

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

Identificación fenotípica de *Escherichia coli* productora de carbapenemasas por método rapidez CARBA NP y test de Hodge modificado en aislamientos de muestras clínicas de la región de H. Caborca, Sonora.

TESIS

Que para obtener el grado de

Químico Biólogo Clínico

Presenta

Victor Montaña Olivas

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 **Victor Montaña Olivas**, 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

Q.B Rafael de la Rosa López

Secretario

Dra. Yessica Enciso Martínez

Vocal

Dra. Dora Edith Valencia Rivera

Suplente

M.C Ramón Efraín Lugo Sepúlveda

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mis padres Lorenia Olivas y Víctor Montaña quienes siempre me dieron su apoyo incondicional en cada proyecto y meta que me he propuesto, ser mi ejemplo a seguir, brindándome siempre ánimo, su total confianza, por velar por la educación y el bienestar mío y de mi hermano.

A mi hermano Roberto Montaña Olivas quien siempre me aguantó cuando necesitaba estudiar para mis materias.

A mis abuelos y toda mi familia por darme una palabra de aliento y consejos cuando lo necesitaba.

A todos mis amigos, a los que conocí siendo solamente compañeros de clase pero que el tiempo compartido, las disputas (para ponernos de acuerdo) y los momentos (más buenos que malos) hicieron que nos convirtiéramos en una gran familia y a quienes conozco desde siempre Romerito, Betsaida Díaz, Laura Montaña, Sergio Mazón, Gerardo Estrada. Con los que he pasado muy buenos momentos y con los que compartí viajes, proyectos, clases y muchas experiencias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios quien me ha dado fortaleza, sabiduría y paciencia (mucha).

A la Universidad de Sonora que me recibió durante 4 años y medio, donde viví muchas experiencias y aprendí a ejercer mi carrera a la que amo con profesionalismo y dedicación, además de brindarme compañeros de clase y maestro a los cuales admiro y respeto mucho.

A la Dra. Yessica Enciso Martínez quien me enseñó el manejo del laboratorio clínico y me dio la oportunidad de trabajar en él. Agradezco que me haya aceptado como alumno y haberme compartido todo su conocimiento y tiempo tanto para este proyecto, clases y para el curso de Ceneval, su amistad y sus regaños cuando llegaba a flojear. Por estar siempre disponible a aclarar dudas y resolver los problemas que se presentaban. Además, fomentar en mí lo que me apasiona.

Al Q.B Rafael de la Rosa López por haberme dado su entera confianza y compartir conmigo y mi grupo uno de los viajes más memorables de la generación y hacer todo lo posible por hacer que fuera un éxito. Por permitirme trabajar en el laboratorio de Microbiología y brindarme su conocimiento y amistad.

A la Dra. Dora Edith Valencia Rivera por compartir conmigo sus experiencias y conocimientos durante la carrera.

Al M.C Ramón Efraín Lugo Sepúlveda por ayudarme a superarme en el aprendizaje, por compartir sus experiencias y ayudarnos en diversos proyectos resolviendo dudas y preguntas.

A todos mis amigos, Familia y a quienes de manera directa o indirecta hicieron todo esto posible.

"Los fracasos son también útiles,
porque, bien analizados, pueden conducir al éxito".

Alexander Fleming

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE GRÁFICAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	xi
RESUMEN	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ENTEROBACTERIAS	4
2.1 Generalidades	4
2.1.1 Características	4
2.1.2 Transmisión y ubicación	4
2.2 <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.1 Características	7
2.2.2 Epidemiología	8
2.2.3 Factores de virulencia	9
2.2.4 Clasificación	10
2.2.4.1 <i>E.coli</i> Enteropatógena (EPEC)	10
2.2.4.2 <i>E.coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	11
2.2.4.3 <i>E.coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	12
2.2.4.4 <i>E.coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	12
2.2.4.5 <i>E.coli</i> Enteroagregante (EAEC)	13

2.2.4.6 <i>E. coli</i> difusamente adherente (DAEC)	14
2.2.4.7 <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	15
2.2.5 Tratamiento	15
3. Antibióticos carbapenémicos	16
3.1 Estructura	17
3.2 Consideraciones generales de la terapia antibiótica	17
3.3 Mecanismo de acción	20
3.4 Mecanismos de resistencia a carbapenémicos por enterobacterias	20
3.4.1 Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa	21
3.4.2 Expulsión del antibiótico mediante la activación de las bombas de eflujo	22
3.4.3 Modificación del sitio blanco	22
3.4.4 Betalactamasas involucradas en la resistencia a Carbapenémicos	23
3.5 Clasificación de las carbapenemasas	24
3.5.1 BLEE clase A: Serincarbapenemasas	24
3.5.2 BLEE clase B: Metallo- β -lactamasas	25
3.5.3 BLEE clase D: Enzimas del tipo OXA	25
3.6 Detección en el laboratorio	26
3.6.1 Métodos fenotípicos	26
3.6.1.1 prueba de sinergismo de doble disco	27
3.6.1.2 Método de Hodge modificado	27
3.6.1.3 prueba de rapidez carba NP	28

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 General	30
5.2 Específicos	30
6. DELIMITACIONES DEL ESTUDIO	31
6.1 Criterios de inclusión	31
6.2 Criterios de exclusión	31
7. MATERIALES Y MÉTODOS	32
7.1 Obtención de la Muestra	32
7.2 Procesamiento de la Muestra	32
7.3 Método RAPIDEC® CARBA NP	33
7.3.1 Preparación del test	33
7.3.2 Preparación del inóculo	34
7.3.3 Procedimiento del test	38
7.4 Método de Hodge modificado	38
7.5 Control de calidad	41
7.6 Análisis de datos	41
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
8.1 Resultados	44
8.2 Discusión	44
9. CONCLUSIÓN	49
10. RECOMENDACIONES	50

11.0 BIBLIOGRAFÍA

51

ANEXOS

58

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
1. Otros miembros patógenos de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	6

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Hallazgos en la muestra de orina analizadas.	45
2. Cepas de enterobacterias aisladas de muestras clínicas.	45
3. Resultados entre el test de Hodge modificado y el test Rapidec carba NP.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de los antibióticos carbapenémicos.	18
2. Agar sangre.	35
3. Tinción de Gram.	35
4. Agar Mac-Conkey.	36
5. Agar EMB.	36
6. Agar Kligler.	37
7. Agar urea.	37
8. Medio de SIM.	37
9. Kit de RAPIDEC® CARBA NP.	39
10. Tira con pocillos de RAPIDEC® CARBA NP.	39
11. Plantilla de la tira para la realización de la prueba rápida RAPIDEC® CARBA NP.	40
12. Placa sin incubar.	44
13. Método de Hodge modificado.	43
14. Resultado positivo en el método de Hodge modificado	43

LISTA DE ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

Significado	Abreviatura
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Toxina causante de cólera	CT
Cepa celular Henrietta Lacks	HeLa
kiloDalton	kDa
proteasas autotransportadoras	Sat
alfa hemolisina	Hly
Ácido sulfhídrico	H ₂ S
Ácido fenil borónico	APB
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
Ácido sulfúrico, indol, motilidad	SIM
Adenosín monofosfato cíclico	AMPc
Aldehído Reductasa Intermedio	ARI
American Type Culture Collection	ATCC
Antígeno factor de colonización	CFA
Betalactamasas de espectro extendido	BLEE
Capsular	Antígeno K
Clinical & Laboratory Standards Institute	CLSI
Concentración inhibitoria mínima	CIM
Dehidropeptidasa	DPH
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica	EHEC

<i>E. coli</i> Enteroinvasiva	EIEC
<i>E. coli</i> Enteropatógena	EPEC
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica	ETEC
<i>E. coli</i> Uropatógena	ECUP
<i>E.coli</i> difusamente adherente	DAEC
<i>E. coli</i> productor de toxina shiga	STEC
<i>E. coli</i> Enteroagregante	EAEC
<i>E.coli</i> productor de verotoxina	ECPV
Enterobacteria productora de carbapenemasa	EPC
Eosina azul de metileno	EMB
Especies	Spp.
Factor necrosante citotóxico	CNF
Flagelar	Antígeno H
Grados centígrados	°C
Gramos	g
Hora	h
Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato de Simmons	IMVIC
Infecciones de vías urinarias	IVU
Infecciones del tracto urinario	ITU
Intermedio	I
<i>Klebsiella</i> productora de carbapenemasas	KPC
Lipopolisacárido	LPS
Métalo betalactamasas	MBL

Hidróxido de potasio	KOH
Metilasa de resistencia a eritromicina A	ermA
Metilasa de resistencia a eritromicina B	ermB
Microgramos	µg
Microlitro	µL
Mililitros	mL
Milímetros	mm
Minutos	min
Mobilidad, indol, ornitina	MIO
Nitrato	NO ₃
Nitrito	NO ₂
Adherencia/esfacelamiento	A/E
Proteína de adherencia A y B	eae A y B
Ácido desoxirribonucleico	ADN
National Committe for Clinical Laboratory Standards	NCCLSI
Oxacilinasas	OXA
Penicillin binding protein	PBP
Pilis formadores de paquetes	Bfp
Porcentaje	%
Porina de membrana externa D	OprD
Potencial de hidrógeno	pH
Proteasa de membrana interna	IMP
Proteína de fisión de membrana	MFP

Químicamente puro	QP
Registrado	®
Revoluciones por minuto	rpm
Resistente	R
Rojo de metilo-Voges Proskauer	MR-VP
Sensible	S
Síndrome hemolítico urémico	SHU
Standardising antimicrobial susceptibility testing in Europe	EUCAST
Termoestable	ST
Termolábil	LT

RESUMEN

La familia *Enterobacteriaceae* conocido como enterobacterias corresponde a bacilos Gram negativos que adquiere su nombre debido que habitan en el intestino de los mamíferos. La más representativa de esta familia es *Escherichia coli* que tiene una diversa estructura antigénica que los hace las más comunes de las bacterias encontradas en pacientes con ITU (infección de tracto urinario).

Los antibióticos son uno de los descubrimientos más importantes de todos los tiempos lo que ha generado una gran cantidad de ellos en el mercado de tal manera que actualmente ha venido a surgir la resistencia a los antibióticos, pero esto es solo el principio pues se ha demostrado que surjan cepas que son resistentes a los carbapenémicos lo cuales son el tratamiento de última instancia usado para cepas multirresistentes

En la presente investigación se llevó a cabo un análisis microbiológicos para identificar cepas de *E. coli* productores de carbapenemasas aisladas de muestras clínicas obtenidas de hospitales y clínicas de las región de H. Caborca, Sonora, en la cual se recolectaron 162 muestras de orina de mujeres en el periodo de enero del 2015 a mayo del 2017 de las cuales 43 (57.3%) de las cuales 34 (79.0%) cepas que correspondieron a *Escherichia coli*

Las pruebas para la determinación de carbapenemasas se realizó a las 34 cepas correspondientes a *E. coli*, de las cuales 15 cepas (44.11 %) mostraron un resultado positivo.

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* corresponde a un grupo heterogéneo y extenso de bacilos Gram negativos que adquiere su nombre debido que habitan de manera saprofita en el intestino de los mamíferos, así como también de manera cosmopolita en agua, suelo y la vegetación. Esta familia comprende muchos géneros siendo la representativa *Escherichia coli*.^{1, 2}

Se han definido más de 50 géneros; sin embargo, las *Enterobacteriaceae* de importancia clínica comprenden 20 a 25 especies y otras se descubren con poca frecuencia. En la literatura se demuestra que hay muchas referencias sobre la identificación bien detallada de esta familia. Géneros como *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* son móviles y *Klebsiella* y *Shigella* son inmóviles. Se caracterizan por fermentar en vez de oxidar. Su ubicuidad y su frecuente adquisición de elementos genéticos móviles demuestran que sus hospedadores están adquiriendo regularmente a nuevas cepas con nuevo material genético (incluyendo resistencia antibiótica) a través del agua, los alimentos, los animales o de fuentes inanimadas en la comunidad.¹

La infección del tracto urinario (ITU) es la infección bacteriana más frecuente. Los microorganismos causales mayormente involucrados en esta infección son aquellos propios de la flora bacteriana del colon ya que se aíslan en casi el 50% de las muestras clínicas que se remiten a los hospitales, predominando *E. coli*; sin embargo, también son comunes otros microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*.^{3,4}

Se estima que entre el 15 y 25% de los pacientes hospitalizados en los servicios de medicina interna y el 85% de los ingresados en las unidades de cuidado intensivo son portadores de sondas urinarias durante corto o mediano plazo. De esta forma, el riesgo de ITU se incrementa entre 3 y 10% por cada día de cateterización, alcanzando una probabilidad de infección del 100% a los 30 días de permanencia del catéter.^{4,5}

Asi mismo debido a los tratamientos mal suministrados las bacterias resistentes a los antibióticos que son difíciles o imposibles de tratar son cada vez más comunes y están ocasionando una crisis de salud de dimensiones globales, lo que deteriora la calidad de vida del hombre y aumenta los costos en salud, convirtiéndose en una carga para el gasto público de los diferentes gobiernos.^{6,7}

Generándose así a las carbapenemasas quienes representan la familia de betalactamasas más versátil, con un amplio espectro. Aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los betalactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores de los betalactámicos.⁸ Las carbapenemasas pueden transferirse entre diferentes cepas de bacterias, usualmente por moléculas circulares de ADN (ácido desoxirribonucleico) conocidas como plásmidos, que pueden replicarse de forma independiente del ADN cromosómico y permitir el intercambio de material genético entre diferentes géneros y especies de enterobacterias.^{4,6} Esta transferencia

horizontal de genes puede involucrar múltiples patógenos y extenderse en un entorno hospitalario.⁹

2. ENTEROBACTERIAS

2.1 Generalidades

2.1.1 Características

Los miembros de esta familia son microorganismos en forma alargada o bastón también llamados bacilos que por lo general miden de 1-3 micras de largo y 0.5 micras de diámetro. Son bacterias Gram negativas, la mayoría de las Enterobacterias son móviles por medio de flagelos peritricos, estos permiten la locomoción mientras que otras especies son inmóviles, tienen elongaciones membranales llamadas pilis que sirven de adhesinas o para la transferencia de ADN del plásmido.³ Son organismos Gram negativos que se caracterizan, desde el punto de vista microbiológico por ser bacterias no esporuladas con crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis, es decir, son anaerobios facultativos; que reducen los nitratos a nitritos salvo algunas excepciones; que fermentan la glucosa con o sin formación de gas; muestran negatividad a la prueba de la oxidasa; no aumenta su crecimiento en un medio hipertónico.¹ En la tabla 1 se puede observar otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

2.1.2 Transmisión y ubicación

Las enterobacterias pueden transmitirse por varias vías en las que destacan el contacto con los rumiantes, y en particular el ganado bovino y ovino, son uno de los principales reservorios de estas bacterias. Otros animales como las cabras, los cerdos, los caballos, las aves de corral, los perros y los gatos pueden actuar

también como reservorio. Los animales portadores no muestran ningún signo clínico.¹⁰

