

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y

AGROPECUARIAS

Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de
espectro extendido (BLEE) en enterobacterias aisladas en muestras
clínicas en H. Caborca, Sonora.

TESIS

Que para obtener el grado de

Químico Biólogo Clínico

Presenta

Mario Enrique Mazón Martínez

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Mario Enrique Mazón Martínez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico otorgado por la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca.

Presidente

M.E Yessica Enciso Martínez

Secretario

M.C Ramón Efraín Lugo Sepúlveda

Vocal

Q.B Rafael de la Rosa López

Suplente

Dr. Dora Edith Valencia Rivera

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de Tesis a mis padres, quienes han estado para mí a lo largo de mi vida, apoyándome en cada uno de los proyectos que me he propuesto. Dándome su entera confianza en todo momento, junto a sus palabras de aliento, y siendo un gran ejemplo a seguir.

A mi hermana y a toda mi familia por creer siempre en mí, darme ánimos y estar apoyándome para lograr todos mis objetivos.

A mis amigos y compañeros por todas las experiencias y momentos que vivimos juntos durante toda la carrera, por el apoyo y la motivación que me otorgaron en el transcurso de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por haberme abierto las puertas y haberme permitido vivir tantas experiencias a lo largo de la carrera, como a los profesores que compartieron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante.

M.E Yessica Enciso Martínez, le agradezco por todo el apoyo brindado durante este proceso, su tiempo y esfuerzo, por haberme aceptado como su alumno para realizar este proyecto. Es una magnífica persona, estuvo siempre que necesite de orientación y consejos, siempre disponible a resolver dudas y detalles cada vez que se presentaron. Además de ser una excelente maestra, es una gran amiga.

M.C Ramón Efraín Lugo Sepúlveda, por su apoyo como maestro, así como en este proyecto, por los conocimientos que me ha compartido, sus experiencias, consejos y de igual manera ayudándome a aprender cada vez más.

Q.B Rafael de la Rosa López, por los conocimientos que me compartió, la confianza brindada al darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, ya que me permitió descubrir lo que me apasiona, fomentando en mí el deseo de investigar y adquirir mayor conocimiento, tanto fuera como dentro de clases.

Dra. Dora Edith Valencia Rivera, le agradezco por haber compartido sus conocimientos y experiencias durante la carrera, dentro como fuera del aula, además de incitarme a superarme más.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE GRÁFICAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ENTEROBACTERIAS	4
2.1 Características	4
2.2 Ecología	6
2.3 Patogenia	6
2.4 Enterobacterias de importancia clínica	7
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	7
2.4.1.1 Características	7
2.4.1.2 Factores de virulencia	8
2.4.1.3 Enfermedades transmitidas	8
2.4.1.4 Clasificación	9
2.4.1.4.1 <i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC)	9
2.4.1.4.2 <i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	10
2.4.1.4.3 <i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	10
2.4.1.4.4 <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	11

2.4.1.4.5 <i>E. coli</i> Enteroagregante (EAEC)	12
2.4.1.4.6 <i>E. coli</i> Uropatógena (ECUP)	12
2.4.1.5 Tratamiento	13
2.4.2 <i>Salmonella</i> spp.	14
2.4.2.1 Taxonomía	14
2.4.2.2 Epidemiología	16
2.4.2.3 Factores de virulencia	16
2.4.2.4 Enfermedades que causa	17
2.4.2.5 Tratamiento	19
2.4.3 <i>Klebsiella</i> spp.	19
2.4.3.1 Características	20
2.4.3.2 Factores de virulencia	20
2.4.3.3 Enfermedades que causa	21
2.4.3.4 Tratamiento	21
2.4.4 <i>Shigella</i> spp.	21
2.4.4.1 Características	22
2.4.4.2 Factores de virulencia	22
2.4.4.3 Enfermedades que causa	23
2.4.4.4 Tratamiento	23
3. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS	25
3.1 Mecanismo de acción	25
3.2 Clasificación y estructura	26

3.3 Espectro bacteriano	29
3.4 Betalactamasas	30
3.5 Generalidades	31
3.6 Antecedentes históricos	31
3.7 Clasificación	32
3.8 Clasificación molecular de Ambler	32
3.9 Clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros	33
3.10 Producción de betalactamasas	34
3.11 Betalactamasas cromosómicas	34
3.12 Betalactamasas plasmídicas	35
4. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)	36
4.1 BLEE tipo TEM	36
4.2 BLEE tipo SHV	37
4.3 BLEE tipo CTX-M	37
4.4 BLEE tipo OXA	38
4.5 BLEE tipo PER, VER-1 y otras BLEE	39
4.6 Epidemiología de las BLEE	40
4.7 Detección en el laboratorio	41
4.7.1 Prueba tamiz BLEE recomendada por CLSI	43
4.7.2 Otras Pruebas para detección de BLEE	43
4.7.3 E test para la detección de BLEE	43
4.7.4 Prueba alternativa Doble disco para la detección de BLEE	44

5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	46
6. OBJETIVOS	47
6.1 General	47
6.2 Particulares	47
7. MATERIALES Y MÉTODOS	48
7.1 Obtención de la Muestra	48
7.2 Procesamiento de la Muestra	48
7.3 Procesamiento en el laboratorio de Microbiología	49
7.3.1 Tinción Gram	49
7.3.2 Medios de cultivo diferenciales para gramnegativos	51
7.3.3 Pruebas de identificación bioquímica de gramnegativos	51
7.3.3.1 Indol	51
7.3.3.2 Rojo de Metilo	55
7.3.3.3 Voges Proskauer	55
7.3.3.4 Citrato de Simmons	55
7.3.3.5 Motilidad	58
7.3.3.6 Medio agar Kligler (Fermentación de glucosa/lactosa)	58
7.3.4 Antibiograma	58
7.4 Control de calidad	62
7.5 Análisis de datos	62
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
8.1 Resultados	64

8.2 Discusión	67
9. CONCLUSIÓN	69
10. RECOMENDACIONES	70
11. BIBLIOGRAFÍA	71
12. ANEXOS	77

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Estructura química de los betalactámicos	28
2. Medidas de susceptibilidad de los antibióticos betalactámicos.	61
3. Susceptibilidad de las cepas aisladas a antibióticos betalactámicos.	66
4. Interpretación morfológica de colonias en medio EMB.	79
5. Interpretación morfológica de colonias en medio Mac Conkey.	81
6. Interpretación morfológica de colonias en medio SS.	83
7. Interpretación morfológica de las colonias en medio Verde brillante.	85
8. Algoritmo para identificación de enterobacterias.	100
9. Antibióticos betalactámicos.	103

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Cepas de enterobacterias aisladas de muestras clínicas de H. Caborca, Sonora.	65
2. Sensibilidad a betalactámicos en cepas de enterobacterias aisladas.	65
3. Cepas de enterobacterias productoras de BLEE.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura del género <i>Enterobacteriaceae</i> .	5
2. Porcentaje de aislados de <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> productores de BLEE.	42
3. Prueba E test para detección de BLEE.	45
4. Prueba doble disco para detección de BLEE.	45
5. Medio de cultivo agar Sangre.	50
6. Tinción Gram.	50
7. Medio de cultivo EMB (Eosin Metil Blue).	52
8. Medio de cultivo Mac Conkey.	52
9. Medio de cultivo SS (<i>Salmonella-Shigella</i>)	53
10. Medio de cultivo Verde brillante.	53
11. Prueba de Indol positiva.	54
12. Prueba de Rojo de Metilo positiva.	56
13. Prueba de Voges Proskauer.	56
14. Prueba de Citrato de Simmons positiva.	57
15. Prueba de motilidad positiva.	59
16. Prueba de medio agar de Hierro Kligler.	59
17. Plantilla del antibiograma.	60
18. Antibiograma.	60
19. Cepas ATCC	63

LISTA DE ABREVIATURAS

Significado	Abreviatura
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Ácido sulfhídrico	H ₂ S
Ácido sulfúrico, indol, motilidad	SIM
Adenosín monofosfato cíclico	AmpC
American Type Culture Collection	ATCC
Amoxicilina/Ác. Clavulánico	AMC
Aztreonam	ATM
Betalactamasas de espectro extendido	BLEE
Capsular	Antígeno K
Cefotaxima	CTX
Cefoxitina	FOX
Ceftazidima	CAZ
Ceftriaxona	CRO
Clinical & Laboratory Standards Institute	CLSI
Coagulación intravascular diseminada	CID
Concentración inhibitoria mínima	CIM
Diyodo	I ₂
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica	EHEC
<i>E. coli</i> Enteroagregante	EAEC
<i>E. coli</i> Uropatógena	ECUP
<i>E. coli</i> Enteropatógena	EPEC
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica	ETEC

<i>E. coli</i> Enteroinvasiva	EIEC
<i>E. coli</i> patógena extra-intestinal	ExPEC
Eosin Metil Blue	EMB
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
Especie	Spp.
Flagelar	Antígeno H
Grados centígrados	°C
Gramos	G
Hidróxido de potasio	KOH
Hierro	Fe
Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato de Simmons	IMVIC
Indole Acetic Acid	IAA
Infecciones del tracto urinario	ITU
Infecciones de vías urinarias	IVU
Interleucina-8	IL-8
Lipopolisacárido	Antígeno O
Lipopolisacárido	LPS
Microgramos	Mg
Microlitros	μL
Micrómetros	Mm
Mililitros	mL
Milímetros	mm
National Committee for Clinical Laboratory Standards	NCCLS
Porcentaje	%
Potasio	K

Potencial de hidrógeno	pH
Proteínas fijadoras de Penicilinas	PBP
Revoluciones por minuto	Rmp
Rojo de metilo-Voges Proskauer	MR-VP
<i>Salmonella-Shigella</i>	SS
Síndrome hemolítico urémico	SHU
Smart Study Series Microbiology	SMART
Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica	SEIMC
Temoneira	TEM
Termoestable	ST
Termolábil	LT
The Clinical & Laboratory Standards Institute	CLSI
Virulencia	Antígeno Vi
Virus de inmunodeficiencia humana	VIH
Yoduro de potasio	KI

RESUMEN

Las enterobacterias son una familia compuesta por organismos de vida libre, patógenas y otras que constituyen parte de la microbiota normal del ser humano y resto de mamíferos. Son microorganismos ubicuos que se encuentran de forma universal en el suelo, agua y vegetación. Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, entre las que se encuentran 30 a 35% de las septicemias, más del 70% de las infecciones de tracto urinario siendo *Escherichia coli* el patógeno causal más común.

La resistencia bacteriana es un problema antiguo, pero de gran importancia en la actualidad, ya que cada vez es más frecuente y obteniendo una continua resistencia a diferentes antibióticos, la presencia de microorganismos multirresistentes es cada vez mayor, lo que ocasiona que las opciones terapéuticas contra infecciones de este tipo sean limitadas.

En la presente investigación se realizó un análisis microbiológico para identificar la susceptibilidad a antibióticos betalactámicos y la presencia de bacterias productoras de BLEE en el área de H. Caborca, Sonora. Donde se recolectaron 162 muestras clínicas de orina en el periodo de noviembre del 2015 a diciembre del 2016, de las cuales 82 fueron cepas correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Se encontró que el betalactámico con mayor susceptibilidad a las enterobacterias trabajadas fue el Aztreonam con 47.56%, además se obtuvo que el 42.68% de las cepas procesadas tuvieron producción de betalactamasas de espectro extendido, siendo el patógeno más frecuente *Escherichia coli*, con el 85.71% del total de las cepas productoras de BLEE.

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Las especies que poseen flagelos son móviles; el resto, inmóviles. La capacidad para fermentar la lactosa y el tiempo empleado en hacerlo sirven para diferenciar los géneros y pueden tener o no cápsulas. Nunca forman esporas. Son algo polimórficas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como, formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre.¹

Dentro de esta familia se reconocen más de 30 géneros diferentes. Actualmente, varios de ellos están siendo sometidos a revisión mediante técnicas de Biología Molecular, estudiando la homología de sus ADN y frecuentemente se crean nuevas variaciones de especies con géneros ya existentes.²

Las enterobacterias son la mayor causa de infecciones intestinales y también de extraintestinales como infecciones en las vías urinarias (IVU), a pesar de que son parte de la flora intestinal normal pueden presentar riesgo para sus huéspedes por distintos motivos, siendo la principal un sistema inmunocomprometido. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación.¹

Este grupo de bacterias además de ser importantes clínicamente por las infecciones que producen, se están estudiando debido a que han

desarrollado fenotipos de resistencia bastante amplios frente a los antimicrobianos; situación que ha sido reportada en prácticamente todo el mundo.

Resulta particularmente importante porque las cepas no sólo son de origen clínico sino ambiental, lo cual permite suponer que si se facilita la diseminación de cepas resistentes.³

La emergencia y diseminación de la resistencia antimicrobiana es un hecho inevitable que sucede en forma posterior a la introducción de agentes antimicrobianos. La resistencia antimicrobiana se ha incrementado en todo el mundo durante los últimos 30 años y se ha convertido en un reto clínico cada vez más serio.⁴

El intercambio de material genético entre las poblaciones bacterianas permite el intercambio de características fenotípicas que originan la aparición de cepas bacterianas nuevas, lo que puede resultar ventajoso especialmente si el ADN adquirido codifica la resistencia a los antibióticos.⁴

La aparición de enterobacterias multirresistentes gracias a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se ha incrementado en los últimos años, y se registra, además, una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes con infecciones por estas bacterias.⁴

Prácticamente todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por poseer mecanismos enzimáticos naturales de resistencia a los antibióticos betalactámicos como resultado de la captación de los elementos de ADN móviles (plásmidos, transposones, etc.) o a través de mutaciones cromosómicas. Dónde están les confieren dos distintos

fenómenos: impermeabilidad (mutaciones que afectan el número o funcionalidad de las porinas) y eflujo (se ven afectados el número o la actividad de bombas capaces de eliminar el antibiótico del interior de la bacteria).⁴

Los antibióticos betalactámicos, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad.⁵

Algunas modificaciones de la molécula original han dado lugar a compuestos con mayor espectro antimicrobiano, pero la progresiva aparición de resistencias limita su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Aun así, la penicilina continúa siendo el tratamiento de elección en un buen número de infecciones; las Cefalosporinas tienen un gran abanico de indicaciones; los Carbapenémicos se usan en infecciones nosocomiales y en infecciones causadas por bacterias multirresistentes, y los inhibidores de las betalactamasas permiten recuperar el espectro de actividad de las Penicilinas a las que acompañan cuando la resistencia está causada por la producción de betalactamasas.⁵

2. ENTEROBACTERIAS

2.1 Características

La familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gramnegativos por lo general de 1-3 μm de largo y 0.5 μm de diámetro¹, ya sea móviles con flagelos peritricos o no móviles; se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros complementos; proliferan en medios aerobios y anaerobios, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono en vez de oxidar, a menudo produciendo gas; catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitrato a nitrito.⁷ (Fig.1).

