vez recogida la muestra:

- Enviar rápidamente la muestra al Laboratorio (el mayor retraso permisible es de dos horas).
- Si esto no fuera posible, guardarse en frigorífico con una temperatura de 2-8° C hasta el momento de su uso (tiempo máximo 18 horas).
- Los frascos con conservante pueden mantener la viabilidad de las bacterias varias horas sin refrigeración
- En caso de haber sido centrifugada la muestra Pueden permanecer a temperatura ambiente de 22°C a 25°C por una hora. Refrigerar de 2°C a 8°C
- Se la puede tener en refrigeración de 2°C a 8°C cuando el análisis se va a realizar el día siguiente se la puede Congelar a -20°C hasta por 22 días
- Cuando el análisis se va a realizar el día siguiente.
- La muestra debe ser transportada en posición vertical en el menor tiempo posible y en nevera para conservar la integridad de la muestra, así como para evitar accidentes a la persona que la transporta y a la auxiliar que la recibe.

Fuente.

- ✓ Bailey& Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Medica Panamericana .S.A.
- ✓ Cercenado, E., Canton, R. (2010). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Septiembre.14 septiembre, de Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Sitio web: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia14a.pdf>

ANEXO 6
APLICACIÓN DE FORMATO PARA REGISTRO DE DATOS DEL PACIENTE



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
AREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO
REGISTRO DE DATOS DEL USUARIO

Fecha:

Nro.	Nombre Y apellidos	Sexo	Edad	Teléfono	C.I. Nro.	Medicamentos	Malestar por lo que ingresa

ANEXO 7

PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE AGAR SANGRE.

Base de Agar de Sangre (Infusión Agar) M073

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

Composición:

Ingredientes	Gms / Litro
• Peptona de corazón de res	23.000
• Triptosa	1,000
• El cloruro de sodio	5,000
• Agar	15.000
• El pH final (a 25 ° C)	7,3 ± 0,2
Fórmula ajustada, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento.	

Principio e interpretación

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

Base de Agar de Sangre medios de comunicación pueden ser utilizados con fosfato de fenoltaleína añadido (1) para la detección de la producción de fosfato

Los estafilococos, con sal y agar añadido para la evaluación de la contaminación de la superficie en el equipo y cerdo de carcasa (2) y para determinar gama salinidad del Flavobacterias marino (3). También se puede utilizar para la preparación de antígenos de Salmonella Typhi (4).

Base de Agar de Sangre es recomendada por APHA (5) y métodos estándar (6, 7) para la prueba de muestras de alimentos.

Extracto de carne de triptosa proporciona carbono, nitrógeno, aminoácidos y vitaminas. Cloruro de sodio ayuda en el mantenimiento de la el equilibrio osmótico del medio. La

adición de la sangre hace que el medio más nutritivo, proporcione un crecimiento adicional para factores requeridos por organismos fastidiosos.

También ayuda en la visualización de las reacciones hemolíticas. Sin embargo, las reacciones hemolíticas dependerán de la sangre animal utilizado. Sangre de oveja da mejores resultados para estreptococos del grupo A (8). Pero la sangre de oveja no apoya al crecimiento de *Haemophilus haemolyticus* ya que la sangre es deficiente en ovejitas nucleótidos de piridina. Sin embargo cuando la sangre de caballo es de colonias *haemolyticus* H. usados producen hemólisis e imitan *Streptococcus pyogenes*

Preparación;

- Suspender 40 gramos en 1000 ml de agua destilada.
- Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- Esterilizar en autoclave a Presión de 15 libras (121 ° C) durante 15 minutos.
- Enfriar a 50 ° C y añadir aseptícamente 5% v / v de sangre de oveja desfibrinada estéril. Mezclar bien y verter en placas de Petri estériles.

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia:** Crema a amarillo polvo fluido homogéneo
- **Gelificación:** Firme, comparable con un 1,5% en gel de agar
- **El color y la claridad de medio preparado**
Medio de base: la luz de color ámbar transparente a ligeramente opalescente gel. Después de la adición de 5% v / v de sangre desfibrinada estéril: rojo Cereza formas opacas de color rojo de gel en placas de Petri.
- **Reacción:** 4,4% v / v solución acuosa a 25 ° C. pH: 7,3 ± 0,2
- **pH:** 7,10-7,50
- **Cajas Petri con Medio Agar Sangre:** A las 24 horas de guardar en refrigeración tomar de 2 a 4 cajas al azar y verificar si hay crecimiento bacteriano. Si existe crecimiento bacteriano se interpreta que las cajas están contaminadas y por lo tanto no sirven para realizar la identificación de la bacteria. Si no hay crecimiento bacteriano, las cajas están listas para su uso.

Almacenamiento y caducidad

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

Respuesta del cultivo.

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

Organismo	Inóculo (cfu)	Crecimiento w / o sangre	Recuperación w / o sangre	Crecimiento con sangre	Recuperación con sangre	Hemólisis
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	50 – 100	equitativo	40 – 50 %	exuberante	> = 70 %	Nada
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50 – 100	util	50 – 70 %	exuberante	> = 70 %	Beta
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	50 – 100	Util	50 – 70 %	exuberante	> = 70 %	Nada
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303	50 – 100	Equitativo - util	40 – 50 %	exuberante	> = 70 %	Alpha
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	50 – 100	Equitativo - util	40 – 50 %	exuberante	> = 70 %	Beta

Hemoglobina liofilizada de bovino BBL

REF. 212392 .500g

Lot. 4020408

Enriquecimiento para uso en la preparación de agar chocolate

INSTRUCCIONES: Disuelva 10g de hemoglobina por cada litro de medio deseado en volumen de agua desmineralizada fría. Procesa en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Con la solución aún caliente, agregue el volumen de solución base de agar estéril (por ejemplo, base de agar 6C.) Mezcle bien antes de verter en recipientes adecuados. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Para uso de Laboratorio, mantener el envase bien cerrado.

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA EN AGAR SANGRE

✓ Retirar las cajas Petri de refrigeración e incubarlas a una temperatura de 37 ° C.

- ✓ En una cámara de bioseguridad se hace todo el procedimiento; rotular la caja.
- ✓ Esterilizar el asa metálica calibrada; prender el mechero, tomar el asa bacteriológica por el mango y colocarla en posición vertical sobre la llama hasta que el alambre quede al rojo vivo.
- ✓ Dejar enfriar, sumergir dentro del urocultivo y realizar el estriado para aislar el microorganismo en el agar.

Siembra por el método de Kass

- ✓ Descargar una gota de orina con el asa calibrada en la parte superior de la caja que contiene el medio y extenderla hacia la parte inferior y estriar desde la parte superior de derecha a izquierda. Este estriado implica una sola inoculación a lo largo del medio.
- ✓ Incubar las cajas Petri en forma invertida (tapa hacia abajo) a una temperatura de 35 a 37°C de 24 a 48 horas.
- ✓ Retirar las cajas de incubadora y observar si existe crecimiento bacteriano, se cuenta el número de colonias y el resultado se multiplica por 1000 ya que el asa calibrada contiene de 0.001ml.

Crecimiento de colonias en agar sangre:

Escherichia coli: Abundante colonias medianas de color blanquecino, cremosas y redondeadas.

Fuente:

- Himedia laboratories disponible en sitio web: <http://himedialabs.com/TD/M073.pdf>
- Downes F. P. and Ito K., (Eds.), 2001, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., APHA, Washington, DC.
- Atlas R. M., 1993, Handbook of Microbiology of Microbiological Media, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Murray P. R., Baron J. H., Jorgensen J. H., Tenover F. C., Tenover P. C., (Eds.), 8th Ed., 2003, Manual of Clinical Microbiology, ASM, Washington, D.C.
- Bernal, M. (2014). *Identificación Bacteriana*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Departamento de Microbiología, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://www.medicina.unal.edu.co/Departamentos/microbiologia/Docs/W_IDENTIFICACION_BACTERIANA%20I%2014.pdf

- Álvarez, Bouquet & I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A. Madrid.

ANEXO 8

PROTOCOLO PARA AGAR MACCONKEY.

Agar de MacConkey M081B

MacConkey Agar se recomienda para el aislamiento selectivo de *Escherichia coli* de los productos farmacéuticos y está de acuerdo con una metodología armonizada de BP. También se recomienda para el aislamiento selectivo y diferenciación de fermentación la lactosa y lactosa no fermentación de bacterias entéricas.

Principio

Agar de MacConkey es el medio selectivo y diferencial temprano para el cultivo de organismos coliformes. Posteriormente agar MacConkey y caldo se han recomendado para su uso en análisis microbiológico de los productos alimenticios y para la siembra / inoculación directa de muestras de agua para el recuento de coliformes. Este medio también es aceptado por los métodos estándar para el examen de Leche y Productos Lácteos.

Farmacopea Británica (6) ha recomendado este medio para la subcultura e identificación de *Escherichia coli*. También se cita como medio de agar H. También se recomienda por y de acuerdo con el método armonizado de USP / BP / EP / JP (7, 6, 8, 9).

Pancreático Recopilación de gelatina y peptonas (carne y caseína) proporcionar los nutrientes esenciales, vitaminas y factores nitrogenados necesarios para el crecimiento de microorganismos. Lactosa monohidrato es la fuente de hidratos de carbono fermentables. La acción selectiva de este medio se atribuye a violeta cristal y sales biliares, que son inhibidoras de la mayoría de especies de bacterias grampositivas. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico en el medio.

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

La fermentación de la lactosa de cepas crecen como rojo o rosado y pueden estar rodeadas por una zona de ácido precipitó bilis. El color rojo es debido a la producción de ácido a partir de lactosa, la absorción de rojo neutro y un cambio de color posterior del colorante cuando el pH del medio cae por debajo de 6,8. Cepas no fermentan la lactosa, como *Shigella* y *Salmonella* es incolora y transparente y no suelen alterar la apariencia del medio. *Yersinia*

enterocolitica puede aparecer como pequeñas colonias de no fermentación de lactosa después de la incubación a una temperatura ambiente

Composición

Ingredientes	Gms / Litro
• Peptonas (carne y caseína)	3,000
• Pancreático compendio de gelatina	17.000
• Lactosa monohidrato	10.000
• Las sales biliares	1,500
• El cloruro de sodio	5,000
• Violeta cristal	0,001
• El rojo neutro	0,030
• Agar	13.500
pH después de la esterilización	a 25 ° C) 7,1 ± 0,2
Fórmula ajustada, normalizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento.	

