

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA BIOLÓGICA**

**IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD
ANTIBIÓTICA DE ENTEROBACTERIAS, AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS DE
PACIENTES INTERNOS EN EL HOSPITAL REGIONAL DE OCCIDENTE
"SAN JUAN DE DIOS", QUETZALTENANGO**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

VELVET ANABELLA PÉREZ JUÁREZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

QUÍMICO BIÓLOGO

GUATEMALA, JULIO DE 2,003

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL**

DL
06
T(2127)

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jeannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Carlos Enrique Serrano	Vocal IV
Br. Claudia Lucía Roca Berreondo	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

- A Dios** Por permitirme llegar a este punto de mi vida, rodeado de mis seres queridos a quien en especial dedico este logro.
- A mis padres** Que con su sabiduría, cariño y comprensión supieron guiarme por el camino y me enseñaron a creer en un mundo diferente.
- A mis hermanos** Alejandra y Hugo por su apoyo incondicional y por entenderme en momentos difíciles.
- A mis tíos y primos** Porque como parte de mi familia me aconsejaron, me apoyaron y me guiaron en cualquier etapa de mi vida.
- A mi novio** Danny Del Cid, por ser una persona especial que me ha brindado amor y apoyo incondicional, en todos los momentos de mi vida, gracias por tu paciencia y por ayudarme a ser una mejor persona.
- A la Familia Del Cid Girón** Por todo el cariño y la ayuda que me han brindado
- A mis amigos** A todos ellos una dedicación especial por compartir conmigo todos estos años de estudio y porque se que en el camino nos volveremos a encontrar, en especial a Margareth Cuellar que me acompañó y supo ser un buen soporte en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Regional de
Occidente San Juan de Dios,
Quetzaltenango

Por brindarme las facilidades y
recursos para realizar mi tesis.

A mis Revisores

Lic. Martín Gil y Licda. Heidi
Logemann por su tiempo y
dedicación para mejorar mi
trabajo de tesis.

A la Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacia

Por proporcionarme los
conocimientos y los medios
para encontrarlos.

A la Universidad de San Carlos
de Guatemala

Por ser mi casa de estudios
durante toda mi carrera.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
III.	ANTECEDENTES	4
	A. Enterobacterias	4
	1. Características Generales	4
	2. Propiedades de las Enterobacterias	4
	a. Propiedades Bioquímicas	4
	b. Estructura antigénica	5
	c. Variaciones genotípicas	6
	3. Clasificación	7
	4. Acción Patógena	8
	a. Factores Determinantes	8
	b. Clasificación	10
	5. Métodos Generales de aislamiento e identificación	10
	a. Obtención y transporte de las muestras	10
	b. Aislamiento	11
	c. Identificación	13
	B. Mecanismos de Resistencia	24
	1. Mecanismos Genéticos de la Resistencia Microbiana	24
	2. Mecanismos Bioquímicos de la Resistencia Microbiana	26
	C. El laboratorio en la orientación del tratamiento antimicrobiano	32
	1. Prueba de susceptibilidad por difusión con discos	33
	a. Progresos iniciales	34
	b. Desarrollo de un procedimiento estandarizado de difusión	34
	c. Limitaciones	39
	D. Susceptibilidad a los patógenos nosocomiales	39
	1. Emergencia de las infecciones nosocomiales	40
	2. Prevención y control de las infecciones nosocomiales	41
IV.	JUSTIFICACIÓN	43
V.	OBJETIVOS	44
VI.	HIPÓTESIS	45
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
VIII.	RESULTADOS	49
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
X.	CONCLUSIONES	70
XI.	RECOMENDACIONES	72
XII.	REFERENCIAS	73
XIII.	ANEXOS	76

I. RESUMEN

La susceptibilidad de las bacterias en el transcurso de los años cambia por el uso o abuso de las terapias antimicrobianas y tomando en cuenta la relevancia que tiene la resistencia antimicrobiana a nivel mundial se realizó este estudio en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango. El presente es un análisis descriptivo, transversal en donde se tomaron 211 muestras de cultivo de los pacientes internos de este Hospital con el objetivo de identificar las cepas de Enterobacterias aisladas y determinar sus patrones de susceptibilidad antimicrobiana.

Los cultivos de los pacientes positivos a Enterobacterias de los distintos servicios del Hospital fueron sometidos pruebas de identificación y determinación de su patrón de susceptibilidad por el sistema semiautomatizado Microscan®, Merck. El resultado de la identificación se obtuvo en una hoja de papel impresa por la máquina, la cual contiene el nombre de la bacteria identificada, y los patrones de susceptibilidad hacia cada antibiótico, comparado con los parámetros de la NCCLS. Se utilizó un panel de 21 antibióticos en donde la mayoría están disponibles en el Hospital que incluyen a: amikacina, ampicilina sulbactam, ampicilina, cefalotina, cefazolina, cefepime, cefotaxima, cefotetan, cefpodoxime, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, ofloxacina, piperacilina tazobactam, piperacilina, ticarcilina-clavulanato, tobramicina y trimetoprim.

Los resultados se analizaron por medio del programa Whonet versión 5.1 que realiza un análisis de frecuencia para la descripción de la población. En este estudio se encontró que del total de Enterobacterias aisladas, el 67% corresponden a *Escherichia coli* (44.1%), seguida de *Enterobacter cloacae* (12.3%) y *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae* (10.4%). Con respecto al origen de la muestra, los aislamientos más frecuentes fueron en heridas (38%), seguido por cultivos de orina (20%), sangre (10%) y catéter (9%).

En todas las muestras la Enterobacteria aislada en mayor porcentaje fue *Escherichia coli*. En los servicios de Medicina Interna, Cuidados Intensivos y Cirugía fueron en los que se obtuvo los porcentajes más altos de aislamiento de Enterobacterias 43%, 16% y 14% respectivamente.

Independientemente del origen de la muestra, se encontró un porcentaje alto de resistencia de las Enterobacterias hacia la ampicilina cefalotina y cefazolina y menor resistencia a imipenen, amikacina, cefepime y piperacilina-tazobactam.

Se observó una resistencia considerable, tanto de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. a ceftazidima y ceftriaxona, lo que refleja la posible producción de B-lactamasas de espectro ampliado, otro aspecto importante fue que en la mayoría de aislamientos, el porcentaje de no susceptibilidad fue evidentemente más alto que el porcentaje de resistencia, lo que debe alertar sobre un aumento progresivo de la resistencia antibiótica.

Los estudios de susceptibilidad antibiótica como el presente, permiten la elaboración de políticas para el uso adecuado y racional de los antibióticos, cuyo objetivo primordial sería disminuir la selección de cepas resistentes y multirresistentes, para, consecuentemente, evitar que aumente la resistencia antibacteriana.

II. INTRODUCCIÓN

Hace años se tenía la idea de que la susceptibilidad antimicrobiana era algo predecible y que la gran mayoría de aislamientos se podrían manejar sin realizar una prueba de susceptibilidad, ya que los antibióticos tenían una adecuada acción contra la gran mayoría de los agentes bacterianos aislados, tanto en los hospitales como en la comunidad. Ahora sabemos que esto no es correcto y que al contrario se tienen serios problemas con el alto grado de resistencia de algunas de las cepas bacterianas aisladas con frecuencia y, más aún, microorganismos que en el pasado presentaban una alta susceptibilidad, presentan en la actualidad altos niveles de resistencia; tal es el caso de las Enterobacterias cuyas cepas se han visto involucradas como causa de infecciones nosocomiales, observándose el surgimiento de cepas multirresistentes de los mismos.

En los tiempos actuales, se requiere una estricta vigilancia del comportamiento de los aislamientos bacterianos, con la finalidad de poner en evidencia los cambios que se puedan presentar en este campo y tomar las medidas correctivas necesarias.

Tomando en cuenta todos estos factores y la relevancia que tiene la resistencia antimicrobiana a nivel mundial, se realizó este estudio con el propósito de tener la identificación y el patrón de resistencia de las Enterobacterias de los pacientes recluidos en el Hospital Regional de Occidente *San Juan de Dios*, Quetzaltenango, el cual se realizó por medio de un sistema semiautomatizado y, de esta forma, contribuir a dirigir mejor la terapéutica y sugerir nuevas conductas.

III. ANTECEDENTES

A. Enterobacterias

1. Características generales

Las Enterobacterias constituyen una amplia familia de bacilos Gram negativo, aerobios y anaerobios facultativos, relacionados por sus propiedades bioquímicas y genómicas, algunos de cuyos componentes son huéspedes habituales del tubo digestivo del hombre y de los animales (1).

Se caracterizan por ser poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a la acción de los agentes externos por cuyo motivo se encuentran muy difundidos. Aunque cierto número se comportan como saprofitos del medio ambiente (agua, suelo, plantas), en su mayoría se encuentran asociadas con el hombre o los animales y constituyen la mayor parte de la microbiota aerobia gramnegativa que coloniza el tubo digestivo, pero, además, en ocasiones pueden intervenir en procesos patógenos intra o extraintestinales (2).

En relación con su acción patógena puede distinguirse un grupo reducido de especies que se consideran patógenos estrictos (capaces de producir cuadros patológicos en huéspedes normales). de la gran mayoría que se comportan como patógenos potenciales (capaces de expresar su acción patógena sólo cuando las condiciones ecológicas del huésped se encuentran modificadas), lo que hace que las Enterobacterias se encuentren en el origen de gran número de infecciones oportunistas y junto con los bacilos Gram negativo no fermentadores, constituyan la causa más importante de infecciones hospitalarias (1, 2).