Poseen una estructura antigénica compleja, producen diversas toxinas, tienen diversos mecanismos de acción y otros factores de virulencia. Se han definido 51 géneros; sin embargo, las especies clínicamente importantes comprenden de 20 a 25 miembros. Sus características morfológicas son muy variables en especímenes clínicos.⁷

Su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el

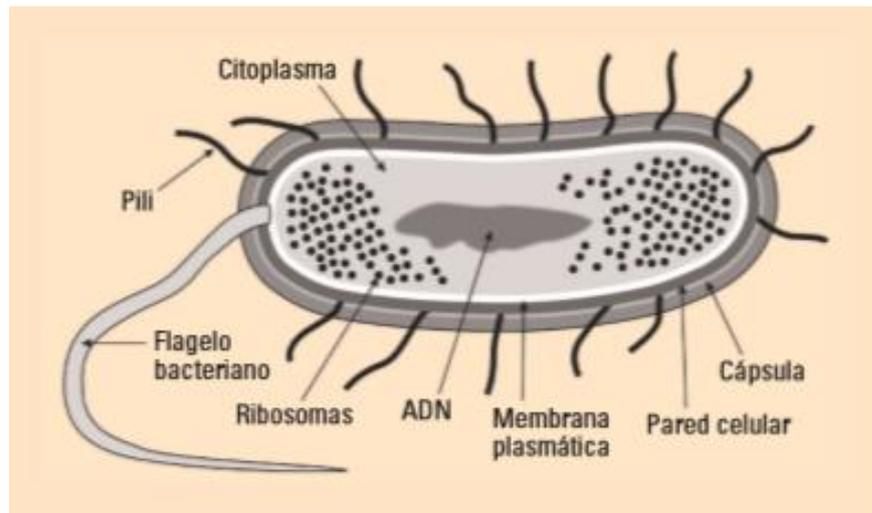


Figura 1: Estructura del género *Enterobacteriaceae*

Fuente: Puerta, A. y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10, 3426-31.

paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa.¹

2.2 Ecología

Las *Enterobacteriaceae* son las bacterias que se recuperan con mayor frecuencia en las muestras clínicas. Ampliamente dispersos en la naturaleza, estos microorganismos se encuentran en la tierra, suelo y agua, sobre plantas y, como lo indica el nombre de la familia, en el tubo digestivo de seres humanos y de animales.⁷

Su transmisión es fácil a partir de las manos de las personas. Se han extendido por todo el mundo y muchas veces generan brotes epidémicos, constituyendo una amenaza para la evolución favorable de las infecciones, tanto hospitalarias⁸ por procedimientos invasores, como cateterismos, broncoscopia, colposcopia o biopsias quirúrgicas⁷ como adquiridas en la comunidad social. Su prevalencia ha ido aumentando en los últimos años.⁸

Las heces de las personas que tienen una enfermedad asintomática o que son portadoras constituyen una fuente más importante de contaminación que los casos clínicos, cuando los portadores que trabajan manejando alimentos “diseminan” los microorganismos. Muchos animales, como el ganado vacuno, los roedores y las aves de corral, tienen una infección natural.⁶

2.3 Patogenia

La familia *Enterobacteriaceae* tiene una estructura antigénica compleja. Se clasifican en más de 150 diferentes antígenos somáticos termoestables “O” (lipopolisacáridos), más de 100 antígenos “K” (capsulares) termolábiles y

más de 50 antígenos “H” (flagelares). Muchos microorganismos gramnegativos generan bacteriocinas; son proteínas bactericidas de alto peso molecular (toxinas formadoras de poros), que son producidas por algunas cepas de bacterias activas contra otras de la misma especie o de muy cercana.⁶

La mayor parte de las bacterias gramnegativas poseen lipopolisacáridos complejos en sus paredes celulares. Tales sustancias, endotoxinas de la envoltura celular tienen diversos efectos fisiopatológicos⁶ como el shock endotóxico que es una manifestación potencialmente letal de la infección por bacterias gramnegativas, entre ellas, las *Enterobacteriaceae*.⁷

2.4 Enterobacterias de importancia clínica

2.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, el microorganismo más prevalente de esta familia, es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Cada vez se admite más que la distinción entre cepas uropatógenas y cepas que provocan otras infecciones extraintestinales. Estas bacterias pueden ser móviles (la mayoría) o inmóviles, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano.¹

2.4.1.1 Características

Escherichia coli es una de las especies más importantes del género *Escherichia* y de la familia *Enterobacteriaceae*, que se caracteriza por ser bacilos gramnegativos cortos, no esporulados, con fimbrias y flagelos peritricos. Crecen rápidamente en medios de cultivo simples con glicerol o

glucosa como única fuente de carbono. Algunas de especies de este género poseen cápsula de polisacáridos, su tamaño es aproximadamente de 0.5 µm de ancho por 3 µm de largo. Tienen un metabolismo que los hace ser anaerobios facultativos.⁹

2.4.1.2 Factores de virulencia

Los antígenos más comunes son el somático “O”, el flagelar “H” y el capsular “K”. El Antígeno “O” es un polisacárido termoestable, que forma parte del lipopolisacáridos presente en la parte externa de la membrana bacteriana. El antígeno “K” corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. Actualmente se conocen un total de 185 antígenos somáticos, 56 flagelares y 60 capsulares. La combinación específica de los antígenos “O” y “H” define el serotipo de una bacteria.¹⁰

2.4.1.3 Enfermedades transmitidas

Estas enterobacterias se asocian con diversas enfermedades, abarcando desde una diarrea autolimitada, hasta infecciones que ponen en peligro la vida, como: bacteriemias, infecciones en heridas quirúrgicas, infección del tracto urinario, perforación intestinal, peritonitis y meningitis.⁹ Es posible que la característica distintiva de la bacteriemia por gramnegativos sea la reacción sistémica a la endotoxina o a los LPS que a veces conducen a respuestas potencialmente fatales como el shock, la coagulación intravascular diseminada (CID) y el consumo de factores del complemento. También se han recuperado cepas de *E. coli* en casos de artritis séptica, endoftalmitis, tiroiditis supurada, abscesos intraabdominales, peritonitis bacteriana espontánea, abscesos hepáticos, abscesos cerebrales,

endocarditis, osteomielitis, prostatitis, sinusitis, tromboflebitis séptica y otras enfermedades.¹

2.4.1.4 Clasificación

- *E. coli* Enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)
- *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)
- *E. coli* Enteroagregante (EAEC)
- *E. coli* Uropatógena (ECUP)

2.4.1.4.1 *E. coli* Enteropatógena (EPEC)

Las cepas EPEC fueron el primer patotipo de *E. coli* descrito, primeramente, estuvo asociado a brotes de diarrea infantil en el Reino Unido y actualmente, aunque es poco frecuente en países desarrollados, en países en vías de desarrollo, todavía son causa frecuente de diarrea secretora en lactantes. Producen una lesión típica en la mucosa, con la formación de microcolonias y la pérdida de las microvellosidades adyacentes.⁹

La patogenia incluye tres pasos: a) adherencia de los microorganismos a los enterocitos; b) inducción de una señal de transducción en los enterocitos y c) desarrollo de adherencia íntima con los enterocitos. Clínicamente se caracteriza por producir diarrea acuosa con más o menos fiebre o vómitos.¹

La diarrea puede estar asociada a fiebre y si no se controla puede llevar a la deshidratación y finalmente a la muerte. La población afectada son principalmente niños menores de dos años de edad. Diferentes estudios realizados en México, Brasil y África del Sur refieren que entre 30 y 40% de los casos de diarrea puede ser atribuido a cepas EPEC.⁹

2.4.1.4.2 *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)

ETEC se caracteriza por incluir cepas que elaboran enterotoxinas ya sea termoestable (ST) y/o termolábil (LT), el efecto que ocasiona es similar al inducido por cultivos de *Vibrio cholerae*.⁹ Es la principal causa de la diarrea del viajero, que en general se desarrolla en un individuo por lo demás sano proveniente de un país industrializado que visita regiones tropicales o subtropicales caracterizadas por condiciones de higiene deficientes. En general, los síntomas tienden a ser leves, con diarrea acuosa. Ocasionalmente los síntomas pueden ser más graves, con fiebre, escalofríos y vómitos. La enterotoxina estimula la secreción masiva de líquido por las células mucosas.¹

2.4.1.4.3 *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas EIEC son verdaderos patógenos intracelulares, ya que tienen la capacidad de internalizarse y reproducirse dentro del citoplasma de las células epiteliales, destruyendo a la célula hospedero y de penetrar dentro de los macrófagos. Las cepas de EIEC afectan la mucosa del colon y producen un cuadro disentérico similar, aunque menos severo, al ocasionado por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Las manifestaciones clínicas asociadas con esta infección son evacuaciones escasas acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre.⁹ La tasa de mortalidad es alta (50% o más) favorecida sobre todo porque afecta a personas debilitadas.¹

El primer paso en el proceso de patogénesis de dichas cepas es la adherencia de las bacterias a las microvellosidades de la mucosa intestinal y

posteriormente al borde en cepillo de enterocito, en el cual se comienza a formar una vesícula en su membrana, lo que favorece la penetración de la bacteria, la cual se establece y multiplica en el interior de la célula intestinal para después internalizarse a otras células adyacentes a través de su migración por el citoesqueleto.⁹

2.4.1.4.4 *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

Estas cepas producen toxinas de tipo Shiga (también denominadas verotoxinas) que consisten en citotoxinas que inducen la muerte de la célula huésped. Las cepas que producen toxinas Shiga pueden causar enfermedad de grado variable como diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico (SHU) y muerte.¹

Estas cepas presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7. El principal reservorio de las cepas EHEC es el tracto intestinal de los bovinos, los primeros brotes de infecciones en humanos estuvieron asociados con el consumo de hamburguesas con carne mal cocida. La rápida propagación de la bacteria se debe, en parte a que tienen una muy baja dosis infectante, ya que se ha estimado que menos de 100 bacterias son capaces de causar una enfermedad.⁹

El tratamiento de la infección intestinal se basa en medidas de soporte. No se deben emplear los antibióticos porque se ha demostrado que aumentan la producción de la toxina Shiga y, en algunos estudios en niños se ha visto que aumenta la incidencia de SHU. Se están llevando a cabo estudios de

modalidades de tratamiento alternativas, incluidos los receptores de toxina solubles y los anticuerpos monoclonales de antitoxina humana.¹

2.4.1.4.5 *E. coli* Enteroagregante (EAEC)

Debe su nombre a la capacidad para agregarse en el cultivo en medio celular. Puede considerarse una verdadera infección emergente. Los estudios han relacionado las cepas de *E. coli* Enteroagregante (EAEA) con diarrea aguda y crónica en los países en vías de desarrollo y diarrea aguda en países desarrollados. Se ha descrito de forma excepcional como causa de diarrea del viajero y, con mayor frecuencia, de diarrea persistente en sujetos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).¹

Las características clínicas de la infección intestinal por EAEC es una diarrea secretora acuosa con moco y sangre, con fiebre en bajo grado. Un gran porcentaje de pacientes que excretan EAEC tienen lactoferrina fecal detectable (Indicador sensitivo de leucocitos fecales) y niveles elevados de IL-8 en las heces. Esto nos puede sugerir que la infección por EAEC puede estar acompañada de una forma sutil de inflamación de la mucosa.⁹

2.4.1.4.6 *E. coli* Uropatógena (ECUP)

Si bien el sitio más importante de colonización normal de las enterobacterias es el tracto gastrointestinal, el sitio más común de infección es el tracto urinario. *E. coli* es la causa más frecuente de infección urinaria.¹ Las cepas capaces de causar enfermedades fuera del tracto gastrointestinal pertenecen a un grupo conocido como *E. coli* patógena extra-intestinal (ExPEC). Estas cepas son responsables de una gran variedad de enfermedades que incluye infecciones del tracto urinario (ITU).⁹ En 2013, las

infecciones de vías urinarias se mantienen como una de las primeras causas de morbilidad. *E. coli* es el principal agente causal con más del 90% de este tipo de infecciones.¹⁰

Los serotipos de *E. coli* comúnmente asociados con ITU son: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25 y O75, los cuales son responsables de más del 75% de estas infecciones. Las infecciones del tracto urinario constituyen una de las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial. Las ITU afectan principalmente a las mujeres, debido a que en las mujeres la distancia desde el colon a la abertura uretral es mucho más corta que en los hombres.¹⁰

Algunos signos y síntomas que presentan los pacientes con ITU son: dolor al orinar (disuria) orinar frecuentemente (polaquiuria) y presencia de sangre en la orina (hematuria). Las ITU siguen la ruta ascendente y son causadas por bacterias presentes en la microbiota intestinal normal. El colon, el introito vaginal y el área periuretral sirven como reservorios para *E. coli* y otros uropatógenos; primero, la bacteria entra por la uretra y asciende hacia la vejiga y asciende a través de los uréteres hasta los riñones. La cistitis y pielonefritis son las enfermedades que más frecuentemente se encuentran en la clínica, sin embargo, hay una amplia variedad de otros síndromes clínicos, incluyendo bacteriuria, prostatitis, uretritis y bacteriuria asintomática.¹⁰

2.4.1.6 Tratamiento

Desde el punto de vista terapéutico los cuadros producidos por cepas EPEC y ETEC deben manejarse con rehidratación, de preferencia por vía oral,

hasta que el proceso infeccioso se autolimita. En el caso de los cuadros asociados con EHEC y en particular EIEC está justificado el empleo de antimicrobianos por el ataque al estado general y el riesgo de transmisión intrafamiliar.¹¹

Las opciones de tratamiento en las infecciones causadas por microorganismos gramnegativos productores de BLEE son limitadas, ya que presentan resistencia a Cefalosporinas (incluidas tercera y cuarta generación excepto Cefamicinas), Penicilinas de amplio espectro y Aztreonam, y además con frecuencia, los plásmidos que codifican esta resistencia portan genes de resistencia a otros antibióticos, y el fenómeno de resistencia cruzada es muy frecuente. Hasta el momento solo los Carbapenemes han demostrado de forma consistente su eficacia frente a infecciones por cepas de *E. coli*.¹²

2.4.2 Salmonella

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y móviles. Crecen bien en los medios de cultivo habituales. De acuerdo con la presencia de los antígenos O, Vi y H pueden actualmente serotiparse en más de 2.300 serovariedades.¹³

2.4.2.1 Taxonomía

Actualmente, el género *Salmonella* consiste de una sola especie, que ha sido denominada *Salmonella entérica*. Ésta, a su vez, está formada por siete subespecies, dependiendo de su capacidad para realizar diferentes

reacciones bioquímicas. Cada subespecie, a su vez, está subdividida por varios métodos de hibridación ADN/ADN y métodos serológicos.¹⁴

Subgrupos de *Salmonella*.⁹

Subgrupo 1 de *Salmonella*. Incluye la mayoría de los subgrupos.