INSTRUCCIONES

Preparación:

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

CONTROL DE CALIDAD

- **Apariencia** Rojo con tinte violáceo coloreado formas de gel transparente a ligeramente opalescente en placas de Petri.

- **La gelificación.** Comparable con 1,35% de agar gel.
- **El color y la claridad de medio preparado.** Rojo con tinte violáceo coloreado formas de gel transparente a ligeramente opalescente en placas de Petri.
- **pH 6,90-7,30**

Respuesta del cultivo

Promoción del crecimiento se lleva a cabo de acuerdo con el método armonizado de BP. Se observó una respuesta Cultural después de una incubación a 30-35 ° C durante 18-72 horas. La Tasa de recuperación se considera como 100% para el crecimiento de las bacterias en la recopilación de agar del digesto de soya

Propiedades estimuladoras del crecimiento

El crecimiento del microorganismo comparable al obtenido previamente con la porción de medio previamente probados y aprobados se produce a la temperatura especificada por no más que el menor período de tiempo especificado inoculando ≤ 100 ufc (a 30-35 ° C durante $\leq 18-72$ horas).

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

Organismo	inóculo	Crecimiento	Valor de lote observado (cfu)	Recuperación	color de la colonia	Temperatura de incubación	periodo de incubación
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	50 – 100	Exuberante	25 - 100	≥ 50 %	rosa-rojo con precipitado de bilis	30-35 °C	18 – 72 hrs
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50 – 100	Exuberante	25 - 100	≥ 50 %	rosa-rojo con precipitado de bilis	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9002	50 – 100	Exuberante	25 - 100	≥ 50 %	rosa-rojo con precipitado de bilis	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	50 – 100	Exuberante	15 – 40	≥ 50 %	rosa a rojo	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	50 – 100	equitativo buena	25 - 100	30 – 40 %	incoloro a Rosa pálido	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	50 – 100	Exuberante	25 - 100	≥ 50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$\geq 10^3$	Inhibido	0	0 %		30-35 °C	24 hrs
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	$\geq 10^3$	Inhibido	0	0 %		30-35 °C	24 hrs

<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	50 – 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Salmonella Paratyphi A</i> ATCC 9150	50 – 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Salmonella Paratyphi B</i> ATCC 8759	50 – 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Salmonella Typhi</i> ATCC 6539	50 – 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Salmonella Abony</i> NCTC 6017	50 – 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	50 – 100	Exuberante	25 - 100	>=50 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	50 – 100	equitativo buena	15 – 40	30 – 40 %	incoloro	30-35 °C	18 – 24 hrs
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	>=10 ³	Inhibido	0	0 %		30-35 °C	24 hrs
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> type gravis	>=10 ³	Inhibido	0	0 %		30-35 °C	24 hrs

Almacenamiento y caducidad

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

PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA EN AGAR MACCONKEY

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

Siembra por el método de Kass.

- ✓ Descargar una gota de orina con el asa calibrada en la parte superior de la caja que contiene el medio y extenderla hacia la parte inferior y estriar desde la parte superior de derecha a izquierda. Este estriado implica una sola inoculación a lo largo del medio.
- ✓ Incubar las cajas Petri en forma invertida (tapa hacia abajo) a una temperatura de 35 a 37°C de 24 a 48 horas.
- ✓ Retirar las cajas de incubadora y observar si existe crecimiento bacteriano, se cuenta el número de colonias y el resultado se multiplica por 1000 ya que el asa calibrada contiene de 0.001ml.

Fuente:

- Himedia laboratories disponible en sitio web:
<http://www.himedialabs.com/TD/M081B.pdf>
- Downes F P and Ito K(Eds.), 2001, Compendium of Methods For The Microbiological Examination of Foods, 4th ed., APHA, Washington, D.C
- Eaton A. D., Clesceri L. S. and Greenberg A W. (Eds.), 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed., APHA, Washington, D.C.5. ,,
- Wehr H M and Frank J H., 2004, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed., APHA Inc., Washington, D.C.
- British Pharmacopoeia 2011, The Stationery office British Pharmacopoeia
- The United States Pharmacopoeia 2011, The United States Pharmacopoeial Convention. Rockville, MD. 8. European Pharmacopoeia 2011, European Dept. for the quality of Medicines
- Álvarez, Bouquet & I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A.
- Bailey & Scott. (2007). *Diagnóstico Microbiológico*. España: Panamericana.

ANEXO 9

PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE MUELLER HINTON EN CALDO

Caldo de Mueller Hinton (Cationes no completos)

Uso previsto

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

Resumen y explicación

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

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

Caldo de Mueller Hinton de cationes completos ahora se recomienda para las pruebas de sensibilidad de todas las especies de bacteria.^{2, 3} anaeróbico aerobios y facultativos más comúnmente encontrado Bundesliga. El caldo de Mueller Hinton es catiónico ajustado, las concentraciones de calcio y de magnesio recomienda ion M7.2 en la norma CLSI

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

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

Principios del procedimiento

Hidrolizado ácido (digerir) de caseína y de suministro de extracto de carne aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, minerales, vitaminas, carbono y otros nutrientes para apoyar el crecimiento de microorganismos.

El almidón actúa como un coloide protector contra sustancias tóxicas que pueden estar presentes en el medio. La hidrólisis del almidón durante el tratamiento en autoclave proporciona una pequeña cantidad de dextrosa, la cual es una fuente de energía.

Control de calidad del usuario

NOTA: Las diferencias en las especificaciones de identidad y pruebas de Respuesta Cultural para los medios que se ofrecen como tanto Difco™ y BBL marcas puede reflejar diferencias en la desarrollo y prueba de los medios de comunicación para aplicaciones industriales y clínicos, por las publicaciones referenciadas.

Especificaciones de la identidad

Difco™ Caldo Mueller Hinton

Apariencia Deshidratada: Beige claro, de flujo libre, homogénea con

Algunas manchas oscuras.

Solución: La solución de 2,1 %, soluble en agua purificada a de ebullición. Solución es de color ámbar muy claro, claro, puede tener un ligero precipitado.

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

La reacción de 2,1 %

Solución a 25 ° C: pH 7,3 ± 0,1

Calcio: 2.9 - 5.9 mg/L

Magnesio: 3.2 - 5.2 mg / L

Respuesta Cultural

Difco™ Caldo Mueller Hinton

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

Organismo	ATCC
<i>Enterococos faecalis</i>	29212
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213

Especificaciones de la identidad

Bundesliga™ Müller Hinton Broth

Apariencia Deshidratada: Fine, homogéneo libre de extraño material.

Solución: La solución de 2,2 %, soluble en agua purificada al hervir. Solución es pálida a la luz, bronceado a amarillo, transparente o ligeramente turbio.

Apariencia Preparado: pálido a la luz, bronceado a amarillo, transparente o ligeramente nebuloso.

La reacción de 2,2 %

Solución a 25 ° C: pH 7,3 ± 0,

Respuesta Cultural

BBL™ Mueller Hinton Broth

Preparar el medio por instrucciones de la etiqueta. Inocular e incubar a 35 ± 2 ° C durante 18 a 24 horas (hasta 72 horas, si es necesario)

Organismo	ATCC™	INÓCULO CFU	RECUPERACIÓN
<i>Enterococos faecalis</i>	29212	≤10 ²	Bueno
<i>Enterococos faecalis</i>	33186	≤10 ²	Bueno
<i>Escherichia coli</i>	25922	≤10 ²	Bueno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	≤10 ²	Bueno
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	≤10 ²	Bueno

Fórmulas

Caldo Mueller Hinton

Ingredientes	Gms / Litro
• Polvo de extracto de carne	2,0 g
• Ácido Recopilación de caseína	17.5 g
• Almidón	1,5 g

BBL™ Müller Hinton Broth

Modo de Preparación de Deshidratados Producto

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

Difco™ Mueller Hinton Broth - 21 g;

BBL™ Mueller Hinton Broth - 22 g.

Mezclar bien.

2. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para completamente disolver el polvo.
3. Autoclave a 116-121 ° C durante 10-15 minutos (consulte producto etiqueta). No sobrecaliente.
4. Compruebe preparó medio para asegurar el pH final es de $7,3 \pm 0,1$ a 25 ° C.
5. Las muestras de ensayo del producto acabado para el rendimiento utilizando, cultivos de control típicos estables.

Procedimiento

Para una discusión completa en caldo de dilución antimicrobiana las pruebas de sensibilidad, se refieren a los procedimientos apropiados esbozados en el referencias.2-5

Organismos de subcultivarse primero deben aislarse en puro cultivo en un medio sólido apropiado. Crecimientos Traslado desde el medio de aislamiento a caldo Mueller Hinton utilizando técnicas estándar bacteriológicos.

Para fines de enriquecimiento, inocular la muestra en medios primarios y, a continuación en el caldo, de acuerdo con recomendado procedimientos.

Incubar los tubos a 35 ° C en condiciones apropiadas para el organismo que se cultivó.

Resultados esperados

Para la dilución de caldo de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, consulte referencias apropiadas para results.2, 5

Crecimiento en medios de caldo se indica por la presencia de turbidez en comparación con un control sin inocular

Fuente:

- Himedia laboratoriae. Disponible en sitio web. https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/275710.pdf
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Approved Standard: M7-A7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. CLSI, Wayne, Pa.
- Murray, Baron, Jorgensen, Landry and Pfaller. 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Koneman E. (2008). Diagnóstico Microbiológico Texto y atlas en color. México: Médica Panamericana.

PREPARACIÓN PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS; Citrato, SIM, UREA, LIA, TSI.