2. Propiedades de las Enterobacterias

La clasificación de las Enterobacterias se efectúa sobre la base de sus propiedades bioquímicas y antigénicas.

a. Propiedades bioquímicas

Las Enterobacterias se definen como bacilos Gram negativo aerobios y anaerobios facultativos de 2-4 μm de longitud por 0.4-0.6 μm de anchura, con extremidades redondeadas, pueden ser móviles por flagelación peritrica, o

inmóviles; no producen oxidasas, pero reducen los nitratos y descomponen la glucosa por fermentación.

Estos caracteres permiten separarlos de otras familias de bacilos Gram negativo, en especial de la familia *Vibrionaceae* (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*), bacilos curvos con flagelación polar, aerobios y anaerobios facultativos, que son oxidasa-positivos y descomponen la glucosa por fermentación, y de la familia *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*), constituida por bacilos móviles con un flagelo polar, aerobios estrictos, que son oxidasa-positivos y atacan la glucosa por oxidación (1, 3).

Las Enterobacterias presentan, además una gran variedad de propiedades bioquímicas o metabólicas, pues son capaces de fermentar diversos azúcares y alcoholes, utilizar diversas vías metabólicas con formación de ácidos, a veces, gas, descomponer diferentes sustratos (ácidos orgánicos, sustancias nitrogenadas) y aún producir gran variedad de fermentos (ureasas, descarboxilasas, desaminasas, dihidrolasas) y productos finales (indol, SH_2), por los que se pueden reconocer y diferenciar. La determinación de estas propiedades mediante pruebas bioquímicas constituye la base de la clasificación de las Enterobacterias en géneros y especies (2).

b. Estructura antigénica

Las Enterobacterias pueden presentar diversos antígenos

i. Antígeno somático o antígeno O:

La pared celular esta constituida por una fina capa de peptidoglicano, recubierta por la membrana externa compuesta de lipopolisacárido, que a su vez se divide en tres fracciones.

La fracción interna o lípido A corresponde a la endotoxina, mientras que las otras dos fracciones se identifican con el Antígeno O termoestable: una fracción central compuesta por oligosacáridos y KDO (ácido ketodesoximanulosoctónico), que, al ser común a la mayoría de bacilos Gram negativo explica la existencia de reacciones cruzadas, y una fracción externa constituida por cadenas terminales de oligosacáridos que son variables y responsables de



la especificidad, de manera que, atendiendo al antígeno O, las diversas especies de Enterobacterias se pueden dividir en grupos O, algunos de los cuales se encuentran asociados con cuadros clínicos (1).

ii. Antígeno capsular o antígeno K.

Algunas especies pueden presentar antígenos superficiales o antígenos K, de naturaleza polisacárida, ya en forma de cápsulas bien definidas (*E. coli*, *Klebsiella sp.*) o de una fina capa mucosa (antígeno M o mucoide de *Salmonella*, antígeno Vi de *S. typhi*), que recubren el antígeno O y son responsables de la O-inaglutinabilidad. Intervienen en la acción patógena por sus propiedades antifagocitarias (2,4).

iii. Antígeno flagelar o antígeno H.

Las cepas móviles presentan antígenos flagelados protéicos y termolábiles, de importancia en la clasificación en serotipos (1).

iv. Antígeno de las fimbrias o antígeno F.

Las cepas fimbriadas presentan antígenos proteicos relacionados con la capacidad de adherencia en las células epiteliales. Serológicamente son heterogéneos y permiten dividir las cepas en serotipos F (1).

c. Variaciones genotípicas

En las Enterobacterias es relativamente frecuente la aparición de variaciones genotípicas por mutación o mecanismos de transferencia genética que pueden afectar tanto la constitución antigénica como los caracteres bioquímicos (1).

Se pueden presentar variaciones antigénicas por mutación que pueden afectar cualquiera de los antígenos, como la pérdida de la fracción terminal del polisacárido, que confiere la especialidad al antígeno O (variación lisa a rugosa), pérdida del antígeno H (variación OH a O) o variación de fase (fase 1 a fase 2), pérdida del antígeno Vi (variación V a W) y aun cambios de serotipo por la aparición de nuevos antígenos como consecuencia de fenómenos de conversión lisogénica o de transferencia genética, cromosómica o plasmídica (1,4).

También se pueden producir variaciones en las propiedades bioquímicas, como en la capacidad de fermentar un determinado azúcar, sintetizar un exofermento y producir exotoxinas, y en la susceptibilidad o resistencia a los antibióticos (1).

Estos fenómenos de variación son importantes, pues permiten explicar por un lado, las dificultades que existen en la clasificación de las Enterobacterias, ya que los géneros son difíciles de delimitar por la existencia de cepas que presentan caracteres atípicos e intermedios, y, por otro, sus amplias posibilidades patógenas con la aparición frecuente de cepas resistentes y multiresistentes a los antibióticos, que se producen en la mayoría de los casos por transferencia plasmídica (factor R), de manera que en el curso del tratamiento por antibióticos se seleccionan cepas resistentes de otras bacterias, que pueden colonizar la mucosa intestinal y transferir los factores de resistencia a Enterobacterias oportunistas, creando el problema de las infecciones hospitalarias por bacterias Gram negativo (1,4).

3. Clasificación

La clasificación de las Enterobacterias se efectúa fundamentalmente por sus propiedades bioquímicas. Mediante el empleo de gran número de pruebas bioquímicas y con la ayuda de los métodos de hibridación y homología del ADN se han podido caracterizar con mayor precisión algunos géneros y especies y aun describir otros nuevos, que han conferido a la clasificación una gran complejidad (1,6).

En la última edición del Manual de Bergey tomando como base estos estudios bioquímicos y genómicos, se presenta una clasificación actualizada de la familia *Enterobacteriaceae* en más de 20 géneros y cerca de 100 especies, que en su mayoría tienen interés médico (1).

Tradicionalmente, y según su capacidad de fermentar la lactosa, las Enterobacterias se han dividido en tres grandes grupos (fermentadores rápidos, fermentadores lentos y no fermentadores) que se han considerado de interés para la clasificación y especialmente por su relación con la acción patógena, pues la

mayoría de Enterobacterias patógenas se incluyen en el grupo de los no fermentadores (*Salmonella*, *Shigella*) (4).

Aunque en la actualidad esta clasificación ha perdido gran parte de su valor, pues se ha observado que las Enterobacterias patógenas también pueden encontrarse entre los fermentadores rápidos (*E. coli* productores de diarrea) o lentos (*Yersinia*) y, por otra parte, no se acepta que la fermentación de la lactosa tenga un valor taxonómico absoluto por la existencia de numerosas excepciones; sin embargo, presenta un indudable interés práctico si se tiene en cuenta que para el aislamiento de las Enterobacterias se utilizan diversos medios de cultivo con la lactosa como azúcar diferencial, lo que constituye la etapa inicial para su identificación (4).

Para la clasificación de las Enterobacterias en géneros y especies se utilizan un conjunto de más de 40 reacciones bioquímicas que constituyen el cometido de laboratorios especializado. A pesar de ello, en la mayoría de laboratorios clínicos se utiliza para el diagnóstico de rutina el estudio de un reducido número de caracteres que permiten llegar a una clasificación presuntiva de los géneros y principales especies, incluidas las atipias más importantes (5).

Pero, además, las especies se pueden clasificar según sus propiedades antigénicas. Atendiendo al antígeno O se pueden dividir en grupos O y por sus antígenos K o H, en serotipos o serovars O:H u O:K:H. Por otra parte, según la capacidad de las especies y serotipos de fermentar determinados azúcares y su sensibilidad a un grupo de fagos seleccionados o de bacteriocinas, pueden subdividirse en biotipos o biovars, fagotipos o fagovars y bacteriocinotipos o bacteriocinovars, de gran interés epidemiológico. Asimismo, el empleo de enzimas de restricción para demostrar la identidad del material genético extracromosómico complementa las subdivisiones intraespecíficas al confirmar la homogeneidad de las cepas aisladas en los brotes epidémicos (5).

4. Acción Patógena

a. Factores Determinantes

La acción patógena de las Enterobacterias es debida a factores diversos:

i. Antígenos estructurales de superficie:

El lipopolisacárido y proteínas de algunos serogrupos (antígenos O), los antígenos capsulares (antígenos K) y las fimbrias (antígenos F) actúan por sus propiedades antifagocitarias, o de seroresistencia o su capacidad de adherencia. Las Enterobacterias pueden presentar fimbrias relacionadas con la adherencia a los receptores de las células epiteliales de la mucosa. Hay que señalar las fimbrias MS o de tipo 1 de muchas Enterobacterias, las fimbrias MR de *E. coli* enterotoxígenos de los animales (K88, K99) y del hombre (CFAI, CFAII, E8775), las fimbrias P de los *E. coli* uropatógenos, etc. También algunas Enterobacterias pueden desarrollar glicocálix que les permiten adherirse a materiales inertes (catéteres, prótesis) y expresar su acción patógena (1).

ii. Bacteriocinas

Las cepas de algunas especies de Enterobacterias (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*) pueden producir bacteriocinas (colicinas, klebocinas, marcesinas), proteínas que presentan propiedades tóxicas frente a cepas de la misma especie o de especies relacionadas. Permiten la clasificación en tipos (bacteriocinotipos) e intervienen facilitando la colonización de las mucosas, al inhibir el desarrollo de especies relacionadas (1).

iii. Endotoxina

La endotoxina ligada al lípido A es responsable de la producción de fiebre y alteraciones vasculares ya por su acción directa o por el mecanismo de las reacciones de hipersensibilidad no específica (1).