- *S. typhi*
- *S. choleraesuis*
- *S. paratyphi*
- *S. gallinarum*
- *S. pollorum*

Subgrupo 2 de *Salmonella*

- *S. salamae*

Subgrupo 3a de *Salmonella*

- *S. arizonae*

Subgrupo 3b de *Salmonella*

- *S. diazoniae*

Subgrupo 4 de *Salmonella*

- *S. hountenae*

Subgrupo 5 de *Salmonella*

- *S. bongori*

Subgrupo 6 de *Salmonella*

- *S. choleraesuis subesp. indica*

2.4.2.2 Epidemiología

Aunque puede ser muy variado el número de *Salmonellas* implicadas en la patología humana y haber diferencias según las áreas geográficas, las más frecuentes son la *S. typhimurium*, la *S. enteritidis* y la *S. virchow*. Su reservorio habitual es el tubo digestivo de las aves, cerdos, bóvidos y muchos otros animales salvajes o de compañía, siendo con diferencia los productos del pollo y gallina (carne y huevos) el origen de la mayoría de los casos. Las personas portadoras crónicas son también fuente de infección.¹³

Los mecanismos de transmisión es el consumo de agua o alimentos contaminados. Durante las épocas de calor, al aumentar en el verano el consumo de la ingesta de productos poco cocidos o elaborados con huevo (helados, mayonesas, etc.) aumenta la incidencia de esta patología, que en ocasiones se presenta en brotes de grupos o más o menos amplios de personas cuando el producto infectado forma parte de la comida consumida en celebraciones o de una cadena de elaboración de productos alimenticios.¹³

2.4.2.3 Factores de virulencia

Salmonella es un grupo de bacterias que ocasiona enfermedad severa pero casi nunca la muerte, presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunas serovariedades no tienen una estricta adaptación a un huésped, siendo capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies animales y en el hombre, otras serovariedades si son específicas, como *S. gallinarum* para las aves o *S. typhi* en el caso del hombre.¹⁵

La supervivencia de un microorganismo en un nicho determinado depende de su habilidad para adherirse, las adhesinas de la bacteria tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, con una estereoquímica específica. En general, las adhesinas de bacterias gramnegativas son: fimbria, fibrilla, flagelo, LPS y cápsula.¹⁶

Después de la ingestión de agua y alimento contaminado, *Salmonella* inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través de tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M que, debido a la ausencia del borde de cepillo, así como de glicocálix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias.¹⁶

Muchos microorganismos patógenos son capaces de entrar y sobrevivir dentro de las células eucarióticas. *Salmonella* dirige su arribo a células hospederas que no son normalmente fagocíticas como la superficie de la capa mucosa de células epiteliales. Presumiblemente, esta técnica de invasión asegura un nicho celular protegido para que el microbio se replique o persista.¹⁶

2.4.2.4 Enfermedades que causa

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril aguda de origen entérico producida por la *Salmonella typhi*. En raras ocasiones *Salmonella paratyphi A*, *paratyphi B* (*Salmonella schottmuelleri*) y *Salmonella paratyphica C* (*Salmonella hirschfeldii*) pueden producir un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad. Estas *Salmonellas* sólo afectan al ser humano. La

mortalidad con un tratamiento adecuado es casi nula y las complicaciones más graves suelen ser la perforación y la hemorragia intestinal.¹³

Se caracteriza por la aparición de fiebre progresiva asociada a estreñimiento o diarrea profusa de carácter inflamatorio. Clásicamente se ha asociado a esta enfermedad la bradicardia relativa, pero en realidad es un dato con baja sensibilidad y especificidad. Las complicaciones más graves son la hemorragia digestiva, la perforación intestinal y los aneurismas micóticos.¹

Salmonelosis gastroenteríticas o salmonelosis no tifoideas, son cualquier infección producida por *Salmonellas* distintas a la *S. typhi*. El cuadro clínico más frecuente relacionado con estas *Salmonellas* es la gastroenteritis aguda, siendo también responsables de casos de bacteriemias y de infecciones focales extradigestivas en algunas ocasiones.¹³

La infección por *Salmonella* no tifoidea produce una gastroenteritis indistinguible de la producida por otros patógenos gastrointestinales, siendo la responsable de aproximadamente el 50% de los casos de toxiinfecciones alimentarias. Los casos letales son excepcionales, pero pueden ocurrir, sobre todo en pacientes ancianos ingresados en residencias geriátricas y en inmunodeprimidos.¹³

Entre un 1-4% de los pacientes inmunocompetentes con gastroenteritis aguda por *Salmonella* pueden presentar hemocultivos positivos, siendo aun mayor este porcentaje en pacientes ancianos, con patología de base y en personas infectadas por el VIH. La bacteriemia, sobre todo si es persistente, nos debe hacer sospechar la existencia de una infección endovascular

(placas ateroscleróticas, aneurismas, prótesis endovasculares) u otra focalidad.¹³

2.4.2.5 Tratamiento

La gastroenteritis aguda por *Salmonella* es un cuadro autolimitado que no precisa de tratamiento antibiótico, sólo de medidas de sostén con reposición de líquidos y electrolitos. En los pacientes más vulnerables, con enfermedades asociadas o patologías que alteren la resistencia a la infección, se trabajará la posibilidad de emplear antibioterapia, que puede realizarse con Quinolonas, Cotrimoxazol o Amoxicilina durante 48-72 horas.¹³

No se recomienda el uso de inhibidores de la motilidad intestinal, ya que predisponen a la aparición de bacteriemia. En casos de infecciones vasculares se recomienda un tratamiento con betalactámicos (Ampicilina o Ceftriaxona) por vía intravenosa durante 6 semanas. En infecciones locales además de la antibioterapia habrá que valorar la necesidad de cirugía.¹³

2.4.3 *Klebsiella pneumoniae*

El género *Klebsiella* está muy extendido en la naturaleza: en la tierra, en el agua, en el polvo, en la leche, en los alimentos. También se las ve como organismos saprófitos de las vías respiratorias y del tracto digestivo del hombre y de los animales. Son microorganismos capsulados, inmóviles, fermentadores de lactosa y glucosa.²

Dentro de este género, la especie más importante es *K. pneumoniae*. Es la especie tipo y produce infecciones urinarias, respiratorias y sepsis, siendo

frecuentemente involucrada en brotes de infecciones hospitalarias. En algunos hospitales *Klebsiella* ha desplazado a *E. coli* como agente etiológico de infecciones intrahospitalarias.²

2.4.3.1 Características

Estas bacterias son bacilos gramnegativos, presentan cápsula que está compuesta por polisacáridos, carece de movilidad. Su tamaño es aproximadamente de 0.5 µm de diámetro por 3 µm de longitud. Poseen un metabolismo anaerobio facultativo, teniendo como hábitat natural suelo, agua e intestinos de animales.⁹

2.4.3.2 Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *K. pneumoniae* se expresan de forma diferente en las infecciones de la comunidad y en las nosocomiales. El serotipo K1 y la hipermucosidad se expresaban sobre todo en aislados procedentes de la comunidad. Dichos factores de virulencia condicionan la formación de abscesos hepáticos.¹

Se asocia a la neumonía lobar, de carácter necrotizante, que afecta por lo general a pacientes con enfermedades de base. Existe una importante tendencia a la formación de abscesos, cavitación, empiema y adherencias pleurales. La mortalidad es alta. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo se presenta como neumonía bacteriémica en pacientes no inmunodeprimidos.¹

Klebsiella es característicamente resistente a múltiples antibióticos. Además de la resistencia natural de este microorganismo a la Ampicilina y a la

Carbenicilina, la adquisición creciente de plásmidos R lo está dotando de una resistencia farmacológica creciente a las Cefalosporinas y a los aminoglucósidos. Además, están aumentando las cepas productoras de BLEE.¹

2.4.3.3 Enfermedades que causa

Las *Klebsiellas* tienen capacidad de producir una gama de procesos infecciosos como ser: infecciones de vías urinarias, neumonías, meningitis, bacteriemias, por lo que se han convertido en patógenos intrahospitalarios de alta importancia.¹⁷ La frecuencia como causantes de infecciones comparada con otros microorganismos, las coloca en primer lugar como causa de bacteriemias, en segundo lugar en infecciones por venopunción y de las vías urinarias y en tercer lugar en infecciones expuestas como es el caso de quemaduras.⁹

2.4.3.4 Tratamiento

La elección del antimicrobiano apropiado para el tratamiento de las infecciones causadas por *Klebsiella*, implica seguridad en la identificación bioquímica y serológica de la especie, la cual se someterá a los ensayos de sensibilidad a antimicrobianos. Los antibióticos de elección son los del grupo de los aminoglucósidos (Gentamicina, Tobramicina, y Amikacina): como alternativas los del grupo de Cefalosporinas (Cefuroxima y Cefotaxima).⁹

2.4.4 *Shigella*

Existen cuatro especies del género *Shigella* que causan shigelosis (disentería bacilar), esta infección tiene como característica daño a la mucosa intestinal del colon. Los estudios epidemiológicos indican que *Shigella* es transmitida por vía fecal-oral y en ocasiones por alimentos contaminados. Las *Shigellas* son muy infecciosas para los humanos. Generalmente la *Shigella* se asocia a inflamación localizada exclusivamente a la mucosa del colon y rara vez alcanza el torrente sanguíneo para producir bacteriemia.⁹

2.4.4.1 Características

El hábitat natural de las *Shigellas* está limitado al tubo digestivo de seres humanos y otros primates, donde producen disentería bacilar.⁶ El género *Shigella* está constituido por bacilos cortos gramnegativos sin agrupación, que miden de 0.7 µm de ancho por 3 µm de largo: además son inmóviles, no esporulan ni presentan cápsula y su ADN alcanza una similitud de hasta 70-75% en relación con *Escherichia coli*.⁹ De acuerdo a su antígeno "O", el género se divide en cuatro especies que, a su vez, abarcan 43 serotipos.⁹

2.4.4.2 Factores de virulencia

Las infecciones por *Shigella* casi siempre están limitadas al tubo digestivo; la invasión de la circulación sanguínea es poco frecuente. El proceso patológico esencial es la invasión de las células del epitelio de la mucosa por la fagocitosis activada, el escape de la vacuola fagocítica, la multiplicación y diseminación dentro del citoplasma de la célula epitelial y su paso a las células adyacentes. Los microabcesos de la pared del intestino grueso y la

porción terminal del intestino desencadenan necrosis de la mucosa, ulceración superficial, hemorragia y formación de una “pseudomembrana” en la zona ulcerosa. Todas las *Shigellas* liberan su lipopolisacárido tóxico. Esta endotoxina probablemente contribuye a la irritación de la pared intestinal.⁶

También producen una exotoxina termolábil que afecta tanto al intestino como al sistema nervioso central. La exotoxina es una proteína antigénica (estimula la producción de antitoxinas). Al actuar como una enterotoxina, produce diarrea lo mismo que la toxina similar a Shiga de *E. coli*, tal vez por el mismo mecanismo. En los seres humanos, la exotoxina inhibe la absorción de glúcidos y aminoácidos en el intestino delgado. Al actuar como “neurotoxina”, este material puede contribuir a la gravedad extrema y carácter letal de las infecciones y las reacciones del sistema nervioso central.⁶

2.4.4.3 Enfermedades que causa

La shigelosis o disentería bacilar corresponde a una severa colitis aguda cuyos principales síntomas son fiebre, tenesmo, calambres abdominales y diarrea mucosanguinolenta. La hipersensibilidad abdominal es más pronunciada, los ruidos intestinales son más frecuentes y, la mucosa colónica se torna hiperémica y edematosa, los folículos linfoides aumentan de tamaño y el exudado fibrinosupurativo da lugar a pseudomembranas grisáceas o amarillentas que recubren al tejido epitelial.⁹

2.4.4.4 Tratamiento

Ciprofloxacina, ampicilina, doxiciclina y trimetoprim-sulfametoxazol son los inhibidores más frecuentes de las cepas de *Shigella* y pueden suprimir los ataques clínicos agudos de la disentería y abreviar la duración de los síntomas. Es posible que no erradiquen los microorganismos del intestino.⁶

El tratamiento fundamental de la disentería bacilar contempla, como acción fundamental, la adecuada y oportuna restitución del agua y los electrolitos perdidos durante la fiebre y a través de las evacuaciones. Adicionalmente, se administran antibióticos tales como tetraciclinas, estreptomina, en caso de presentar resistencia las fluoroquinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina, etc.) representan una alternativa más eficaz.⁶

3. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Tras 70 años de uso clínico, que se iniciaron con la administración de penicilina a un paciente con sepsis estafilocócica en 1941, los betalactámicos son los antimicrobianos más prescritos, tanto en atención primaria como en los hospitales. A pesar de que no se dispone de ningún betalactámico realmente nuevo desde hace más de dos décadas, el aumento incesante de las resistencias y los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares han condicionado que exista una gran cantidad de información en la literatura sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos.¹⁸

3.1 Mecanismo de acción

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano.¹⁸

El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido) que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (gramnegativos) o mediante un pentapéptido de glicina (grampositivos).¹⁸

Los betalactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda

debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.¹⁸

3.2 Clasificación y estructura

La presencia del anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos. Además, éste determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa (actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal) y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) de esta gran familia de antibióticos. No obstante, para que el betalactámico sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos).⁵ (Tabla 1).

La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenémicos, Monobactamas e inhibidores de las betalactamasas.⁵

Las Penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral, que varía de unas

Penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades.¹⁸

Las Cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las Penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrothiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las Penicilinas) y un anillo betalactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina las diversas Cefalosporinas.¹⁸

La estructura básica de las Carbapenemes consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas, siendo los betalactámicos de más amplio espectro y actividad.¹⁸

Los Monoatómicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura betalactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo betalactámico no está fusionado a otro secundario.¹⁸

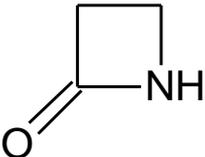
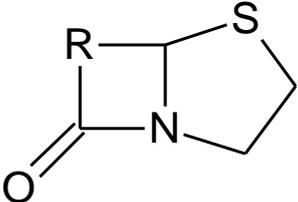
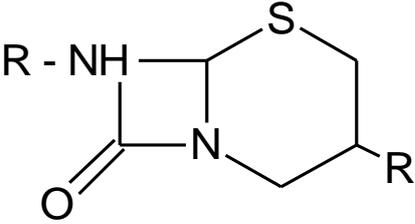
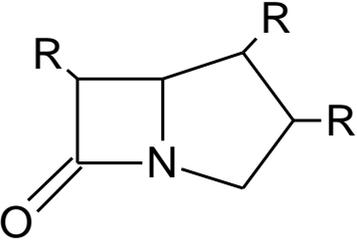
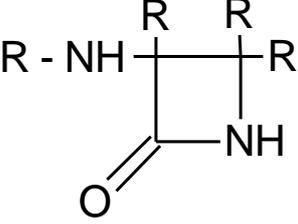
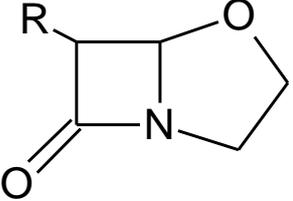
	Anillo betalactámico	+ Anillo Secundario	=Núcleo del betalactámico	→ GRUPO ANTIBIÓTICO
	Anillo tiazolidínico		Ácido 6- aminopenicilánico	PENICILINAS
	Anillo dihidrotiacínico		Ácido 7 α - cefalosporínico	CEFALOSPORINAS
	Anillo pirrolínico		Carbapenemo	CARBAPENEMAS
	Ninguno		Monobactamo	MONOBACTÁMICOS
	Anillo oxazolidínico		Clavamo/oxapena mo	ÁCIDO CLAVULÁNICO

Tabla 1: Estructura química de los betalactámicos.