Agar de Citrato Simmons M099 (ANEXO 10)

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

Composición:

Ingredientes	g / Litro
• Fosfato nonoamónico	1,000
• Sulfato de magnesio	0,200
• Fosfato dipotásico	1,000
• Citrato de sodio	2,000
• Cloruro de sodio:	5,000
• Agar	15:00
• Azul de bromotimol	0,080
pH final	a 25 ° C) 6,8 ± 0,1
Fórmula ajustada, normalizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento.	

Direcciones

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

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

Principio e interpretación

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

Inicialmente el medio de citrato fue desarrollado por Koser que contiene sal de amonio (1) como la única fuente de nitrógeno y citrato como única fuente de carbono para la diferenciación de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* mediante pruebas IMViC.

Más tarde Simmons modifico formulación Kosers mediante la adición de agar y bromo azul de timol (3). Se recomienda por APHA.

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

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

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

Control de calidad

Apariencia. Crema a amarillo polvo fluido homogéneo

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

El color y la claridad del medio preparado

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

Reacción La reacción de 2,43% w / v solución acuosa a 25 ° C. pH: 6,8 ± 0,2

pH 6,60-7,00

Respuesta Cultural

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

Organismo	Inóculo(cfu)	Crecimiento	Citrato utilización
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	50-100	Buena exuberante	Reacción positivo, color azul
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50 - 100	inhibido	
<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	50-100	buena exuberante	Reacción positivo, color azul
<i>Salmonella Typhi</i> ATCC 6539	50-100	regular - buena	Reacción negativo , color verde
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	50-100	Buena exuberante	Reacción positivo, color azul
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	50-100	Inhibido	Reacción negativo color verde

Almacenamiento y caducidad

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

Fuente:

- Himedia. Disponible en <http://www.himedialabs.com/TD/M099S.pdf>
- MacFaddin J., 1985, Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore.

ANEXO 11

SIM Motilidad Medio, Modificado.

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

Ingredientes	Gms/Litro
Pancreático digestión de la caseína	20.000
Péptica compendio de tejido animal	6.100
Sulfato de amonio ferroso	0,200
El tiosulfato de sodio	0,200
Agar	3.500
El pH final (a 25 ° C)	7,3 ± 0,2
Fórmula ajustado, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento.	

Direcciones

Suspender 30,0 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta hervir para disolver el medio completamente. Dispense en tubos. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Permita que los tubos se enfríen en posición vertical.

Principio e interpretación

Medio SIM se recomienda por la FDA BAM, 1.998 para diferenciar bacilos entéricos particularmente *Salmonella* y *Shigella* sobre la base de la producción de sulfuro, formación de indol y la motilidad Jordania y Victorson reportaron que *la Salmonella Paratyphi A* y *Paratyphi B* se pueden distinguir sobre la base de la producción de H₂S usando acetato de plomo. Sulkin y Willett utilizaron triple azúcar hierro agar con 1% de agar para la motilidad, junto con la producción de H₂S y la fermentación de carbohidratos. Sosa (5) se describe un medio de peptona con baja agar para la motilidad y la determinación de indol.

Motilidad, indol y de producción de sulfuro de pruebas se utilizan para diferenciar los miembros de Enterobacterias. Medio SIM combina estas tres características diferenciales en un solo medio. Hierro peptonizado y tiosulfato de sodio son los indicadores de producción de H₂S. Este H₂S reacciona con el hierro peptonizado para formar un precipitado negro de sulfuro de hierro. *Salmonella* son H₂S positivo y *Shigella* son negativos H₂S. Organismos móviles intensifican la reacción H₂S. Organismos móviles crecen lejos de la línea de la

inoculación con un crecimiento difuso mientras que los organismos no móviles crecen a lo largo del stabline. Motilidad de detección es posible debido a la naturaleza semisólida de la media. Salmonella es móvil, mientras que *Shigella* son no móviles. El triptófano, desde péptica resumen de tejido animal, es degradado por bacterias específicas para producir indol. El indol se detecta mediante la adición de reactivos químicos que siguen al período de incubación.

Inocular cultivo fresco con una solo pinchazo, utilizando aguja recta por el centro del medio. Después de la incubación, se observa la motilidad (crecimiento difuso hacia fuera, turbidez en todo el medio) y para la producción de H₂S (ennegrecimiento del medio). Para detectar la producción de indol, se añade tres o cuatro gotas de reactivo de Kovacs y se observa para el desarrollo del color rojo (reacción positiva). Se Determina la motilidad y la producción de H₂S antes de la determinación de la producción de indol.

Aparición. Crema a beige polvo fluido homogéneo

Gelificante. Semisólida, comparable con 0,3% de agar gel.

Organismo	inóculo (CFU)	Crecimiento	Motilidad	Indol Adición de Kovac	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50-100	exuberante	positivo, el crecimiento desde la línea del pinchazo causando turbiedad	reacción positiva, anillo rojo en la interfaz del medio	reacción negativa
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	50-100	exuberante	negativo, el crecimiento a lo largo de la línea del pinchazo y su alrededor sigue siendo clara	Reacción negativa	reacción negativa
<i>Salmonella Paratyphi A</i> ATCC 9150	50-100	exuberante	positivo, el crecimiento desde la línea del pinchazo causando turbiedad	Reacción negativa	reacción negativa
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	50-100	exuberante	negativo, el crecimiento a lo largo de la línea del pinchazo y su alrededor sigue siendo clara	Reacción negativa	reacción negativa

Reacción .La reacción de 3,0% w / v solución acuosa a 25 ° C. pH: 7,3 ± 0,2 pH 7,10-7,50

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

Fuente:

- Himedia laboratorie disponible en; sitio web:
<http://www.himedialabs.com/TD/M181F.pdf>
- FDA, U.S. 1998. Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. Gaithersburg, MD: AOAC International
- MacFaddin, J. F. 1985. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins.

ANEXO 12

UREA AGAR BASE, CHRISTENSEN

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

Composición:

Ingredientes	Gms / Litro
• Digerido péptico de tejido animal	1,000
• Dextrosa	1,000
• El cloruro de sodio	5,000
• Fosfato disódico	1,200
• Fosfato monopotásico	2,000
• Rojo Fenol	0,012
• Agar	15.000
• El pH final (a 25 ° C)	6,8 ± 0,2
Formula ajustada normalizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento	

Principio e interpretación. Agar de Urea se utiliza para detectar la producción de ureasa. Agar de Urea descrito por Christense detecta actividad de la ureasa por todos los organismos *Proteus* rápidamente ureasa positiva y también por otros miembros de Enterobacterias (1) que exhiben una ureasa retardada de reacción. Esto se logró mediante:

- a) la adición de glucosa al medio
- b) disminuyendo la concentración de peptona y
- c) la disminución de la sistema de taponamiento, como un medio menos tamponada detecta incluso más pequeña cantidad de álcali.

Péptica recopilación de tejidos animales es la fuente de nutrientes esenciales. La dextrosa es la fuente de energía. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio, mientras que los fosfatos sirven para amortiguar el medio. La urea se hidroliza para liberar amoníaco. Indicador rojo de fenol detecta la alcalinidad generada por el cambio de color visible desde el naranja al rosa.

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

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

Control de calidad

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

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

El color y la claridad del medio preparado

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

Reacción. La reacción de 2,4% w / v solución acuosa a 25 ° C. pH: 6,8 ± 0,2 **pH** 6,60-7,00

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

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Ureasa
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	50 – 100	Exuberante	reacción negativa, ningún cambio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50 – 100	Exuberante	reacción negativa, ningún cambio
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13883	50 – 100	Exuberante	reacción positiva, color cereza
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	50 – 100	Exuberante	reacción positiva, color cereza

Almacenamiento y caducidad

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

Fuente:

- Himedia laboratorie disponible en. Sitio web: <http://himedialabs.com/TD/M112.pdf>
- Christensen W. B., 1946, J. Bacteriol., 52:461.
- MacFaddin J. F., 2000, Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3rd Ed.

ANEXO 13

AGAR DE LISINA DE HIERRO M377

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

Composición:

Ingredientes	Gms / Litro
• Digerido péptico de tejido animal	5,000
• Extracto de Levadura	3,000
• Dextrosa	1,000
• L- lisina	10.000
• Citrato de amonio férrico	0,500
• Tiosulfato de Sodio	0,040
• Purpura de bromocresol	0,020
• Agar	15.000
• El pH final (a 25 ° C)	6,7 ± 0,2
Fórmula ajustada, normalizada para adaptarse a los parámetros de rendimiento.	

Principio e interpretación

Agar de lisina de hierro fue desarrollado por Edwards y Fife (1) para detectar la fermentación de la lactosa *Salmonellae*. *Salmonellae* es conocida para descarboxilar la lisina rápidamente y producir grandes cantidades de sulfuro de hidrógeno. Este medio es un medio sensible para la detección de fermentación de la lactosa y las especies de *Salmonella* que no fermentan la lactosa.

Muchas cepas de este grupo fermentan la lactosa muy rápidamente por lo tanto suprimen la producción de H₂S en triple azúcar hierro Agar (M021). Así que hay una posibilidad de que los organismos frecuentes en brotes de intoxicación alimentaria pueden ser pasados por alto. Thatcher y Clark (4) describen el aislamiento de especies de *Salmonella* de los alimentos de agar selectivo y para inocular en Agar de lisina de hierro y Triple Azúcar Hierro (M021)

juntos. Usando estos dos medios de comunicación con mayor discriminación se puede hacer entre organismos coliformes por ejemplo, *Escherichia* y *Shigella* (5, 6).

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

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

Los organismos que desaminan lisina, forma ácido alfa - cetocarboxílico, que reacciona con sal de hierro cerca de la superficie del medio de bajo la influencia del oxígeno para formar el compuesto de color marrón rojizo. El medio es apuñalado hasta la base de la culata y el veteado de inclinación.

Direcciones

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

Control de calidad

Aparición.

Amarillo claro a grisáceo polvo suelto homogénea amarilla

Gelificante.

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

El color y la claridad del medio preparado

De color púrpura, claras a forma un gel ligeramente opalescente en tubos como sesgos

Reacción.