iv. Enterotoxinas

Algunas cepas producen enterotoxinas que actúan ya sea por acción tóxica directa sobre las células del epitelio intestinal o del endotelio vascular (enterotoxinas citotóxicas) o produciendo un estímulo funcional, generalmente a través del fermento adenilciclase (enterotoxinas citotónicas) o produciendo un estímulo funcional, generalmente a través del fermento adenilciclase (enterotoxinas citotónicas). Las enterotoxinas mejor conocidas son las de *E. coli*, pero también se han señalado en otras Enterobacterias (*Salmonella*, *Shigella*, etc.) (1,3).

b. Clasificación

Atendiendo a su acción patógena, las Enterobacterias se pueden dividir en dos grandes grupos (1).

i. Enterobacterias patógenas (*E. coli* productores de diarrea, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*)

Son bacterias que por lo general no forman parte de la microbiota intestinal, pero que pueden dar lugar a procesos diversos en huéspedes normales, en su mayoría en el tubo digestivo (enteritis). Se caracterizan por su susceptibilidad a gran número de antibióticos que no siempre es necesario administrar para la curación del proceso (1,2).

ii. Enterobacterias oportunistas (*E.coli*, *Klebsiella-Enterobacter*, *Serratia-Hafnia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Morganella-Providencia*)

Son microorganismos que forman parte de la microbiota comensal del tubo digestivo o que se encuentran como saprofitos en el medio externo que normalmente no se comportan como patógenos, pero, cuando se presentan factores predisponentes, pueden dar lugar a cuadros clínicos diversos por lo general fuera del aparato digestivo (infecciones urinarias, supuraciones de diversa localización y sepsis). En su mayoría son cepas resistentes o multiresistentes a los antibióticos, que generalmente es necesario administrar para la curación del proceso. Los nuevos géneros *Cedecea*, *Tatumella*, *Kluyvera*, *Rahnella* y *Ewingella* de origen ambiental se consideran probables oportunistas. También se han aislado ocasionalmente del hombre otros géneros de origen telúrico o animal sin que se hayan podido relacionar con procesos patógenos (*Buttiauxella*, *Moellerella*, *Obesumbacterium*, *Xenorhabdus*, *Budvicia*, *Koserella* y *Leminorella*), por lo que su interés en microbiología clínica es muy limitado (1,2).

5. Métodos generales de aislamiento e identificación

a. Obtención y transporte de las muestras

Las muestras deben ser recientes y representativas y obtenerse en condiciones asépticas y, a ser posible, antes de la administración de antimicrobianos.

Las heces (enteritis) deben obtenerse durante los primeros días de la enfermedad, cuando los patógenos se encuentran en mayor proporción. Una muestra directa es más representativa y permite, además, seleccionar las zonas patológicas (moco o pus), pero también se pueden utilizar hisopos rectales. La orina debe obtenerse del chorro medio en recipiente estéril y la sangre durante los periodos febriles (hemocultivos). El pus y exudados son más representativos si se recogen en cantidad por aspiración con jeringa, pues, además permiten la conservación de los anaerobios que se encuentran a menudo en el producto (1,6).

Si las muestras no se transportan y procesan rápidamente, deben utilizarse medios de transporte adecuados y conservarse en la nevera, para que se mantenga la viabilidad de los microorganismos y sus propiedades relativas (1).

b. Aislamiento

i. Medios de Cultivo

El aislamiento de Enterobacterias de los productos patológicos se facilita por el empleo de medios de enriquecimiento y de aislamiento, que se distinguen por su estado físico y su capacidad diferencial e inhibidora de la microbiota no patógena (4).

ii. Medios de Enriquecimiento

Son medios líquidos que permiten el desarrollo de las Enterobacterias patógenas de las heces, especialmente *Salmonella* y contienen sustancias inhibidoras de la microbiota grampositiva y gramnegativa comensal. Los más utilizados son el caldo de tetrionato con bilis y verde brillante de Muller y Kauffman para el aislamiento de *Salmonella* (a excepción de *S. typhi*) y el caldo de selenito F de Leifson para *Salmonella* y algunas especies de *Shigella* (2,4).

iii. Medios de aislamiento en placa

Son medios sólidos que se distinguen por su capacidad diferencial y selectiva de la microbiota patógena. Se pueden dividir en:

Medios ordinarios

Son los medios que no tienen carácter diferencial ni selectivo, como el agar común y el agar sangre (2).

Medios diferenciales

Son medios que permiten distinguir las colonias de las bacterias fermentadoras de la lactosa. Como las colonias de Enterobacterias presentan caracteres microscópicos semejantes, puede establecerse una primera diferenciación sembrando el producto patológico en un medio sólido que contenga lactosa y un indicador de pH que permita diferenciar por el color las colonias fermentadoras rápidas de la lactosa (agar-lactosa con azul de bromotimol o rojo fenol) (2).

Medios diferenciales y selectivos

A diferencia de los anteriores, estos contienen además, sustancias inhibitoras de la microbiota grampositiva y a veces de la coliforme. Según su grado de selectividad pueden ser:

- Pocos selectivos, cuando permiten el crecimiento de todas las Enterobacterias como el medio EMB (eosina-azul de metileno) y MacConkey (sales biliares y cristal violeta).
- Moderadamente selectivos, cuando además inhiben en parte la microbiota coliforme, como el medio SS (*Salmonella-Shigella*), desoxicolato-citrato o desoxicolato-xilosa-lisina.
- Muy selectivos, como el medio de Wilson-Blair (agar sulfito de bismuto) y el agar verde brillante, que se emplean para el aislamiento de *Salmonella* (1).

iv. Método

El aislamiento a partir de las heces se efectúa sembrando la muestra en medios líquidos de enriquecimiento y en medios diferenciales en placa, poco selectivos y moderadamente selectivos. A las 18 horas, a partir de los medios de enriquecimiento, se siembran nuevos medios selectivos. A partir de otros productos (orina, pus, exudados) se siembra directamente la muestra en agar sangre y en medios diferenciales poco selectivos (1,2).

El desarrollo en los medios diferenciales permite distinguir por el color las colonias, las Enterobacterias fermentadoras rápidas de la lactosa de las no

fermentadoras y fermentadoras lentas, donde se encuentran la mayoría de especies patógenas (*Salmonella*, *Shigella*) (1).

c. Identificación

La identificación presuntiva de los géneros y especies más importantes se efectúa sobre la base del conocimiento de una serie de propiedades bioquímicas, cuya determinación se facilita por el uso de un grupo reducido de medios combinados que permiten obtener varias respuestas (medio de TSI, LIA, Urea, Citrato), y aun de sistemas de identificación comerciales (API 20E, Minitek, etc) (1,4).

En general, la marcha de identificación presuntiva se efectúa de la siguiente manera:

i. Selección de medios de aislamiento primario

Deben usarse medios de cultivo selectivos para recuperar las especies de bacterias importantes de las muestras que pueden alojar una mezcla de microorganismos. Para hacer racional las selecciones, los microbiólogos deben conocer la composición de cada fórmula y el propósito y la concentración relativa de cada químico o compuesto que se incluye. Por ejemplo, no es suficiente con saber que se incluyen sales biliares en las fórmulas de varios medios selectivos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivo y de algunas especies bacterianas gramnegativa más exigentes; así, el agar SS contiene alrededor de cinco veces la concentración de sales biliares del agar MacConkey, inhibe más eficientemente a *E.coli*, más selectivo para la recuperación de especies de *Salmonella* de cultivos de materia fecal (1,2,4).

Se dispone de tres tipos generales de medio para la recuperación de *Enterobacteriaceae* de muestras clínicas que potencialmente alojan bacterias mixtas: 1) medio no selectivo para aislamiento primario (p. ej., agar sangre); 2) agar selectivo y diferencial (p.ej. agar MacConkey) y 3) caldos de enriquecimiento (1,2,4).



Medios de Aislamiento Selectivos

En 1,905 MacConkey describió por primera vez un medio selectivo diferencial (agar rojo neutro-sales biliares) que él uso para aislar bacilos entéricos de muestras que contenían mezclas de especies bacterianas. Incorporó lactosa y el indicador rojo neutro en el medio para proveer un medio visual para detectar la utilización de lactosa por el organismo prueba. En ese momento, a todos los bacilos Gram negativo no formadores de esporas, se los denominaba aún bacilos entéricos; sin embargo, los microbiólogos habían reconocido que ciertas especies eran más patógenas para los humanos que otras. El patrón de utilización de hidratos de carbono de varias especies de bacterias ya era conocido a fines del siglo y la fermentación de la lactosa, en particular, fue reconocida como un importante marcador para diferenciar ciertos patógenos entéricos. En 1,916, Holt-Harris y Teague describieron un medio con eosina y azul de metileno como indicadores para diferenciar entre las colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Se incluyó sacarosa en el medio para detectar aquellos miembros del grupo coliforme que fermentan la sacarosa más rápidamente que la lactosa (1).

Los agares MacConkey y EMB son solamente moderadamente inhibitorios y fueron diseñados en principio para evitar el crecimiento de bacterias Gram positivo a partir de cultivos mixtos. Muchas especies de microorganismos Gram negativo exigentes son inhibidas del mismo modo; sin embargo, todas las *Enterobacteriaceae* crecen bien (1).