Fuente: Suárez, Cristina y Gudiol, Francesc. (2009). Antibióticos betalactámicos. En Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (116-129). Barcelona, España: Elsevier España.

3.3 Espectro bacteriano

En general, el espectro de los betalactámicos incluye bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas. No son antimicrobianos activos sobre los micoplasmas (porque éstos carecen de pared celular) ni sobre bacterias intracelulares como las *Chlamydia* o *Rickettsia*, ya que tienen escasa capacidad de penetración dentro de las células. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de betalactamasas, probablemente unida a una penetración lenta debida a las características de la pared.⁵

El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarcaba inicialmente los cocos grampositivos, los cocos gramnegativos y los bacilos grampositivos (tanto facultativos como anaerobios), así como las espiroquetas y algunos bacilos gramnegativos anaerobios. La producción de derivados semisintéticos a partir de la molécula nativa permitió disponer de preparados activos por vía oral (penicilina V, Aminopenicilinas), con resistencia a las betalactamasas (Penicilinas antiestafilocócicas), mayor capacidad de penetración en las bacterias gramnegativas (Aminopenicilinas) o incluso con actividad antipseudomónica (Ureidopenicilinas y Carboxipenicilinas).⁵

Las Cefalosporinas de primera generación son muy activas sobre los cocos grampositivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esta actividad, en beneficio de una actividad mayor frente a bacilos gramnegativos, con excepciones notables. Todas las Cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la Meticilina y *Listeria monocytogenes*.¹⁸

Las Carbapenémicos son los betalactámicos de más amplio espectro. Sólo carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a Meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, algunas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas maltophilia*, y son poco activos frente a *Clostridium difficile*. Ertapenem es poco activo frente a *P. aeruginosa*.¹⁸

El Aztreonam (el único monobactámico disponible para uso clínico) posee una actividad excelente sobre bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias.⁵

3.4 Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas de naturaleza proteica, codificadas a través de la expresión de un gen de tipo cromosómico o transferidas por plásmidos o transposones de las cuales tienen un origen bacteriano inducible o constitutivo y que son capaces de hidrolizar el anillo betalactámico dejándolo inactivo.¹⁹

Las betalactamasas constituyen la estrategia de mayor éxito en la defensa bacteriana frente antibióticos betalactámicos. Probablemente estas enzimas se han desarrollado como variante de las propias enzimas biosintéticas de la pared celular, las transpeptidasas, transglicosidasas y carboxipeptidasas, que conocemos como PBP, objetivos del ataque de los betalactámicos.¹⁹

En este sentido es evidente que las betalactamasas son proteínas que fijan penicilina. En forma de proteína excretada (no membranaria como las PBP), las betalactamasas hidrolizan el anillo betalactámico del antibiótico¹⁹ pierda

su capacidad para unirse a las proteínas de unión a la penicilina y su acción bactericida²⁰ provocando su desestabilización química y su destrucción.¹⁹

3.5 Generalidades

Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones.¹⁸

3.7 Antecedentes históricos

El descubrimiento de la penicilina se atribuye a Alexander Fleming quien, en septiembre de 1928, observó que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en algunos de los tubos de ensayo utilizados para el cultivo se inhibe ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*. Este hongo producía una sustancia capaz de impedir el crecimiento no sólo de diferentes tipos de estafilococos, sino también de muchos estreptococos. En 1930, Cecil George Paine, un joven microbiólogo, utilizó por primera vez la penicilina como tratamiento tópico en varios sujetos con infecciones cutáneas y oculares.⁵

Sin embargo, debido a problemas de estabilidad química, el primer tratamiento parenteral con penicilina, tuvo que esperar hasta 1940. Aun ahora, después de casi 70 años, los betalactámicos son los antimicrobianos más prescritos, tanto en atención primaria como en los hospitales. A pesar de que no se dispone de ningún betalactámico realmente nuevo desde hace

más de 2 décadas, el aumento incesante de las resistencias y de los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares ha condicionado la existencia de una gran cantidad de información en la literatura médica sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos.⁵

3.7 Clasificación

Existen dos sistemas principales de clasificación: la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros y su correlación con la clasificación molecular de Ambler.²¹

3.8 Clasificación molecular de Ambler

La clasificación de Ambler se basa en la estructura molecular de las betalactamasas y su secuencia de aminoácidos. Esta clasificación, que, en forma inicial, fue introducida por Ambler en 1980, reconoce cuatro tipos moleculares designados A hasta D. Los tipos A, C y D incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa. Las betalactamasas de tipo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa y son inhibidas por EDTA.²¹

- Clase A.- Penicilinasas (encontradas en *Staphylococcus aureus*), TEM-1, SHV-1, betalactamasas cromosomales de *Proteus*, *Klebsiella* y Carbapenemasas.
- Clase B.- Metalo betalactamasas requieren un ión bivalente para su actividad (Zinc²⁺).

- Clase C.- betalactamasas usualmente tipo cromosomal AmpC propia de la mayoría de enterobacterias
- Clase D.- betalactamasas plasmidial tipo OXA.²¹

3.9 Clasificación funcional de Bush, Jacoby y Medeiros

La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros se basa en los sustratos que la betalactamasa hidroliza y en la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA, y Aztreonam u Oxacilina. Las mutaciones puntuales pueden alterar la afinidad por el sustrato específico y la susceptibilidad a los inhibidores, cambiando el grupo al que está asignada la enzima. Este modelo funcional de clasificación de las betalactamasas, propuesto por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, define los cuatro siguientes grupos de acuerdo a los sustratos hidrolizados y perfiles de inhibición.²¹

- Grupo 1.- Cefalosporinasas que no son adecuadamente inhibidas por el ácido clavulánico.
- Grupo 2.- Penicilinasas, Cefalosporinasas y Carbapenemasas que generalmente son inhibidas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Incluye 6 subgrupos que se definen de acuerdo a las tasas de hidrólisis de Carbenicilina o Cloxacilina (Oxacilina) producidas por las penicilinasas del Grupo 2.
- Grupo 3.- Metallo-betalactamasas que hidrolizan Penicilinas, Cefalosporinas, y Carbapenemes que son inhibidas por EDTA y no por inhibidores estructuralmente relacionados a los betalactámicos.
- Grupo 4.- Penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el Ácido Clavulánico.²¹

3.10 Producción de betalactamasas

El intercambio de material genético entre las poblaciones bacterianas permite el cambio de características fenotípicas que originan la aparición de cepas bacterianas nuevas, lo que puede resultar ventajoso especialmente si el ADN adquirido codifica la resistencia a los antibióticos.⁴

Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol.²²

Su aparición es especialmente importante por el amplio patrón de resistencia que provocan y son las responsables de infecciones nosocomiales graves, pero también de infecciones de menor gravedad, aunque más frecuentes como las ITU.²³

3.11 Betalactamasas cromosómicas

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.^{24, 25}

Para los organismos entéricos con potencial de AmpC betalactamasa de alto nivel por mutación, el desarrollo de la resistencia después de la terapia es una preocupación.²⁶

3.12 Betalactamasas plasmídicas

Las betalactamasas mediadas por plásmidos se han encontrado en todo el mundo, pero son menos comunes que las BLEE.²⁶ Probablemente, la infinidad de betalactamasas plasmídicas existentes tiene su origen en las mutaciones de los genes que codifican formas más sencillas de estas enzimas.²⁷

Cuando los fragmentos de ADN contienen genes de resistencia a un agente antimicrobiano estos pueden traspasar la resistencia a la nueva célula huésped.²⁸ Una importante proporción de las betalactamasas es codificada por genes de ubicación plasmídica, es decir, en material genómico bacteriano fácilmente transmisible.²⁹ Las betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas pueden causar fracasos terapéuticos.³⁰

4. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

Hace uno 20 años se empezaron a describir en Alemania y Francia las primeras betalactamasas que se conocerían después como betalactamasas de espectro extendido. Fenotípicamente, el rasgo que más llamaba la atención era que se trataba de enzimas que combinaban la posibilidad de transmisión plasmídica. El número de BLEE descritas ha aumentado de forma exponencial desde los primeros hallazgos.³¹

En el momento actual se han descrito más de 160 tipos de TEM y 100 tipos de SHV. Estas enzimas son de codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación, lo que favoreció su rápida dispersión, se reconocen también alrededor de 65 tipos de CTX-M.³²

4.1 BLEE tipo TEM

Son derivados de TEM-1 y TEM-2. TEM-1 se reportó por primera vez en 1965 a partir de una *Escherichia coli* aislado de un paciente en Atenas (Grecia) llamado Temoneira (de ahí la designación TEM). TEM-1 es capaz de hidrolizar ampicilina a una tasa mayor que la Carbenicilina, Oxacilina, o Cefalotina, y tiene una actividad insignificante contra Cefalosporinas de espectro extendido. Se inhibe por el ácido clavulánico. TEM-2 tiene el mismo perfil hidrolítico que TEM-1, pero difiere de este por tener un promotor nativo más activo y por una diferencia en el punto isoeléctrico. TEM-13 también tiene un perfil similar hidrolítico similar a TEM-1 y TEM-2. Se han descrito más de 100 tipos de betalactamasas tipo TEM.³⁴

Sin embargo, las betalactamasas mutantes recuperadas de TEM que mantienen la capacidad para hidrolizar Cefalosporinas de tercera

generación, pero que también demuestran resistencia a inhibidores de betalactamasas son consideradas como BLEE.³⁵

4.2 BLEE tipo SHV

Las BLEE tipo SHV pueden encontrarse con mayor frecuencia en aislados clínicos que cualquier otro tipo de ESBL. SHV se refiere a la variable sulfhidrilo. Esta designación fue hecha porque se pensó que la inhibición de la actividad del SHV estaba relacionado por el sustrato p-cloromercuribenzoato, y fue variable de acuerdo con otro sustrato usado para el ensayo. En 1983 Philliton y sus colaboradores obtuvieron un aislado de *Klebsiella ozaenae* en Alemania, fue descubierto que poseía una betalactamasa que hidroliza de manera eficiente Cefotaxima, y en un grado menor Ceftazidima.^{35, 36}

La secuenciación mostró que la betalactamasa difería de SHV-1, por la sustitución de glicina por serina en la posición 238. Esta mutación por sí sola representa las propiedades de amplio espectro de estas betalactamasas, designado como SHV-2. Las BLEEs tipo SHV se han detectado en una amplia gama de *Enterobacteriaceae* y en brotes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.^{35, 36}

4.3 BLEE tipo CTX-M

El nombre CTX refleja la actividad hidrolítica potente de estas betalactamasas contra Cefotaxima y Ceftriaxona. Este es un nuevo grupo que prevaleció en Sudamérica y Europa del Este, las BLEE CTX-M. Tazobactam exhibe una mayor actividad inhibidora de casi 10 veces del ácido clavulánico en contra betalactamasas tipo CTX-M. Cabe señalar que el

mismo organismo puede albergar tanto BLEE tipo CTX- M y BLEE tipo SHV o BLEE de tipo CTX-M y de betalactamasas tipo AmpC, pudiendo alterar el fenotipo de resistencia del antibiótico.³⁷

El número de BLEE tipo CTX-M se está expandiendo rápidamente. En la actualidad se han detectado en todos los continentes poblados. Estas cepas bacterianas que albergan estas enzimas son endémicas en Europa Occidental y América del Norte, por ejemplo, CTX-M-3 se ha descubierto en Polonia y Taiwán, CTX-M-2 en Argentina, CTX-M-4 en Rusia lo que sugiere una evolución independiente de estas enzimas.^{35, 37, 38}

4.4 BLEE tipo OXA

Las betalactamasas tipo OXA se llaman así debido a su habilidad de hidrolizar Oxacilina. Estas betalactamasas (grupo 2d) se caracterizan por tener velocidades de hidrólisis mayor que 50% para Cloxacilina y Oxacilina que para la bencilpenicilina.³⁵

Elas están predominantemente en *Pseudomonas aeruginosa*, pero han sido detectadas en muchas otras bacterias gramnegativas. De hecho, la más común de las betalactamasas tipo OXA, es OXA-1 que ha sido encontrada en 1 a 10% de los aislados de *Escherichia coli*. La mayoría de betalactamasas tipo OXA no hidrolizan las Cefalosporinas de amplio espectro en un grado significativo y no son considerados como BLEE. Sin embargo, OXA-10 hidroliza (débilmente) Cefotaxima, Ceftriaxona y Aztreonam, dando la mayoría de los organismos susceptibilidad reducida a estos antibióticos. Las BLEE tipo OXA se descubrieron originalmente en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de un solo hospital en Ankara, Turquía.