De modo que su principal hábitat es el intestino del hombre y de los animales, incluye muchas bacterias que normalmente se consideran inofensivas y dos géneros cuyos miembros son patógenos: *Salmonella* y *Shigella*. *Escherichia* y *Klebsiella pneumoniae* comprenden los gérmenes coliformes normales, y estos junto con *Proteus*, se encuentran en el intestino de la mayor parte de individuos. No suelen ser patógenos, pero son oportunistas y producen enfermedad cuando alcanzan un tejido u órgano susceptible.¹¹ 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.¹²

Tabla 1. Otros miembros patógenos de la familia *Enterobacteriaceae*.¹³

Género	Características	Taxonomía	Factores de virulencia	Patogenia
<i>Salmonella</i> spp	Móviles (flagelos peritricos), fermentadores de glucosa pero no lactosa, productores de H ₂ S.	Género <i>Salmonella</i> fueron clasificados originalmente con base a su epidemiología, gama de hospedadores, reacciones bioquímicas y estructura de los antígenos.	Fimbrias (cromosómicos [sef] y plasmídicos [pef]), proteínas involucradas en la patogénesis de <i>S.typhimurium</i> , antígenos membranales O, K y Vi.	Es invasiva, pirogénica. <i>S. typhi</i> es capaz de crecer dentro de los macrófagos, <i>S. typhimurium</i> requiere la participación de GTPasa una enzima que ayuda a la producción de cambios en el citoesqueleto (daño intracelular).
<i>klebsiella</i> spp	Inmóviles, encapsuladas, fermentadores de lactosa que producen lisina y descarboxilasa y son positivas en la prueba de Voges-Proskauer.	La importancia médica llevó a su subdivisión en tres especies: <i>K.pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> y <i>K. rhinoscleromatis</i> . Con el tiempo, surgieron tres clasificaciones principales, las de Cowan, Bascomb y Ørskov.	Presenta los antígenos de superficie polisacárido tisular y lipopolisacraidos), las adhesinas (fimbrias), los sideroforos y la hiperviscosidad.	Representa del 6 al 17% de todas las ITU nosocomiales y muestra una incidencia aún mayor en grupos específicos de pacientes en riesgo. Como causa de bacteriemia Gram negativa nosocomial, <i>Klebsiella</i> ocupa el segundo lugar después de <i>Escherichia coli</i> .
<i>Shigella</i> spp	Crecen de mejor manera en condiciones aerobias, todas las <i>Shigellas</i> fermentan glucosa y lactosa.	Con base en pruebas bioquímicas y serológicas se reconocen 4 especies: <i>Shigella dysenteriae</i> (A), <i>Shigella flexneri</i> (B), <i>Shigella boydii</i> (C) y <i>Shigella sonnei</i> (D).	Los antígenos O (lipopolisacáridos). Es productor de endotoxinas y exotoxinas ambos son polisacáridos que actúan sobre las células epiteliales de la mucosa del intestino contribuyendo a la ulceración.	Produce infección intestinal con fiebre de 39-40 °C, vómito al inicio, malestar general, dolor abdominal intenso, dolor general, hiperestesia en marco cólico, evacuaciones con moco, pus y sangre, diarrea acuosa.
<i>Proteus</i> spp	Son lactosa negativos, móviles o inmóviles, pleomórficos todos son indol positivo a acepción de <i>P. mirabilis</i> , degradan la urea.	Su caracterización fue complicada ya que las especie del genero <i>Proteus</i> varían en sus características bioquímicas.	La estructura antigénica está compuesta por antígeno somático O, flagelar H y superficial K. El antígeno flagelar H contribuye a la capacidad invasora de las vías urinarias.	Hay tres especies que causan infecciones oportunistas: <i>P.vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> y <i>P. penneri</i> . Causan infecciones urinarias, enteritis, abscesos hepáticos, meningitis, otitis media y neumonía.

2.2 *Escherichia coli*

Dentro del género *Enterobacteriaceae*, la especie de mayor importancia es *Escherichia coli*. Se encuentra en número muy elevado en el contenido intestinal y tiene la capacidad de suprimir el crecimiento de microorganismos proteolíticos debido a la liberación de bacteriocinas (colicinas), sustancias con acción bactericida, y está relacionado con la síntesis de vitamina K. Son fermentadoras de lactosa y móviles. *E. coli* es el principal agente etiológico de infecciones urinarias, tanto en pacientes internados como ambulatorios ya que posee fimbrias capaces de adherirse al epitelio urinario y colonizarlo. Produce además peritonitis, abscesos, meningitis, endocarditis, neumonías nosocomiales, etc.¹⁴

2.2.1 Características

Escherichia coli es una enterobacteria de localización ubicua. Fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente, la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.¹⁵

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo con un metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. Puede ser inmóvil o móvil por flagelos peritricos. Constituye el habitante facultativo del intestino grueso más importante, tanto del hombre como de animales de sangre caliente y es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y es parte de la microbiota que mantiene la fisiología en el hospedador sano.¹⁵

Es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, y aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, pueden ser patógenos oportunistas que causan infecciones en el hospedador inmunocomprometido.^{15,16} Fisiológicamente, *E. coli* es versátil, está adaptado a las características del hábitat y puede crecer en un medio con glucosa como única fuente orgánica. Puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno y bajo condiciones anaeróbicas puede proliferar por fermentación, produciendo una mezcla de ácidos y gas como productos finales. Puede también crecer por medio de una respiración anaeróbica ya que es capaz de utilizar NO_3^- , NO_2^- fumarato como aceptores finales de electrones mediante procesos respiratorios de transporte de electrones. Esta versatilidad de *E. coli* le confiere habilidad para adaptarse al hábitat intestinal (anaeróbico) y extraintestinal (aeróbico o anaeróbico).¹⁵

2.2.2 Epidemiología

Suele detectarse las enfermedades disentéricas o diarreicas por el consumo de alimentos contenidos además de la interacción mano a mano con personas o el contacto con superficies que tengan al microorganismo. *E. coli* también está involucrada con las infecciones de vías urinarias (ITU) principalmente en mujeres debido a la facilidad de migración que tienen este tipo de bacterias hacia el tracto genitourinario causando cistitis principalmente caracterizado por la polaquiuria dolor y sensación de vaciado incompleto, en varones mayores de 50 años puede inducir a la hiperplasia prostática caracterizado por la compresión de las zonas uretrales causando dolor y obstrucción parcial del flujo de la orina.¹⁵

2.2.3 Factores de virulencia

Esta especie posee antígenos somáticos O (de la molécula de endotoxina), antígenos flagelares H y capsulares K, hasta el presente se identificaron más de 174 antígenos O, 56 H y 80 K, con más de 700 serotipos (basados en las combinaciones de los antígenos O, H y K). Los diferentes tipos de pili de *E. coli* favorecen la adherencia de la bacteria a los epitelios ya que hay diferentes subgrupos de esta especie que están asociados a cuadros disentéricos y colitis hemorrágica.¹⁷⁻¹⁹

Las especies enteropatógenas poseen adhesinas que les permiten la unión a las células del intestino, las especies enterotoxigénicas producen exotoxinas termolábiles generadas durante el crecimiento que se unen a los gangliósidos de las células del huésped los que inducen la pérdida de líquidos, las especies de *Escherichia coli* productor de verotoxina (ECVT) o toxina Shiga (STEC), también conocidas como enteroinvasiva se presenta asociado a la aparición de síndrome urémico hemolítico (SUH) por su acción en las células vero (línea células del riñón de mono verde), a las especies enteroagregativa no se han asociado factores de virulencia.¹⁹

2.2.4 Clasificación

2.2.4.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC coloniza la mucosa del intestino delgado y grueso provocando diarreas en niños menores de 2 años reportándose a la fecha mayor prevalencia en bebés de hasta 6 meses de nacidos.²⁰ EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (pilis formados de paquetes) cuya información genética está codificada en un plásmido.²¹

También cuenta con genes cromosomales nombrados eae (proteína de adherencia) A y B que operan en combinación con los genes plasmídicos y dan lugar a una proteína de 94 kDa (intimina) asociada a la producción de la lesión de adherencia íntima y esfacelamiento. Esta adherencia íntima de cepas EPEC produce cambios en el citoesqueleto de la célula del hospedero, con proliferación de filamentos de actina por debajo del sitio de pegamiento de las bacterias.¹⁸

2.2.4.2 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (antígenos factor de colonización), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's,¹⁹

Elaboran ya sea una o las dos Enterotoxinas (LT y/o ST) por su sensibilidad y tolerancia al calor respectivamente. LT es semejante en estructura y función a la toxina causante del cólera (CT) producida por *Vibrio cholerae*. La toxina LT es un dímero de bajo peso molecular, compuesta por una subunidad A (porción de acción enzimática formada de fracciones unidad por puentes bisulfuro) de 28 kDa y 5 subunidades B (componente que se une al gangliósidos) iguales de 11.5 kDa cada una. Las ST tiene variedades que son de bajo peso molecular. Los enlaces bisulfuro de éstas son los que contribuyen a la estabilidad térmica que presentan estas enterotoxinas. Son dos clases STs difieren tanto en su estructura como en su mecanismo de acción. Los genes que codifican para la expresión de ambas se encuentran en plásmidos. La enterotoxina (STa) descrita también como ST-I es producida tanto por cepas ETEC como por otras bacterias Gram negativas. Sin embargo STb, la otra variedad de estas enterotoxinas, solo es elaborada por cepas ETEC.²²

2.2.4.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas enteroinvasivas (EIEC) son capaces de penetrar las células del epitelio y producen una diarrea inflamatoria, similar a las que causa las especies de *Shigella* son fermentadoras tardías de lactosa y debido a su naturaleza invasiva es intracelular y no móvil. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes.^{23, 24}

2.2.4.4 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Las cepas hemorrágicas de *E. coli* producen diarrea sanguinolenta en los seres humanos, derivado por el daño que una toxina en las células del tejido vascular. Fue descrito por primera vez en 1977 por Konowalchuk y colaboradores, quienes demostraron que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128, aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón, producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1.^{25, 26}

Además, EHEC presenta otros factores que están relacionados a la patogenicidad de la bacteria. Uno de ellos es el gen *eae* o intimina, asociado a la adherencia

íntima de las bacterias a los enterocitos y destrucción de microvellosidades (fenómeno de “adherencia y esfacelamiento” A/E). Otro factor de virulencia característico en EHEC es un plásmido de 60 MDa (millones de Daltons) que codifica una enterohemolisina denominado pO1577.²⁷

2.2.4.5 *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* enteroagregativa (EAEC) con diarrea aguda y crónica en los países en vías de desarrollo y diarrea aguda en países desarrollados⁴. En los últimos diez años ha recibido mayor atención como causante de diarrea acuosa, la cual se presenta como patología persistente e inflamatoria.²⁸

El conocimiento sobre la patogénesis de EAEC es menor en comparación con las otras cuatro categorías de *E. coli* diarregénico. La localización de la infección en el tracto gastrointestinal no está bien definida. Los estudios realizados sobre muestras obtenidas por endoscopia intestinal muestran que EAEC se puede localizar en yeyuno, íleon y epitelio del colon.¹⁵

EAEC se considera un patógeno no invasivo. Sin embargo, algunos autores han demostrado el fenotipo invasivo en cultivos celulares. Cepas EAEC fueron internalizadas por células HeLa, mediante componentes del citoesqueleto celular. Estas observaciones, conjuntamente con la descripción de casos en niños con

diarrea sanguinolenta por EAEC sugieren que la capacidad de invasión puede ser otra característica de virulencia.¹⁵

2.2.4.6 *E. coli* difusamente adherente (DAEC)

Es una entidad emergente de reciente descripción, se ha descrito que predomina en preescolares y lactantes, es causante de diarrea aguda, deposiciones acuosas, mucoides. La adhesión es el primer paso para mantener a los miembros de la microbiota normal en el intestino; sin embargo, es también la primera etapa crítica en todas las infecciones diarreicas causadas por cepas patógenas de *E. coli*. Es importante, por lo tanto, comprender las características que subyacen a la adhesión de *E. coli* difusamente adherente. Estudios morfológicos han descrito que las cepas DAEC generan un fenotipo inusual de adherencia celular sobre el cultivo de células HEP-2, observándose la inducción de algunas proyecciones de la membrana celular.²⁹

El tratamiento consiste en la reposición de las pérdidas de líquidos por un adecuado aporte con soluciones orales. No se ha evaluado la eficacia del tratamiento antibacteriano. Si bien el subsalicilato de bismuto reduce la duración de la diarrea y el número de deposiciones, así como también la hospitalización, no se recomienda el uso de rutina.²⁹

2.2.4.7 *E. coli* uropatógena (UPEC)

E. coli uropatógena o UPEC es la causa principal de infecciones del tracto urinario (ITU) y responsable en un 50% de las infecciones urinarias nosocomiales, representando elevados gastos médicos y alta morbilidad en el mundo. Dependiendo del nivel de infección la ITU se puede clasificar en cistitis o pielonefritis, en casos graves se complica a septicemia o con alta frecuencia se vuelve crónica.³⁰

El principal agente etiológico de las ITU's es *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), la cual se asocia con el 80 % de las ITU's registradas. UPEC presenta diversos factores de virulencia entre los que se incluyen factores de adherencia (fimbrias P, de tipo 1, S, M FIC y Dr), alfa-hemolisina (Hly), lipopolisacárido (LPS), aerobactinas, proteasas autotrasportadoras (Sat) y Factor Necrosante Citotóxico 1 (CNF-1) y mayor producción de antígeno capsular (antígeno K). UPEC pertenece a un sorprendente grupo heterogéneo de patógenos. Seis grupos O causan el 75% de las ITU.³⁰

2.2.5 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 limite. 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.¹⁸

3. ANTIBIÓTICOS CARBAPENÉMICOS

Después de que en 1928 Alexander Fleming descubriera accidentalmente la capacidad de algunos mohos de la familia *Penicillium* de inhibir el crecimiento de una cepa de *Staphylococcus aureus* y que se usara por primera vez en un paciente con sepsis estafilocócica en 1941, los antibióticos betalactámicos son los más prescritos.³¹

A finales de la década de los años 70, durante el análisis rutinario de microorganismos de la tierra en busca de nuevos inhibidores de la síntesis de los peptidoglucanos, fueron descubiertos los carbapenémicos. Esto ocurrió a partir de una nueva especie de *Streptomyces*, denominada *Streptomyces cattleya*. La estructura de la tienamicina, primera de este grupo, fue descubierta por Albert Chonberg y colaboradores en 1978, y la misma guarda notable semejanza con los betalactámicos corrientes. Por su gran inestabilidad fisicoquímica, este producto no pudo ser usado clínicamente.³²