La decisión de usar agar MacConkey o EMB es ante todo una cuestión de preferencia personal, dado que las especies bacterianas que utilizan lactosa pueden ser diferenciadas por ambos. El agar Mac Conkey contiene rojo neutro como indicador de pH y como resultado, las colonias que metabolizan la lactosa aparecen rosadas a partir de la producción de ácidos mixtos. Las bacterias que son fuertes productoras de ácido, como *E. coli*, forman colonias rojo oscuro. Las bacterias productoras de bajas cantidades de ácido forman colonias rosado pálido o colonias que son claras en la periferia y tienen centros rosados. Sobre agar EMB, las bacterias que son fuertes productoras de ácido forman colonias con brillo metálico. La apariencia brillante es causada por la precipitación del colorante sobre las colonias, y es altamente indicativa de *E. coli*, aunque otros

fuertes productores de ácido, como *Yersinia enterocolitica*, pueden tener apariencia similar (1).

Medios de aislamiento altamente selectivos usados principalmente para muestras gastrointestinales

Los medios se hacen altamente selectivos mediante el agregado de una variedad de inhibidores a sus fórmulas, generalmente en concentraciones más altas que en agar MacConkey o EMB. Estos medios son usados primariamente para inhibir el crecimiento de *E. coli* y otros coliformes, pero permiten el crecimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella* a partir de muestras de materia fecal.

Los medios más comúnmente utilizados en laboratorios clínicos son el agar *Salmonella-Shigella* (SS), el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) y el agar Hektoen entérico (1,2).

La decisión respecto de cuál de estos medios usar para la recuperación de patógenos entéricos de muestras fecales depende de la preferencia personal y de las especies que van a ser seleccionadas. En general, estos medios se emplean en el laboratorio clínico para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras de materia fecal diarreica, o en laboratorios de salud pública para investigar una posible contaminación fecal de suministros de agua y de comida. Virtualmente, todas las especies crecen bien en presencia de sales biliares, lo cual explica por qué la vesícula biliar a menudo sirve como reservorio en los seres humanos portadores. Se agregan sales biliares al medio selectivo debido a que otras especies de bacilos entéricos, incluidas algunas de las cepas de *Shigella* más exigentes, crecen poco o no crecen. El agar SS y el HE contienen concentraciones relativamente altas de sales biliares y están bien adaptados para la recuperación de especies de *Salmonella* de muestras muy contaminadas con otros bacilos coliformes. Sin embargo, a causa de su efecto inhibitor sobre la recuperación de ciertas especies de *Shigella*, no se recomienda el uso de rutina de agar SS como único medio selectivo para el aislamiento de patógenos entéricos de muestras de materia fecal (1,4).

El agar XLD contiene lactosa, sacarosa y xilosa, por lo tanto, los microorganismos que fermentan estos hidratos de carbono forman colonias amarillas. Las bacterias incapaces de fermentar estos hidratos de carbono no producen ácido y forman colonias sin color. Los microorganismos que producen sulfuro de hidrógeno forman pigmento negro que comienza desde el centro de la colonia. El agar XLD también contiene lisina. Esto es importante porque muchas especies de *Salmonella* fermentan la xilosa, y, por lo tanto, inicialmente producen colonias amarillas en XLD, pero dado que estas especies contienen lisina descarboxilasa, las colonias revierten a rosado después de que se utiliza una pequeña cantidad de xilosa del medio. La lactosa y la sacarosa agregadas en exceso, previenen que los coliformes lisina positivos reviertan de manera similar. Dado que la descarboxilación de la lisina resulta en la formación de aminas fuertemente alcalinas, puede aparecer un halo rosado claro alrededor de las colonias en el agar XLD. Las colonias negras sin halo rosado son más sugestivas de cepas productoras de sulfuro de hidrógeno de especies de *Proteus* (1).

Los hidratos de carbono del agar HE, son lactosa, sacarosa y salicina. Los microorganismos capaces de fermentar estos hidratos de carbono también forman colonias amarillas; las cepas asacarolíticas producen colonias traslúcidas o verde claro. Las bacterias lactosa y sacarosa negativas que acidifican la salicina pueden producir colonias anaranjadas. El agar HE también contiene sales de hierro; por lo tanto, las colonias productoras de sulfuro de hidrógeno aparecen negras (1).

El agar sulfito de bismuto y el verde brillante son altamente selectivos y no se emplean con frecuencia en los laboratorios clínicos; son difíciles de preparar y su vida de almacenamiento es muy corta (48 a 72 horas). Estos medios han sido diseñados en forma específica para recuperar *Salmonella typhi* de muestras fecales y se usan particularmente cuando se investigan numerosos pacientes en áreas endémicas o durante una epidemia. Las especies de *Salmonella* (*S. typhi* en particular) pueden sospecharse en estos medios dada la propensión para producir colonias con brillo negro (1).

Medios de enriquecimiento

Como el nombre lo indica, un medio de enriquecimiento se usa para resaltar el crecimiento de ciertas especies bacterianas al mismo tiempo que inhibe el desarrollo de microorganismos no deseados. Los medios de enriquecimiento son los que más se emplean en los laboratorios clínicos para la recuperación de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras fecales. Los caldos de enriquecimiento son particularmente útiles para la recuperación de microorganismos de materia fecal a partir de portadores de *Salmonella* y de pacientes con infecciones leves por *Shigella*, en los cuales el número de microorganismos puede estar por debajo de 200/g de heces. (*E. coli* y otros bacilos entéricos pueden llegar a concentraciones masivas tan altas como 10^9 /g de heces) (1,6).

El medio de enriquecimiento trabaja sobre el principio de que *E. coli* y otros microorganismos Gram negativo, los cuales constituyen la flora fecal normal, se mantienen en una fase de retardo prolongada por los inhibidores químicos presentes en el caldo. Las especies de *Salmonella* y *Shigella* se inhiben mucho menos, entran en una fase exponencial de crecimiento, y son recuperadas mucho más rápido de muestras de materia fecal. Sin embargo, después de varias horas, el medio de enriquecimientos deja de suprimir el crecimiento de *E. coli* y otros microorganismos entéricos, los cuales, en última instancia, sobrecrecen en el cultivo. Por lo tanto, para la recuperación de máxima de especies de *Salmonella* y *Shigella* de muestras fecales, se recomienda que el caldo de enriquecimiento se subcultive dentro de las 8 horas.

Los dos medios de enriquecimiento más comunes son el caldo selenito y el caldo Gram negativo (GN). El caldo selenito es más inhibitor para el crecimiento de *E. coli* y otros bacilos entéricos Gram negativos que el caldo GN. Por lo que, el caldo selenito está mejor adaptado para la recuperación de *Salmonella* y *Shigella* de muestras muy contaminadas como heces y aguas servidas. Sin embargo, el caldo GN se usa con gran frecuencia en el laboratorio clínico porque es menos inhibitor para el crecimiento de muchas de las cepas más exigentes de especies de *Salmonella*. El enriquecimiento de muestras fecales en caldo GN durante 4 a 6 horas y el subcultivo posterior a agar HE o

XLD es la técnica óptima de recuperación de especies de *Shigella* en casos en los que se sospecha disentería bacilar (1,6).

ii. Características Diferenciales de Identificación

Aunque la identificación preliminar de Enterobacteriaceae se basa posiblemente en las características de las colonias y las reacciones bioquímicas en medios de aislamiento primarios; otras técnicas de identificación de especies requieren la determinación de características fenotípicas adicionales que reflejan el código genético y la identidad única de los microorganismos que se prueban. Esta discusión tiene por propósito de revisar los hechos sobresalientes de las pruebas que miden estas características fenotípicas y que son usadas comúnmente en laboratorios clínicos. Esta orientación es necesaria para que el personal del laboratorio pueda comprender los principios que se encuentran detrás de estos procedimientos con el fin de reconocer y corregir cualquier inconsistencia bioquímica, problemas con cultivos mixtos y fallas en las técnicas. No es posible comentar la variedad de diferentes pruebas y numerosos esquemas disponibles para la identificación final de especies de Enterobacteriaceae (4).

Producción de Indol

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa pueden clivar el triptófano, y de este modo producir indol, ácido pirúvico y amonio. El indol puede detectarse en un medio triptófano de prueba mediante la observación del desarrollo de color rojo después de agregar una solución que contiene p-dimetilaminobenzaldehído.

La elección entre los reactivos de Ehrlich o Kovacs depende de la preferencia personal. El reactivo de Ehrlich es más sensible y se prefiere cuando se prueban bacilos no fermentadores o anaerobios en los cuales la producción de indol es mínima. Dado que el indol es soluble en compuestos orgánicos, debería agregarse xileno o cloroformo al medio de prueba antes del reactivo de Ehrlich. Este paso de extracción es menos crítico en el caso de reactivo de Kovacs porque se usa alcohol amílico para diluir (con el reactivo de Ehrlich se usa alcohol etílico) (1,2, 7).

Prueba del Rojo de Metilo

La prueba del rojo de metilo proporciona características valiosas para la identificación de especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de la glucosa. La prueba requiere de 48 a 72 horas de incubación antes de que pueda obtenerse un resultado válido, una cantidad de tiempo inaceptable para la mayoría de los laboratorios de microbiología, Barry y col. Describieron una modificación que puede leerse entre las 18 a 24 horas. Se emplea una alícuota de caldo de 0.5 ml con un inóculo relativamente cargado para probar el microorganismo. Después de este período de incubación a 35° C se agregan 1 o 2 gotas de reactivo rojo de metilo, el desarrollo de color rojo indica una prueba positiva. La modificación de Barry es tan certera como la prueba originalmente descrita y ahorra una cantidad significativa de tiempo (1,7).

Prueba de Voges-Proskauer

Esta prueba se basa en la conversión de acetyl-methyl-carbinol (acetoína) en diacetilo, a través de la acción del hidróxido de potasio y el oxígeno atmosférico. El diacetilo se convierte en un complejo rojo bajo la acción catalítica del alfa-naftol y la creatinina.