En Francia, un nuevo derivado de OXA-10 fue encontrado en un aislado de *Pseudomonas aeruginosa*.³⁵

4.5 BLEE tipo PER, VER-1 y otras BLEE

Las BLEE de este tipo muestran una homología que va del 25 al 27% comparado con BLEE tipo TEM y SHV. La betalactamasa PER-1 hidroliza eficientemente Penicilinas, Cefalosporinas y siendo susceptible a la inhibición del ácido clavulánico. PER-1 fue detectada por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa*, y más tarde en aislamientos de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y *Acinetobacter*.³⁶

Se han descubierto una variedad de otras betalactamasas que son mediadas por plásmidos o integrones de clase-A. Son reconocidas por su diversidad geográfica. También se han descrito nuevos BLEEs codificados cromosómicamente. VES-1 tiene mayor homología con PER-1 y PER-2 (38%), confiere resistencia de alto nivel a la Ceftazidima, Cefotaxima, y Aztreonam, que se inhibe por el ácido clavulánico.³⁹

Se encontró que el gen que codifica VES-1 es mediado por plásmido. Fue descrita originalmente en un bebé vietnamita hospitalizado en Francia. Otras enzimas VES también han sido detectadas en Kuwait y China. Otras BLEEs como BES, TLA, OFS e IBC son otros ejemplos de BLEEs no-TEM, BLEEs no SHV y se han encontrado en una amplia gama de ubicaciones geográficas.³⁹

4.6 Epidemiología de las BLEE

Los estudios de vigilancia epidemiológica realizados mundialmente evidencian una importante dispersión de las enterobacterias productoras de BLEE. Su magnitud lo ha convertido en un problema de salud, su codificación plasmídica favorece su diseminación entre cepas de la misma especie e incluso de especies diferentes.³²

Existe un comportamiento epidemiológico diferente, mientras las *K. pneumoniae* productoras de BLEE se diseminan de forma epidémica en el nosocomio, muy relacionadas con la comorbilidad de los pacientes, las manipulaciones diagnósticas y terapéuticas y el uso previo de antibióticos sobre todo de Oxiiminocefalosporinas, las *E. coli* aparecen en casos esporádicos, con presencia de catéter urinario, uso previo de Fluorquinolonas y muy frecuentemente de origen comunitario.³²

De acuerdo con el estudio para el monitoreo de la resistencia antimicrobiana (SMART), las tasas de *E. coli* productoras de BLEE en la región Asia/Pacífico fueron entre 34.9 y 42.2%. India y China representaron los países más afectados con tasas de 79 y 54%, respectivamente. Ambos países tienen una población mayor a los 2.5 billones de habitantes y una alta tasa de portadores fecales tanto en animales como humanos, éstos representan los reservorios más grandes para bacterias BLEE en todo el mundo.³⁴ (Fig. 2).

4.7 Detección en el laboratorio

Al menos 200 BLEE han sido detectadas en diferentes especies y presentan una variedad de perfiles de susceptibilidad. La detección de betalactamasas de espectro extendido es un aspecto de gran importancia en todos los laboratorios de microbiología; en la actualidad las normas de CLSI M100 S-20 establece nuevos criterios de interpretación para Cefalosporinas (Cefazolina, Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona y Ceftizoxima) y Aztreonam.²⁰

Según la evaluación de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos y datos clínicos limitados, se establecieron los nuevos criterios de interpretación para Cefalosporinas. Cefepime y Cefuroxima (parenteral) también se evaluaron, sin embargo, no fueron necesarios cambios en el criterio de interpretación para las dosis indicadas.²⁰

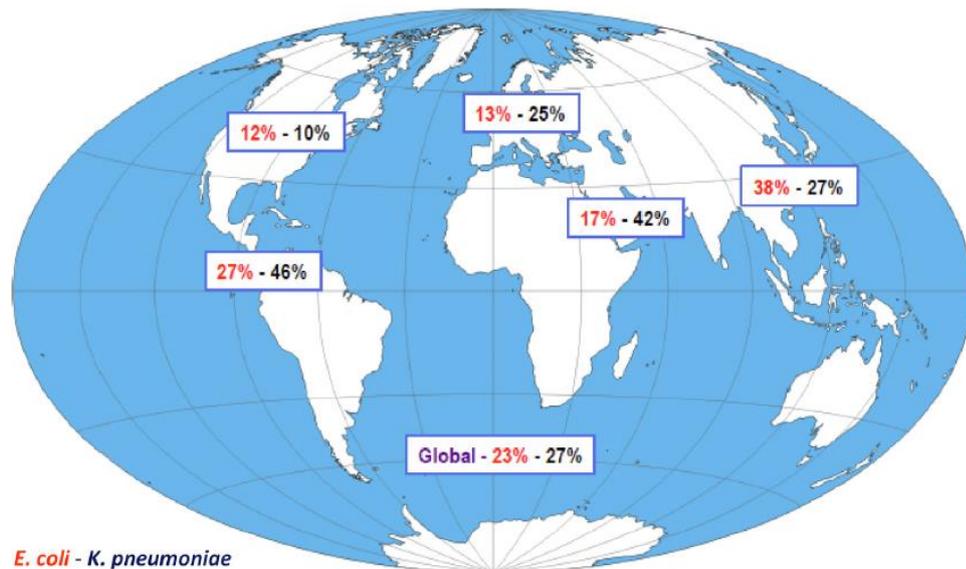


Figura 2: Porcentaje de aislados de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE.

Fuente: Ruiz, Patricia y Cantón, Rafael. (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. Rev Esp Quimioter, 29, 21-25.

4.7.1 Prueba tamiz BLEE recomendada por CLSI

La prueba tamiz y la prueba confirmatoria fenotípica para la detección de BLEE está recomendada para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, y cuando no se han implementado los nuevos criterios de interpretación. Esta prueba se puede realizar por el método de difusión en disco y por el método de microdilución. Cuando se realiza por difusión en disco se deben tener en cuenta las recomendaciones de CLSI para esta técnica en cuanto a medio de cultivo (Agar Mueller Hinton), concentración del inóculo (estándar 0.5 McFarland), tiempo y atmósfera de incubación.²⁰

Para el método de microdilución en caldo se debe tener en cuenta el medio (Caldo Mueller Hinton ajustando su pH), concentración del inóculo (estándar 0.5 McFarland), tiempo y atmósfera de incubación.²⁰

4.7.2 Otras Pruebas para detección de BLEE

Adicional a la prueba para la detección de BLEE recomendada por CLSI existen varios métodos descritos como son el test tridimensional, agares cromogénicos, métodos de microdilución que usan el clavulanato con diferentes betalactámicos como es el E test. Estas pruebas pueden utilizarse como alternativas para la detección de BLEE.²⁰

4.7.3 E test para la detección de BLEE

Esta prueba utiliza tiras que contienen en una parte de ella diferentes concentraciones decrecientes de la cefalosporina (Ceftazidima) y en la otra parte la misma cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico.

Las tiras deben ser colocadas en el agar Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones de CLSI para el método de difusión en disco en cuanto a inóculo, tiempo y atmósfera de incubación. La CIM se determina observando el punto en que la elipse de inhibición intercepta la escala de la tira. Se lee el extremo del antibiótico sin el ácido clavulánico y el extremo que contiene ácido clavulánico, se divide las dos concentraciones en ese orden y un resultado positivo para BLEE es cuando la proporción es ≥ 8 y negativo < 8 .²⁰

Cuando el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa formación de la elipse de inhibición, la CIM será el valor superior que tiene la tira y, por el contrario, cuando la elipse de inhibición se encuentre por debajo de la tira debe informar el valor mínimo de la escala.²⁰ (Fig. 3).

4.7.4 Prueba alternativa Doble disco para la detección de BLEE

Este método de doble disco fue descrito por Jarlier en 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (20/10 μg) en el centro de una placa a una distancia de 20 mm se coloca un disco de Ceftazima (30 μg) y al otro lado un disco de Cefotaxima (30 μg). La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE.²⁰ (Fig. 4).



Figura 3: Prueba E test para detección de BLEE.

Fuente: Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010.



Figura 4: Prueba doble disco para detección de BLEE.

Fuente: Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010.

5. JUSTIFICACIÓN

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a Penicilinas y Cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Son en su mayoría producidas por enterobacterias especialmente frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. La identificación de este tipo de enzima es muy importante porque impone un plan de acción para el control de las infecciones que pudieran producirse. Por lo que se hace necesario diferenciar entre la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y otros mecanismos de resistencia para evitar el tratamiento inadecuado de infecciones causadas por este tipo de cepas.

Los procedimientos de laboratorio para la identificación de BLEE son muy importantes, existen varios métodos fenotípicos, de bioensayos, bioquímicos y genotípicos. No existe una metodología que proporcione la sensibilidad, especificidad y sencillez, dada la complejidad de la detección de las BLEE y sus variantes, por lo que se recomienda una adecuada interpretación de los perfiles de sensibilidad con los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma y posteriormente, se debe elegir el método de confirmación. Lo que permitirá conocer la verdadera dimensión del problema que representan, limitar su diseminación y adecuar las escasas opciones terapéuticas.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Enterobacteriaceae* aisladas de muestras biológicas en H. Caborca, Sonora.

6.2 Particulares

- Identificar enterobacterias de importancia clínica
- Evaluar la susceptibilidad a betalactámicos
- Determinar su capacidad de producir betalactamasas de espectro extendido

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de la Muestra

Las muestras fueron proporcionadas por hospitales y laboratorios de H. Caborca, Sonora. El muestreo se realizó a conveniencia tomando solo aquellas que presentaban de moderadas a abundantes bacterias y piuria en sedimento urinario basándose en las recomendaciones de la Secretaría de Salud, en total se recaudaron 162 muestras durante un período de noviembre de 2015 a diciembre del 2016, de las cuales se obtuvieron 82 cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. La muestra fue la primera orina matinal obtenida a través de la micción, previo aseo vaginal se colectó la porción media en un recipiente estéril, según lo recomendado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

7.2 Procesamiento de la Muestra

Se tomó una alícuota de la muestra en un tubo 13x100 para llevar a cabo el examen químico de la orina sin centrifugar utilizando tiras reactivas de la marca Combur-Test[®]. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 3,500 rpm para llevar a cabo la revisión del sedimento urinario al microscopio. En base a los resultados obtenidos en estas pruebas se seleccionaron las muestras que serían transportadas al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte para llevar a cabo el urocultivo. Los parámetros a tomar en cuenta fueron la presencia de nitritos y leucocitos en la tira reactiva, la observación microscópica de moderadas o abundantes bacterias en el sedimento urinario

y más de 5 leucocitos por campo, según las recomendaciones de la Secretaria de Salud.

7.3 Procesamiento en el laboratorio de Microbiológico

Dentro de la campana de flujo laminar (Purifier Logic Class II Biosafety Cabinets) marca LABCONCO se utilizó un ambiente estéril para llevar a cabo la inoculación de la muestra en un medio agar sangre, en el cual se utilizó la técnica del estriado en cuatro cuadrantes. Posteriormente se incubó a una temperatura de 37°C durante un tiempo de 24 a 48 horas, se procedió a observar la morfología de las colonias, así como llevar a cabo prueba de identificación primaria: tinción Gram, para así aislar los microorganismos de nuestro interés que son los gramnegativos (Fig. 5).

7.3.1 Tinción Gram

Para llevar a cabo la tinción Gram, se encendió el mechero dentro de la campana de flujo laminar para esterilizar el área, una vez estéril se procedió a tomar con un asa calibrada (10 µL) una colonia de la placa de agar Sangre y se colocó en un portaobjetos al que previamente se le agregó una gota de solución salina estéril, se esparció la muestra sobre el portaobjetos y se fijó con calor. Posteriormente se tiñó la muestra 1 minuto con colorante Cristal violeta, se enjuagó con agua destilada y se esperó a que se secase. Se hizo el mismo proceso en disolución de Lugol, después de enjuagar y secar se decoloró utilizando Alcohol cetona durante 30 segundos, de nuevo se enjuagó. Por último, se tiñó durante un minuto con Safranina, repitiendo el procedimiento de nuevo. Una vez seca la muestra se observó la laminilla al microscopio con aceite de inmersión y objetivo de 100x (Fig. 6).



Figura 5: Medio de cultivo agar Sangre.

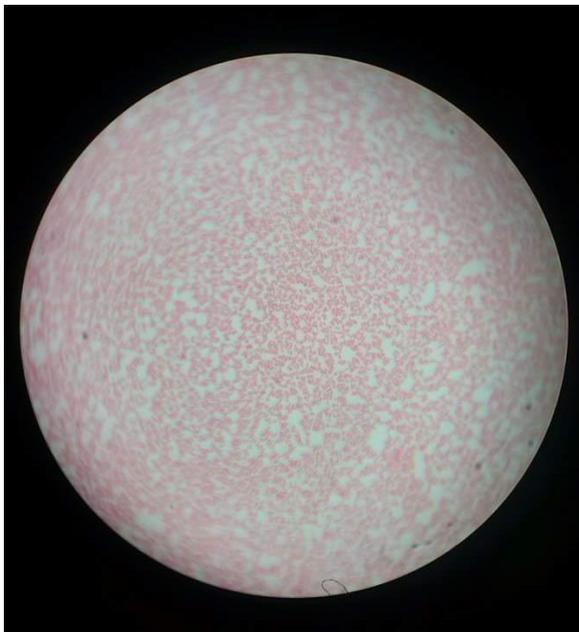


Figura 6: Tinción Gram.

Los microorganismos teñidos de morado son grampositivos mientras que los de color rosa o rojo son gramnegativos. En base a estos resultados se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas de identificación y antibiograma.

7.3.2 Medios de cultivo diferenciales para gramnegativos.

Los medios de cultivo diferenciales que se utilizaron fueron EMB, Mac Conkey, SS y Verde brillante, los cuales se inocularon por la técnica de estriado sencillo (Fig. 7, 8, 9,10).

7.3.3 Pruebas de identificación bioquímica de gramnegativos

Las pruebas bioquímicas empleadas fueron las IMVIC (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato Simmons), Agar inclinado Kligler, motilidad y la fermentación de carbohidratos.

7.3.3.1 Indol

Para llevar a cabo esta prueba se inoculó por picadura una colonia del cultivo problema en un tubo con medio SIM (ácido sulfúrico, indol, motilidad), el cual permite la determinación de los tres parámetros ya mencionados. Para determinar si el microorganismo es productor de Indol se agregaron 3-5 gotas del reactivo de Kovac, se agita suavemente y se observa. La formación de un anillo color rojo en la superficie del medio indica una reacción positiva (Indol positivo) (Fig. 11).

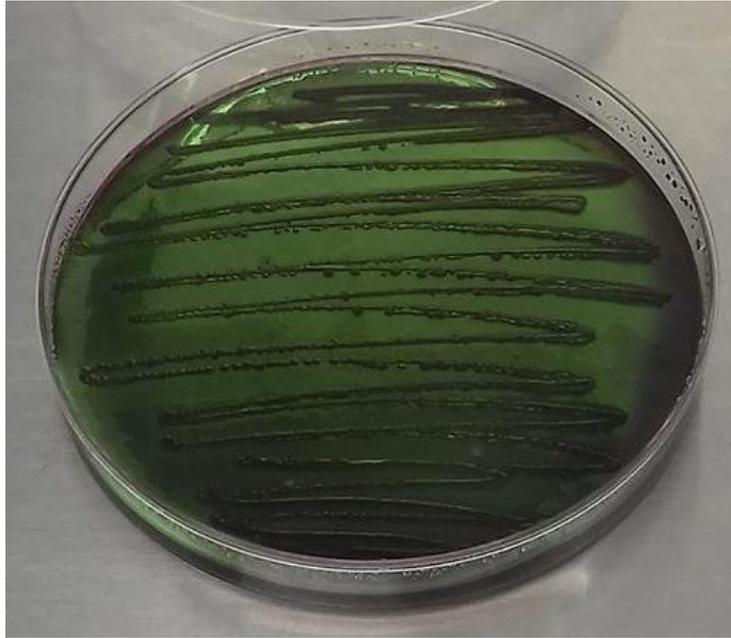


Figura 7: Medio de cultivo EMB (Eosin Metil Blue).