A través de los estudios de Leanza y colaboradores se obtuvo una molécula más estable, sintetizándose el N-forminidoiltienamicina, conocido como imipenem, congénere sintético de la tienamicina natural fue el primer carbapenémico de uso clínico, su uso en humanos data desde 1985 el cual es susceptible a la actividad hidrolítica de la enzima renal dehidropeptidasas 1 (DHP-1) por lo cual se suministra con cilastatina como estabilizador, seguido del meropenem en 1997 el cual es estable contra la acción del DHP-1 posteriormente, en 1998 se autoriza el uso inyectable del mismo, el otro carbapenem es el ertapenem su uso clínico inicia

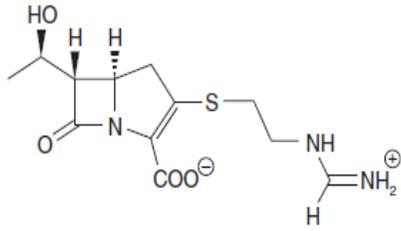
en el 2001 el cual se usa contra bacterias Gram negativas productoras de betalactamasas de espectro extendido, el doripenem representa el carbapenémico más reciente su uso se autoriza en el año 2009 el cual es estable contra las enzimas hidrolíticas del riñón .32

3.1 Estructura

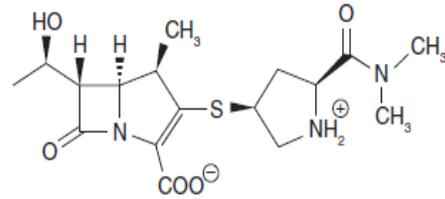
La estructura básica de las carbapenemasas consiste en un anillo betalactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como la posición espacial de éstas, condicionan la mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) diana, un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las betalactamasas, siendo los betalactámicos de más amplio espectro y actividad.³¹

3.2 Consideraciones generales de la terapia antibiótica

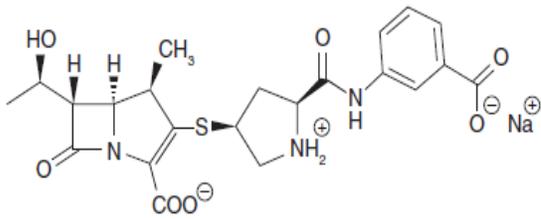
Los carbapenémicos son los antibióticos betalactámicos con el espectro de actividad más amplio. Se usan comúnmente para tratar las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Para ejercer su efecto, los carbapenémicos deben atravesar la pared celular. Esto ocurre a través de las porinas de la membrana externa en bacterias.³³ Los carbapenemes han sido los



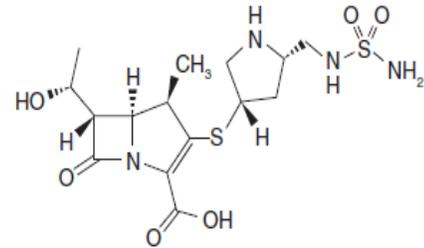
Imipenem



Meropenem



Ertapenem



Doripenem

Figura 1. Estructura de los antibióticos carbapenémicos.³⁴

antibióticos betalactámicos de mayor actividad evadiendo la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana y, generalmente, se reservan para el tratamiento de infecciones graves.³⁵ Estas cualidades hacen que los carbapenémicos sean imprescindibles en el tratamiento empírico donde se sospecha de un patógeno multirresistente, en la monoterapia de numerosas infecciones nosocomiales graves (incluso algunas de origen comunitario) y en la terapia dirigida contra las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes o productoras de betalactamasas de amplio espectro y espectro extendido. Todos los carbapenémicos disponibles son similares en cuanto a espectro se refiere.³⁶

La resistencia antimicrobiana es el fenómeno por el cual los microorganismos disminuyen la acción de los antimicrobianos, de modo tal que los tratamientos no cumplen con su objetivo y como resultado las infecciones persisten. Dicha resistencia ha aumentado en los últimos años, especialmente a antibióticos como las quinolonas, carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación. El elevado consumo de antibióticos sin prescripción médica, además del flujo constante de especies patógenas en el entorno médico, favorece el desarrollo de la resistencia y amenaza el éxito de los tratamientos en todos los niveles de atención en salud, generándose así un entorno ideal para la propagación de bacterias resistentes y la transferencia de genes de resistencia.³⁷

3.3 Mecanismo de acción

Los carbapenémicos al igual que los demás betalactámicos muestran una elevada afinidad por las diferentes enzimas que participan en el ensamblaje del peptidoglucano, estructura esencial en la pared celular de las bacterias. Estas enzimas se denominan como PBP's (proteínas de unión a penicilinas), por sus siglas en inglés) y según su función se clasifican en transglicosilasas, transpeptidasas y carboxipeptidasas.³²

Para que el carbapenémico pueda ejercer su función debe llegar a su sitio blanco. En el caso de las bacterias Gram positivas las cuales no presentan membrana externa es fácil; sin embargo, en las bacterias Gram negativas debe primero atravesar la membrana externa a través de las porinas inespecíficas denominadas OprD, esta constituye una característica específica de estos fármacos y los diferencia de las penicilinas, posteriormente inhiben la síntesis de la pared celular durante el proceso de transpeptidación, esto produce inestabilidad y debilitamiento de las membranas e incluso lisis de la célula bacteriana.³⁶ La capacidad antimicrobiana depende de la estructura y el tiempo de acción de cada uno de los Carbapenémicos. Estas condiciones hacen que su acción sea diferente en cada caso.³²

3.4 Mecanismos de resistencia a carbapenémicos por enterobacterias

La resistencia múltiple en Gram negativos es producto de una combinación de mecanismos de resistencia. Algunos de ellos inherentes a la especie (resistencia intrínseca o natural) y otros adquiridos (resistencia adquirida por elementos

móviles como plásmidos y transposones), que finalmente se manifiestan como resistencia a una amplia gama de antibióticos.³⁵

En términos generales, los principales mecanismos de resistencia a antibióticos en Gram negativos son: 1) disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa debido a la disminución en la expresión de porinas, 2) expulsión del antibiótico mediada por la activación de las bombas de flujo), 3) modificación o mutación del sitio blanco del antibiótico. Y 4) modificación y desactivación del antibiótico por hidrólisis mediada por enzimas. Es común pensar que la producción de una carbapenemasa es suficiente para que la bacteria presente resistencia a los carbapenems. Sin embargo, en Enterobacteriaceae se ha demostrado que, además de la carbapenemasa, se requiere de la disminución de la permeabilidad de la membrana externa mediante la pérdida de porinas.³⁵

3.4.1 Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa

Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por los cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplasmico.³⁸

3.4.2 Expulsión del antibiótico mediante la activación de las bombas de eflujo

El mecanismo de eflujo para múltiples agentes antimicrobianos contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra tales agentes. El análisis del genoma de bacterias Gram positivas y Gram negativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas. Este modo de resistencia puede llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos.³⁹

El diseño de flujo (bomba) es mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos. En las bacterias Gram negativas es necesario un sistema de eflujo tripartita para expulsar el antimicrobiano hacia el medio externo, una proteína localizada en la membrana citoplasmática, otra en el espacio periplasmático (proteína de fusión de membrana MFP) y una tercera en la membrana externa (factor de membrana externa OMF). Los sistemas de eflujo particularmente de bacterias Gram negativas se asocian con resistencia a múltiples antimicrobianos de importancia clínica como las fluoroquinolona).³⁹

3.4.3 Modificación del sitio blanco

La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. El PBP es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos. En la modificación ribosomal los genes erm A y erm B

producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*.⁴⁰

3.4.4 Betalactamasas involucradas en la resistencia a carbapenémicos

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que pierda su funcionalidad. En este caso, la producción de enzimas tipo betalactamasas es el principal mecanismo de resistencia empleado. Estas enzimas periplásmicas hidrolizan los antibióticos betalactámicos y evitan que la droga se pueda unir a su PBP blanco.³² Las dos betalactamasas que con mayor frecuencia pueden llevar a resistencia a los carbapenemes son las del grupo AmpC y las carbapenemasas.³⁵

Las carbapenemasas representan la familia de betalactamasas más versátil, con un amplio espectro. Aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los betalactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores de los betalactámicos.⁸

Hasta la década de los 90, todas las carbapenemasas fueron descritas como específicas de especie, codificadas en cromosomas, con una serie de características bien definidas.⁸ Sin embargo, el patrón de disseminación de estas enzimas ha cambiado a partir del descubrimiento de las carbapenemasas IMP-1 , ARI-1 (OXA-23) y KPC-1 codificadas en plásmidos 28-31. Lo que una vez fue

considerado un problema de expansión clonal de especies ahora es un problema global de dispersión entre especies.⁴¹

3.5 Clasificación de las carbapenemasas

3.5.1 BLEE clase A: Serincarbapenemasas

Las carbapenemasas de clase A tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de betalactámicos entre los que se incluyen las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y aztreonam. Dentro de las carbapenemasas de clase A, las que tienen mayor trascendencia clínica e importancia epidemiológica son las denominadas KPC, que reciben su nombre por haberse aislado inicialmente en *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Son parcialmente inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, no se inhiben por el EDTA, pero sí por el ácido bórico no es exclusiva de la enzima KPC ya que también es un inhibidor eficiente de las betalactamasas de tipo AMPc.⁴²

Las AmpC son serin-betalactamasas pertenecientes a la clase A son también llamadas cefalosporinasas, aunque su espectro de acción hidrolítica no sólo incluya cefalosporinas. Son de naturaleza cromosómica inducible y explican la resistencia natural a las aminopenicilinas, cefalosporinas de 1ra generación, cefamicinas (cefotetán, cefotaxima) y aminopenicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasas (amoxicilina- ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam), expresada por estos agentes bacterianos. Por otra parte, existen AmpC de codificación plasmídica que pueden ser inducibles o no. Una característica de las enzimas AmpC es que no tienen efecto, por sí solas, sobre cefalosporinas de 4ta

generación, ni sobre carbapenémicos, siendo estos últimos los betalactámicos de elección en cepas productoras de AmpC.⁴³

3.5.2 BLEE clase B: Metallo- β -lactamasas

Las carbapenemasas de clase B, más conocidas como MBL (metalo-betalactamasas), son quizá el grupo más relevante de carbapenemasas, tanto por diversificación en diferentes variantes aminoacídicas como por su diseminación prácticamente mundial, y en diferentes microorganismos. Como elemento definitorio, las MBL de la subclase B1 (a la que pertenecen las MBL que podemos hallar en *Pseudomonas* por transferencia horizontal) poseen un motivo de unión de zinc del tipo His-X-His-X-Asp, al que se unen dos iones de zinc, necesarios para la actividad de la enzima. Así pues, todas las MBL tienen también en común su inhibición por quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Dentro de ellas, se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM. Las MBL AIM-1 y DIM-1 se han detectado recientemente en *P. aeruginosa* y *P. stutzeri*, en Australia y Holanda, respectivamente, pero la información disponible acerca de ellas es aún muy escasa.⁴⁴

3.5.3 BLEE clase D: Enzimas del tipo OXA

Se ubican dentro del grupo 2df de Bush (clase D de Ambler) descritas en 1980. Se caracterizan por su capacidad de hidrolizar cloxacilina y oxacilina (de ahí su nombre “oxacillinhidrolizing” carbapenémicos, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam (a excepción de OXA 27) y en general son inhibidas por el ácido clavulánico (menos OXA 23 que es resistente).⁴⁵

Para el año 2007 se habían identificado más de 100 variantes, de las cuales 9 eran clasificadas como BLEE y 37 como carbapenemasas. Aunque se ha descrito que la hidrólisis a los carbapenémicos es débil, se incrementa si otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo, alteraciones en las porinas o modificaciones en el sitio blanco están presentes. Las betalactamasas tipo OXA se detectan principalmente en *A. baumannii*, habitualmente dentro de integrones situados en plásmidos o transposones, aunque ciertos casos se han asociado a secuencias de inserción.⁴⁵

3.6 Detección en el laboratorio

La detección de carbapenemasas también supone un reto para los laboratorios de Microbiología Clínica debido a que su detección fenotípica no es fácil, ya que en muchos casos los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las carbapenemes frente a las EPC se encuentran en el rango de sensibilidad, por debajo de los puntos de corte clínicos. Por tanto, es necesario establecer una metodología que facilite su detección.⁴⁶

3.6.1 Métodos fenotípicos

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local y la

identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas.⁴⁵

3.6.1.1 Prueba de sinergismo de doble disco

Las pruebas de fenotipificación por sinergismo con doble disco en donde se utiliza ácido fenil borónico (APB) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se fundamentan en la potenciación del halo de inhibición, que se genera alrededor del disco del antibiótico, cuando este se enfrenta a un disco cargado con un inhibidor de la acción enzimática. Por tanto, se considera resultado positivo cuando se observa una potenciación del halo de inhibición, generado entre ambos discos.⁴⁵

3.6.1.2 Test de Hodge modificado

Según lo recomendado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) el test de Hodge modificado debe usarse como método de referencia o prueba confirmatoria cuando las pruebas de tamiz da positivo. Un resultado positivo se evidencia por el crecimiento de la cepa ATCC de *E. coli* en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa problema formando una hendidura en la parte proximal al disco. Esto indica la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que son liberadas al medio y permiten el crecimiento de *E. coli*.⁴⁷

3.6.1.3 Prueba de rapidez Carba NP

Una detección rápida y bioquímica de la producción de carbapenemasa. Recientemente se propuso, a saber, la prueba Carba NP, que es basado en la detección de la hidrólisis del anillo -lactama de imipenem. La prueba Carba NP ha sido ampliamente validada para la detección de productores de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp. y una versión ligeramente modificada de esta prueba (CarbAcineto NP) se ha desarrollado para el detección de *Acinetobacter* spp. que produce carbapenemasas.⁴⁸

4. JUSTIFICACIÓN

Las carbapenemasas son enzimas que siendo producidas por las bacterias les confiere resistencia a los antibióticos carbapenémicos y a los demás pertenecientes a la familia de los betalactámicos lo cual, la resistencia a antibióticos, sobre todo la combinada a múltiples familias de estos, es una prioridad de primer orden para los enfermos, la comunidad, profesionales sanitarios y personal de salud en general. En los últimos años la resistencia antimicrobiana ha aumentado, tanto así, que se ha convertido en una emergencia sanitaria, según todas las agencias internacionales de salud.

Escherichia coli y los demás miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presentan con mayor frecuencia resistencia a múltiples antibióticos, siendo preocupante la resistencia a los Carbapenémicos, antibióticos de cuarta generación y comúnmente usados contra bacterias multirresistentes.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Identificar fenotípicamente a *Escherichia coli* productora de carbapenemasas por método rapidec CARBA NP y test de Hodge modificado en aislamientos de muestra clínicas de la región de H. Caborca, Sonora.

5.2 Específicos

- Aislar e identificar cepas de *Escherichia coli*
- Evaluar la producción a Carbapenemasas.