La formación de acetoína y butilenglicol es un camino alternativo para el metabolismo del ácido pirúvico. Las bacterias que usan este camino, como ciertas cepas dentro del grupo de *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia*, producen sólo pequeñas cantidad de ácidos mixtos, que pueden ser insuficientes para disminuir el pH del medio rojo de metilo, lo suficiente para producir un cambio de color. En consecuencia, la mayoría de las especies de *Enterobacteriaceae* Voges-Proskauer positivas, con raras excepciones, son rojo de metilo negativas y viceversa (1).

Utilización del Citrato

El principio de utilización del citrato es determinar la capacidad de un microorganismo para usar citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento (1,8).



El procedimiento para realizar esta prueba con el agar citrato de Simmons es el siguiente: Se estría un inóculo liviano de una colonia de crecimiento del microorganismo prueba sobre la superficie oblicua del agar. Si el inóculo es muy cargado, los compuestos orgánicos preformados dentro de las paredes celulares de bacterias moribundas pueden liberar suficiente carbono y nitrógeno para producir una prueba con resultado falso positivo. Cuando se inocula una serie de tubos de medio de cultivo diferencial con un microorganismo desconocido, es importante que el medio citrato sea estriado primero para prevenir el arrastre de proteínas o hidratos de carbono de otro medio (8,9).

La producción de color azul en el medio de prueba de 24 horas de incubación a 35°C indica la presencia de productos alcalinos y un resultado positivo de la prueba de utilización del citrato. Si se utiliza el carbón a partir del citrato de sodio, el nitrógeno se extrae del fosfato de amonio contenido en el medio, con lo cual se libera amonio. En ocasiones se detecta un crecimiento visible a lo largo de la estría antes de la conversión del medio al color azul. El crecimiento visible también indica una prueba de resultado positivo. El malonato, el acetato y el mucato son otros radicales aniónicos comúnmente empleados para determinar la capacidad de las bacterias para usar estos compuestos simples como única fuente de carbono (9).

El acrónimo IMVIC (indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato) era utilizado por los sanitarios y epidemiólogos para referirse a las pruebas necesarias para detectar contaminación fecal en el agua y la comida. *Escherichia coli* se ha usado durante muchos años como indicador de contaminación fecal. *Enterobacter aerogenes* produce colonias en medio de aislamiento primario que, a menudo, no pueden ser distinguidas de las de *Escherichia coli*. Sin embargo, la recuperación de *E. aerogenes*, a partir de la comida y el agua potable no necesariamente indica contaminación fecal, porque el microorganismo está ampliamente distribuido en el suelo, los pastos y el material vegetal. Por lo tanto, se necesita un conjunto de características bioquímicas para diferenciar los dos microorganismos. Las pruebas IMVIC fueron adoptadas para servir a este propósito. La mayoría de las cepas de *E. coli* son indol y rojo de metilo positivas y Voges-Proskauer-citrato negativas. *E.*

aerogenes típicamente produce reacciones opuestas. Aunque las características individuales incluidas en la batería IMVIC aún se emplean para la identificación bacteriana, con poca frecuencia se las utiliza como un conjunto de pruebas específicas (1,7).

Producción de ureasa

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea, con lo cual se libera amonio y se produce un cambio de color rosado-rojo en el medio.

Debe descartarse las diferencias importantes entre el caldo urea de Stuart y el agar urea de Christensen. El caldo urea de Stuart es fuertemente tamponado con sales de fosfato a un pH 6.8. El microorganismo prueba debe formar cantidades importantes de amonio antes de que el sistema tampón sea vencido y el pH del medio se eleve por encima de 8 para producir un cambio de color en el indicador. El caldo de Stuart, por lo tanto, es virtualmente selectivo para especies de *Proteus*.

El agar urea de Christensen es menos tamponado que el caldo urea de Stuart y contiene peptonas y glucosa. Este medio enriquecido soporta el crecimiento de muchas especies de bacterias que no pueden crecer en caldo de Stuart y la capacidad tampón disminuida permite la detección de pequeñas cantidades de amonio. Los microorganismos que producen menos ureasa, como ciertas especies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Brucella* y *Bordetella bronchiseptica*, pueden probarse con el agar urea de Christensen. Para muchas de estas especies, una reacción de ureasa positiva se detecta primero por un cambio de color rosado a rojo en la porción inclinada del agar. Al comienzo, la superficie inclinada se pone roja porque la reacción alcalina, que resulta de la dispersión de pequeñas cantidades de urea, aumento por las aminas formadas provenientes de la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos en la región del medio expuesta al aire (1,7,8).

Descarboxilación de la lisina, ornitina y arginina

Muchas especies de bacterias poseen enzimas que pueden descarboxilar aminoácidos específicos en el medio de prueba. Las enzimas descarboxilasas remueven una molécula de CO_2 de un aminoácido para formar aminas reactivas alcalinas. Los siguientes son los aminoácidos más comúnmente probados y las aminas producto de su degradación:

Cuadro No. 1

Lisina	→	cadaverina
Ornitina	→	putrescina
Arginina	→	citrulina

Se han descrito numerosos sistemas de prueba para medir esta propiedad, basados en la detección de un cambio a pH alcalino en el medio de prueba o en la medición directa de los productos de la reacción de descarboxilación, los que pueden ser detectadas con el reactivo ninhidrina después de la extracción del caldo de cultivo con cloroformo (7,9)

La actividad descarboxilasa de Enterobacteriaceae se mide más comúnmente en los laboratorios de microbiología clínica con el caldo descarboxilasa de Moeller. El punto final de la reacción es la producción de un cambio del pH alcalino en el medio y del desarrollo de color azul púrpura después de la incubación con el mecanismo prueba. Este pH bajo es necesario, porque las enzimas descarboxilasa son óptimamente activas hasta que el pH del medio cae a 5.5. La disminución de 6 a 5.5 ocurre porque la bacteria crece y metaboliza una pequeña cantidad de la glucosa del medio para producir ácidos mixtos. Cuando se lleva a cabo la prueba de la descarboxilasa siempre se debe incluir un tubo control sin aminoácidos para asegurarse de que ha ocurrido la caída de pH inicial. Un cambio de color amarillo en el indicador púrpura de bromocresol del tubo control muestra la acidificación. El fosfato de piridoxal se incluye en el medio y actúa como una coenzima para acentuar más la actividad de la descarboxilasa (7,9).

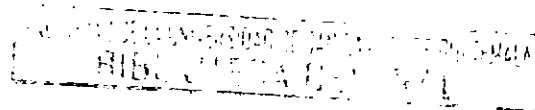
Muchos microbiólogos prefieren el caldo lisina de Falkow al de Moeller porque la prueba Falkow depende sólo de un cambio alcalino en el indicador de pH, y no se requiere ni un medio anaerobio ni uno ácido. Sin embargo, este medio no puede ser usado para detectar actividad de lisina descarboxilasa en ciertos miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia*. Estos producen acetil-metil-carbinol, el cual interfiere con el cambio de pH alcalino final, lo que conduce a interpretaciones falsas negativas. Las modificaciones en este medio son la base del agar semisólido movilidad idol ornitina (MIO) usado en los laboratorios de microbiología clínica. Se han descrito métodos rápidos para detectar actividad de ornitina y lisina descarboxilasa en miembros de Enterobacteriaceae (1,7).

Producción de fenilalanina desaminasa

La determinación de fenilalanina desaminasa es útil para la diferenciación inicial de especies de *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* de otros bacilos Gram negativo. Sólo los miembros de estos géneros y algunos aislamientos relativamente raros del grupo *Enterobacter*, poseen la enzima responsable para la desaminación oxidativa de la fenilalanina. El ácido fenilpirúvico puede detectarse en sólo 4 horas si se usa un inóculo cargado; sin embargo, se recomiendan generalmente 18 a 24 horas de incubación. El medio empleado utiliza extracto de levadura como fuente de carbono y nitrógeno. Los extractos de carne o hidrolizados de proteínas contienen cantidades variables de fenilalanina, que aparecen naturalmente y que pueden conducir a resultados contradictorios. El desarrollo de color verde después del agregado del reactivo cloruro férrico es inmediato y fácil de visualizar (1,8).

Producción de Sulfuro de Hidrógeno

Una característica importante para la identificación de ciertas especies de bacterias es su capacidad de liberar azufre a partir de aminoácidos que contienen azufre u otros compuestos, en la forma de H_2S . Con los sistemas de detección de H_2S el punto final es sulfito, un metal pesado insoluble que produce un precipitado negro en el medio o en la tira de papel filtro. Dado que debe haber iones hidrógeno disponibles para la formación de H_2S , el ennegrecimiento se observa primero en la zona del medio de la prueba en la cual la formación de ácido es máxima, esto es, a lo largo de la línea de inoculación, dentro del agar



profundo e inclinado o en el centro de las colonias que crecen sobre la superficie de agar (1).

iii. Sistemas de Identificación MicroScan

El sistema MicroScan (Dade MicroScan Inc., West Sacramento CA) consiste en bandejas de microtitulación de 96 pocillos de plástico de tamaño estándar, en las cuales se incluyen hasta 32 sustratos reactivos para la identificación de *Enterobacteriaceae* y otras especies bacterianas. Las bandejas "combo", también incluyen microdiluciones en caldo de varios antibióticos en ciertos microtubos para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad. Los paneles de MicroScan pueden adquirirse en estado congelado o en la forma de sustratos deshidratados que hacen el transporte más conveniente y permiten el almacenamiento a temperatura ambiente y una larga vida de estante. Los microtubos se inoculan con una suspensión cargada del microorganismo que se debe identificar y se incuban a 35° C durante 15 a 18 horas. Los paneles pueden interpretarse visualmente, después de lo cual los resultados bioquímicos se convierten en un número biotípico de siete u ocho dígitos que puede ser traducido en una identificación con un libro de códigos provisto por el fabricante. Como alternativa puede usarse un lector automático de bandejas para detectar crecimiento bacteriano o los cambios de color por diferencias en la luz de transmisión. Las diferencias en los pulsos electrónicos son analizadas automáticamente en microcomputadoras que comparan los patrones de reacción con un programa interno para determinar la probabilidad de identificaciones (1).