Figura 8: Medio de cultivo Mac Conkey.

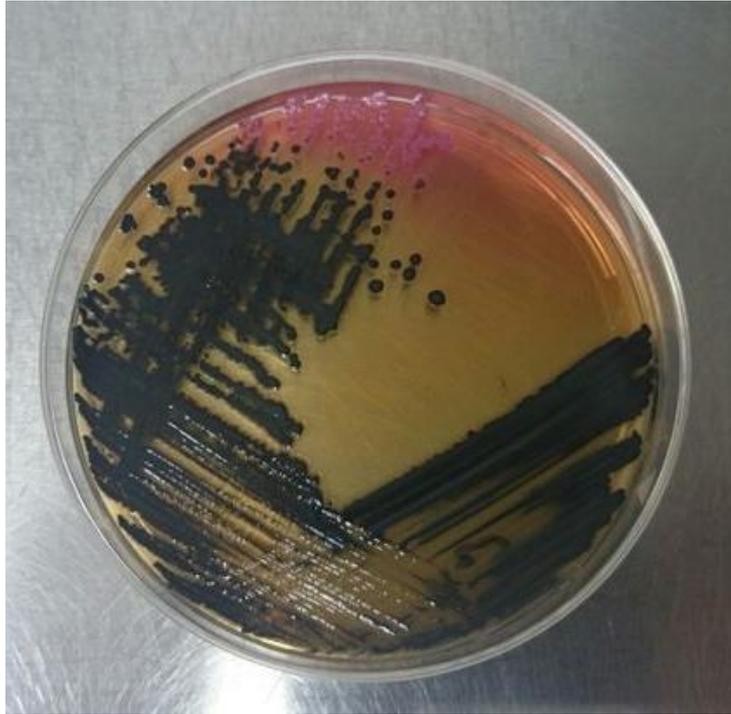


Figura 9: Medio de cultivo SS (*Salmonella-Shigella*).



Figura 10: Medio de cultivo Verde brillante.

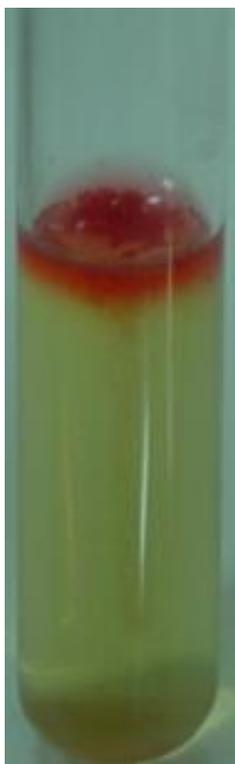


Figura 11: Prueba de Indol positiva.

7.3.3.2 Rojo de Metilo

Se utilizó el medio líquido MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer) que se emplea para la determinación de los parámetros ya mencionados. En un tubo con 5 mL del medio se inoculó de un cultivo puro la colonia problema, se incubó durante 24-48 horas a 37°C y posteriormente se adicionaron 5 gotas de solución indicadora Rojo de metilo. Una coloración roja, indicadora de la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de la glucosa, constituye un resultado positivo y una amarilla indica reacción negativa (Fig. 12).

7.3.3.3 Voges Proskauer

Se utilizó el medio líquido MR-VP. En un tubo con 1 mL del medio se inoculó de cultivo puro la colonia problema, se incubó durante 24-48 horas a 37°C y posteriormente se adicionaron 12 gotas (0.6 mL) de α naftol y 4 gotas (0.2 mL) de KOH al 40%, se agitó y se dejó reposar de 5 a 10 minutos. La aparición de un color rosado o rojo constituye una reacción positiva (Fig. 13).

7.3.3.4 Citrato de Simmons

Para realizar esta prueba se utilizó el medio de cultivo Citrato de Simmons, se prepararon tubos en pico de flauta y se inocularon con un asa de punta por picadura y estriado, se incubaron de 24 a 48 horas. La observación de crecimiento y viraje del medio a azul presenta un resultado positivo (Fig. 14).



Figura 12: Prueba de Rojo de Metilo positiva.



Figura 13: Prueba de Voges Proskauer.



Figura 14: Prueba de Citrato de Simmons positiva.

7.3.3.5 Motilidad

Se utilizó el medio SIM, se inoculó por picadura la colonia bacteriana y se incubó durante 24 horas a 37°C. La presencia de turbidez en el medio es indicativa de positividad a la prueba (Fig. 15).

7.3.3.6 Medio agar de Hierro Kligler (Fermentación de glucosa/lactosa)

Se utilizó en el medio Kligler, que además permitió determinar la producción de ácido sulfhídrico y gas. Se prepararon tubos pico de flauta, se inoculó una colonia del cultivo, por picadura y estriado, se incubó durante 24 horas a 37°C y se observaron los cambios del medio (Fig. 16).

7.3.4 Antibiograma

Para realizar el antibiograma se utilizaron los discos marca “BBL Sensi-Disc Antimicrobial Susceptibility test Discs”

Estos discos se colocaron en una placa de agar Mueller Hinton previamente inoculada con una suspensión bacteriana establecida al 0.5 de McFarland. Se utilizaron 6 discos con una separación de 1.5 cm entre cada uno. Los antibióticos utilizados fueron: AMC, CRO, CTX, CAZ, ATM y FOX (Fig. 17).

Se incubó a 37°C durante 24 horas y se midieron los halos de inhibición generados, basándonos en las medidas establecidas por la casa comercial para considerar si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente a la acción de los antibióticos empleados (Fig. 18) (Tabla 2).



Figura 15: Prueba de motilidad positiva.



Figura 16: Prueba de medio agar de Hierro Kligler.

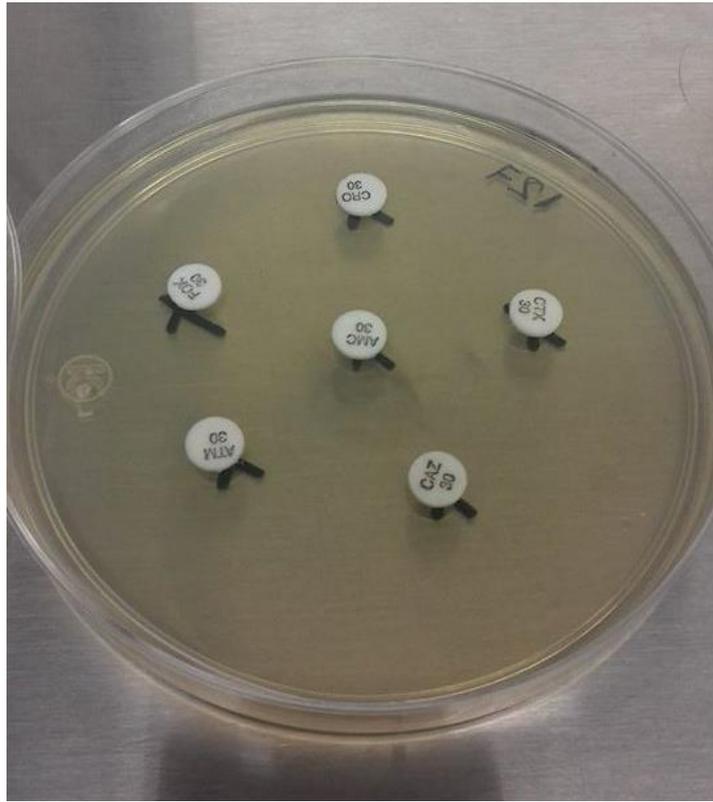


Figura 17: Plantilla del antibiograma.



Figura 18: Antibiograma.

Antibiótico	Sensibilidad		
	R	I	S
Amoxicilina	<13	14-17	>18
Ceftazidima	<17	18-20	>21
Cefotaxima	<22	23-25	>26
Ceftriaxona	<19	20-22	>23
Aztreonam	<17	18-20	>21
Cefoxitina	<14	15-17	>18

Tabla 2. Medidas de susceptibilidad de los antibióticos betalactámicos.
Fuente: "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing"
página 44-49. Junio 2016.

7.4 Control de calidad

Se utilizaron las cepas ATCC de *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883, marca “Difco” Bactrol Disks Set A, como control para las diferentes pruebas realizadas (Fig. 19).

7.5 Análisis de datos

Los resultados fueron capturados y guardados en Microsoft Excel. Se utilizó el mismo programa para graficar los datos obtenidos.



Figura 19: Cepas ATCC.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

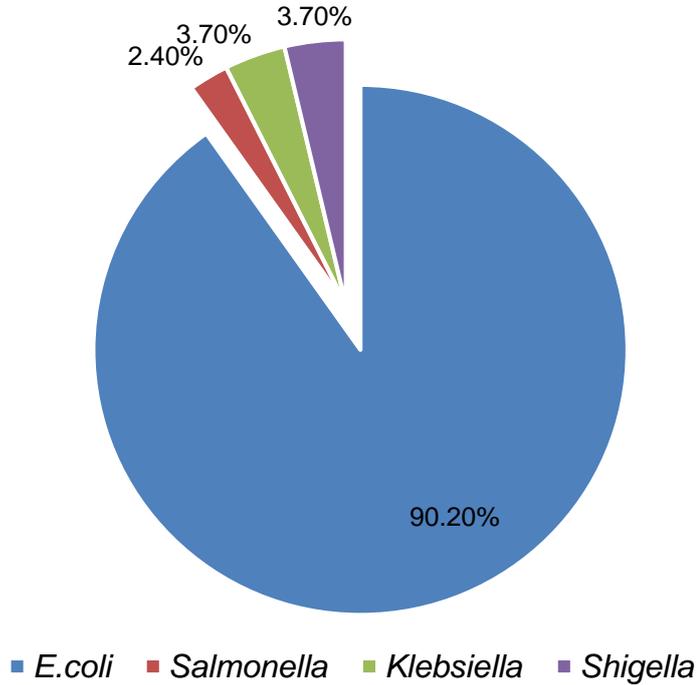
8.1 Resultados

Se procesaron 162 muestras clínicas de orina durante el periodo de noviembre del 2015 a diciembre del 2016, de las cuales 82 (50.61%) cumplieron con las recomendaciones de la Secretaria de Salud y las especificaciones para microorganismos gramnegativos. Se identificaron 74 (90.2%) cepas de *E. coli*, 2 del género *Salmonella* spp. (2.4%), 3 de *Klebsiella* (3.7%) y 3 de *Shigella* (3.7%) (Gráfica 1).

Al realizar el antibiograma con los diferentes antibióticos betalactámicos con las cepas de enterobacterias aisladas se encontró una sensibilidad del 42.68% a Ceftriaxona, 20.73% a Cefotaxima, 42.68% a Ceftazidima, 47.56% a Aztreonam, 35.36 % a Cefoxitina y 15.82% a Amoxicilina/Ácido Clavulánico (Gráfica 2).

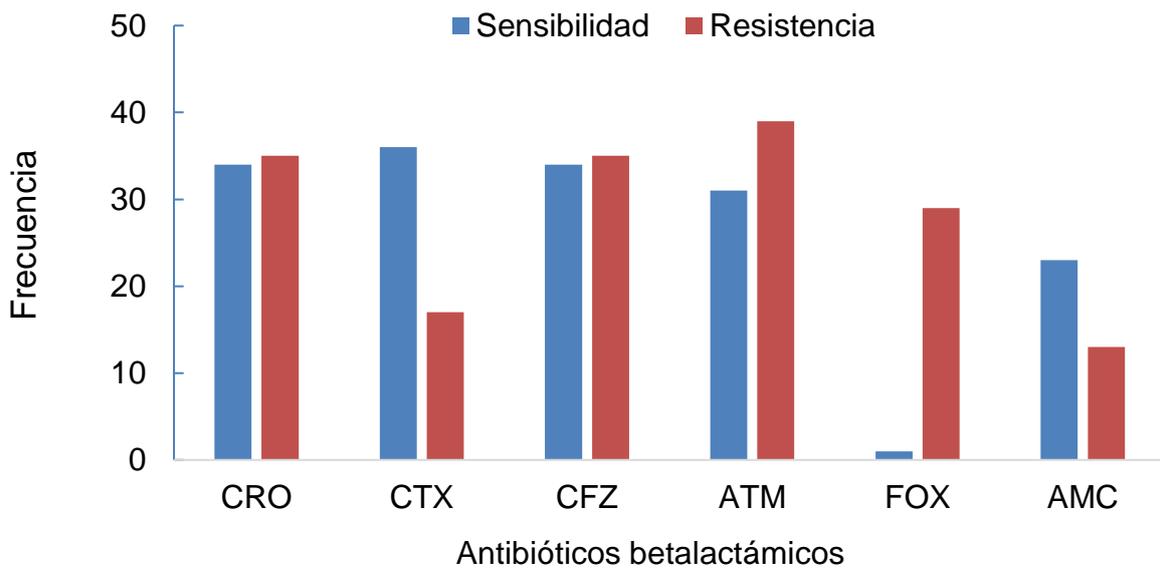
En la tabla 3 se muestra la susceptibilidad de las cepas de *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Shigella* a los antibióticos betalactámicos. De las 82 cepas de enterobacterias aisladas el 42.68% presentaron betalactamasas de espectro extendido. De las cuales el 85.71% corresponden a cepas de *E. coli*, 5.72% a *Klebsiella*, 5.72% a *Shigella* y 2.85% a *Salmonella* (Gráfica 3).

Cepas de enterobacterias aisladas de muestras clínicas de H. Caborca, Sonora



Gráfica 1: Cepas de enterobacterias aisladas de muestras clínicas de H. Caborca, Sonora.

Sensibilidad a betalactámicos en cepas de enterobacterias aisladas

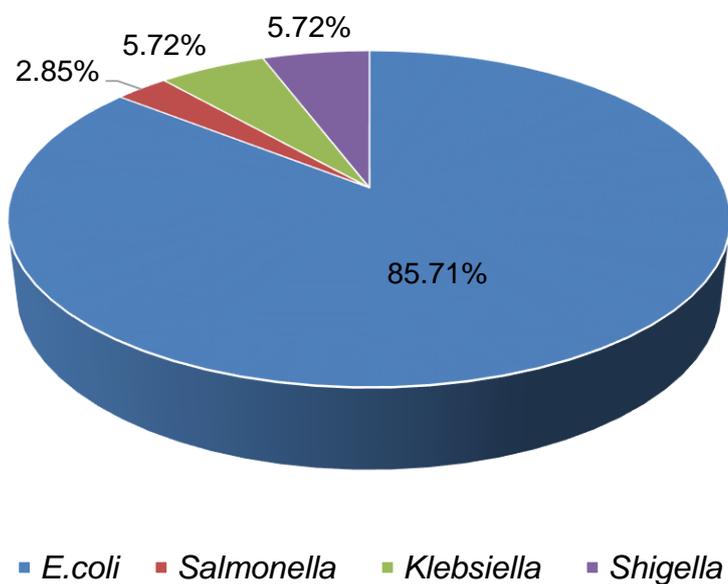


Gráfica 2: Sensibilidad a betalactámicos en cepas de enterobacterias aisladas.