La reacción de 3,45% w / v solución acuosa a 25 ° C. pH: 6,7 ± 0,2

pH 6,50-6,90

Almacenamiento y caducidad

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

Respuesta Cultural

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

Organismo	Inóculo (CFU)	Crecimiento	Extremo	Inclinación	H2S
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	50-100	exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
<i>Escherichia Coli.</i> ATCC 25922	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	50-100	exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	color rojo oscuro, desaminación de lisina	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
<i>Salmonella Arizonae</i> ATCC 13314	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	50-100	exuberante	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	50-100	exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción alcalina, púrpura o sin ningún cambio de color	

Fuente:

- Himedia laboratorie disponible en sitio web : <http://himedialabs.com/TD/M377.pdf>
- Edward P.R. and Fife M.A., 1961, Appl. Microbiol., 9:478.
- Moeller V., 1954, Acta Pathol. Microbiol. Scand., 355:259.
- Ewing W.H., Davis B.R. and Edward P.R., 1960, Pub. Hlth. Labs, 18:77.
- Thatcher F.S. and Clark D.S., 1968, University of Toronto Press, p. 100.

ANEXO 14

TRIPLE AZÚCAR HIERRO AGAR TSI.

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

Principio e Interpretación

Agar de hierro de triple azúcar fue propuesto originalmente por Sulkin y Willett (1) y modificado por Hajna para la identificación de enterobacterias. Este medio cumple con las recomendaciones de la APHA, para el examen de la carne y los productos alimenticios (3), para el examen de la leche y los productos lácteos y para la prueba de límite microbiano para confirmar la presencia de *Salmonella* y en la identificación de bacilos gram-negativo

Comité ISO y BIS ha recomendado una ligera modificación para la identificación de *Salmonella*. BPI ha recomendado el medio (M021S) para la detección de *Escherichia coli* y *Vibrio*.

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

El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. Lactosa, sacarosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. Sodio iones tiosulfato y férricos o ferrosos hacen del sistema indicador de H₂S. Rojo fenol es el indicador de pH. Los organismos que fermentan la glucosa producen una variedad de ácidos, convirtiendo el color del medio de rojo a amarillo. Más cantidad de ácidos se liberan en el fondo (fermentación) que en la inclinación (respiración). Bacterias que crecen también forman productos alcalinos del oxidativo descarboxilación de peptona y estos productos alcalinos neutralizan las grandes cantidades de ácido presente en el fondo. Por lo tanto, la aparición de un alcalino (rojo) de inclinación y un ácido (amarillo) a tope después de la incubación indica que el organismo es fermentador de glucosa pero es incapaz de fermentar la lactosa y / o sacarosa. Las bacterias que fermentan la lactosa o sacarosa (o ambos), además de glucosa, producen grandes cantidades de ácido. Por lo tanto no reversión de pH en esa región es posible y por lo tanto las bacterias presentan una inclinación ácido y tope ácido. La producción de gas (CO₂) se detecta por la presencia de grietas o burbujas en el medio, cuando el acumulado tiene escapes de gas. Tiosulfato se reduce a sulfuro de hidrógeno por varias especies de bacterias y H₂S se combina con los

iones férricos de sales férricas para producir el precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso. La Reducción de tiosulfato procede sólo en un ambiente con medio ácido y el ennegrecimiento ocurre generalmente en el extremo del tubo. Triple Azúcar Agar Hierro se debe utilizar en paralelo con Urea Agar / Caldo (M112 / M111) para distinguir entre Salmonella y Proteus especie. Las reacciones se pueden resumir como sigue:

Alcalina inclinación / ácido a tope Sólo glucosa fermentada

Acido inclinación / ácido a tope glucosa y sacarosa fermentadas o glucosa y la lactosa fermentadas o los tres azúcares, glucosa, lactosa y sacarosa fermentado.

Burbujas o grietas presente- la producción de gas

Negro presente- precipitado H₂S producción de gas

Algunos miembros de las enterobacterias y algunas productoras de H₂S Salmonella pueden no ser H₂S positivo sobre TSI Agar. Algunas bacterias pueden mostrar producción de H₂S en Kligler Hierro Agar pero no en TSI Agar. Esto puede ocurrir debido a la utilización de los sacarosa en TSI Agar suprime la vía enzimática que da lugar a la producción de H₂S

Composición:

Ingredientes	Gms / Litro
Peptona	20.000
Extracto de carne	3.000
Lactosa	10,000
La sacarosa	10,000
Dextrosa	1000
El cloruro de sodio	5,000
Sulfato ferroso, heptahidrato	0.200
Tiosulfato de sodio, pentahidratado	0.300
Rojo de fenol	0,024
Agar	12.000
El pH final (a 25 ° C)	7,4 ± 0,2

Fórmula ajustado, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento

Direcciones

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

Control de calidad

Aparición. Amarillo claro a rosa polvo suelto homogénea de color

Gelificante. Firme, comparable con el 1,2% en gel de agar.

El color y la claridad del medio preparado. Formas de color rojo rosado claro a ligeramente opalescente gel en tubos como sesgos

Reacción. La reacción de 6,43% w / v solución acuosa a 25°C. pH: 7,4 ± 0,2.

Respuesta Cultural. Observados después de una incubación a 35 - 37 ° C durante 18-24 horas.

Organismo	Inóculo	Crecimiento	Inclinación	Extremo	Gas	H2S
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	50 – 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	50 – 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50 – 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	50 – 100	Exuberante	reacción ácida, color amarillento en el medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción positiva	reacción negativa, no ennegrecimiento de medio
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	50 – 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento en el medio	Reacción negativa	reacción positiva, ennegrecimiento de medio
<i>Salmonella Typhi</i> ATCC 6539	50 – 100	Exuberante	reacción alcalina, color rojo del medio	reacción ácida, color amarillento	Reacción negativa	reacción positiva, ennegrecimiento de medio

Almacenamiento y caducidad

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

Fuente:

- Himedia Laboratorie disponible en sitio web
<http://www.himedialabs.com/TD/M021S.pdf>
- Vanderzant C. and Splittstoesser D., (Eds.), 1992, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. APHA, Washington D.C.
- Marshall R. (Ed.), 1992, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th ed., APHA, Washington., D.C.

FASE ANALÍTICA

ANEXO 15

PROTOCOLO PARA EL DESARROLLO DE CEPA CONTROL *Escherichia coli* ATCC 25922.

Reconstitución de la Bacteria.



1.- Retire el vial sin abrir LYFO DISCO de 2C al almacenamiento 8C y deje que el frasco sin abrir se equilibre a la temperatura ambiente.



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



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



4.- Aplastar la píldora con la esponja de asterile hasta que la suspensión es homogénea, inmediatamente pesada saturar el mismo hisopo con el material hidratado y traslado al medio de agar



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



6.- Utilizando un asa estéril, rayar para facilitar el aislamiento de colonias



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



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

CRIOCONSERVACIÓN DE *E coli* ATCC 25922

- Luego de reconstituida la cepa se colocó 1ml de Glicerina al 50% (conservante) y 1ml de la cepa control.
- Se mezcló e inmediatamente se llevó a una refrigeradora a -80°C para su posterior uso.

Fuente:

- Cepa control ATCC disponible en sitio web:
<https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjZtqWhneTJAhXLRiYKHSeNAVUQFggfMAA&url=https%3A%3A>

2F%2Fwww.atcc.org%2F~%2Fps%2F25922.ashx&usg=AFQjCNFf0814ixtU1PXeWbl5
TfK_RXwqUQ&bvm=bv.110151844%2Cd.dmo

- References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.
- Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ANEXO 16

PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE UROCULTIVO.

El número de microorganismos aislados por milímetro en el urocultivo puede ayudar en el diagnóstico diferencial de las IU. Las asas están calibradas para cargar un volumen conocido de líquido cuando se manipulan en forma correcta, lo que permite que el microbiólogo calcule el número de microorganismos presentes en la muestra original de acuerdo con las UFC desarrollados en los cultivos.

SIEMBRA. La técnica para el aislamiento comienza preparando un inóculo de siembra, que consiste en colocar una pequeña cantidad de la muestra en el medio o en los medios de cultivo adecuados, en función de las especies microbianas que se espera encontrar.

Técnica de Kass: Método del asa calibrada

- ✓ Se flamea un asa calibrada de alambre y se la deja enfriar sin tocar ninguna superficie
- ✓ Se mezcla la orina sin centrifugar en su propio recipiente
- ✓ Se inserta el asa en sentido vertical en la orina para permitir que esta se cargue en ella, estriar en línea recta y luego zig-zag, en los medios seleccionados MACCONKEY y AGAR SANGRE
- ✓ Se incuban las cajas durante 24-48 horas a 35-37 °C
- ✓ Se cuentan las colonias de cada placa, El número de UFC.

INTERPRETACIÓN. Luego de haber incubado las muestras durante 24 a 48 horas se cuenta el número de colonias desarrolladas y el resultado se multiplican por 1.000 (si se usó un asa de 0,001mL) o por 100 (si se usó un asa de 0,01mL) para determinar la cantidad de microorganismos por milímetro en la muestra original. Se hace el respectivo reporte de resultados informándolos de la siguiente manera:

- ♦ No hubo crecimiento bacteriano
- ♦ Menos de 10 000 UFC/MI.
- ♦ Entre 10 000 y 100 000 UFC/ml y Más de 100 000 UFC/ml

Fuente:

- Bailey & Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Médica Panamericana .S.A
- Koneman E. (2008). Diagnóstico Microbiológico Texto y atlas en color. México: Médica Panamericana.

ANEXO 17

PROTOCOLO PARA TINCIÓN DE GRAM.

Se utiliza tanto para referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana.

Reactivos.