B. Mecanismos de Resistencia

1. Mecanismos Genéticos de la Resistencia Microbiana.

Los cambios genéticos que explican la resistencia pueden producirse por varios mecanismos que involucran ya sea al DNA cromosomal, como en la mutación, o por la adquisición de material genético extracromosomal, por transducción, transformación o conjugación (10).

En la mutación, aparecen cambios en el cromosoma que pueden ser debidos al azar o a la influencia de agentes físicos o químicos y, de hecho, no necesariamente debidos a la exposición al antimicrobiano, como se demuestra por la observación de que muchos microorganismos aislados antes de la aparición de los antibióticos han presentado mutaciones que los han hecho

insensibles a los mismos. Aunque el antimicrobiano no es el causante de la mutación, tiene, sin embargo, un papel importante en la selección de las cepas resistentes, ya que cuando el antimicrobiano se administra a un paciente con un cultivo bacteriano en el que existen cepas sensibles y otras con mutación que les confiere resistencia, el antimicrobiano eliminará a los microorganismos sensibles dejando solo a los resistentes. La velocidad de aparición de las cepas mutantes es muy variable y puede ocurrir muy rápidamente en algunos casos o, por el contrario, en forma muy lenta y gradual a lo largo de los años.

Más comúnmente, la alteración genética que condiciona la resistencia es producida mediante la adquisición, por parte del microorganismo, de genes transportados en plásmidos extracromosomales, mediante transducción, transformación o conjugación (11).

En la transducción, un virus bacteriófago transfiere DNA extracromosomal bacteriano, incorporado en su cubierta proteica, desde una bacteria insensible a una sensible, la cual adquiere la resistencia y la capacidad de transferirla a su descendencia; tal como se ha observado en cepas de *Staphylococcus aureus* que adquieren resistencia a las penicilinas (12).

En el proceso de transformación, las bacterias sensibles pueden incorporar DNA del medio ambiente y si éste posee genes que codifican para resistencia, la bacteria se convierte en resistente para uno o más antimicrobianos. El origen del DNA del medio ambiente radicaría en el hecho de que algunas bacterias, en ciertas fases de su crecimiento, son capaces de excretar DNA (11).

La conjugación es un importante mecanismo de adquisición de resistencia microbiana y consiste en el pasaje de genes (determinantes R) desde una bacteria resistente a una sensible, mediante acoplamiento directo entre las bacterias por la formación de un pili sexual. Los factores R pueden contener información para brindar resistencia a varios antimicrobianos a la vez y esto ocurre muy rápidamente, en un solo paso. Para que ocurra la conjugación entre bacterias y la formación del pili sexual, es necesaria la intervención de otro grupo de genes denominado factor de transferencia de la resistencia, sin los cuales no puede realizarse el proceso. El complejo determinante R más el factor de transferencia de la resistencia es conocido como factor R. La aparición de

resistencia mediada por factores R es muy importante entre bacterias Gram negativo, en especial entre Enterobacterias. Entre los microorganismos capaces de transferir este tipo de resistencia a bacterias sensibles están *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shiguella*, *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por este mecanismo se produce resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, penicilinas y aminoglucósidos (11,13).

2. Mecanismos Bioquímicos de la Resistencia Microbiana.

Los cambios genéticos producidos dan lugar a diversos tipos de alteraciones bioquímicas en el metabolismo bacteriano, las cuales pueden ser de tres tipos generales: cambios en el sitio de acción del antimicrobiano, producción de enzimas que modifiquen a la droga o disminución de la captación del antimicrobiano (14). Anexo No. 2.

Cuadro No. 2

Se han demostrado cambios en el sitio de acción del antimicrobiano en los siguientes casos:

- a) Para aminoglucósidos, cambios en la proteína receptora de la subunidad 30S.
- b) Para beta lactámicos, alteraciones o aparición de nuevas proteínas fijadoras de penicilinas.
- c) Para eritromicina y clindamicina, metilación del RNA ribosomal en la subunidad 50S.
- d) Para quinolonas, alteraciones en la DNA girasa.
- e) Para trimetoprim, cambios en la dihidrofolato reductasa bacteriana.
- f) Para sulfonamidas, cambios en la dihidropterico sintetasa.
- g) Para rifamicinas, alteraciones en la RNA polimerasa DNA dependiente.
- h) Para vancomicina, cambios en los péptidos de la pared celular bacteriana.

En lo relativo a la adquisición por parte de la bacteria de la capacidad de formar enzimas que inactiven a antimicrobianos, se conocen los siguientes casos: a) Para aminoglucósidos, la aparición de enzimas adenilantes, acetilantes y fosforilantes. b) Para cloranfenicol, la producción de acetiltransferasa. c) Para beta lactámicos, la destrucción de los antibióticos por enzimas beta lactamasas (15,16).

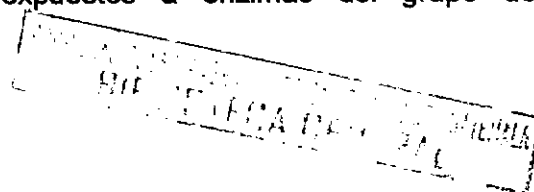
Finalmente, los cambios bioquímicos que reducen la captación, ya sea porque reducen el ingreso o porque aumentan la salida o eflujo del antimicrobiano, se han encontrado los siguientes casos: a) Aumento del eflujo: Para tetraciclinas, macrólidos y quinolonas, mediante la adquisición de nuevos sistemas de transporte en la membrana citoplasmática. b) Reducción del ingreso por disminución de la permeabilidad: Para trimetoprim, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y beta lactámicos, por cambios en la constitución de la membrana celular externa (15).

Los mecanismos bioquímicos sólo pueden ser adecuadamente comprendidos si se recuerdan los mecanismos de acción de los antimicrobianos, así como los mecanismos mediante los cuales estas drogas acceden al microorganismo (17).

Dado que en el momento actual los antimicrobianos más utilizados son los betalactámicos, los aminoglucósidos y las quinolonas, se enfocará especial atención a la resistencia para estos fármacos (17).

a. Resistencia a B-lactámicos

Estos antibióticos tienen un mecanismo de acción común. Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana, en especial, la formación de puentes cruzados entre las diversas capas de peptidoglicanos, que normalmente brinda rigidez a la pared celular y protege a la membrana celular del ingreso de cantidades excesivas de agua a la bacteria, lo que ocurriría debido a la elevada concentración de solutos en estos microorganismos. La formación de puentes cruzados es efectuada por proteínas con acción de transpeptidasas, denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (PFP). Debe también recordarse que cuando los antibióticos beta lactámicos son expuestos a enzimas del grupo de las



betalactamasas, se convierten en inactivos, debido a destrucción (ruptura) del anillo betalactámico (18,19,23).

Relacionado a este último aspecto, se ha logrado sintetizar antimicrobianos que son resistentes a las betalactamasas. como por ejemplo, la dicloxacilina utilizada como tratamiento para *Staphylococcus aureus*. Las bacterias Gram negativo, como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, también han aprendido a sintetizar beta lactamasas que destruyen a los antimicrobianos que clásicamente eran eficaces frente a bacilos Gram negativo, como aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureido penicilinas, así como cefalosporinas de primera y segunda generación. Ello obligó al desarrollo de cefalosporinas de tercera generación, de monobactams y de carbapenems, con la idea de contrarrestar la resistencia microbiana (23).

Las bacterias Gram negativo poseen en el cromosoma un gen (*ampC*) que codifica para una beta lactamasa más activa frente a cefalosporinas que frente a penicilinas; además, muchos bacilos Gram negativo poseen genes reguladores de la producción de esta betalactamasa *ampC*. En algunas oportunidades y por procesos de mutación, las bacterias se convierten en productoras de grandes cantidades de la enzima, que aunque no es muy eficaz para destruir los betalactámicos, es tan grande la producción que al final aparece la resistencia, como se ha observado con *Enterobacter cloacae*. Existen también casos, como en *Escherichia coli* resistente a ampicilina, en los cuales la mayor producción de beta lactamasa *ampC* es debida a modificaciones en la zona promotora del *ampC* que le permiten una expresión genética más eficaz (20,21).

Aunque los mecanismos anteriores tienen cierta importancia, en la mayor parte de casos la resistencia a los betalactámicos, se debe a la adquisición en la capacidad de sintetizar betalactamasas mediante la intervención de un plásmido. En las bacterias Gram negativo las más importantes de estas betalactamasas ligadas a plásmidos son la TEM-1 y en menor grado la SHV-1 (en *K. pneumoniae*) y la PSE-1 (en *Pseudomonas aeruginosa*). Estas enzimas brindan resistencia a las bacterias Gram negativo frente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación. Se ha descrito además la existencia de betalactamasas de espectro ampliado, ligadas a plásmido, especialmente en *Klebsiella pneumoniae*, que producen la inactivación de

cefalosporinas de tercera generación y monobactamos. Estas enzimas están relacionadas a TEM-1 y TEM-2 (16 enzimas) y a SHV-1 (4 enzimas), y en ellas sólo hay variación de uno a tres aminoácidos en relación a las beta lactamasas originales TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las betalactamasas de espectro ampliado no destruyen a la cefoxitina y su actividad puede ser anulada combinando un beta lactámico con un inhibidor de las betalactamasas como ácido clavulánico o sulbactam. Existe una tercera clase de betalactamasas de espectro ampliado y que está relacionada a la betalactamasa ampC que sí brinda resistencia frente a cefoxitina y que no es inhibida por ácido clavulánico ni sulbactam. El imipenem no es afectado por ninguno de los tres tipos de betalactamasas de espectro ampliado, pero sí por algunas betalactamasas ligadas a genes cromosómicos, en bacterias como *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia* (20,23).