6. DELIMITACIONES DEL ESTUDIO

6.1 Criterios de inclusión

- Los miembros participes en este proceso experimental deben de ser del sexo femenino.
- Deben de tener como diagnostico presuntivo una infección de vías urinarias (IVU).
- Deben de proporcionar la muestra conforme a las indicaciones de toma de muestra las cuales se les hizo saber en la carta de consentimiento informado.
- Los pacientes no deben de estar en tratamiento con antibióticos.

6.2 Criterios de exclusión

- Las muestras sean proporcionadas por pacientes del sexo masculino
- Que los miembros participantes contengan la muestra en un recipiente no apto para toma de muestra de orina o no la conserven debidamente.
- Que el microorganismo aislado sea Gram positivo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de la muestra

Durante el periodo comprendido de enero del 2015 y mayo del 2017 se recaudaron 162 muestras de orina, que se obtuvieron de laboratorios y hospitales de la ciudad de Heroica Caborca, Sonora. Seleccionándose y procesándose a conveniencia solo aquellas que en el sedimento tenían de moderadas a abundantes bacterias y además presentaban piuria, tomando como base las recomendaciones proporcionadas por la Secretaría de Salud. Las muestras fueron tomadas de pacientes femeninas mediante la técnica de chorro medio, siendo esta la primera micción matutina, con previo aseo vaginal y obteniéndose en un recipiente estéril, según lo recomienda el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

7.2 Procesamiento de la muestra

Se tomó una alícuota de la muestra la cual se colocó en un tubo de ensaye 13x100, llevando a cabo el análisis químico utilizando tiras reactivas de la marca Combur Test-10. Se prosiguió a centrifugar 10 minutos a 3,500 rpm y obtener el sedimento para su posterior revisión al microscopio con el objetivo 40X. La presencia de nitritos, bacterias (moderadas a abundantes) y leucocitos (concentración mayor de 5 por campo) fueron los parámetros a considerar para seleccionar las muestras. En el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sonora se llevó a cabo el urocultivo.

La inoculación de las muestras se realizó en agar sangre mediante la técnica de estriado en los cuatro cuadrantes y se incubó a 37°C durante 18 horas (Figura 2). Transcurrido este tiempo se observó la morfología de las colonias y realizó la tinción de Gram (Figura 3). Se seleccionaron las placas de agar sangre en las cuales se observaron bacilos Gram negativos, utilizando como medios diferenciales agar Mac-Conkey (Figura 4), EMB (Eosina Azul de Metileno) (Figura 5) y Salmonella-Shigella. Se realizó la técnica de estriado sencillo para inocularlos e incubándose durante 18 horas a una temperatura de 37°C.

Las pruebas de identificación bioquímica realizadas fueron fermentación de glucosa (Figura 6), fermentación de lactosa (Figura 6), motilidad, hidrólisis de urea (Figura 7), producción de gas, producción de azufre, indol (Figura 8), fermentación de citrato, rojo de metilo, oxidasa y Voges-Proskauer.

7.3 Método RAPIDEC® CARBA NP

Es una prueba rápida para la detección de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas.

7.3.1 Preparación del test

Se aseguró un área estéril, se sacó la tira de su empaque y se rotuló. Se abrió la ampolleta con el medio se suspensión API® proporcionado en el kit y se agregaron 100 µL en los pocillos A, B y C, posteriormente se colocó una tapa

transparente para proteger el contenido de la tira, se dejó reposar a temperatura ambiente (15-25°C), pasado este tiempo se homogenizó el contenido del pocillo B con uno de los agitadores proporcionados en el kit (Figura 9).

7.3.2 Preparación del inculo

Con un agitador nuevo se tomó una colonia y se suspendió en el pocillo C, se colocó la tira en el fondo color negro del soporte bicolor proporcionado en el kit para facilitar la comparación de la turbidez entre los pocillos B y C, se repitió este proceso en caso de ser necesario hasta que la turbidez sea equivalente, se dejó en reposo 30 minutos a temperatura ambiente (Figura 10).

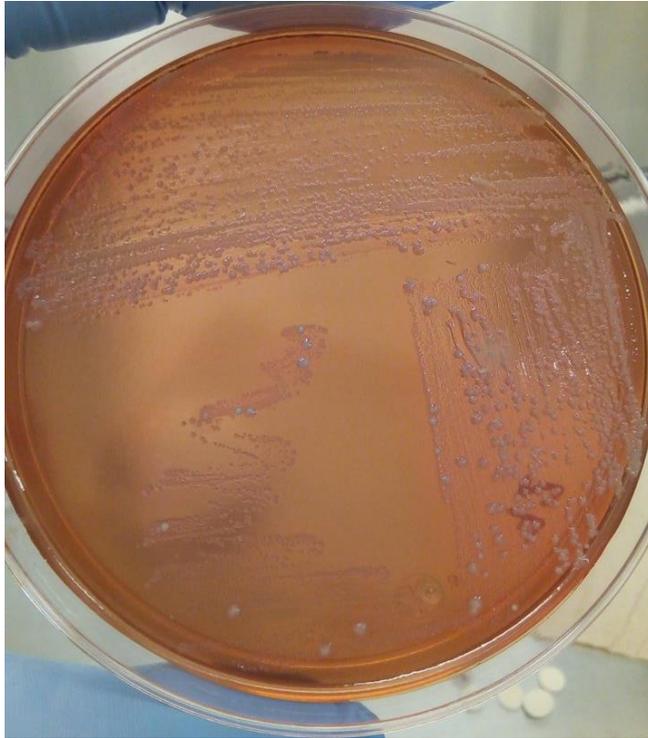


Figura 2. Agar sangre.

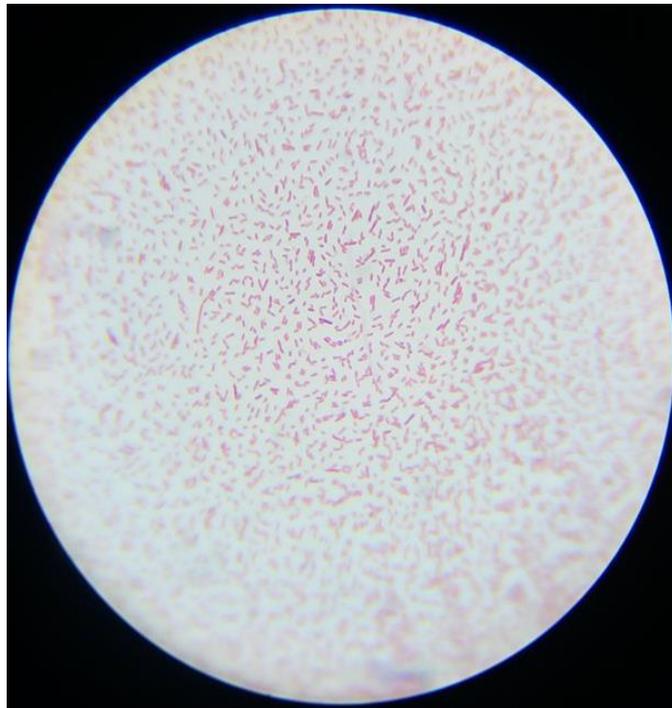


Figura 3. Tinción de Gram.



Figura 4. Agar Mac-Conkey. (Izquierda) medio sin inocular, (centro) fermentadora de lactosa, (derecha) no fermentadora de lactosa.

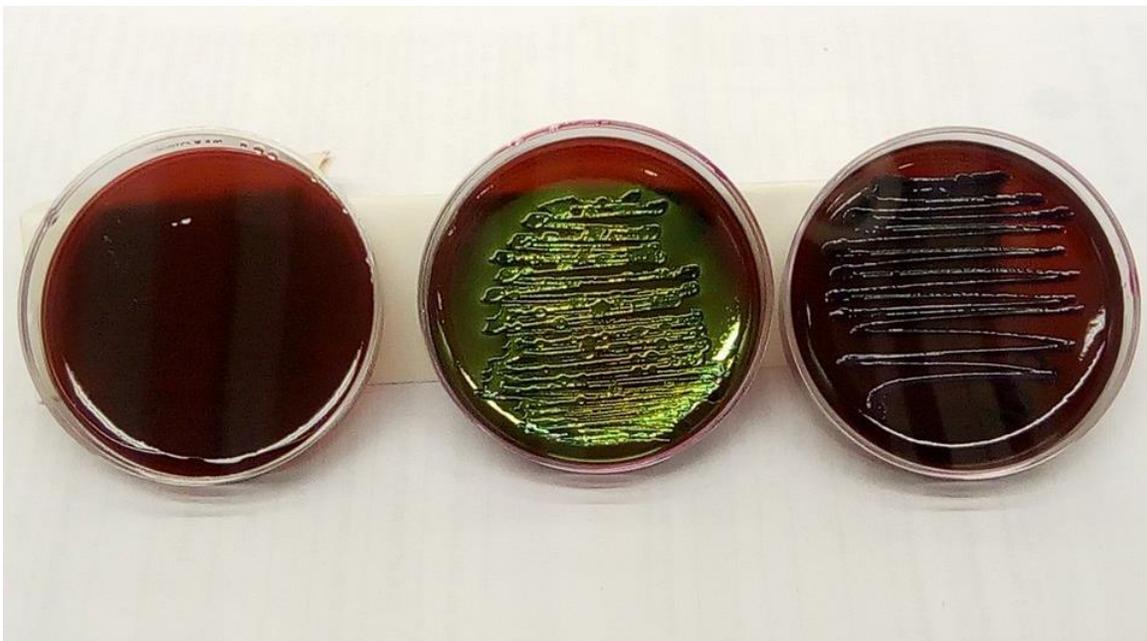


Figura 5. Agar EMB. (Izquierda) medio sin inocular, (centro y derecha) fermentadora de lactosa.



Figura 6. Agar Kligler
 (A) medio sin inocular
 (B) producción de azufre
 (C) prueba negativa
 (D) fermentación de lactosa

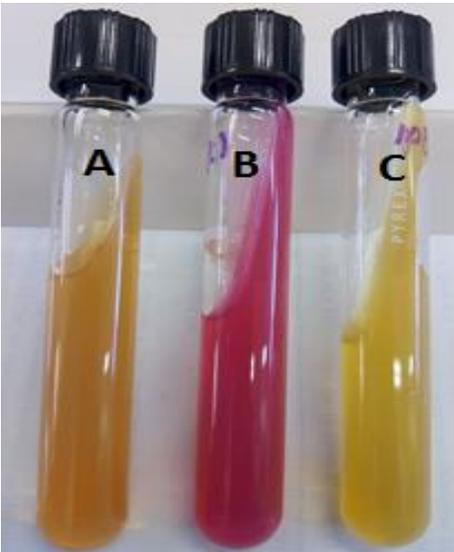


Figura 7. Agar urea
 (A) medio sin inocular
 (B) prueba positiva
 (C) prueba negativa

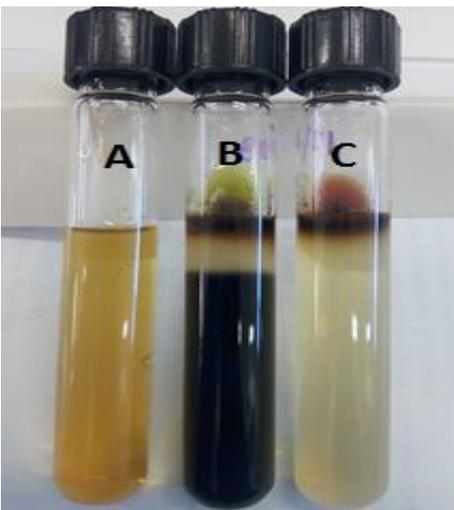


Figura 8. Medio de SIM.
 (A) Medio sin inoculado,
 (B) producción de azufre e Indol negativo
 (C) Indol positivo

7.3.3 Procedimiento del test

Se traspasaron 25 μ L del contenido del pocillo C en los pocillos D y E, a continuación, se transfirieron 25 μ L del contenido del pocillo A en los pocillos D y E, se incubaron a 37°C posteriormente se hizo una primera observación a los 30 minutos y después una segunda observación pasados una hora y 30 minutos, dichas observaciones se hicieron sobre la parte blanca del soporte bicolor, comparando los colores que se formaron en los pocillos D y E, y se anotaron resultados (Figura 11).

7.4 Método de Hodge modificado

Siguiendo las instrucciones proporcionadas por el CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute). Se preparó una suspensión de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 al 0.5 de la escala de McFarland y posteriormente se realizó una dilución de 1:10 con solución salina. Se extendió el inóculo de la cepa ATCC sobre agar Mueller-Hinton (Figura 12), se colocó un disco de meropenem de la marca Sensi-Disc BD BBL 10 μ g (REF 232174) justo en el centro de la placa, se tomó una colonia de la enterobacteria sospechosa de producir carbapenemasas y se realizó una estría desde el centro a la periferia rotulándose con la letra C (Figura 13). Después se realizó el mismo procedimiento con la cepa de *E. coli* ATCC (control negativo) y una cepa de *K. oxytoca* productora de carbapenemasa (KPC) (control positivo), rotulándose con las letras A y B respectivamente. Se realizó el mismo procedimiento con ertapenem. Siendo una prueba positiva la formación de una hendidura en el crecimiento (Figura 14).



Figura 9. Kit de Rapidec Carba NP

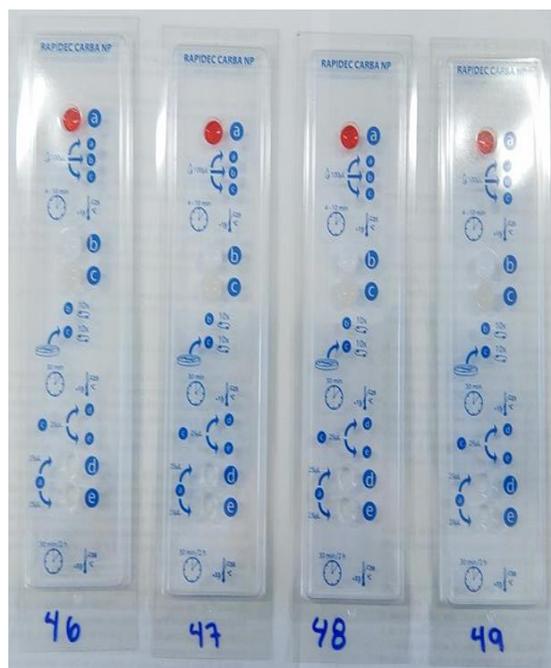


Figura 10. Tira con pocillos de Rapidec Carba NP



Figura 11. Plantilla de la Tira para la realización de la prueba Rapidec Carba NP.

7.5 Control de calidad

Como control negativo se usó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. La cepa de control positivo fue *Klebsiella oxytoca* KPC la cual fue proporcionada por el cepario de la sección de Bacteriología de la Unidad de Laboratorio del Hospital del Niño y el Adolescente Morelense, Emiliano Zapata, Morelos.