Antibiótico	Cepas aisladas			
	<i>E. coli</i> (%)	<i>Salmonella</i> (%)	<i>Shigella</i> (%)	<i>Klebsiella</i> (%)
Amoxicilina	16.2	0	0	33.33
Ceftazidima	40.5	100	33.33	66.66
Cefotaxima	21.6	0	0	33.33
Ceftriaxona	44.5	50	33.33	33.33
Aztreonam	48.6	100	33.33	66.66
Cefoxitina	39.1	50	33.33	66.66

Tabla 3: Susceptibilidad de las cepas aisladas a antibióticos betalactámicos.

Cepas de enterobacterias productoras de BLEE



Gráfica 3: Cepas de enterobacterias productoras de BLEE.

8.2 Discusión

Las infecciones causadas por bacterias productoras de Betalactamasas representan un reto para la salud pública a nivel mundial; aún se desconoce la prevalencia real de las BLEE en la mayoría de las instituciones de salud; pero los frecuentes fracasos terapéuticos en las infecciones por enterobacterias han dirigido los estudios, hacia los mecanismos de resistencia de dichos microorganismos, ya que este grupo de bacterias es el que más mecanismos de resistencia a betalactámicos ha desarrollado.⁴³

La emergencia de la producción de BLEE está modificando de forma significativa la sensibilidad a antimicrobianos de las enterobacterias, y en especial de algunas de las más frecuentemente implicadas en ITU.⁴⁴ En este estudio se encontró un porcentaje de enterobacterias productoras de BLEE en urocultivos del 42.68% siendo el 85.71% cepas de *Escherichia coli*, mientras que en un estudio realizado en el 2015 por Morones y colaboradores encontraron una prevalencia de cepas BLEE en urocultivos del 28% donde el 92% correspondieron a *Escherichia coli*.

En el mismo estudio hecho por Morones y colaboradores se encontró en hemocultivos un porcentaje de enterobacterias productoras de BLEE de 49%, 71% y 59% en los años 2012, 2013 y 2014, respectivamente.

Las bacterias no son sólo eficientes en generar resistencia por su habilidad de multiplicarse rápidamente, sino que también, por su capacidad de transferir genes de resistencia a otras cepas o especies, lo cual actualmente está ocasionando que haya cepas multirresistentes y éstas pueden propagarse por todo el mundo.

Aunque inicialmente las BLEE aparecían sobre todo en brotes hospitalarios, poco a poco su producción ha ido derivando hacia el medio extrahospitalario, y en este momento casi la mitad de las cepas productoras de BLEE proceden de este origen.⁴⁴

Los tratamientos para infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE son escasas. La mayoría de los autores concuerdan que Imipenem es el tratamiento de elección para infecciones producidas por BLEE. Aunque debe de administrarse de manera apropiada, ya que un uso exagerado puede generar cepas multirresistentes. Además de lo dicho antes, se requiere de un manejo controlado de antibióticos para evitar un mayor aumento de cepas resistentes.

9. CONCLUSIÓN

De todas las muestras clínicas procesadas la mitad pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Identificándose cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella*, siendo *E. coli* la de mayor prevalencia. Mostrando la mayoría susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos como Ceftriaxona, Cefotaxima y Ceftazidima.

Se deja en evidencia un alto porcentaje de desarrollo de BLEE en las muestras clínicas analizadas, lo que es alarmante porque se encontró un 42.68% de estas cepas, lo que confiere resistencia a Cefalosporinas de tercera generación, como Ceftriaxona (uno de los antimicrobianos mayormente prescritos); esto sin considerar que existen otros mecanismos que confieren resistencia a Cefalosporinas.

Se espera que conocer el patrón de resistencia local facilite la toma de decisiones clínicas para disminuir la prescripción errónea de antimicrobianos, con efecto positivo en el desenlace del paciente.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar un nuevo antibiograma con antibióticos Carbapénemicos para las bacterias productoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).
- Realizar pruebas de susceptibilidad bacteriana en diferentes muestras clínicas e intrahospitalarias.
- Implementar el uso de métodos moleculares para la identificación bacteriana.
- Uso de equipos especializados.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Puerta, A. y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10, 3426-31.
2. Merino, Luis A. y Lösch, Liliana S. (2007). FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE. Universidad Nacional del Nordeste - Facultad de Medicina - Microbiología e Inmunología, 12, 1-8.
3. Rivera, Marco A. (2012). Betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. aisladas de reservorios inanimados en un hospital del norte del Perú. *Rev Esp Quimioter*, 25, 161-163.
4. Muzachiodi, Marisol I. - Ferrero, Susana M. (2005). Incidencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. 05/12/2016, de Hospital Escuela José F. de San Martín - Rivadavia 1250- Corrientes (3400) Argentina Sitio web: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/3-Medicina/M-135.pdf>
5. Suárez, Cristina & Gudiol, Francesc. (2009). Antibióticos betalactámicos. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (116-129). Barcelona, España: Elsevier España.
6. Geo F. Brooks, 2011, JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG. MICROBIOLOGÍA MÉDICA, The McGraw-Hill Companies, Inc, Estados Unidos, 815.
7. Whashington C. Winn, 2006, Koneman Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color, Panamericana, México, 1475.

8. Gobernado, M. (2005). Betalactamasas de espectro extendido en aumento. REV ESP QUIMIOTERAP, 18, 115-117.
9. Molina, José. 2010, Microbiología Bacteriología y Virología. MÉNDEZ EDITORES, México, D.F., 912.
10. Molina, José y Manjarrez, Ángel. (2015). INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS - ESCHERICHIA COLI. 12/12/2016, de Universidad Nacional Autónoma de México Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/enfermedades-vias-urinarias.html>
11. Molina, José y Eslava, Carlos A. (2015). ESCHERICHIA COLI DIARROGÉNICA. 11/12/2016, de Universidad Nacional Autónoma de México Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
12. García, Ana Ma., García, Elisa., Hernández, Alicia., Ruiz, Joaquín., Yagüe, Genoveva., Herrero, José Antonio y Gómez, Joaquín. (2011). Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter, 24, 57-66.
13. Jurado, R., Arenas, C., Doblaz, A., Rivera, A. y Torre, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. Medicine, 10, 3497-3501.
14. Calva, Edmundo (2006). Salmonella typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. 14/12/2016, de Instituto de

Biotecnología, UNAM Sitio web:
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>

15. Parra, Miguel., Durango, Johny y Máttar, Salim. (2002). MICROBIOLOGÍA, PATOGÉNESIS, EPIDEMIOLOGÍA, CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR Salmonella. MVZ-CÓRDOBA, 7, 187-200
16. Figueroa, Inda Marcela y Verdugo, Antonio. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. Rev Latinoam Microbiol, 47, 25-47.
17. Remo, M., E.D (s.f.) Bacilos Gram negativos Fermentadores: ENTEROBACTERIAS. Vigilancia, prevención y control de infecciones asociadas a los servicios de la salud, 305-318.
18. Marín, Mar y Gudiol, Francesc. (2003). Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin, 21, 42-55.
19. Giner, S., Canós, M., Rodilla, F. y Ferrer, C. (1996). Valoración de los inhibidores de las betalactamasas. Farm Hosp, 20, 225-235.
20. Secretaria distrital de salud, 2010, Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20 2010. Bogotá bicentenario, Bogotá, 78.
21. Martín, Susana., Martín, Ma. Trinidad y Liso, F. Javier. (2010). TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE). 12/01/2017, de Farma Hospital Sitio web:
<https://microred.files.wordpress.com/2012/08/beta-lactamasas-para-leer-e-interpretar.pdf>

22. Oliver, Antonio y Cantón, Rafael. (2006). ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS PLASMÍDICAS DE ESPECTRO EXTENDIDO. *Control calidad SEIMC*, 1-10.
23. Carrillo, Ana y García, Alicia. (2007). Taller del Laboratorio Clínico. España: Asociación Española de Biopatología Médica.
24. García, J., Miguel, S., Lerma, Á., Barcelona, F., Cardenal, A., y 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
25. Merentes, A., Rizzi, A., Papartzikos, J., Rivero, N., y 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>
26. Jacoby, George A. (Jan. 2009). AmpC Beta-Lactamases. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 22, 161-182.
27. Martínez, Luis y Calvo, Jorge. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 28, 4-9.
28. 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>
29. Barcelona, Laura., Marin, Marcelo y Stambouljan, Daniel. (2008). BETALACTAMICOS CON INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS AMOXICILINA-SULBACTAM. *MEDICINA*, 68, 65-74.

30. Navarro, Ferran, Calvoc, Jorge., Cantónd, Rafael., Fernández, Felipe y Mirelisa, Beatriz. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 29, 524-535.
31. Muñoz. J.L. (diciembre 2004). Betalactamasas de espectro extendido: ¿Son hoy un problema en España? *Rev Esp Quimioterap*, 17, 314-316.
32. Morejón, Moisés. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista cubana de Medicina*, 52, 272-280.
33. Aguilar, Daniel. (2015). E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Rev Invest Med Sur*, 22, 57-63.
34. Bradford, P. Extended-Spectrum B-Lactamasas in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and Detection of this Important Resistant Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001. 14 (4): 933-951
35. Jacoby G.A., MUNOZ-PRICE L.S. Mechanisms of disease: The New b- Lactamases. *N Engl J Med* 2005. 352:380-91
36. Phillipon A., Labia R., Jacoby G. Extended-Spectrum b-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989. 33(8): 1131 – 1136
37. Ho P., Poon W., Loke S., Leung M., Chow K., Wong R., Yip. K., Lai E., Tsang K. Community emergence of CTX-M type extended-spectrum b-lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007. 60: 140–144
38. Pallechi L., Bartoloni A., Fiorelli C. Rapid dissemination and diversity of CTX-M Extended-espectrum betalactamases genes in commensal

- Escherichia coli isolates from low-resource setting in Latin America. Antimicrobial agents and chemotherapy, Aug. 2007, p. 2720–2725
39. Garcia C., De La Gandara M. y Castillo F. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella. 2010 Enferm Infecc Microbiol Clin. 28 (Supl 1): 12-18
40. Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de la Infección Aguda, no Complicada del Tracto Urinario de la Mujer: Secretaría de Salud; 2008.
41. Diagnóstico y Tratamiento de la Infección del Tracto urinario Bajo Durante el Embarazo, en un primer Nivel de Atención, México: Secretaria de Salud; 2009.
42. Andreu, Antonia., 2010, *Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario* (2010). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimiento-smicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia14a.pdf>
43. Perozo, Armindo José y Castellano, Maribel Josefina. (2009). Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. Kasma, 37, 25-37.
44. Hernández, Ma. S., García, J. Á y Muñoz, J.L. (2009). Actividad in vitro de fosfomicina frente a enterobacterias de origen urinario productoras de betalactamasas de espectro extendido. Rev Esp Quimioter, 22, 25-29.

APÉNDICE A

MEDIOS EMPLEADOS PARA EL AISLAMIENTO

1. Agar sangre (base)

Para la preparación de placas de Agar-Sangre destinadas al aislamiento y cultivo de diversos microorganismos, sobre todo patógenos exigentes y para su determinación. Sin adición de sangre, es adecuado para la realización de hemocultivos y como base para la preparación de diversos medios de cultivo especiales.

Fundamento

Su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los microorganismos presentes. El valor de pH 6.8 es especialmente favorable para la conversación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros. Para la determinación de las formas de hemólisis es adecuado añadir sangre, recién obtenida.

Cuando se utiliza el medio basal de cultivo, sin adición de sangre, se recomienda ajustar su pH entre 7.2 y 7.4 pues la mayoría de las bacterias forman colonias más precozmente y crecen con mayor exuberancia en un medio ligeramente básico.

Composición

Un litro del medio contiene: extracto de corazón y peptona (20.0 g), cloruro sódico (5.0 g) y agar (15.0 g). El pH es de 6.8 ± 0.2

Preparación

Disolver 40 gramos en un litro de agua destilada, mezclar bien hasta obtener una solución uniforme, calentar y agitar frecuentemente, hervir durante 1 minuto.

Esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C), dejar enfriar a 45-50°C, incorporar 5 a 8 % de sangre desfibrinada y verter en placas.

El medio de cultivo preparado es, antes de la adición de la sangre, claro y amarillo parduzco y posteriormente a la adición de sangre del color de la misma y no hemolizado.

2. Agar EMB

Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos gramnegativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

Fundamento

Este medio combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos gramnegativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias grampositivas.

Composición

Un litro del medio contiene aproximadamente: Peptona (10.0 g), lactosa (5.0 g), sacarosa (5.0 g), fosfato dipotásico (2.0 g), agar (13.5 g), eosina (0.4 g) y azul de metileno (0.065 g). El pH final: 7.2 ± 0.2

Preparación

Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos; mezclar, calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a no más de 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°C y distribuir agitando suavemente.

Interpretación

Microorganismo	Tipo de Colonia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Verdosas con brillo metálico
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Mucosas, rosa púrpura, confluyente.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Incoloras
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Incoloras
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Incoloras

Tabla 4: Interpretación morfológica de colonias en medio EMB.

3. Agar Mac Conkey

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos gramnegativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo.

Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora grampositiva.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Composición

Un litro del medio contiene aproximadamente: peptona (17.0 g), pluripeptona (3.0 g), lactosa (10.0 g), mezcla de sales biliares (1.5 g), cloruro de sodio (5.0 g), rojo neutro (0.03 g), cristal violeta (0.003 g) y agar (13.5 g). El pH es de 7.1 ±0.2.

Preparación

Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio preparado es de color rojo-púrpura.

Interpretación

Microorganismo	Tipo de Colonia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Rojas con halo turbio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Rosadas mucosas
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Incoloras, transparentes
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Incoloras, transparentes
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Incoloras, transparentes
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Diminutas, incoloras, opacas.

Tabla 5: Interpretación morfológica de colonias en medio Mac Conkey.

4. Agar SS

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. y de algunas especies de *Shigella* spp. a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia.

Fundamento

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial.

La selectividad, está dada por sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias grampositivas, de la mayoría de los Coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp. Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio.

Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. *Salmonella*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen bien en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes. La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro.