Se conoce también que existen cepas de estafilococos resistentes a la meticilina. En la mayor parte de estos casos, la resistencia se debe a la producción de una enzima que mantiene la integridad de la pared celular bacteriana a pesar de que las proteínas fijadoras de penicilinas normales son inactivadas por el antibiótico. Esta enzima es una proteína fijadora de penicilina denominada PFP 2a o PFP2'. Esta es codificada por un gen cromosómico adquirido denominado mecA, el que está ausente cuando la bacteria es sensible a meticilina. Este mecanismo explica por qué el 15% de los *Staphylococcus aureus* hospitalarios, el 75% de *Staphylococcus epidermidis* y el 80% de *Staphylococcus haemolyticus* son resistentes a meticilina (23).

Aunque el mecA está presente sólo en estafilococos, otros microorganismos también fabrican PFP de baja afinidad por los beta lactámicos, como es el caso de los enterococos y de los neumococos resistentes a penicilina. El gen que existe para PFP en estos casos es diferente al de los neumococos sensibles en varios segmentos, los cuales probablemente han sido insertados en el gen original provenientes de otros estreptococos. Observaciones similares han sido efectuadas en cepas de *H. influenzae* y gonococos resistentes a penicilina G o a ampicilina (17,23).

b. Resistencia a aminoglucósidos

La resistencia a los aminoglucósidos puede ocurrir mediante la intervención de tres mecanismos, que son: a) Variaciones en el receptor, a nivel de la subunidad 30S. b) Modificación enzimática del antibiótico. c) Reducción del ingreso del antibiótico a la célula bacteriana. De estos mecanismos, es indudable que el segundo es el más importante y el que mejor ha sido estudiado. La modificación del aminoglucósido puede efectuarse por fosforilación, adenilación o acetilación. Algunas enzimas bacterianas tienen doble capacidad funcional y pueden ser, por ejemplo, fosforilantes y acetilantes a la vez, como ocurre con la enzima 6' acetilante y 2' fosforilante que brinda capacidad defensiva al *Staphylococcus aureus* frente a gentamicina y otros aminoglucósidos; esta enzima fosforila a la gentamicina en 2' mientras que es capaz de acetilar en 6' a la amikacina y kanamicina. Los genes que codifican para esta enzima en estafilococos pueden ser adquiridos de otros estafilococos por plásmidos o por DNA en forma de transposones. Se han descrito también muchas otras enzimas capaces de modificar aminoglucósidos como la 4'-O-nucleotidiltransferasa de bacilos Gram negativo como *E. coli*, *Klebsiella* o *P. aeruginosa* que puede inactivar a kanamicina, tobramicina o amikacina. La 4',4''-O-nucleotidiltransferasa modifica a los mismos antibióticos y es producida por *Serratia* y varios estafilococos. La 3'-O-fosforiltransferasa inactiva a kanamicina y tobramicina y puede ser producida por diversos bacilos Gram negativo como *E. coli*, *Serratia*, *Proteus* y *P. aeruginosa*. Los aminoglucósidos más importantes pueden ser inactivados por acetilación mediante la 3'-N-acetiltransferasa o por la 6'-N-acetiltransferasa producidas especialmente por bacilos Gram negativo (19,21).

Dado que los antibióticos aminoglucósidos deben ingresar al interior de las bacterias para impedir la síntesis proteica y teniendo en cuenta que el ingreso de estas drogas es un proceso activo que involucra la intervención de mecanismos oxidativos, las bacterias han logrado desarrollar resistencia a los aminoglucósido bloqueando su ingreso, es decir haciéndose impermeables al antibiótico, tal como se ha observado en *P. aeruginosa*. La adición de antibióticos de pared como las penicilinas a la terapia con aminoglucósidos puede incrementar la entrada del aminoglucósido al interior de la bacteria aumentando así la eficacia de la acción antimicrobiana (21).

Finalmente, los cambios en la composición de la proteína receptora en el ribosoma 30S tienen menor importancia clínica. Estos cambios, algunas veces en un solo aminoácido de la proteína ribosomal pueden ocurrir por mutación. Porcentajes importantes de *Streptococcus faecalis* no son capaces de ligar aminoglucósidos y ello explica la resistencia que puede ocurrir por parte de estos microorganismos a la estreptomina. En estos casos no hay sinergismo entre penicilinas y aminoglucósidos (21).

c. Resistencia a la Quinolonas Fluoradas

Las quinolonas son los quimioterápicos antimicrobianos que han tenido un mayor desarrollo en los últimos 10 años. Actúan tanto sobre bacterias extracelulares como sobre las intracelulares y su actividad antimicrobiana depende de su capacidad de inhibir a la DNA girasa, complejo enzimático formado por subunidades A y B, que interviene en los procesos de replicación y de transcripción del DNA (12,21).

Se está observando un incremento en la resistencia a las fluoroquinolonas. Esta depende en algunos casos de mutaciones que pueden conferir resistencia a fluoroquinolonas, pero ocurre con menor frecuencia que para quinolonas no fluoradas como el ácido nalidíxico (21).

Las mutaciones pueden ocurrir ya sea en las subunidades de la DNA girasa, como se ha observado en *Escherichia coli* o en las porinas, proteínas de la membrana celular externa, a través de las cuales ingresan las quinolonas. La mutación en estas porinas reduce el ingreso del quimioterápico a la bacteria, lo que naturalmente disminuye su eficacia. En muchos casos la disminución de la acumulación intrabacteriana de quinolonas depende de un mecanismo activo de eflujo del quimioterápico, mecanismo localizado en la membrana citoplasmática de la bacteria. Las bacterias con alta tasa de resistencia las quinolonas suelen combinar mecanismos de mutación tanto en la DNA girasa como en las porinas. Recordemos que algunos antibióticos, como tetraciclinas y cloranfenicol requieren también de las porinas para ingresar a los microorganismos, por lo que en muchos de estos casos se observará resistencia cruzada entre quinolonas y otros antimicrobianos. Entre nosotros, probablemente debido a la gran frecuencia de

utilización, se está observando marcado incremento en la resistencia a las fluoroquinolonas, especialmente en bacilos Gram negativo (21).

La frecuencia de aparición de resistencia a los antimicrobianos es tan grande y tan rápida que aparentemente está ganando a la velocidad con que se obtienen nuevos antimicrobianos. Por otro lado, la resistencia no ocurre para un solo antimicrobiano sino que, en la mayor parte de los casos, tiene un carácter múltiple, por lo que en un futuro muy cercano, la mayor parte de las infecciones podrían ser producidas por microorganismos con múltiple resistencia. El control en el uso de antimicrobianos se hace cada vez más necesario y evidentemente contribuirá al control en la velocidad de aparición de resistencia (21).

El uso de antimicrobianos requiere de un adecuado conocimiento de las características y potencialidad de cada droga y de un preciso criterio clínico para utilizar los antimicrobianos sólo en aquellos casos en que están indicados y en caso de tomar la decisión de usarlos, aplicarlos en las dosis adecuadas y por el tiempo suficiente (21,22).

C. El laboratorio en la orientación del tratamiento antimicrobiano

Una droga quimioterapéutica es un compuesto químico que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad. El compuesto puede ser de origen natural o haber sido sintetizado por los químicos en el laboratorio. La enfermedad puede ser de cualquier tipo, incluidos los procesos infecciosos y neoplásicos. Un antibiótico es un agente antimicrobiano que proviene de un microorganismo; un agente antimicrobiano es una droga que actúa fundamentalmente contra microorganismos infecciosos (1,24).

Los microbiólogos pueden ser de gran ayuda para los médicos. Pueden evaluar las interacciones *in vitro* entre un aislamiento bacteriano y los agentes antimicrobianos que serían adecuados para el tratamiento de la infección *in vivo*. Su trabajo puede proporcionar datos que ayuden al médico a decidir si las dosis de antibiótico elegidas son las adecuadas (1,24).

Las pruebas de susceptibilidad antibiótica pueden dividirse en dos grupos: 1) las que predicen la eficacia del tratamiento y 2) las pruebas que controlan la eficacia del tratamiento (24) (Anexo No. 3).

Las dos pruebas de referencia son los procedimientos macroscópicos de dilución en caldo y dilución en agar. Ambos están diseñados para cuantificar la menor concentración de un antibiótico que inhibe el desarrollo visible del microorganismo *in vitro*, la concentración inhibitoria mínima (CIM). La prueba utilizada con mayor frecuencia para orientar el tratamiento es el procedimiento de difusión con discos (prueba de Bauer-Kirby), en la cual las interpretaciones clínicas se deducen por correlación con la prueba de referencia. En los últimos años, una gran cantidad de laboratorios ha utilizado una prueba miniaturizada en medio líquido (prueba de microdilución en caldo) o un sistema comercial automatizado. La prueba de microdilución en caldo se ha hecho tan común y está tan bien estudiada que se ha convertido en el estándar de referencia para muchos investigadores (24).