7.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron capturados en la plataforma de Microsoft EXEL posteriormente se utilizó el mismo programa para generar las gráficas y tablas

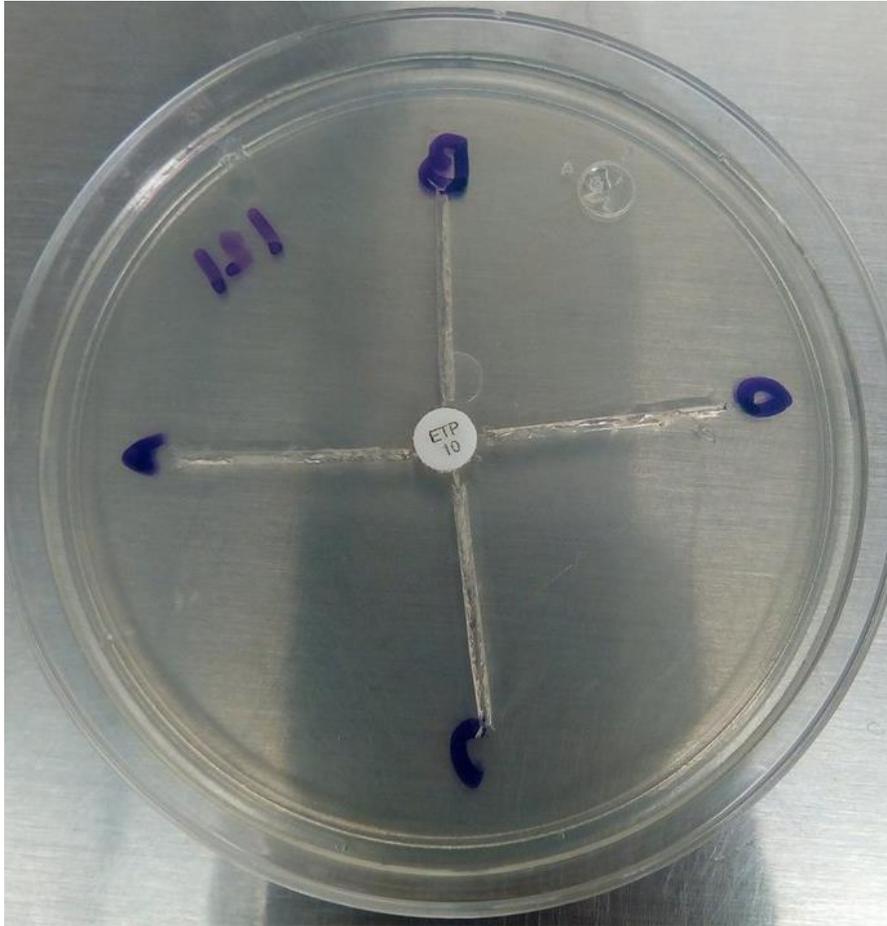


Figura 12. Placa sin inocular.

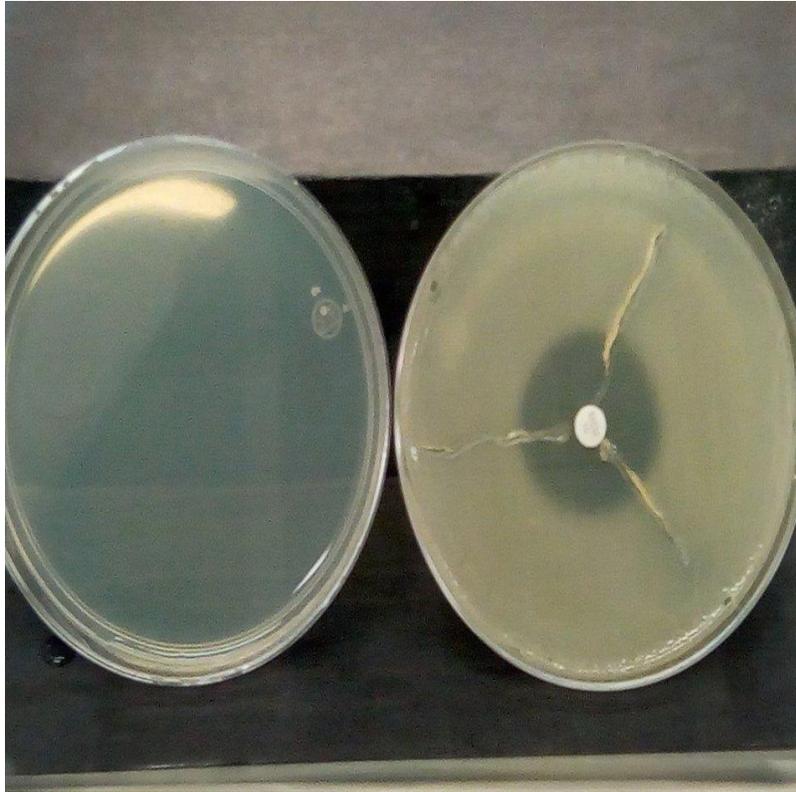


Figura 13. Método de Hodge modificado, placa sin inocular (izquierda) y prueba negativa (derecha).

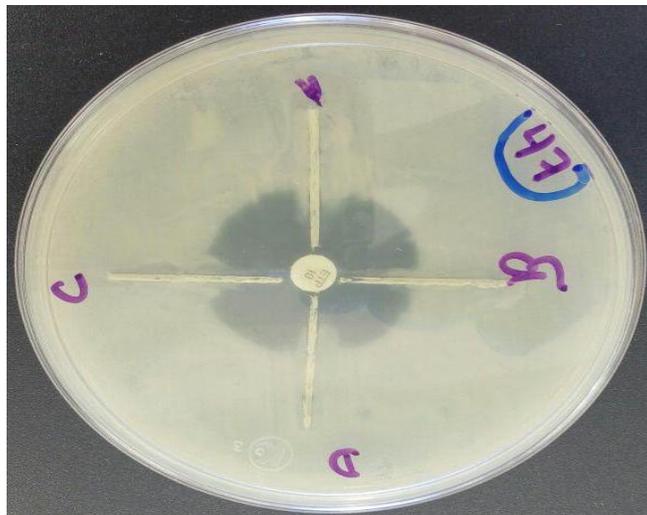


Figura 14. Resultado positivo en el test de Hodge modificado.

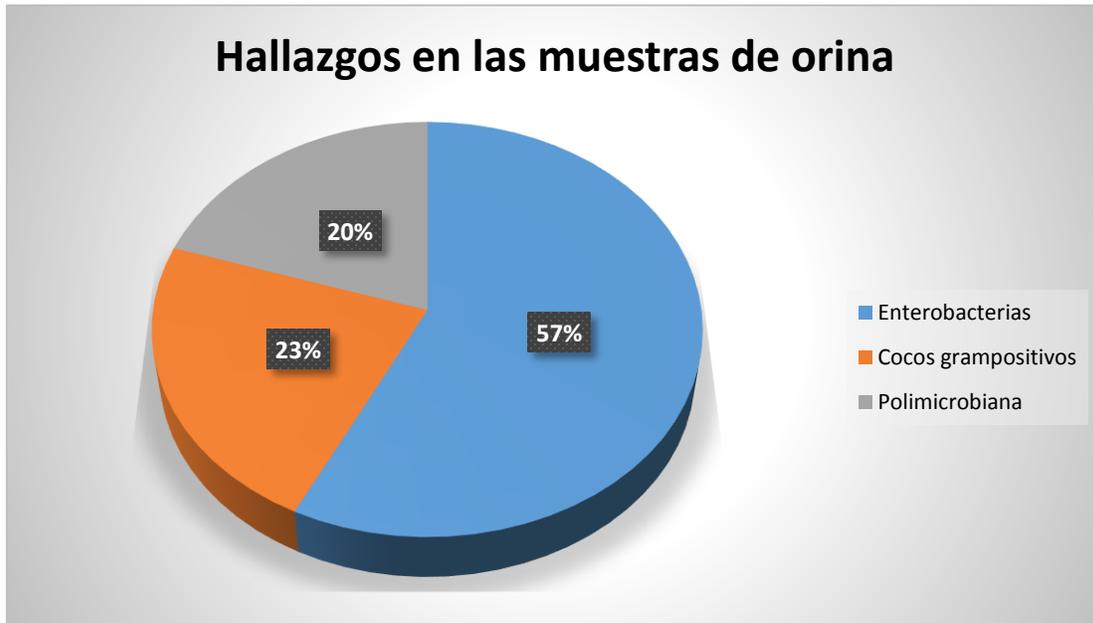
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Resultados

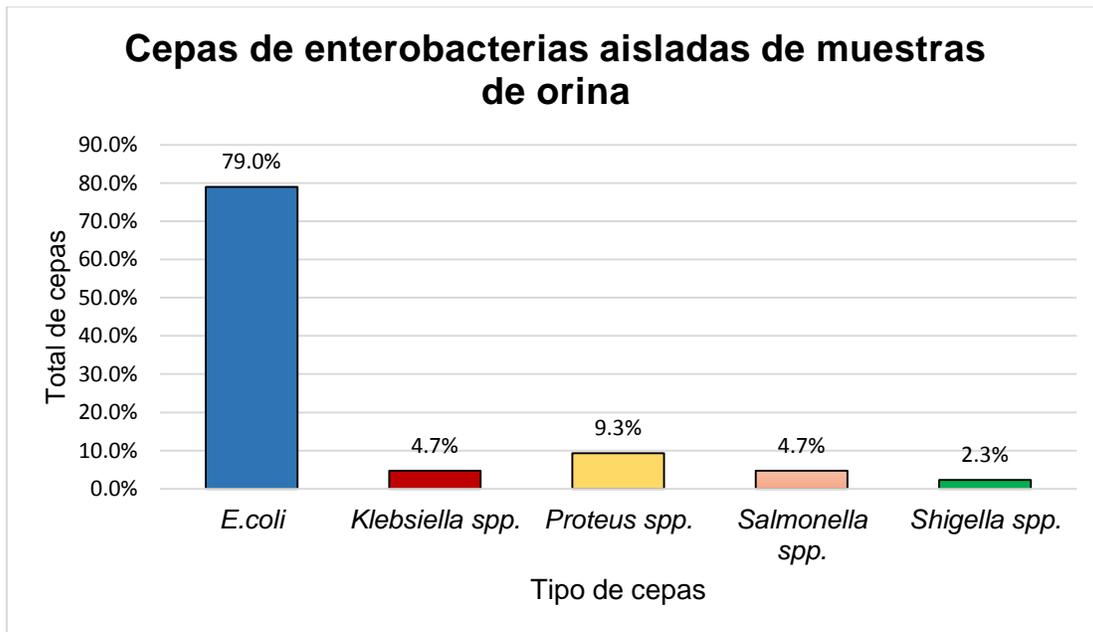
Se procesaron 162 muestras clínicas de orina durante el periodo de enero del 2015 a mayo del 2017, de las cuales 75 cumplieron con las recomendaciones de la Secretaria de Salud (Gráfica 1). Se identificaron 43 (57.3%) cepas correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae*, de las cuales 34 (79.0%) cepas que correspondieron a *Escherichia coli*, 4 del género *Proteus* spp. (9.3%), 2 de *Klebsiella* spp. (4.7%), 2 de *Salmonella* spp. (4.7%) y 1 de *Shigella* spp. (2.3%). (Gráfica 2).

La prueba Rapidec Carba NP se realizó a las 34 cepas correspondientes a *E. coli*, de las cuales 15 cepas (44.11 %) mostraron un resultado positivo.

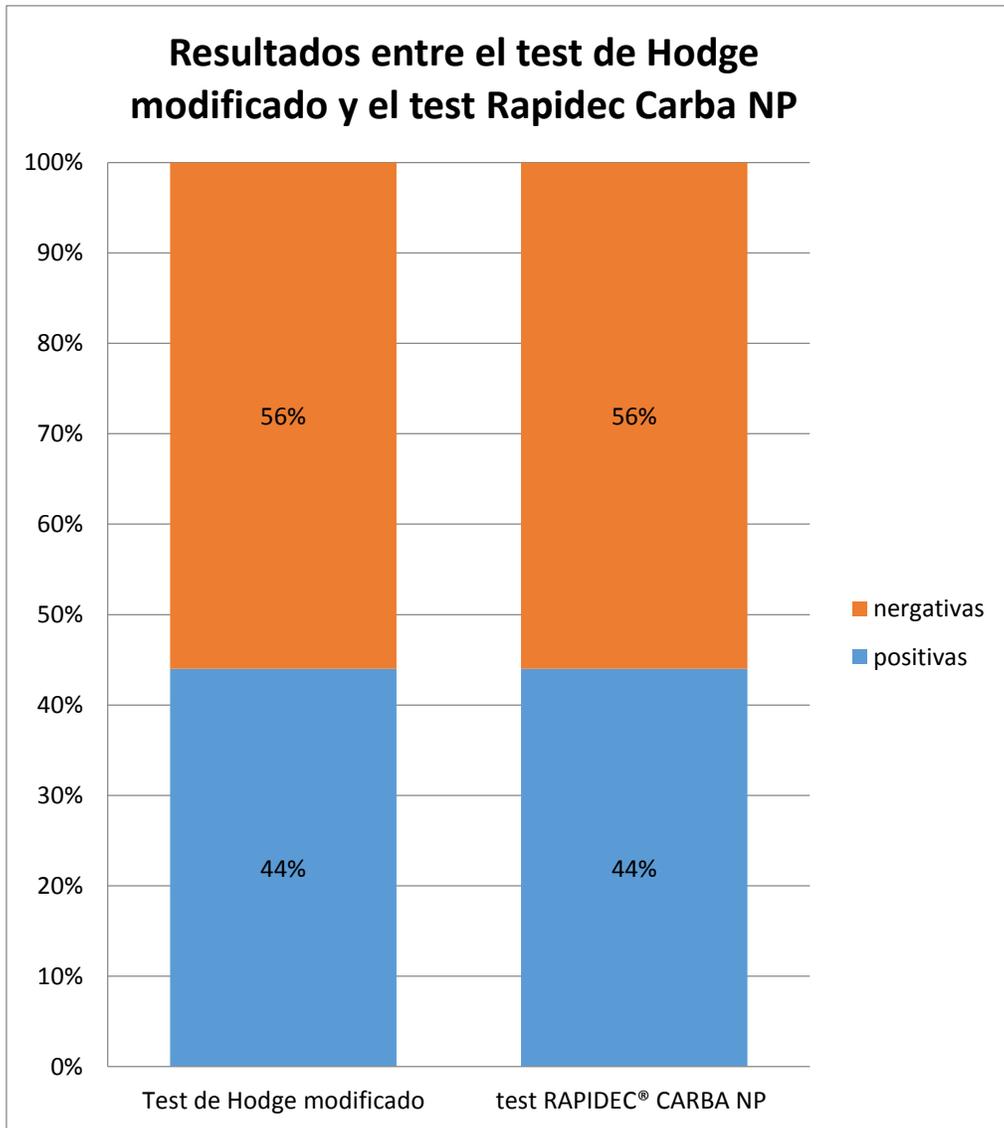
El test de Hodge modificado se realizó solamente a las cepas de *E. coli*, de las cuales 15 cepas (44.11 %) mostraron un resultado positivo.