Violeta de genciana.	Solución de Lugol	Decolorante	Fucsina diluida
✓ Violeta de genciana: 1g ✓ Acido fénico 25g. ✓ Alcohol absoluto: 10 ml ✓ Agua destilada: 100 ml	✓ Yodo: 1g. ✓ Yoduro potásico: 2g. ✓ Agua destilada: 300 ml	✓ Alcohol de 96 ° 70ml ✓ Acetona 30ml	✓ Fucsina de Ziehl: 10ml ✓ Agua destilada: 90ml

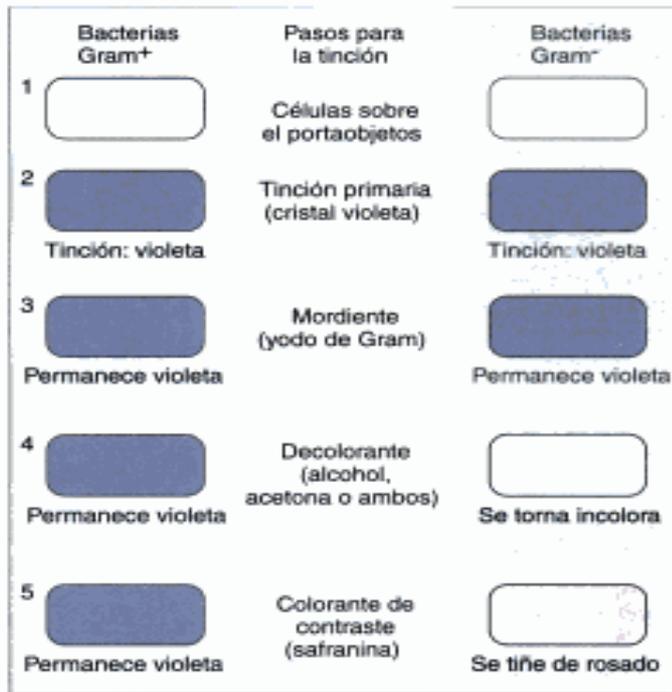
Técnica.

1. Fijar el material sobre el portaobjetos con calor dejar que se enfríe antes de aplicar el colorante.
2. Cubrir la preparación con violeta de genciana y dejar actuar un minuto.
3. Lavar con agua.
4. Cubrir la preparación con lugol y dejar actuar un minuto
5. lavar con agua
6. Decolorar con alcohol cetona por 30 segundos.
7. Cubrir la preparación con fucsina diluida y dejar actuar por 30 segundos, si se utiliza safranina dejar actuar por un minuto.
8. Lavar con agua.
9. Secar a temperatura ambiente y observar con objetivo de inmersión.

Resultados.

- Las bacterias Gram positivas se observan de color violeta.
- Las Gram negativas de color rosa.

Ejemplo *E. coli*. Bacilo Gramnegativo.



Fuente:

- Bailey & Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Medica Panamericana .S.A
- Álvarez, Bouquet & I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A

ANEXO 18

PROTOCOLO PARA PRUEBA DE OXIDASA.

OXISTRIPS™ TIRAS DE OXIDASA

RESUMEN

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

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

OxiSticks™ oxidasa hisopos son hisopos que contienen reactivos impregnados en la punta del hisopo para facilitar su uso.

FÓRMULA DE REACTIVOS

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

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

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

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

Este producto tiene la siguiente vida útil de la fecha de fabricación: 365 días:

PRECAUCIONES

Este producto puede contener componentes de origen animal. Certificado de conocimientos sobre el origen y / o el estado sanitario de los animales no garantiza la ausencia de agentes

patógenos transmisibles. Por lo tanto, se recomienda que estos productos pueden tratar como potencialmente infecciosos y manipularse siguiendo las precauciones universales de sangre habituales. No ingerir, inhalar, o permitir que entre en contacto con la piel.

Este producto es sólo para uso diagnóstico in vitro y es para ser utilizado sólo por personal de laboratorio adecuadamente formados y cualificados. Observe las precauciones de seguridad y utilizar técnicas asépticas. Todas las muestras de laboratorio deben ser consideradas infecciosas y manejados de acuerdo a las "precauciones estándar". La "Guía para Precauciones de Aislamiento" está disponible en los Centros de Control y Prevención de Enfermedades en www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation.html.

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

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

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

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

PROCEDIMIENTO

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

Modo de empleo:

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

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

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

LIMITACIONES

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

El uso de hierro nicrom o de otro tipo que contenga dispositivos de inoculación puede causar reacciones de falsos positivos.

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

La mayoría de *Haemophilus spp*. Son oxidasa-positivo. Tiras o reactivos de prueba oxidasa Menos sensibles pueden dar resultados falsos negativos. Consultar referencia que figura para más información. (7)

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

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

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

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

Consulte la sección "Limitaciones de los procedimientos y de garantía" de documentos en el sitio web Hardy de diagnóstico Documento Técnico para más información.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

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

USUARIO CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que cada nuevo lote o envío de reactivo de la prueba con controles positivos y negativos conocidos. (3,8)

APARIENCIA FÍSICA

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

- ✓ *Pseudomona aeruginosa* (ATCC ® 27853) aplicada a un OxiStrip™ (Cat. N. Z93). El desarrollo de un color azul / morado dentro de 10-20 segundos era indicativo de una reacción positiva a la oxidasa.
- ✓ *Escherichia coli* (ATCC 25922 ®) aplicado a un OxiStrip™ (Cat. N. Z93). Sin el desarrollo de un color azul / morado dentro de 10-20 segundos era indicativo de una reacción oxidasa negativo.

CONTROL DE CALIDAD

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

Microorganismo	Reacción
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC ® 27853	Oxidasa-positivo; de color azul / morado se desarrolla dentro de 10-20 segundo
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 25922	Oxidase-negative; no color

Fuente:

- Catálogo de Hardy diagnostics disponible en: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/product/z93-oxistrips-oxidase-test-25-paper-strips-per-package-by-hardy-diagnostics-test-disks-strips-reagent

- Jean. F. MacFarddin. (2003). Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia clínica. Estados Unidos: Médica Panamericana.

ANEXO 19

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN *E. coli*: CITRATO, SIM, UREA, LIA, TSI. (Procedimiento)

1.) **CITRATO AGAR SIMMONS.** Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante

Procedimiento de siembra

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

Siembra por estría:

En superficie inclinada se introduce el ansa en el tubo que contiene el medio, se desliza el asa en movimiento de zig-zag (en pico de flauta)

- ✓ Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el ansa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar los tubos y observar si existe crecimiento bacteriano y cambio de color en el medio.

Interpretación.

- ✓ *Escherichia Coli* citrato negativo (-) no cambia de color

Fuente:

- Bailey & Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Medica Panamericana .S.A
- Álvarez, Bouquet & I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A.

- López, L., & Torres, C., (2006). *Identificación de Bacterias*. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias Microbiología General- Carrera Farmacia. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp6.pdf>

2.) AGAR SIM (Motilidad, Indol, sulfuro de hidrogeno).

Determinar si un organismo es móvil o inmóvil si es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contiene azufre produciendo una reacción visible de color negro y por último la capacidad de desdoblar el indol de la molécula triptófano,

Procedimiento de siembra

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

Siembra por punción:

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

RESPUESTA DEL CULTIVO

Observadas, después de una incubación a 35-37 ° C durante 18-24 horas

Interpretación de resultados:

Sulfuro de hidrógeno: negativo reacción, no se observa ennegrecimiento. La bacteria no produce sulfuro. ejm *Escherichia coli*.

Indol: Prueba positiva: color rojo fucsia en la interface del reactivo y el medio. Indol positivo: La producción de indol se verifica luego de la incubación mediante el agregado de 15 gotas del reactivo de Kovac. Este reactivo contiene p-dimetilaminobenzaldehído que forma un complejo de color rojo con el indol.

Movilidad: Prueba positiva: Se visualiza turbidez parcial del medio.

Escherichia coli: Crecimiento exuberante, motilidad positiva,

Indol positivo; H₂S negativo (-)

Fuente:

- Bailey & Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Médica Panamericana .S.A
- Álvarez, Bouquet & I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A.
- Jean. F. MacFaddin. (2003). Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia clínica. Estados Unidos: Médica Panamericana.

3.) UREA AGAR BASE, CHRISTENSEN. Determinar la capacidad de un microorganismo para desdoblar la urea en amoníaco y CO₂ por acción de la enzima ureasa.

Procedimiento de siembra

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

Siembra. Picar y estría:

En superficie inclinada se introduce el asa en el tubo que contiene el medio; desde el fondo y en progresión ascendente se desliza el ansa en movimiento de zig-zag (Picar y se estría).

- ✓ Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar los tubos y observar si existe crecimiento bacteriano.

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

Urea positivo: aparece un color rojo. La bacteria produce ureasa. Ej: En las especies de *Proteus* el medio se alcaliniza poco después de la inoculación, por lo tanto sus resultados deben ser leídos en las primeras 2-6 horas, mientras que *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* tienen actividad ureasa dentro de las 24-48 horas de incubación.

Urea negativo: el medio permanece amarillo. La bacteria no posee ni produce la enzima ureasa. Ej: *Escherichia coli* y *Shigella*. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

Resultado *E. coli*: crecimiento presenta colonias pequeñas blanquecinas, color del medio amarillo sin cambio de color (-); ***Proteus*.** Ureasa positiva (+)

Fuente:

- Bailey & Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Médica Panamericana .S.A
- Jean. F. MacFaddin. (2003). Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia clínica. Estados Unidos: Médica Panamericana.

4.) HIERRO AGAR Lisina (LIA). Mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina.

Procedimiento de siembra

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

Siembra. Picar y estriar:

En superficie inclinada se introduce el ansa en el tubo que contiene el medio; desde el fondo y en progresión ascendente se desliza el ansa en movimiento de zig-zag (Se estría).

- ✓ Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el ansa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar los tubos y observar si existe crecimiento bacteriano.

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

A: Reacción acida. Color amarillo

K: Reacción alcalina. Color violeta

R: Reacción alcalina: color rojo

K/K: Descarboxilación lisina, prueba positiva, tendido violeta/fondo violeta

K/A: Fermentación glucosa. Descarboxilación lisina, prueba negativa tendido violeta/ fondo

amarillo

R/A: Desaminación lisina. Fermentación glucosa. Tendido rojizo/fondo amarillo sucede con cepas del género *Proteus*

Producción de ácido sulfhídrico: -Prueba positiva: Ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del Tendido y fondo)

E coli: Crecimiento Abundante, colonias pequeñas, fondo del medio alcalino, sin cambio de color (K) y pico de flauta alcalino sin cambio de color (k) color purpura., **H₂S negativo (-)**

Fuente.