Composición

Un litro del medio contiene aproximadamente: Pluripeptona (5.0 g), extracto de carne (5.0 g), lactosa (10.0 g), mezcla de sales biliares (8.5 g), citrato de

sodio (8.5 g), tiosulfato de sodio (8.5 g), citrato férrico (1.0 g), agar (13.5 g), verde brillante (0.00033 g) y rojo neutro (0.025 g). pH final: 7.0 ± 0.2

Preparación

Suspender 60 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta homogeneizar. Calentar a ebullición durante 2 o 3 minutos. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Enfriar a 45-50°C y distribuir unos 20 mL por placa. Secar la superficie del medio unos minutos en la estufa.

Interpretación

Microorganismos	Tipo de Colonia
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Transparentes, centro negro
<i>Shigella flexneri</i>	Incoloras
<i>Shigella sonnei</i>	Incoloras
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Transparentes, centro negro
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Rosadas o rojas
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Rosadas cremosas y mucosas
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Incoloras, de muy escaso crecimiento

Tabla 6: Interpretación morfológica de colonias en medio SS.

5. Agar Verde brillante

Medio de enriquecimiento altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella* spp., excepto *S. typhi* y *S. paratyphi*, a partir de muestras clínicas, alimentos, y otros materiales de importancia sanitaria. No se recomienda para el aislamiento de *Shigella* spp.

Es de un valor excepcional cuando se investiga un gran número de muestras de heces o alimentos, por su alta capacidad de diferenciación de las colonias sospechosas.

Fundamento

En el medio de cultivo, la pluripeptona y el extracto de levadura, constituyen la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. La lactosa y la sacarosa son los hidratos de carbono fermentables, el rojo fenol es el indicador de pH, que vira al amarillo cuando hay producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el verde brillante actúa como agente selectivo.

Composición

Un litro de medio está compuesto aproximadamente: Pluripeptona (10.0 g), extracto de carne (3.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), lactosa (10.0 g), sacarosa (10.0 g), rojo fenol (0.08 g), Verde brillante (0.0125 g), agar (20.0 g). pH final: 6.9 ± 0.2 .

Preparación

Suspender 58 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 2 o 3 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos. Secar la superficie del medio por unos minutos en la estufa.

Interpretación

Microorganismos	Tipo de Colonia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Amarillo-verdosas sobre fondo amarillento
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Rosas, blancas o transparentes sobre fondo rojo
<i>Salmonella typhi</i>	Crecimiento inhibido
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Rosas, blancas o transparentes sobre fondo rojo
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Crecimiento inhibido
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento inhibido

Tabla 7: Interpretación morfológica de las colonias en medio Verde brillante.

APÉNDICE B

Tinción Gram

1. Tinción de Gram

Técnica utilizada para la diferenciación bacteriana en base a la composición de su pared celular. Nombrada en honor el bacteriólogo Christian Gram.

Fundamento

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta (otros colorantes básicos no son tan efectivos) y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las grampositivas como las gramnegativas, están teñidas de azul.

El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el I_2 ; el KI simplemente hace soluble el I_2 en agua. El I_2 entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo I_2 -cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran, mientras que otros (gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias gramnegativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula. La delgada capa de peptidoglicano es

incapaz de retener el de complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente, provocando que el de complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular.

Después de la decoloración las células grampositivas son todavía azules, pero las gramnegativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica.

Preparación de reactivos

Cristal violeta

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Violeta de Genciana	0.5 g
Agua destilada	100 mL

Lugol

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Yodo	1.0 g
Yoduro de potásico	2.0 g
Agua destilada	100 mL

Alcohol cetona

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad</u>
Alcohol etílico (95%)	500 mL
Agua destilada	300 mL

Safranina

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad</u>
Safranina	0.25 g
Agua destilada	100 mL

Procedimiento

- Se agrega una gota de solución fisiológica en un portaobjetos nuevo, se coloca la colonia sospechosa sobre la gota y se homogeniza. Posteriormente se fija la muestra con calor.
- Una vez fijada la muestra se le añaden de 10-15 gotas de Cristal violeta durante 1 minuto, se enjuaga con solución fisiológica y se deja secar la laminilla.
- Se colore la muestra ahora con Lugol durante 1 minuto, se enjuaga y deja secar una vez más la laminilla.
- Se procede con la coloración de la muestra utilizando alcohol cetona durante 30 segundos, se enjuaga y deja secar la laminilla.
- Se añade el colorante Safranina durante 1 minuto, se enjuaga y deja secar la laminilla.
- Una vez seca, se observa al microscopio 100x utilizando aceite de inmersión.

Resultados

Después de la coloración de contraste las células gramnegativas son rojas, mientras que las grampositivas permanecen azules.

APÉNDICE C

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICAS

1. Indol

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: Indol, escatol (metilindol) e indolacetico (IAA-indolacetato). Diversas enzimas intracelulares que intervienen en este proceso reciben el nombre colectivo de triptofanasa lo que indica un sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del indol.

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismo para desdoblar el indol de la molécula triptófano.

Medios y reactivo empleados

Existen diferentes medios que permiten la identificación de indol uno de ellos es el medio agar SIM (ácido sulfhídrico, indol, motilidad). El reactivo empleado es el Kovac.

Procedimiento

El medio es inoculado por picadura y se incuba durante 18-24 horas una vez pasado el periodo de incubación se le adicionan 5 gotas del reactivo de Kovac directamente al tubo y se agita levemente.

Interpretación

- La formación de un anillo color rojo o rosa es indicativo de indol positivo.
- Si no se produce color en la superficie el resultado es negativo.

2. Rojo de Metilo

Permite comprobar la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación amortiguadora de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema.

La prueba del rojo de metilo (RM) se basa en el empleo de un indicador del pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrogeno (pH) presente cuando un organismo fermenta la glucosa.

Medios y reactivo empleados

Caldo RM-VP (Rojo de Metilo- Voges-Proskauer). El reactivo utilizado es el Rojo de metilo.

Procedimiento

Se inocula de un cultivo puro la colonia sospechosa en el medio y se incuba 48 horas a 37°C. Una vez pasado el lapso de incubación se le adiciona directamente al tubo 5 gotas del reactivo.

Interpretación

- Si el reactivo mantiene su color rojo en la superficie del medio el resultado es positivo (pH 4.4).

- Si el color del reactivo es amarillo es un resultado negativo (pH 6)
- Si la tonalidad del reactivo es naranja se trata de una reacción retardada y se debe someter a reincubación (24-48 horas).

3. Voges-Proskauer

Mediante esta prueba podemos determinar la capacidad de algunos microorganismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de glucosa.

La reacción de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoína), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Ésta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias.

Medio y reactivo empleados

Se utiliza el medio MR-VP y los reactivos empleados son α -naftol al 5% y KOH al 40%.

Procedimiento

Se inocula el medio con las colonias sospechosas obtenidas de un cultivo puro, se incuba durante 24-48 horas, una vez pasado el periodo de incubación se le añaden 0.6 mL de α -naftol al 5% y posteriormente 0.2 mL de KOH al 40%. Se deja reposar de 10 a 15 minutos antes de realizar la interpretación del color.

Interpretación

- La presencia de un color rojo o rosado en la superficie del medio es indicativa de una reacción positiva (presenta acetoina).
- El color amarillo o cobrizo en la superficie del medio indica una reacción negativa.

4. Motilidad

Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo, algunas formas de cocos son móviles. Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con motilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles. Los organismos no móviles carecen de flagelos.

Esta prueba permite determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil.

Medio y reactivo empleados

El medio utilizado para llevar a cabo esta prueba de identificación es el agar SIM. No requiere de ningún reactivo.

Procedimiento

Se inocular por picadura la colonia sospechosa obtenida de un cultivo puro y se somete a un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Una vez lista se observan los cambios en el medio.

Interpretación

- Un resultado positivo es representado por la presencia de turbidez alrededor de la picadura en el medio.
- Un resultado negativo no muestra cambios en la turbidez.

5.Citrato de Simmons

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

Fundamento

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarbóxico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y

bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

Composición

En un litro del medio se encuentran: citrato de sodio (2.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), fosfato dipotásico (1.0 g), fosfato monoamónico (1.0 g), sulfato de magnesio (0.2 g), azul de bromotimol (0.08 g) y agar (15 g). El pH es de 6.9 ± 0.2 .

Preparación

Suspender 24.2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

Siembra

A partir de un cultivo puro de 18-24 horas, sembrar en superficie un inóculo ligero, usando un asa sin arrastrar el agar.

Incubación

A 37°C , durante 24-48 horas, en aerobiosis. Algunos microorganismos pueden requerir hasta 4 días de incubación.

Resultados

- Positivo: crecimiento y color azul en el pico, alcalinidad.
- Negativo: el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color.

6. Agar inclinado Kligler

Medio de cultivo frecuentemente usado en microbiología de alimentos para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa y lactosa, y a la producción de ácido sulfhídrico.

Fundamento

En el medio de cultivo, la peptona de carne y la tripteína, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Composición

Un litro del medio contiene aproximadamente: peptona de carne (13.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), lactosa (10.0 g), tripteína (10.0 g), glucosa (1.0 g), citrato de hierro y amonio (0.5 g), tiosulfato de sodio (0.3 g), rojo de fenol (0.025 g) y agar (15.0 g). El pH es de 7.3 ± 0.2 .

Preparación.

Suspender 24.2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

Siembra

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, sembrar el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del medio. Se somete a un periodo de incubación de 37°C durante 24 horas, en aerobiosis.

Resultados

- Pico alcalino (rojo)-fondo ácido (amarillo): el microorganismo solo fermenta glucosa.
- Pico ácido-fondo ácido: el microorganismo fermenta glucosa y lactosa.
- Pico alcalino-fondo alcalino: el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- Formación de burbujas o rajaduras en el medio: el microorganismo es productor de gas.
- Viraje del medio a negro: el microorganismo es productor de H₂S

7. Agar SIM

Medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos. Es útil para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Fundamento

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

Composición

Un litro del medio contiene: tripteína (20.0 g), peptona (6.1 g), sulfato de hierro y amonio (0.2 g), tiosulfato de sodio (0.2 g) y agar (3.5 g).

Preparación

Suspender 30 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver; calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir unos 4 mL en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical.

Siembra

A partir de un cultivo de 18-24 horas en medio sólido, sembrar por punción profunda con aguja de inoculación recta (no usar ansa con anillo). Se debe inocular el centro del tubo, y la punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Es importante que la siembra se realice en línea recta.

Incubación

Durante 24 horas, a 37 °C, en aerobiosis. Luego de la incubación, agregar 3-5 gotas de reactivo de Kovac o de Erlich.

Resultados

- Turbidez en el medio: Cepa móvil
- Oscurecimiento del medio: Cepa productora de H₂S
- Desarrollo de anillo color rojo después de agregar reactivo de Kovac: Cepa indol positiva.

8. Caldo MR-VP

Medio utilizado para la realización del ensayo de Rojo de Metilo y Voges-Proskauer. Es particularmente útil para la clasificación de enterobacterias.

Fundamento

En el medio de cultivo, la pluripectona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos

finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol).

Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros. Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa. Esta coloración se debe a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo.

Composición

Un litro del medio contiene: pluripeptona (7.0 g), glucosa (5.0 g), y fosfato dipotásico (5.0 g). El pH es de 6.9 ± 0.2

Preparación

Suspender 17 g del polvo por litro de agua destilada. Calentar suavemente agitando hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.

Siembra e incubación

Por inoculación directa, a partir del cultivo en estudio. En aerobiosis, a 37°C por 3 días.

Reactivos empleados

- Rojo de metilo: rojo de metilo 0,04%.

- Voges-Proskauer: alfa naftol al 5% e hidróxido de potasio al 40%.

Resultados

- Rojo de metilo: Viraje del medio a rojo tras adicionar el reactivo indican un resultado positivo.
- Voges-Proskauer: Viraje del medio a rojo tras adicionar los reactivos y agitar representan un resultado positivo.

9. Algoritmo de trabajo

Género	KIA	GAS	H ₂ S	RM	VP	IND	CIT	MOT
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	+
<i>Salmonella</i>	Alc/A	+	+	+	-	-	+	+
<i>Shigella</i>	Alc/A	-	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	A/A	++	-	-	+	-/+	+	-

KIA: agar hierro de Kligler; H₂S: ácido sulfhídrico; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; IND: Indol; CIT: citrato; MOT: motilidad.
 ++: reacción positiva fuerte; +: reacción positiva; -: reacción negativa; -/+: 50-90% de cepas negativas.

Tabla 8: Algoritmo para identificación de enterobacterias.

APÉNDICE D

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA

1. Agar Mueller Hinton

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además, es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Fundamento

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ex National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomendó su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que se detallan a continuación: presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, es útil para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos.

Composición

Un litro del medio contiene: Infusión de carne (300.0 g), peptona ácida de caseína (17.5 g), Almidón (1.5 g), agar (15.0 g). pH final: 7.3 ± 0.1

Preparación

Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas de Petri (o agregar los suplementos que se desee) hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 mL en placas de 9 cm de diámetro).

2. Antibiograma

Los fenómenos de la transferencia genética y la aparición de mutantes en las bacterias grampositivas y gramnegativas, han dado lugar a la aparición de cepas resistentes a uno o varios antimicrobianos tanto en población general como en el ambiente hospitalario han incrementado tal fenómeno. Esto lleva a la necesidad de conocer el patrón de susceptibilidad de las cepas aisladas en los casos clínicos frente a los antimicrobianos disponibles, teniendo en consideración que tales patrones varían ampliamente, dependiendo del género, la especie y el sitio donde se aísla el microorganismo.

Entre los grupos de bacterias que presentan patrones variables de susceptibilidad se encuentran las enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, *Staphylococcus*, *Enterococos* y *Pseudomonas*. Las pruebas de susceptibilidad *in Vitro* pueden ser cuantitativas (se mide la mínima concentración capaz de inhibir el desarrollo de las bacterias) o semicuantitativas (las cepas se clasifican en resistentes o sensibles).

Fundamento de la prueba

Esta prueba se fundamenta en que, al colocar un disco impregnado con determinada cantidad de antimicrobiano sobre un medio sólido inoculado con bacterias, el antimicrobiano se difundirá formándose un gradiente de concentración, el cual inhibirá o permitirá el crecimiento de la bacteria. Una vez que se coloca el disco de papel filtro en contacto con el medio del cultivo, el antibiótico se difundirá hacia el interior.

3. Antibióticos

Antibiótico	Siglas	Concentración
Amoxicilina/Ac.Clavulánico	AMC	10/20 µg
Ceftriaxona	CRO	30 µg
Cefotaxima	CTX	30 µg
Ceftazidima	CAZ	30 µg
Aztreonam	ATM	30 µg
Cefoxitina	FOX	30 µg

Tabla 9. Antibióticos betalactámicos.