Gráfica 1. Hallazgos en las muestras de orina analizadas.



Gráfica 2. Cepas de enterobacterias aisladas de muestras clínicas.



Gráfica 3. Resultados entre el test de Hodge modificado y el test Rapidec Carba NP.

8.2 Discusión

En la investigación realizada por Grundmann en el año 2017 concluyeron que 77 cepas (19%) de 402 muestras de *E. coli* fueron productores de carbapenemasa, lo cual se puede observar que en la comunidad de H. Caborca, Sonora existe la presencia de *E. coli* productora también de carbapenemasas.

En la investigación llevada a cabo por García y colaboradores en el año 2011 establecen la relación de la presencia de BLEE y un mayor número de tasa de mortalidad en las bacteriemias por *E. coli*, debido a los múltiples mecanismos de resistencia generados por este tipo de bacterias. Ocasionando un fracaso en el tratamiento o siendo este deficiente, considerándose la mayoría los carbapenemes los antibióticos de elección en estos casos. Los carbapenemes juegan un importante papel en el tratamiento de múltiples enfermedades infecciosas debido a que en muchos de los casos constituye una de las últimas opciones terapéuticas, especialmente en cuadros infecciosos causados por Enterobacterias. De tal manera que una falla en la terapia con estos antimicrobianos reduce las opciones terapéuticas disponibles, aumenta el tiempo y los costos de hospitalización, y finalmente se pueden generar complicaciones clínicas que comprometan la vida del paciente.

La resistencia puede ser de difícil identificación y la resolución de las infecciones ocasionadas por estos microorganismos productores de carbapenemasas puede

estar comprometida dado el escaso arsenal terapéutico con el que contamos. Por otra parte, tienen claros factores de riesgo vinculados a los cuidados de la salud en áreas cerradas y con procedimientos invasivos, así como al uso de antibioticoterapia previa.

Luque y colaboradores en el año 2011 en su investigación realizadas encontraron la presencia de varias enterobacterias productoras de carbapenemasas en diversas muestras analizadas, mostrando con esto los complejos perfiles de multirresistencia que actualmente están presentando este tipo de bacterias presentes tanto a nivel intrahospitalario como en la comunidad.

9. CONCLUSIÓN

Del total de muestras de orina analizadas se obtuvo que más el 50% de las cepas corresponden a la familia *Enterobacteriaceae* aislándose con mayor prevalencia *E. coli*, siendo estas las que mostraron más resultados positivos en la producción de carbapenemasas, conjuntamente se identificaron también cepas de *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Klebsiella*.

Se observa que el 44% de las 34 cepas de *E. coli* encontradas son productores de carbapenemasas lo que evidencia la resistencia a los antibióticos carbapenémicos, que son de última instancia usados para bacterias multirresistentes.

Queda en claro que ambos métodos tienen especificidad y sensibilidad pues las mismas muestras que dieron positivo en la prueba rápida del test Rapidec carba NP también dieron positiva en el test de Hodge modificado que se usó como prueba confirmatoria para la producción de carbapenemasas según lo indica la guía que proporciona el CLSI.

10. RECOMENDACIONES

- Sería de interés realizar un estudio más amplio sobre la identificación genotípica de las bacterias aisladas para entender que genes están involucrados en la producción de carbapenemasas en nuestra región y relacionarla con otros serotipos de *E. coli* de otras regiones.
- Es importante resaltar la importancia de las medidas de prevención como el fortalecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica para lograr minimizar la incidencia de bacterias productoras de carbapenemasas.
- Se debe hacer uso de equipos automatizados e implementar el uso de métodos moleculares para la identificación fenotípica de los microorganismos y así minimizar el tiempo de identificación.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Geo F. Brooks, (2011), JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG. MICROBIOLOGIA MEDICA, THE McGraw-Hill Companies, Inc, Estados Unidos, 213.
2. Puerta, A. Mateos, F. (2010). Enterobacterias, *Medicine*, 10, 3426-31.
3. Albert, M., Gutiérrez, F., Belda, A., Calvo, B. (2005). estudio epidemiológico de las infecciones urinarias por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en un hospital comarcal. factores asociados a mortalidad. 03 de enero del 2018, de Universidad Miguel Hernández. Sitio web:
<http://dspace.umh.es/bitstream/11000/3334/1/ALBERT%20CONTELL,%20MARIA%20AMPARO.pdf>
4. Díaz, M., Acosta, B., Pérez R., Hernández, E. (2016). Infección del tracto urinario causada por Enterobacteriaceae y su relación con reflujo vésico-ureteral en recién nacidos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 74, 34-40.
5. Quijada, P., Flores, A., Labrador, I., Araque, M. (2017) Estudio clínico y microbiológico de la infección urinaria asociada a catéter en los servicios de medicina interna de un hospital universitario venezolano. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 34, 52-61.
6. Mena, A., Marín, M., Catellano, M., Toledo, E., Núñez, D., Ginestre, M., Villasmil, J., Bermúdez, J., Villalobos, R., Gómez, L. (2017). Detección de

- Betalactamasas de espectro extendido en Enterobacteriaceae en un Centro de Salud de Maracaibo, Venezuela. KASMER, 45, 88-99.
7. Gali, Z. (2010). Enterobacterias. Antibioticoterapia. APUA. 5.
 8. Peña, I., Rodríguez, I., Rodríguez, C. (2016). Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas. Tesis Doctoral. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, FACULTAD DE MEDICINA.
 9. Silva, L., Randerson, B., Lemos, T., Kurtz, K., Cerutti, C. (2017). Factores asociados con la contracción de enterobacterias resistentes al carbapenem. Revista Latino-Americana. Enfermagem, 25, e2935.
 10. Organización Mundial de la Salud. (2018). E. coli. De WHO Sitio web: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
 11. Villarraga, O. (2016). AISLAMIENTO, UBICACIÓN E IDENTIFICACION DE LA COLONIZACION DE LAS BACTERIAS SITUADAS EN INTESTINO DELGADO, CIEGOS Y COLON EN EL CICLO COMPLETO DE POLLOS DE ENGORDE DE LA LINEA COBB. De Zootecnia Sitio web: <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/20827>.
 12. Whashington C. Winn. (2006). Koneman diagnostico microbiológico texto y atlas en color. panamericana, México, 1475.
 13. Taylor, M., Giono, S., Haro, I., Lopez, Y. (2006). Guía de Bacteriología Médica. México, McGRAW-HILL INTERAMERICANA, 63-68.
 14. Merino, L., Losch, L. FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, microbiología e inmunología.

15. Lopardo, H., Predar, S. (2011). Bacterias de Importancia Clínica. MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA, 1, 11-53.
16. Ocaña, A., Rocchi, M., Gasparotto, A., Conrero, I., Navarro, M., Factorovich, S., Albetch, C., Monterisi, A. (2007). Bacteriemia por enterobacterias en adultos en un hospital universitario: análisis de cinco años. Revista Argentina de Microbiología, 39, 38-43.
17. Carnet, J. (2016). *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I). De seguridad e higiene alimentaria Sitio web: <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>.
18. Molina, J., Manjarrez, A. (2015). INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS – *Escherichia coli*. De Universidad Nacional Autónoma de México, sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>.
19. Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. salud pública de México, 44, 464-476.
20. Vidal, J., González, A., Gutiérrez, J., Navarro, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. salud pública de México, 49, 376-386.
21. González, E., Reséndiz, A., Canizales, V. (2011). IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS EN MUESTRAS CLÍNICAS (HECES)

Y DE ALIMENTOS EN EL ESTADO DE SINALOA, Tesis de Maestría.
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

22. Molina, J., Eslava, C. (2015). Texto normal Texto normal *ESCHERICHIA COLI* DIARROGÉNICA. ., De Universidad Nacional Autónoma de México
Sitio web:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>.
23. Alba, J., Ortega, J., Álvarez, G., Cervantes, M., Ruiz, E., Urtis, N., Martínez A. (2013). Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica. *Química Viva*, 3, 215-233
24. Pérez, J., Gutiérrez, J. (2017). Capacidad de adhesión y algunos genes implicados en la patogenicidad de *Escherichia coli* en aislados de Chiapas. tesis de Licenciatura. UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS, INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
25. Margal, N., Domínguez, A., Prats, G., Salleras, L. (1997). *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA. *Revista Española de Salud Pública*, 71, 437-443.
26. Rivera, F., Ochoa, T. (2013). *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en el Perú. de Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú
Sitio web: <http://www.fihudiagnostico.org.pe/revista/numeros/2013/ene-mar/23-26.html>.
27. Farfán, A., Ariza, S., Vargas, F. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena Infectología*, 33, 438-450.

28. Arias, I., Caceres, O., Figueroa, M., Huguet, J., Camiña, M. (2004). *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA EN NIÑOS CON DIARREA DE UN HOSPITAL DE LIMA. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 21.
29. Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E., Contreras, C., Rivera, F., Mosquito, S., Lluque, A., Ochoa, T. (2011). Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* Difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 28(1), 21-28.
30. Arenas, M., Ocaña, N., Alvarado, J., Laguna, Y. (2013). IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MÚLTIPLE Y SEROTIPIFICACIÓN. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
31. Marín, M., Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21, 42-55.
32. Moreno, K. (2013). CARBAPENÉMICOS: TIPOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANOS. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXX*, 608, 599-605.
33. Estepa, V., Rojo, B., Azcona, J., Olarte, I. (2017). Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 35, 141-147.
34. Ruiz, G. (2016). Características microbiológicas y clínico-epidemiológicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa oxa-48 en el contexto

- de un brote hospitalario. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
35. Suarez, C., Katia, J., Guzmán, A., Villegas, M. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas,, 10, 85-93.
36. Maza, C., Clavijo, M. (2017). Tesis. Recuperado a partir de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26828>.
37. Castañeda, J., Gómez, K., Corrales, L., Cortés, S. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática. *Nova*, 14(25), 95-111.
38. Tafur, J., Torres, J., Villegas, M. (2008). mecanismos de resistencia. *Asociación colombiana de infectología*, 12, 217-226.
39. Cabrera, C., Gómez, M., Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38, 149-158.
40. Moreno, C., González, R., Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *REVISTA DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO*, 69, 185-192.
41. Walther-Rasmussen, J, Hoiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, 57(3): 373-83.
42. Ruiz, G., Mingorance, J. (2016). Características microbiológicas y clínico-epidemiológicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa oxa-48

en el contexto de un brote hospitalario. Tesis Doctoral, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, FACULTAD DE FARMACIA.

43. Martínez, D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Sociedad Venezolana de Microbiología Caracas, Venezuela, 29, 78-83.
44. Moreno, V., Chaves, F. (2014). Caracterización molecular y epidemiológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. tesis Doctoral. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, FACULTAD DE MEDICINA.
45. Cerda, H., Martínez, W., Pérez, A., Medina, O. (2017). Genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo- β -lactamasas, KPC y OXA mediante la técnica de PCR convencional en Enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el periodo Agosto 2015- Octubre 2016.. Tesis de licenciatura. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA., INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD.
46. Cercenado, E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. Quimioter, 28, 8-11.
47. CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. 1-249.
48. Poirel, L., Nordmann, P. (2015). Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. Journal of Clinical Microbiology, 53, 3003-3008.

ANEXOS

APÉNDICE A

MEDIOS DE CULTIVOS

1.0 Agar sangre

Es un medio nutritivo de uso general para el aislamiento y el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes a partir de muestras clínicas. El medio de cultivo sin la adición de sangre llamado también agar Columbia puede ser usado como medio para la realización de agares especiales y para hemocultivos.

1.1 Principio

Las propiedades superiores del agar sangre con 5.0% de sangre para propiciar el crecimiento se derivan de la combinación de dos peptonas y del extracto de levadura como fuente de vitaminas del complejo B. Se incluye almidón de maíz para absorber los derivados tóxicos contenidos en la muestra y sirve como fuente de energía para los microorganismos que poseen alfa-amilasas. La sangre de carnero permite detectar las reacciones hemolíticas y aporta el factor X (hemo) necesario para el crecimiento de numerosas especies patogénicas.

El medio de agar sangre se sugiere ajustar el pH de 7.2 a 7.5 ya que las bacterias alcanzan un grado de desarrollo mayor en medios ligeramente alcalinos.

1.2 Fórmula

Por un litro de medio sin sangre contiene: infusión de músculo cardíaco (2.0 g), peptona de caseína (13.0 g), extracto de levadura (5.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), agar (15.0 g), sangre de carnero desfibrinada (5.0%) y como medio de agar sangre se agrega sangre de carnero al 5.0% ambos el pH final a 7.3 +/- 0.2.

1.3 Preparación

Suspender 40 g del polvo en un litro de agua purificada y mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave 15 minutos a una temperatura de 121°C. Dejar enfriar a 45-50°C, verter 5.0% de sangre de carnero estéril anticoagulada con EDTA y distribuir en placas.

2.0 Agar Mac-Conkey

Es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de *Enterobacteriaceae* y diversos otros bacilos Gram negativos a partir de muestras clínicas.

2.1 Principio

El agar Mac-Conkey es sólo ligeramente selectivo, dado que la concentración de sales biliares, que inhiben los microorganismos Gram positivos, es baja en comparación con otros medios en placa entéricos. Se recomienda el uso de este

medio en muestras clínicas con posible flora microbiana mixta, tal como procedentes de la orina, del sistema respiratorio, de heridas y otras, porque permite la agrupación preliminar de bacterias entéricas y otras bacterias Gram negativas en organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa. El agar Mac-Conkey también se utiliza en el examen microbiológico de alimentos. Se diseñó para lograr una diferenciación más definitiva de los organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa y alcanzar un crecimiento superior de las bacterias entéricas. Las peptonas proporcionan los nutrientes, el cristal violeta inhibe las bacterias Gram positivas, en especial los Enterococos y Estafilococos. La diferenciación de los microorganismos entéricos se logra mediante la combinación de lactosa y el indicador de pH rojo neutro. Se producen colonias incoloras o de color de rosa a rojo según la capacidad del aislado para fermentar carbohidratos.

2.2 Fórmula

Por cada 1000 mL de agar contiene: peptona de caseína (1.5 g), peptona de gelatina (17.0 g), peptona de carne (1.5 g), lactosa (10.0 g), sales biliares (1.5 g), cloruro de sodio (13.5 g), agar (13.5 g), rojo neutro (0.03 g) y cristal violeta (0.001 g), pH final 7.1 +/- 0.2.

2.3 Preparación

Suspender 50 g del medio en un litro de agua purificada, mezclar bien hasta que quede una suspensión uniforme, dejar reposar 10-15 minutos, calentar con agitación frecuente y dejar hervir durante un minuto.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121°C y distribuir en placas de Petri.