- Koneman, E.(2008). Diagnóstico Microbiológico .Madris España: Panamericana S.A.

5.) TRIPLE AZÚCAR HIERRO AGAR (TSI). Determinar las fermentaciones de hidratos de carbono y producción de gas y de sulfhídrico.

Procedimiento de siembra

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

Siembra. Picar y estría:

En superficie inclinada se introduce el asa en el tubo que contiene el medio; desde el fondo y en progresión ascendente se desliza el asa en movimiento de zig-zag (Se pica en el fondo y se estría).

- ✓ Se tapan los tubos en los que se ha realizado la siembra, esterilizar el asa e incubarlos a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.
- ✓ Retirar los tubos y observar si existe crecimiento bacteriano.

RESPUESTA DEL CULTIVO

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

Interpretación

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

- La aparición de un alcalino (rojo) de inclinación y un ácido (amarillo) a tope después de la incubación indica que el organismo es fermentador de glucosa pero es incapaz de fermentar la lactosa y / o sacarosa.

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

A: Reacción acida. Color amarillo

K: Reacción alcalina. Color rojo naranja.

K/A: Tendido rojo/fondo amarillo) .Fermentación de glucosa,

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

K/K: Tendido alcalino/fondo alcalino (Tendido rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.

Burbujas o ruptura del medio de cultivo: indica que el microorganismo produce gas.

Un precipitado negro en el agar: indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

Resultado. *E. coli*: Crecimiento abundantes colonias pequeñas en el fondo presenta color amarillo y pico de flauta color amarillo, gas positivo (+), **H₂S** (-).

Fuente:

- Álvarez, Bouquet I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A.
- Jean. F. MacFarddin. (2003). Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia clínica. Estados Unidos: Médica Panamericana.

ANEXO 20

DETERMINACIÓN DE LA CMI MEDIANTE LA TÉCNICA DE MACRODILUCIÓN.

	Técnica de CMI por macrodilución	
MATERIALES	<ul style="list-style-type: none"> Hisopos estériles , Tubos de ensayo, Puntas plásticas, pipetas Medio de cultivo Müller-Hinton en caldo. CMI del 2015 Ampicilina $S \leq 8$ I 16 y $R \geq 32$ ug/ml (manual de CLSI) 	<p>EQUIPO</p> <ul style="list-style-type: none"> Incubadora Turbidímetro. McFarland Cámara de bioseguridad Mechero bunsen
<p>1. Preparación de las concentraciones.</p> <p>El número de tubos de cada serie estará condicionado por las diferentes concentraciones de cada fármaco a investigar.</p> <p>Los antimicrobianos deben proceder de las firmas comerciales y tener un título de actividad en sustancia pura conocida ug/ml y las diluciones de cada serie se efectuaran en caldo Müller Hinton.</p> <p>2. PROCEDIMIENTO.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar cultivos de 18horas de las bacterias a estudiar en Agar Müller Hinton 2. Inocular una colonia aislada en 4ml de solución salina estéril (previa esterilización en autoclave) Ajustar la turbidez con la solución hasta una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland. 3. Preparar 15 tubos de los cuales 1tubo con 2 ml de caldo Müller Hinton y 14 tubos restantes con 1ml de caldo Müller-Hinton 4. Preparar una solución madre de antibiótico a una concentración de 16.384 ug/ml 5. Añadir 250 ul de la solución madre de antibiótico al tubo que contiene 2ml de caldo Müller-Hinton; en este caso se deberá retirar 250ul de caldo y reemplazar por 250 de la solución madre; (quedando una concentración de este tubo = 16,384 ug/ml. A partir de este tubo, preparar diluciones dobles seriadas, al sacar 1 ml del tubo 1, queda en el mismo 8192 ug/ml) y transfiriéndolo y al segundo que hay 1ml de Müller se diluye (la concentración de antibiótico de este tubo será de 4096 ug/ml). Después de mezclar bien todo el contenido del segundo tubo, luego al transferir 1ml al tercer tubo (es de 2048 ug/ml) y así sucesivamente hasta el tubo 15, en este último tubo quedan 2ml por lo que se descarta un ml quedando todos los 15 tubos con 1 ml. De esta manera habremos obtenido diluciones dobles del antibiótico desde 8192 ug/ml hasta 0,50 ug/ml 6. Añadir a los 15 tubos que contiene el antibiotico1ml del inculo la bacteria preparado que contiene aproximadamente 106 UFC/ml. Las concentraciones finales de antibiótico es de 4096 ug/ml hasta 0,25ug/ml. 7. CONTROL NEGATIVO. Caldo Müller Hinton. 8. CONTROL POSITIVO. Caldo más la bacteria. 9. Incubar los tubos de las diluciones durante 18horas a 37°C. al día siguiente leer los resultados y calcular la CMI. 10. Para confirmar CMI, se debe desarrollar la CMB, para lo cual a partir del tubo que presento turbidez, los 2 tubos siguientes que no presentaron turbidez, inoculará en una placa de MacConkey. Incubar las placas 18 horas a 37°C. luego verificar el crecimiento de colonias en las placas ;el inculo que no creció es la CBM y la que hubo crecimiento es la CMI 		

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Los resultados de la CMI pueden ser interpretados en las categorías de sensible, intermedio o resistente de acuerdo a la CLSI del 2015
- Se considera CMB como la menor concentración de antibiótico cuyo subcultivo produce un número de colonias menor al 0,1% del inóculo original

Fuente:

- Bailey & Scott. (2007). Diagnóstico microbiológico. Madrid España: Medica Panamericana.
- Álvarez, Bouquet I de Fez. (1995). Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Quito-Ecuador: Garsi S.A.
- Stephen J. Cavalieri. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. 12, Agosto.2015, de Library of Congress Cataloging-in-Publication. Sitio web: http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf
- Malbrán, Carlos. (2012). Método de Terminación de Sensibilidad antimicrobiana por dilución. Agosto 6,2015, de Clinical and Laboratory Standards Institute Sitio web: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04>

ANEXO 21
REGISTRO INTERNO DE LABORATORIO

		MEDIOS DE CRECIMIENTO				PRUEBAS BOQUÍMICAS								MICROORG A-NISMO AISLADO	
Nro	NOMBRES Y APELLIDOS	AGAR MACCONKEY	AGAR SANGRE	UFC/ml	GRAM	CITRATO	SIM-INDOL			LISINA	TSI	UREA	OXIDASA		
							motilidad	indol	SH2						
1		Colonias rosadas y secas y limitadas.	Colonias blanquecinas redondeadas , pequeñas	+ 100.000 0	Bacilos Gram negativos	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	A/A	Gas (+)	(-)	(-)	<i>Escherichia coli</i>
2		Colonias rosadas grandes mucoides	Colonias blanquecinas , mucoides	+ 100.000	Bacilos Gram negativos	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	A/A	Gas (++)	(+)	(-)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3		Colonias grandes , mucosas olor a fermentación	Colonias blanquecinas, olor uvas fermentadas	+ 100.000	Bacilos Gram negativos	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	k/k	Gas (-)	(-)	(+)	<i>Pseudomona</i>
4		No hubo crecimiento	Colonias blancas pequeñas	- 100.000	Cocos Gram positivos										

ANEXO 22

REGISTRO DE LOS RESULTADOS DE LA CONCENTRACIONES DE AMPICILINA FRENTE A *E. coli* spp POR EL MÉTODO DE MACRODILCIÓN TRIPLICADO.

Resultados de la concentración mínima inhibitoria de ampicilina obtenidos por el método de macrodilución frente a <i>Escherichia coli</i>																							
CMI																				CMB			
Fecha	Nombre	N R	TC-	T1 4096 µg/ml	T2 2048 µg/ml	T3 1024 µg/ml	T4 512 µg/ml	T5 256 µg/ml	T6 128 µg/ml	T7 64 µg/ml	T8 32 µg/ml	T9 16 µg/ml	T10 8 µg/ml	T11 4 µg/ml	T12 2 µg/ml	T13 1 µg/ml	T14 0.5 µg/ml	T15 0.25 µg/ml	TC+	Nro. tubo	µg/ ml		
07/04/15	Cepa Control ATCC 25922	R1												X						10	8 µg/ml		
		R2													X								
		R3													X								
07/04/15	Elmer José Mora	R1				X														2	2048 µg/ml		
		R2				X																	
		R3				X																	

NR: número de repeticiones

R1: Repetición 1; **R2:** Repetición 2; **R3:** Repetición 3

TC-: Tubo control negativo; **TC+:** Tubo control positivo; **Tubos del 1-15:** corresponde a las diferentes concentraciones de antibiótico.

CMI: Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

CMB: Es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir las bacterias de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

ANEXO 23



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

Of. N^o. 228- CDM- ASH-UNL

Loja, 11 de junio del 2015

Srta.

Irene del Rocío Suquilanda Espinosa

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

Presente.-

La presente tiene la finalidad de CERTIFICAR que:

La Srta. Irene del Rocío Suquilanda Espinosa, procesó 107 muestras de orina en las que realizó urocultivo y sensibilidad mínima inhibitoria de ampicilina, en el Laboratorio Clínico "Centro de Diagnóstico Médico" del ASH desde el 16 de marzo hasta el 05 de junio del 2015, como parte del trabajo de titulación denominado: "Concentración mínima inhibitoria de ampicilina frente a *Escherichia coli* aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada N^o 7. Marzo - julio 2015"

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

Por la atención prestada a la presente antelo mis agradecimientos

Atentamente,


Lic. Carmen Ullauri González
RESPONSABLE DEL CDM.



ANEXO 24



Sr. Crnl. Edison Moreno
DIRECTOR DEL HOSPITAL MILITAR B-7
Ciudad.-

SECCION: Tute Zamborano.
FECHA: 27/07/2015.
Lugar: ITHB.
A: Coordinar con estudiantes.
para exposicion el miércoles
29 07 00 - JUL - 2015 -
Loja, 27 de Julio del 2015.