2.4 Interpretación de resultados

Solo las bacterias Gram negativas crecen en el medio. La formación de colonias rojas-rosadas es diagnóstica para bacterias que fermentan lactosa debido a la acidificación del medio, las colonias incoloras u opacas son no fermentadoras de lactosa.

Tabla 2. Interpretación de la morfología en agar Mac-Conkey.

Microorganismo	Crecimiento	Color	Precipitación biliar
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(+)	rosado-rojizo	(+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	(+)	rosado-rojizo	(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	(+)	rosado-rojizo	(+)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	(+)	incoloro	(-)
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	(+)	incoloro	(-)
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	(+)	incoloro	(-)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	(-)	////	////

3.0 Agar EMB

Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

3.1 Principio

El agar EMB, contiene colorantes de azul de metileno y eosina Y, que inhiben las bacterias Gram positivas en cierto grado. Los colorantes también actúan como indicadores diferenciales en respuesta a la fermentación de la lactosa o la sacarosa por parte de los microorganismos. Los coliformes producen colonias de color negro azulado, mientras que las colonias de *Salmonella* y *Shigella* son incoloras o de color ámbar transparente. Las colonias de *Escherichia coli* pueden exhibir un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa.

3.2 Fórmula

Por cada 1000 mL de agua contiene: peptona de gelatina (10.0 g), lactosa (5.0 g), sacarosa (5.0 g), fosfato dipotásico (2.0 g), agar (16.5 g), eosina (0.4 g) y azul de metileno (0.065 g), pH final de 7.2 +/-0.2.

3.3 Preparación

Se suspende 36 g del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación continua y hervir durante un minuto. Esterilizar durante 15 minutos a una temperatura de 121°C y distribuir en placas de Petri.

3.4 Interpretación de resultados

Las colonias de microorganismos que fermentan la lactosa o sacarosa generan una coloración negro-azulado. En caso de ser *E. coli* o *Citrobacter* spp., suelen generar un color verde metálico. Las colonias de microorganismos no fermentadoras no presentan coloración.

Tabla 3. Interpretación de la morfología en agar EMB.

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(+)	NA/VM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	(+)	NA/VM
<i>Klebsiella</i> <i>Pneumoniae</i> ATCC 70603	(+)	mucosas con centro oscuro
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	(+)	incoloras
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 14028	(+)	incoloras
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	(+)	incoloras
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	(+)	incoloras
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> ATCC 29213	inhibición	puntiformes
NA: negro azulado		VM: verde metálico

APÉNDICE B

TINCIÓN GRAM

1.1 Principio

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas (en este caso, los términos positivo y negativo simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias).

1.2 Fundamento

La tinción de Gram está basada en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo.

Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal-violeta después de la decoloración y aparecen de color azul intenso (purpura). La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglucano y una membrana celular externa, cuyo componente estructural único son los lipopolisacáridos. Las bacterias Gram negativas no son capaces de retener el cristal-violeta después de la decoloración y son teñidas de rojo con safranina.

1.3 Colorantes de la tinción de Gram

1.3.1 Cristal violeta

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Cristal violeta	0.5 g
Agua destilada	100 mL

1.3.2 Lugol

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

1.3.3 Alcohol cetona

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

1.3.4 Safranina

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

1.4 Procedimiento

Se coloca una gota de solución salina sobre un portaobjetos limpio, seguido de una colonia de la muestra sospechosa, se homogeniza y se fija secando directamente a la flama del mechero.

Se coloca el portaobjetos ya fijado en una bandeja de tinción donde se le agrega cristal violeta, lo necesario para cubrir toda la superficie donde se ubica la muestra, se deja reposar durante un minuto, seguido se lava con agua destilada hasta retirar todo el colorante.

Después se agrega la solución de lugol que hace la función de mordiente para fijar el colorante inicial este proceso debe durar un minuto y de igual manera se lava con agua destilada.

Seguido se agrega la solución de alcohol-acetona para decolorar la muestra durante 30 segundos y se lava con agua destilada.

Por último, se adiciona la solución de safranina para dar contraste a la tinción inicial, este proceso debe durar un minuto y se lava con agua destilada.

Se deja secar el portaobjetos y se observa al microscopio con aceite de inmersión con el objetivo de 100X.

1.5 Interpretación de resultados

Las bacterias que se observen con una coloración rosada o roja se reportan como Gram negativas y las de color purpura o azul de reportan como Gram positivas.

APÉNDICE C

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

1.0 Agar hierro de Kligler

Agar hierro Kligler (Kligler Iron Agar) favorece la diferenciación de los bacilos entéricos Gram negativos sobre la base de su capacidad de fermentar dextrosa y lactosa y producir sulfuro.

1.1 Principio

Kligler Iron Agar, además de caseína y peptonas de carne, contiene lactosa y dextrosa, que permiten la diferenciación de las especies de bacilos entéricos según el cambio de color del indicador de pH rojo fenol como respuesta al ácido producido durante la fermentación de estos azúcares. La concentración de dextrosa es de sólo el 10% de la concentración de lactosa. La combinación de citrato férrico amónico y tiosulfato sódico permite detectar la producción de ácido sulfhídrico.

1.2 Fórmula

La fórmula por litro contiene: caseína digerida por enzimas pancreáticas (10.0 g), tejido animal digerido por enzimas pépticas (10.0 g), lactosa (10.5 g), dextrosa (10.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), citrato de amonio férrico (0.5 g), tiosulfato de sodio (0.5 g), agar (15.5 g), rojo de fenol (0.025 g). pH final 7,4 +/- 0.2

1.3 Preparación

Suspender 52 g del polvo en agua purificada, mezclar bien calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Agregar a los tubos, esterilizar en autoclave durante 15 min a una temperatura de 121°C, enroscar bien los tubos y colocar en posición inclinada para generar el pico de flauta y dejar enfriar.

1.4 Siembra

Usando un asa recta se debe esterilizar a la flama y picar varias colonias semejantes, introducir de forma recta hasta el fondo del agar y realizar un estriado en la superficie. Incubar a una temperatura de 37°C durante 24 hr.

1.5 Interpretación de resultados

Cuando la superficie es de color rojo y fondo amarillo (alcalino/ácido respectivamente): el microorganismo solo es fermentador de glucosa (glucosa positivo y lactosa negativo), cuando la superficie el color rojo y el fondo rojo (alcalino/alcalino): el microorganismo no es fermentador de carbohidratos (lactosa y glucosa negativo), cuando la superficie es color amarillo y el fondo amarillo (ácido/ácido): el microorganismo es fermentador de carbohidratos (lactosa y glucosa positivo), además, el medio se torna negro cuando el microorganismo es productor de ácido sulfúrico y se forman burbujas intercaladas en el medio cuando el organismo es productor de gas.

2.0 Medio SIM

El medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad) está destinado a determinar producción de indol, de sulfuro de hidrógeno y debido a que es un medio semisólido también puede determinar la movilidad en un solo tubo.

2.1 Principio

Los elementos del medio de SIM posibilitan la determinación de tres actividades por las que se pueden diferenciar las bacterias entéricas. El tiosulfato de sodio es indicador para la producción de ácido sulfúrico este a su vez reacciona con el sulfato de hierro y amonio para formar sulfuro ferroso (precipitado negro). La peptona de caseína es rica en triptófano que determinados microorganismos atacan lo que da como resultado la producción de indol el cual se detecta con determinados reactivos al agregarse posteriormente de la incubación. Gracias a la forma semisólida del medio hace posible la detección de la movilidad ya que facilita la propagación hacia el exterior de la línea de inoculación debido al crecimiento.

2.2 Fórmula

El medio por litro de agua contiene: peptona de caseína (20.0 g), peptona de carne (6.1 g), sulfato de hierro y amonio (0.2 g), tiosulfato de sodio (0.2 g), agar (3.5 g). pH final 7.3 +/- 0.2.

2.3 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.

2.4 Siembra

Se toma muestra previamente aislada y se inocula de línea recta abarcando dos tercios del agar procurando no rasgar de más el medio.

2.5 Interpretación de resultados

2.5.1 Motilidad

Las cepas móviles producen turbidez en el medio, que se extiende más allá de la línea de inoculación, las cepas inmóviles no forman turbidez.

2.5.2 Producción de H₂S

Las cepas productoras de sulfuro generan un oscurecimiento del medio, la cepa no productora de sulfuro permanecerá sin cambios de color.

Tabla 4. Interpretación de los resultados en medio Kligler.

Microorganismos	Superficie	Fondo	Producción de gas	Producción de Azufre
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	acido	acido	(+)	(-)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700630	acido	acido	(+)	(-)
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	alcalino	acido	(-)	(+)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	alcalino	acido	(-)	(+)
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	alcalino	acido	(-)	(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	alcalino	alcalino	(-)	(-)

Tabla 5. Interpretación de los resultados en agar SIM.

Microorganismos	Motilidad	Indol	Producción de Azufre
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(+)	(+)	(-)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	(+)	(+)	(-)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	(+)	(-)	(+)
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	(-)	(-)	(-)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700630	(-)	(-)	(-)
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	(+)	(-)	(+)

3.0 Agar urea

El agar urea (medio Christensen) es un medio diferencial para organismos, en especial miembros de la especie *Enterobacteriaceae*, según su capacidad de producir ureasa.

3.1 Principio

En el medio de cultivo, la tripteína y la glucosa, aportan los numerosos nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el rojo de fenol es el indicador de pH.

Las bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberan amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el indicador de color amarillo- naranja a rosado.

Es recomendado especialmente para la detección de la actividad ureásica en bacterias que hidrolizan la urea ya que la fermentación de la glucosa presente activa la función ureásica. Este es el caso de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp.

3.2 Fórmula

Por 950 mL de agua destilada contiene: tripteína (1.0 g), glucosa (1.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), fosfato monopotásico (2.0 g), rojo de fenol (0.012 g), además, se agrega una solución de urea al 40% (50 mL). pH final 6.8 +/- 0.2.

3.3 Preparación

Suspender 24 g de polvo en 950 mL de agua destilada. Dejar reposar 2 minutos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 50 mL de una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración o cloroformo ya que la urea se desnaturaliza fácilmente con las altas temperaturas. Fraccionar en tubos y solidificar en pico de flauta con fondo profundo.

3.4 Siembra

Se estría la superficie y el fondo del agar con un asa recta para detectar viraje correctamente.

3.5 Interpretación de resultados

El microorganismo que hidroliza la urea virara el medio a color rosado-rojizo, cuando el microorganismo no hidroliza la urea el medio se torna amarillo.

Tabla 6. Interpretación de resultados en agar urea.

Microorganismo	Crecimiento	Color del medio
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	(+)	rojo-rosado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700630	(+)	rojo-rosado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(-)	amarillo
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	(-)	amarillo

4.0 Indol

Se utilizan en la determinación de la capacidad de las bacterias para producir indol mediante la desaminación de triptófano.

4.1 Principio

La producción de indol ha sido utilizada ampliamente como una ayuda para la diferenciación de algunos géneros y especies del mismo género.

Es un ensayo cualitativo utilizado para diferenciar microorganismos en base a la capacidad para separar indol a partir de L-triptófano. Es necesario el crecimiento previo del microorganismo en estudio en medios de cultivo con alto contenido de L-triptófano, como ser los medios semisólidos medio SIM, medio MIO o el medio líquido agua triptona. Al agregar el reactivo de Ehrlich o reactivo Kovac al medio de cultivo, el indol generado se combina con el grupo aldehído del p-dimetilamino benzaldehído del reactivo incorporado y se forma un complejo de color rojo.

4.2 Preparación del reactivo

4.2.1 Reactivo de Kovac

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
P-dimetilaminobenzaldehído	1.0 g
Alcohol amílico o butílico	80 mL

Ácido clorhídrico Q.P. 20 mL

Se debe diluir el p-dimetil-amino-benzaldehído en el alcohol amílico o butílico y agregarse al ácido clorhídrico. Se debe conservar en un recipiente color ámbar alejado de la luz y en refrigeración.

4.3 Procedimiento

Una vez dejando en incubación el medio SIM y reportar los resultados de motilidad y producción de H₂S, se agrega directamente al medio 6 gotas de reactivo de Kovac o reactivo de Erlich y se deja reposar de 5-10 min pasado este tiempo se anotan los resultados.

4.4 Interpretación de resultados

Si en la interface del reactivo y el medio se forma un anillo de color rojo la muestra es productora de indol (indol positivo). Los microorganismos que no producen indol se verá un anillo color amarillo o sin color aparente.

5.0 Medio líquido RM-VP

Un medio que ayuda a la diferenciación de Enterobacterias mediante reacciones de rojo de metilo y Voges-Proskauer.

5.1 Principio

En el medio de cultivo, la peptona 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 (Acetilmetilcarbinol).

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 Acetilmetilcarbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo.

5.2 Fórmula

Por litro de agua el medio contiene: peptona tamponada (7.0 g), fosfato dipotásico (5.0 g), dextrosa (5.0 g). pH final de 6.9 +/- 2.0.

Tabla 7. Interpretación de los resultados en el medio RM-VP.

Microorganismos	Prueba de Rojo de Metilo	Prueba de Voges Proskauer
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(+)	(-)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700630	(-)	(+)
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	(+)	(-)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	(+)	(-)
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	(-)	(+)

5.3 Preparación del medio

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

5.4 Preparación de reactivo

5.4.1 Rojo de Metilo

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Rojo de Metilo	0.1 g
Alcohol etílico (95%)	250 mL
Agua destilada	250 mL

5.4.2 Reactivo alfa-naftol

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Alfa-naftol	5.0 g
Alcohol etílico (95%)	100 mL

5.4.3 KOH al 40%

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Hidróxido de potasio	40.0 g
Agua destilada	100 mL

5.5 Procedimiento

Para la prueba de rojo de metilo se toma una alícuota del caldo RM-VP previamente inoculado con la muestra problema y se agrega el indicador rojo de metilo el resultado aparece inmediatamente.

Para la prueba de Voges-Proskauer se toma una alícuota del caldo RM-VP y se agregan 0.6 mL (12 gotas) de alfa-naftol seguido de 0.2 mL (4 gotas) de KOH al 40% y se agita se es resultado es notable de 10 a 15 minutos de reposo.

5.6 Interpretación de resultados

Prueba roja de metilo. La prueba es positiva cuando se genera un color rojo en el medio, la prueba es negativa cuando se genera una coloración amarillenta.

La reacción de Voges-Proskauer es positiva cuando se genera una coloración roja en el medio y negativa cuando no hay cambio de color.

6.0 Citrato de Simmons

El agar citrato Simmons es un medio de cultivo para la diferenciación de bacterias Gram negativas mediante la utilización de citrato.

6.1 Principio

Los organismos capaces de utilizar el fosfato de amonio dihidrogenado y citrato sódico como las únicas fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente, crecerán en este medio y producirán una reacción alcalina, detectada por el cambio de color del indicador de Azul de bromotimol de color verde (neutro) a azul (alcalino).