De mis consideraciones:

Las estudiantes del octavo módulo de la Carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente nos dirigimos muy respetuosamente a Ud. para extenderle un fraterno saludo y a la vez desearle éxitos en sus funciones.

Aprovechando la oportunidad para solicitarle de la manera mas comedida se digne en autorizar el permiso correspondiente para dar cumplimiento al tercer objetivo planteado "Difusión de resultados al personal de Salud", de este prestigioso plantel. Proyecto de tesis denominado: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA, AMIKACINA, CIPROFLOXACINA, CEFUROXIMA, AMPICILINA Y CEFOTAXIMA FRENTE A ESCHERICHIA COLI EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR DE LA CIUDAD DE LOJA.

De acuerdo a lo antes mencionado, desde ya le antelo mis más sinceros agradecimientos. Esperando que la presente tenga su favorable acogida misma que servirá como aporte para el conocimiento de los profesionales y para el beneficio de los pacientes.

Muy atentamente,

- Ana Gabriela Castillo Gonzaga
- Deydamia Andrade Chalaco
- Daniela Alejandra Flores Pasaca
- Ximena Nathaly Granda Briceño
- Liliana del Cisne Jima Solano
- Ximena Lizbeth Lanche Silva
- Irene Rocío Suquilanda Espinosa

ESTUDIANTES DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.

Mercos
5 de agosto
Aulo del HBT
PH Tute Zamborano D.

TRÍPTICO EMPLEADO EN LA SOCIALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

CONCLUSIONES	RECOMENDACIONES	 UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA 1859 AREA DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE LABORATORIO CLINICO TEMA: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA, AMIKACINA, CEFTRIAXONE, CEFUROXIMA, CEFOTAXIMA, GENTAMICINA Y CIPROFLOXACINA FRENTE A ESCHERICHIA COLI AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA NRO. 7 LOJA LOJA- ECUADOR 2015
<p>◆ El desarrollo de métodos estandarizados de susceptibilidad antimicrobiana, a pesar de las dificultades que presentan, constituyen un notable avance en la terapia de infecciones bacterianas, sobre todo las que comprometen la vida del paciente. Actualmente se cuenta con puntos de corte para varios antimicrobianos de uso clínico y para bacterias frecuentemente aisladas de infecciones de vías urinarias.</p> <p>◆ Con la información obtenida de los métodos estandarizados se ha podido detectar cepas intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos y cepas con CIMs más elevadas que lo habitual, asociado a falla terapéutica</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Destacar la prevención y tratamiento adecuado en las infecciones principalmente la de vías urinarias, que este inmerso en el uso de los antibióticos, con charlas educativas dirigidos por profesionales de la salud debidamente aptos y capacitados, y de esta manera evitarla automedicación 2. Actualizar con mayor frecuencia nuevas investigaciones con la finalidad de conocer nuevos datos estadísticos acerca de la resistencia y/o sensibilidad bacteriana a los antibióticos para que tomen en cuenta al momento de prescribir fármacos 	

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ampicilina, amikacina, ceftriaxone, cefuroxima, cefotaxima, gentamicina y ciprofloxacina frente a *Escherichia coli* en pacientes de consulta externa con solicitud de urocultivo del Hospital Militar Brigada Nro. 7 Loja.

Objetivos específicos:

- Realizar urocultivo a partir de muestras de orina de pacientes que acuden a consulta externa que tengan petición de urocultivo en el Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de ampicilina, amikacina, ceftriaxone, cefuroxima, cefotaxima, gentamicina y ciprofloxacina en urocultivos de *Escherichia colispp* en muestras de orina de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja mediante la técnica de macrodilución.
- Difundir los resultados al personal médico del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja.

DEFINICIONES

INFECCION DE VIAS URINARIAS: Se considera como infección del trato urinario a la presencia de microorganismo patógeno que puedan estar presentes con o sin síntomas, de ahí que las de origen bacteriano son las más frecuentes.

ESCHERICHIA COLI: La *Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo, bacteria común que se encuentra en los intestinos de los animales y las personas y es la causa más frecuente de infección de vías urinarias y contribuye casi al 90% de las infecciones urinarias en mujeres jóvenes

UROCULTIVO: Es el cultivo de orina para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática en pacientes con riesgo de infección.

CIM: es la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo después de un tiempo de incubación que generalmente es de 24 horas.

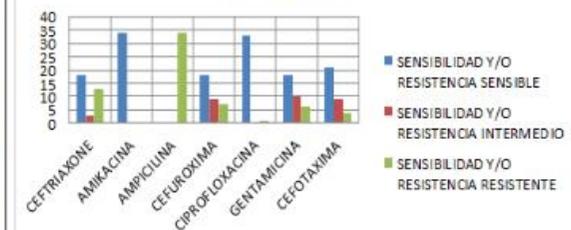
RESISTENCIA BACTERIANA: el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos

RESULTADOS

Sensibilidad y/o resistencia de ceftriaxone, amikacina, ampicilina, cefuroxima, ciproloxacina, gentamicina y cefotaxima frente a *Escherichia coli* en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada N° 7 Loja

ANTIBIOTICO	SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA			FRECUENCIA	PORCENTAJE
	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE		
CEFTRIAXONE	18	3	13	34	100%
AMIKACINA	34			34	100%
AMPICILINA			34	34	100%
CEFUROXIMA	18	9	7	34	100%
CIPROFLOXACINA	33		1	34	100%
GENTAMICINA	18	10	6	34	100%
CEFOTAXIMA	36	7	4	47	100%

SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA DE CEFTRIAXONE, AMIKACINA, AMPICILINA, CEFUROXIMA, CIPROFLOXACINA, GENTAMICINA Y CEFOTAXIMA FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA N° 7 LOJA



ANEXO 25
FOTOGRAFÍAS DE LOS PROCEDIMIENTOS REALIZADOS
FASE PREANALÍTICA



Fig1. Preparación de medios de cultivo, pruebas bioquímicas y caldo Müller Hinton

FASE ANALÍTICA



Fig 2. Reconstitución y crioconservación de la cepa control E.coli ATCC 25922

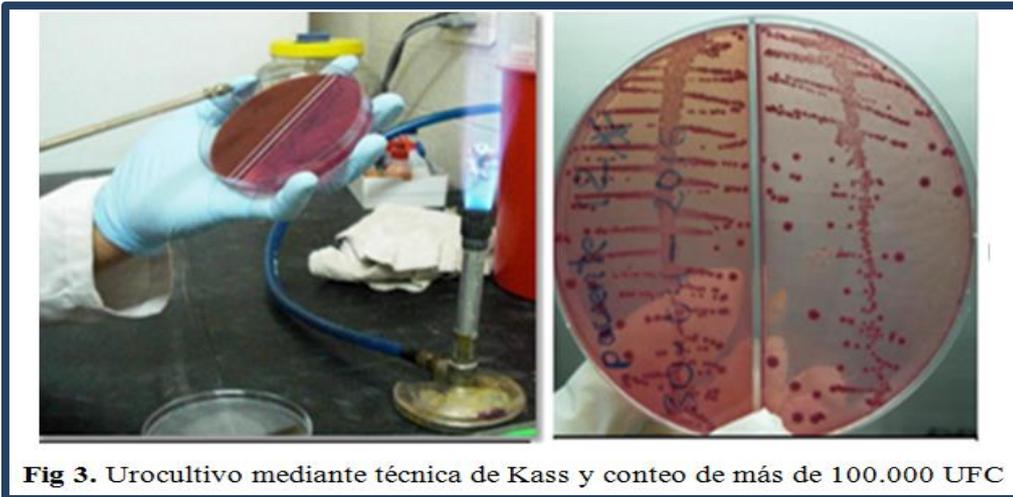


Fig 3. Urocultivo mediante técnica de Kass y conteo de más de 100.000 UFC

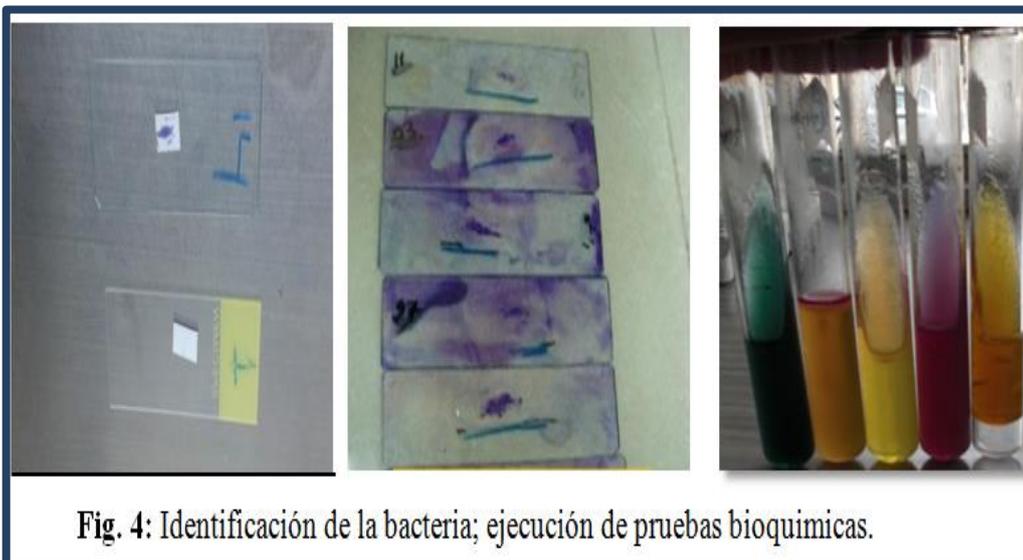


Fig. 4: Identificación de la bacteria; ejecución de pruebas bioquímicas.

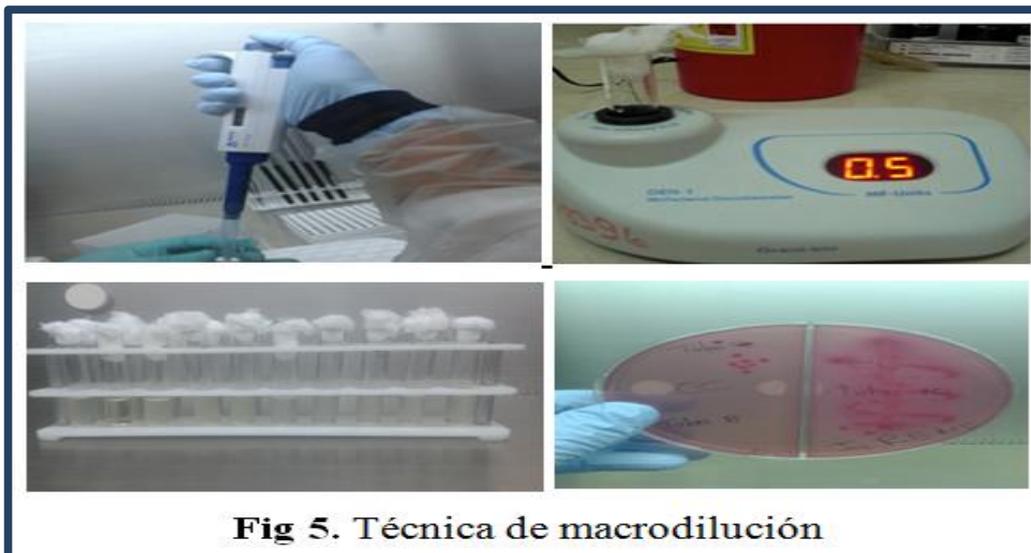


Fig 5. Técnica de macrodilución

FASE POSTANALÍTICA



Fig 6. Socialización de resultados con el personal de salud del Hospital Militar

CONCLUSIONES

- El desarrollo de métodos estandarizados de susceptibilidad antimicrobiana, a pesar de las dificultades que presentan, constituyen un notable avance en la terapia de infecciones bacterianas, sobre todo las que comprometen la vida del paciente. Actualmente se cuenta con puntos de corte para varios antimicrobianos de uso clínico y para bacterias frecuentemente aisladas de infecciones de vías urinarias.
- Con la información obtenida de los métodos estandarizados se ha podido detectar cepas intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos y cepas con CIMs más elevadas que lo habitual, asociado a falla terapéutica.

RECOMENDACIONES

- Destacar la prevención y tratamiento adecuado en las infecciones principalmente de las vías urinarias, que este inmerso en el uso de los antibióticos, con charlas educativas dirigidos por profesionales de la salud debidamente aptos y capacitados, y de esta manera evitaría automedicación.
- Actualizar con mayor frecuencia nuevas investigaciones con la finalidad de conocer nuevos datos estadísticos acerca de la resistencia y/o sensibilidad bacteriana a los antibióticos para que tomen en cuenta al momento de prescribir fármacos.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
1859
AREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO
TEMA:
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE AMPICILINA, AMIKACINA, OFETRIAXONA, CEFUROXIMA, CEFOTAXIMA, GENTAMICINA Y CIPROFLOXACINA FRENTE A ESCHERICHIA COLI AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA NRO. 7 LOJA
LOJA, ECUADOR
2015

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ampicilina, amikacina, ofetriaxona, cefuroxima, cefotaxima y ciprofloxacina frente a Escherichia coli en pacientes de consulta externa con solicitud de urocultivo del Hospital Militar Brigada Nro. 7 Loja.

Objetivos específicos:

- Realizar urocultivo a partir de muestras de orina de pacientes que acuden a consulta externa que tengan petición de urocultivo en el Hospital Militar Brigada Nros. 7 de la ciudad de Loja.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de ampicilina, amikacina, ofetriaxona, cefuroxima, cefotaxima y ciprofloxacina en urocultivos de Escherichia coli en muestras de orina de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja mediante la técnica de macrodilución.
- Diffundir los resultados al personal médico del Hospital Militar Brigada Nro. 7 de la ciudad de Loja.

DEFINICIONES

INFECCION DE VIAS URINARIAS: Se considera como infección del tracto urinario a la presencia de microorganismos patógenos que puedan estar presentes con o sin síntomas, de ahí que las de origen bacteriano son las más frecuentes.

ESCHERICHIA COLI: La Escherichia coli es un bacilo gramnegativo, bacteria común que se encuentra en los intestinos de los animales y las personas y es la causa más frecuente de infección de vías urinarias y contribuye casi al 90% de las infecciones urinarias en mujeres jóvenes.

UROCULTIVO: Es el estudio de orina para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática en pacientes con riesgo de infección.

CIM: es la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento y de que interorganismo después de un tiempo de incubación que generalmente va que 2 a horas.

RESISTENCIA BACTERIANA: es el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos.

RESULTADOS

Sensibilidad y/o resistencia de ceftriaxona, amikacina, ampicilina, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina y cefotaxima frente a Escherichia coli en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar Brigada N° 7 Loja

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO/RESISTENTE	FRECUENCIA PORCENTAJE
OFETRIAXONA	34	0	34 100%
AMIKACINA	34	0	34 100%
AMPICILINA	34	0	34 100%
CEFUROXIMA	34	0	34 100%
CIPROFLOXACINA	34	0	34 100%
GENTAMICINA	34	0	34 100%
CEFOTAXIMA	34	0	34 100%

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA, CARRERA DE LABORATORIO CLINICO, AREA DE LA SALUD HUMANA, CARRERA DE LABORATORIO CLINICO Y FARMACIA, CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO TECNOLÓGICO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA NRO. 7 LOJA

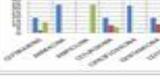


Fig 7. Entrega de un tríptico al personal de salud del Hospital Militar

109

ÍNDICE

PORTADA.....	1
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
a. TÍTULO.....	1
b. RESUMEN	2
SUMMARY	3
c. INTRODUCCIÓN.....	4
d. REVISIÓN DE LITERATURA	7
d.1. INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS	7
d.1.1. Tipos	7
d.1.2. Agente etiológico	7
d.1.3. Signos y síntomas	8
d.1.4. Factores que predisponen al huésped.....	8
d.2. ENTEROBACTERIAS	9
d.2.1. <i>Escherichia coli</i>	9
d.2.1.1. Clasificación científica	9
d.2.1.2. Características morfológicas y tintoriales.....	9
d.2.1.3. Características nutricionales	10
d.2.1.4. Características de las colonias	10
d.2.1.5. Estructura antigénica	10
d.2.1.6. Clasificación general:	10
d.2.1.6.1. <i>Escherichia coli</i> entero patógena (ECEP)	10
d.2.1.6.2. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	11
d.2.1.6.3. <i>Escherichia coli</i> entero invasiva (ECEI)	11
d.2.1.6.4. <i>Escherichia coli</i> entero hemorrágica o verotoxigénica (ECEH).....	11
d.2.1.6.5. <i>Escherichia coli</i> entero agregativa (ECEA).....	11
d.2.1.6.6. <i>Escherichia coli</i> adherencia difusa (ECAD).....	12
d.3. RESISTENCIAS BACTERIANAS	12
d.3.1. Tipos de resistencia.....	12

d.3.2.	Mecanismo para resistir la acción de los antibióticos.....	13
d.3.2.1.	Sistema de expulsión	13
d.3.2.2.	Alteración de la permeabilidad.....	13
d.3.2.3.	Liberación de enzimas de la bacteria.....	13
d.3.2.4.	Modificación del sitio blanco	14
d.3.2.5.	Mutación.....	14
d.3.2.6.	Conjugación.....	14
d.3.2.7.	Transformación.....	14
d.3.2.8.	Transducción.	14
d.3.2.9.	Transposición.....	15
d.4.	ANTIBIÓTICOS.....	15
d.4.1.	Bacteriostático.....	15
d.4.2.	Bactericidas.....	15
d.4.3.	Penicilinas	16
d.4.3.1.	Mecanismo de acción	16
d.4.3.2.	Clasificación	16
d.4.3.2.1.	Penicilinas naturales	16
d.4.3.2.2.	Penicilinas resistentes a la penicilinasa	17
d.4.3.2.3.	Penicilinas de espectro ampliado.....	17
d.4.3.2.4.	Penicilinas asociadas a inhibidores de las betalactamasas.	17
d.4.4.	Ampicilina.....	18
d.4.4.1.	Farmacocinética.....	18
d.4.4.2.	Farmacodinamia	19
d.5.	DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	19
d.5.1.	EMO.....	19
d.5.2.	Urocultivo	20
d.5.3.	Tinción de GRAM.	20
d.5.4.	Medios de cultivo.....	21
d.5.4.1.	Agar sangre.....	21
d.5.4.2.	Agar MacConkey.....	21
d.5.4.3.	Mueller Hinton.	22
d.5.5.	Pruebas bioquímicas	22
d.5.5.1.	Agar TSI:	22
d.5.5.2.	SIM medio (motilidad, indol, sulfuro de hidrógeno).....	22
d.5.5.3.	Citrato	23

d.5.5.4.	Ureasa	23
d.5.5.5.	Lisina, Hierro, Agar (LIA)	23
d.5.5.6.	Oxidasa	24
d.6.	MÉTODOS DE SUCEPTIBILIDAD BACTERIANA.....	24
d.6.1.	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	24
d.6.2.	Concentración mínima bactericida (MBC)	24
d.6.3.	Clasificación de los métodos de susceptibilidad bacteriana	24
d.6.3.1.	Cualitativos	24
d.6.3.1.1.	La difusión en disco.	24
d.6.3.2.	Métodos cuantitativos	25
d.6.3.2.1.	Macrodilución en caldo.....	26
d.6.3.2.2.	Microdilución en caldo.....	26
d.6.3.2.3.	Método de E test	27
d.6.4.	Interpretación de las pruebas de sensibilidad.....	27
d.6.4.1.	Sensible.....	28
d.6.4.2.	Intermedio.....	28
d.6.4.3.	Resistente.....	28
e.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
f.	RESULTADOS	31
g.	DISCUSIÓN	34
h.	CONCLUSIONES.....	36
i.	RECOMENDACIONES	37
j.	BIBLIOGRAFÍA	38
k.	ANEXOS	41
l.	ÍNDICE.....	110