6.2 Preparación

Se suspenden 24,2 g del polvo en un litro de agua destilada. Reposar de 5-10 minutos. Mezclar bien y calentar suavemente con agitación constante, hervir durante un minuto distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min se deja enfriar en posición inclinada.

6.3 Fórmula

Por un litro de medio contiene: fosfato dihidrogenado de amonio (1.0 g), fosfato dipotásico (1.0 g), cloruro de sodio (5.0 g), citrato de sodio (2.0 g), sulfato de magnesio (0.2 g), agar (15.0 g), azul de bromotimol (0.08 g).

6.4 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.

6.5 Interpretación de resultados

Una reacción positiva se indica mediante el crecimiento con un color azul intenso en el agar inclinado. Una reacción negativa se demuestra por la falta de crecimiento o trazas de crecimiento sin cambio de color (el medio retiene un color verde oscuro).

APÉNDICE D

1.0 Método RAPIDEC® CARBA NP REF: 415418 LOTE: 1005914480

La prueba RAPIDEC® CARBA NP consiste en una tira lista para la detección rápida de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productoras de carbapenemasas utilizando bacterias cultivadas en un medio con agar.

1.1 Principio

La prueba RAPIDEC® CARBA NP está basada en la detección de hidrólisis del carbapenemes por bacterias productoras de carbapenemes. La hidrólisis acidifica el medio, lo que provoca un cambio de color en el indicador de pH. Después de la lisis bacteriana que posibilita la extracción de la enzima, se añade el lisado a una solución de detección que contiene imipenem (sustrato de carbapenemes), rojo de fenol (indicador de pH), zinc, requerido para la detección de cepas productoras de carbapenemes metalodependiente. Después de incubar durante un máximo de 2 horas, la lectura se realiza visualmente, comparando un pocillo de control sin imipenem con un pocillo de reacción que contenga imipenem.

1.2 Instrucciones de uso

1.2.1 Preparación de la tira

- Saque la tira de su envase.
- Escriba los números de referencia de la muestra en la tira.

1.2.2 Preparación de la prueba

- Abra la ampolla del medio de suspensión API® (2 mL) según se indica en el párrafo

“Advertencias y precauciones” de la ficha técnica de este producto.

- Dispense 100 µL en cada uno de los pocillos A, B y C.
- Coloque una tapa en la tira.
- Déjela durante 4-10 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) y luego,
- Mezcle suavemente el contenido del pocillo B utilizando un bastoncillo proporcionado con el kit.

1.2.3 Preparación del inóculo y de la lisis bacteriana

- Coloque la tira en el soporte bicolor (blanco y negro). Coloque los pocillos B y C sobre el fondo negro para facilitar la comparación de turbidez.

- Con el extremo de un nuevo bastoncillo, tome varias colonias de la misma morfología con cuidado de no llevarse ningún fragmento de agar (la edad de las colonias debe ser ≤ 72 hrs).

- Deposite el contenido del bastoncillo en el pocillo C y mezcle. Repita este paso varias veces hasta obtener una turbidez equivalente a la del pocillo B. La suspensión del pocillo C debe ser perfectamente homogénea, sin agregados, y el fondo del pocillo no debe ser visible.

- Deje durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C).

1.2.4 Procedimiento

- Transfiera 25 µL del pocillo C a los pocillos D y E; luego,
- Transfiera 25 µL del pocillo A a los pocillos D y E.
- Incube la tira durante 30-40 minutos a 33-38 °C.
- Coloque la tira en el soporte bicolor (blanco y negro). Coloque los pocillos D y E sobre el fondo blanco para facilitar la lectura.
- Realice la lectura inicial.
- En caso de reacción negativa o dudosa, vuelva a incubar la tira y realice una segunda lectura hora y media más tarde. El tiempo de incubación total de la prueba no debe superar las 2 horas.

NOTA: No utilice solución salina para rehidratar los pocillos

1.2.5 Muestras (recogida y preparación)

- Reconstituya el pocillo A solo con 100 µL del medio de suspensión; el pocillo B ya no se usará más.
- Tome 100 µL de esta suspensión bacteriana.
- Dispénsela en el pocillo C de la prueba RAPIDEC® CARBA NP.
- Deje durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Continúe el protocolo en el paso del “Procedimiento” descrito anteriormente.

2.0 Lectura e interpretación

Coloque la tira en el soporte bicolor (blanco y negro). Coloque los pocillos y sobre el fondo blanco para facilitar la lectura. La lectura se lleva a cabo comparando los

colores de los pocillos. Una prueba es positiva cuando se observa una variación significativa de color entre los dos pocillos de prueba (D y E).

Tabla 8. Interpretación de resultados en agar Citrato de Simmons.

Microorganismos	Crecimiento	Color del medio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700630	(+)	azul
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	(+)	azul
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	(+)	azul
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(-)	verde
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	(-)	verde

Tabla 9. Interpretación de resultados de la prueba rápida RAPIDEC® CARBA NP.

Pocillo control D	Pocillo de prueba E	Interpretación
rojo	rojo	negativo
naranja	naranja	
rojo	amarillo, naranja claro, naranja, naranja oscuro	positivo
naranja	naranja	
cualquier otro color que nos sea rojo no naranja	no aplicable	no interpretable
naranja	rojo	

APÉNDICE E

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICO

1.0 Agar Mueller-Hinton

Se utiliza en el procedimiento de difusión en disco estandarizado para la determinación de la sensibilidad de cepas aisladas a partir de muestras clínicas de organismos aerobios de rápido crecimiento ante agentes antimicrobianos, conforme a las normas del CLSI.

1.1 Principio

Bauer, Kirby y otros desarrollaron un procedimiento estandarizado en el que se seleccionó como medio de prueba el agar Mueller Hinton, un medio originalmente diseñado para el aislamiento de gonococos. Un estudio colectivo internacional posterior confirmó el valor del agar Mueller Hinton para este propósito por la reproducibilidad relativamente buena del medio, la sencillez de su fórmula y la riqueza de los datos experimentales que habían sido acumulados utilizando este medio.

El procedimiento Bauer-Kirby se basa en la difusión en un gel de agar de sustancias antimicrobianas que se impregnan en discos de papel. En comparación con los métodos anteriores, que utilizaban discos con concentraciones altas y bajas de agentes antimicrobianos, y que basaban su interpretación en la presencia o ausencia de zonas de inhibición, este método utiliza discos con una sola concentración de agente antimicrobiano y los diámetros de zona presentan una

correlación con las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). En el procedimiento de prueba, se extiende una suspensión estandarizada del organismo mediante torundas sobre toda la superficie del medio. Los discos de papel impregnados con cantidades específicas de antibióticos y otros agentes antimicrobianos luego se colocan en la superficie del medio, se incuba la placa y se miden las zonas de inhibición en torno a cada disco. La determinación de si el organismo es sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) a un agente se realiza mediante la comparación de las zonas obtenidas con los que aparecen en las tablas 2A a 2D del documento M100 (M2) de CLSI. La determinación de si el organismo es sensible (S) o resistente (R) a un agente se realiza mediante la comparación del tamaño de las zonas obtenidas con los tamaños enumerados en las tablas de valores críticos de EUCAST.

1.2 Fórmula

Por 1000 mL de agua destilada contiene: extracto de carne (2.0 g), peptona de caseína ácida (17.5 g), almidón (1.5 g), agar (17.5 g). pH final 7.3 +/- 0.1.

1.3 Preparación

Suspender 38 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y distribuirse en placas de Petri.

2.0 Antibiograma

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana.

2.1 Principio

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La

concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.

3.0 Procedimiento

3.1 Preparación del inóculo

3.1.1 Método del medio de cultivo líquido

Tomar de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo primario de 18 a 24 horas y sembrar en 5 mL de algún medio líquido (infusión cerebro corazón. Tripticasa de soja, etc.) e incubar a 35°C de 2 a 6 horas o hasta conseguir o superar una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland. Si la turbidez es superior ajustar con solución salina estéril.

3.1.2 Métodos de suspensión directa

A partir de la placa de cultivo primario tomar colonias de 18 a 24 horas y disolver en solución salina hasta ajustar la turbidez equivalente a la escala, homogenizando en un agitador Vórtex hasta disolver completamente la colonia.

3.2 Inoculación y colocación de discos

Realizar un estriado masivo en las placas de Mueller-Hinton y dejar secar de 3-5 minutos, después se den colocar los discos de antibióticos con unas pinzas estériles, asegurándose de que se adhieran completamente al agar y distribuirse de tal manera que no se genere una superposición en los halos de inhibición. Incubar a 37°C de 16 a 18 horas.

3.3 Interpretación de resultados

Se mide el diámetro del halo de inhibición que se genera alrededor del disco de antibiótico y se reporta como resistente, intermedio o sensible según sea la medida del diámetro. La interpretación del antibiograma establece la probabilidad de éxito o de fracaso terapéutico que se deriva de la utilización de los antimicrobianos frente a los microorganismos causantes de infección y estudiados en el antibiograma.

APÉNDICE F

MÉTODO DE HODGE MODIFICADO

1.0 Principio

Las *Enterobacteriaceae* que dan positivo a pruebas tamiz de detección de Carbapenemes o presentan resistencia a cefalosporinas y demás antibióticos de tercera generación se usa el test de Hodge modificado para confirmar la sospecha. Método que el CLSI recomienda como confirmatorio para la detección de Carbapenemasas.

Las Carbapenemasas representan la familia más versátil de betalactamasas, estas enzimas tienen la habilidad de hidrolizar carbapenemes y todos los betalactámicos de uso clínico. Las enzimas Carbapenemasas han sido detectadas tanto en plásmidos como en cromosomas. Estas Carbapenemasas se pueden difundir rápidamente debido a su localización en el plásmido, lo cual hace que el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos sea extremadamente difícil debido a su multirresistencia.

1.2 Procedimiento

- Preparar una suspensión de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 al 0,5 MacFarland y realizar una dilución 1:10 en solución salina o agua destilada.
- Extender el inóculo de la cepa ATCC sobre la superficie del agar Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones del CLSI para el método de difusión en disco.
- Colocar el disco de Ertapenem o Meropenem 10 µg en el centro de la placa.

- Tomar de 3 a 5 colonias de un cultivo fresco del microorganismo a probar y realice una estría desde el disco hacia la periferia, que pueden tener una profundidad de 20 a 25 mm.
- Incubación 35 +/- 2°C en aerobiosis por 16-20 horas.

1.3 Interpretación de resultados

El resultado es positivo cuando se genera un crecimiento de la cepa ATCC de *E. coli* en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa sospechosa formando una hendidura en la aproximación hacia el disco lo que confirma la liberación de carbapenemasas al medio y permiten el crecimiento de la cepa ATCC.

El resultado es negativo cuando solo hay crecimiento de la cepa problema y no se genera la hendidura.

APÉNDICE G

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Título de la investigación: Identificación fenotípica de *Escherichia coli* productora de carbapenemasas por método rapidec CARBA NP y test de Hodge modificado en aislamientos de muestras clínicas de la región de H. Caborca, Sonora.

Investigador principal: Q.B Rafael de la Rosa López, Universidad de Sonora Unidad Regional Norte, Campus Caborca.

Investigador secundario: Pasante Q.B.C Victor Montaña Olivas

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este consentimiento.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las infecciones de vías urinarias por enterobacterias (bacterias endémicas del intestino humano) son las más comunes de las infecciones bacterianas, las cuales son más frecuentes en mujeres debido a circunstancias anatómicas (cercanía con la zona rectal, tamaño de la uretra, etc.) y condiciones físicas (humedad, temperatura, etc.) que favorece su desarrollo, la bacteria más común encontrada en este padecimiento es *Escherichia coli* (principal miembro de las enterobacterias). Se vuelve un tema de importancia cuando esas bacterias presentan multirresistencia a los antibióticos, es decir, que los antibióticos de primera instancia ya no son eficaces para erradicar la infección, cuando esto sucede los médicos empiezan un tratamiento con antibióticos más fuertes lo que ocasiona que las bacterias generen enzimas como mecanismos de defensa, dichas enzimas destruyen los antibióticos al grado que los médicos se van

quedando sin opciones para eliminar la infección. En la investigación en la que participará (si usted lo desea) se determinará si las bacteria presente en la muestra son productoras de la enzima carbapenemasa, la cual se encarga de destruir los antibióticos carbapénemicos que son utilizados para tratar infecciones de las vías urinarias.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo determinar si la bacteria *Escherichia coli* produce la enzima carbapenemasa.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Los exámenes de laboratorio realizados serán sin costo para usted y los resultados obtenidos se los haremos llegar por medio de un reporte.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Si reúne las condiciones para participar en este protocolo y de aceptar participar se realizará el siguiente procedimiento:

1. Se le solicitará que responda un cuestionario para conocer sus antecedentes familiares y personales, hábitos alimentarios y otros datos de interés clínico.
2. Se le dará las indicaciones para la toma de muestra de orina.
3. Se le proporcionará un recipiente estéril y de plástico para la recolección de la muestra de orina (aprox. 50 mL).
4. Deberá llevarla inmediatamente al laboratorio de la unidad médica, si no pudiera llevarla la podrá conservar en refrigeración.
5. Se realizará el aislamiento de las bacterias, su identificación y se determinará si es productora de la enzima carbapenemasa.
6. Los resultados obtenidos se guardarán en una base de datos para la investigación y otra copia se le proporcionará a la persona participante.

RIESGOS ASOCIADOS AL ESTUDIO

Durante el procedimiento para obtener la muestra de orina no se corre ningún riesgo.

ACLARACIONES

1. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
2. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
3. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar las razones o no de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
4. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
5. No recibirá pago por su participación.
6. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, **será mantenida con estricta confidencialidad** por el grupo de investigadores.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

INDICACIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE ORINA

- Es conveniente que tome la muestra cuando NO este en tratamiento alguno con antibióticos.
- Tomar la muestra de la primera micción de la mañana de chorro medio.
- Debe lavarse las manos cuidadosamente, posteriormente realizar un lavado genital completo con agua y jabón de la siguiente manera:
 1. Sentarse de tal manera que quede lo más hacia atrás posible.
 2. Separe los labios genitales con una mano y mantenga los pliegues separados.
 3. Proceda a asearse toda la zona genital con jabón.
 4. Enjuagar con abundante agua.
 5. Secará con un paño limpio o gasas.
- Proceda a sacar el frasco de su empaque tratando de abrirlo solo al momento de la micción y sin tocar la parte interior del recipiente o de la tapa.
- Deseche la primera porción del chorro y deposite la parte intermedia directamente el frasco llenando hasta la mitad (aprox. 50 mL).
- Tape muy bien el frasco y llévelo de inmediato al laboratorio de la unidad médica.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Firma del participante: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante)

He explicado al Sr (a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador (o su representante): _____

Fecha: _____