En muchas infecciones la forma más útil para determinar si un tratamiento antimicrobiano es apropiado es la respuesta clínica del paciente, y si es necesario, la demostración por cultivos reiterados de que el microorganismo causante ha sido eliminado o que persiste (24).

Es importante recalcar que las pruebas de susceptibilidad a antibióticos están pensadas para ser una ayuda para el médico, y no una garantía de que un agente antimicrobiano será eficaz para el tratamiento (24,25).

1. Prueba de susceptibilidad por difusión con discos

El principio de esta prueba consiste en que tan pronto como el disco impregnado en el antibiótico toma contacto con la superficie húmeda del agar, el agua se absorbe en el papel filtro y el antibiótico se difunde en el medio que lo rodea. A medida que aumenta la distancia, hay una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico. Si las placas ya fueron inoculadas con una suspensión bacteriana, se produce el crecimiento simultáneo de las bacterias sobre la superficie del agar. Cuando se alcanza una masa celular crítica de bacterias, se sobrepasa la actividad inhibitoria y aparece el crecimiento bacteriano. EL tiempo requerido para alcanzar la masa celular crítica es característico de cada especie, pero depende de la composición del medio y de la temperatura de incubación. Los puntos en los que se alcanza la masa celular crítica aparecen como círculos de crecimiento bacteriano, con bordes definidos con claridad con el medio del disco formando el centro del círculo si la prueba se realiza de manera apropiada (1,24).

La concentración del antibiótico que se difundió en esta interfase de crecimiento y las bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la CIM, obtenida en las pruebas de dilución (1).

a. Progresos iniciales

Con la aparición de diversos antibióticos nuevos, durante la década de 1940, los métodos de dilución en tubo no resultaron más prácticos para los grandes volúmenes de trabajo requeridos. En 1943 Foster y Woodruff colocaron una tira de papel impregnada con antibióticos sobre la superficie de una placa de agar que había sido sembrada previamente. Muchos antibióticos se pudieron probar con éste método simple (1,24).

En un comienzo para la interpretación de los resultados se utilizó el método del halo *versus* no halo. El desarrollo de un halo de inhibición, de cualquier diámetro alrededor de un disco se consideraba evidencia de que el microorganismo era susceptible al antibiótico. Las bacterias resistentes se clasificaban como tales cuando creían exactamente hasta el borde del disco (24).

La imposibilidad de producir resultados cuantitativos en las pruebas iniciales fue una desventaja. Se desarrolló una prueba semicuantitativa utilizando discos con alta y con baja concentración. Las bacterias eran consideradas resistentes si crecían hasta los bordes de ambos discos, mientras que los microorganismos susceptibles mostraban halos de inhibición alrededor de ambos discos. Los aislamientos se consideraban de susceptibilidad intermedia si las bacterias estaban inhibidas sólo por el disco que contenía la concentración más alta de antibiótico (24).

b. Desarrollo de un procedimiento estandarizado de difusión con discos

A fines de la década de 1950 el estado de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en todo el mundo era un caos, debido principalmente a la falta de un procedimiento estándar. Las concentraciones antibióticas variaban, estaban empleándose una amplia variedad de medios de cultivo, el tiempo de incubación no era uniforme y los resultados se interpretaban con criterios diferentes. Se

formó un comité de la Organización Mundial de la Salud, cuya deliberación condujo al desarrollo de diversos procedimientos estandarizados (24).

La prueba estándar en los Estados Unidos se basa en el trabajo de Bauer y Kirby y col. Si ésta prueba se realiza en forma adecuada, los bordes de los halos de inhibición deben ser claros y de fácil medición (6,24).

i. Test de Bauer-Kirby

Se realiza mediante la utilización de una cantidad constante de antimicrobianos aplicada sobre la superficie de discos papel. En el ensayo, dichos discos se colocan sobre la superficie de una placa de medio de Müller - Hinton, previamente inoculada con una suspensión de la bacteria a estudiar. Luego de un período de incubación, se formará, por difusión, un gradiente de concentración del agente antimicrobiano y la susceptibilidad o resistencia hacia el mismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco (6).

Factores que influyen en el ensayo

La validez de esta prueba depende de varios factores que afectan al desarrollo de la misma, dentro de los cuales se encuentran: la carga del disco, el grosor de la capa de agar, su pH, composición del medio, la capacidad de difusión de la droga, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, el tamaño y fase de crecimiento del inóculo (6).

- **Medio de cultivo**

De los medios disponibles, se considera al agar Müller-Hinton como el mejor para las pruebas rutinarias de susceptibilidad, el cual contiene infusión de carne deshidratada, ácido de caseína y almidón de maíz; además, éste medio posee propiedades inhibitorias mínimas para las sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclina. El grosor del medio debe ser de 4 mm (6).

- **pH del Medio**

El pH de cada lote de agar debe ser controlado cuando se prepara el medio, el cual debe estar entre 7.2 y 7.4 a temperatura ambiente, y debe medirse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo, ciertas

drogas parecerán menos activas, mientras que otras parecerán tener mayor actividad (6).

- **Efecto de la Timina o Timidina**

Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o timidina, pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim, produciendo zonas más pequeñas, menos nítidas o sin halo; lo cual puede dar como resultado un informe de falsa resistencia (6).

- **Efectos por variación en la composición de los cationes divalentes**

La variación en cationes divalentes, principalmente Ca^{++} y Mg^{++} , afectarán los resultados con tetraciclina, colistín y aminoglucósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Un excesivo contenido de cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones de cationes resultarán en zonas de inhibición mayores que las esperadas. Un exceso de zinc podría reducir las zonas de inhibición de los carbapenems (6,25).

- **Temperatura**

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son muy susceptibles a la temperatura, por lo que las placas y los tubos deben ser incubados de rutina a 35-37°C (6).

Preparación y aplicación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo, se debe utilizar una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland) (8). Deberán tomarse colonias de aspecto similar, para minimizar las variaciones de la población bacteriana, y el grado de turbidez se compara con el estándar; ambos se observan contra un fondo blanco (6). Inocular las placas de agar en tres planos, con un hisopo impregnado con cierta cantidad del estándar (6).

Aplicación de los discos de antimicrobianos en las placas inoculadas

Los discos se colocan sobre la superficie del agar inoculada con una pinza estéril, con una distancia no menor de 24 mm desde un centro al otro, debido a que las drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser

removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar, no se deben colocar más de 12 discos por placa de 150mm y no más de 5 discos por placa de 100 mm. , las placas se incuban a 35° C y no deberán incubarse en concentración elevada de CO₂, porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO₂ alteraría significativamente el tamaño de las zonas inhibitorias para algunos agentes antibióticos (6,22).

Interpretación de la susceptibilidad

- **Lectura de las placas de agar**

Las placas se leen después de 16 a 18 horas de incubación y se miden los diámetros de las zonas de inhibición, si el inóculo se realizó adecuadamente, estas zonas serán uniformemente circulares y habrá desarrollo confluyente. Para leer se compara con tablas especiales de NCCLS, en la cual los halos derivan de la correlación de los tamaños y de las CIM de aquellas especies que se pueden probar por el método de difusión por disco (24,25).

Dado que una infección dada por la cepa en estudio, puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada, para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que se presentaran contraindicaciones (26). En la práctica esto se interpreta si determinada bacteria presenta un halo de inhibición grande medido en mm. en el medio de inoculación.

Susceptible (S): Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio, puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada, para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que se presentaran contraindicaciones (25). En la práctica esto se interpreta si determinada bacteria presenta un halo de inhibición grande medido en mm. en el medio de inoculación.

Intermedio (I): Indica que el agente causal puede ser inhibido por concentraciones de antibiótico más elevada, siempre que las dosis utilizadas puedan ser aumentadas (25). Debido a que cada bacteria presenta un halo de inhibición diferente para cada antibiótico, el patrón de intermedio se le da a las bacterias que no presentan un halo de inhibición definido.

Resistente (R): El agente causal no es inhibido por las concentraciones séricas de antibiótico normalmente alcanzadas a dosis habituales, lo cual es observado por la formación de un halo de inhibición pequeño, y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia antimicrobiana (por ejemplo β -lactamasas) y la eficiencia clínica no ha sido comprobada (24,25).

ii. Prueba de susceptibilidad por Microdilución en caldo

Esta prueba fue una de las primeras en desarrollarse y aún sirve como método de referencia. Se realizan diluciones seriadas del agente antimicrobiano en caldo o en agar, después de lo cual, se agrega una suspensión bacteriana estandarizada. Se colocan 10 tubos, los cuales contienen caldo de Müller-Hinton suplementado con cationes; las cantidades de antibióticos son diluidas en forma seriada, el tubo con el número 10 no contiene antibiótico y sirve como control del crecimiento. Cada uno de los 10 tubos se inocula con una suspensión calibrada del microorganismo a ser probado y se incuba a 35° C durante 18 horas; al término del período de incubación los tubos se examinan a simple vista, para observar la presencia de turbidez, la que es indicativo de que el crecimiento bacteriano no ha sido inhibido por la concentración de antibiótico contenida en el medio. Existe un punto límite, el cual representa la CIM, definida como la concentración de antibiótico en microorganismos por mililitro que impide el crecimiento *in vitro* de las bacterias (1,24).

iii. Prueba de E-test

Este procedimiento consiste en tiras impregnadas del antibiótico que se colocan en la superficie del agar. El principio es una aplicación del método de difusión en discos y el protocolo para la preparación del inóculo es el mismo. Después de la incubación se lee la CIM por el punto de la tira donde comienza la inhibición del crecimiento. La difusión de los antibióticos comienza inmediatamente después de la colocación de la tira, por lo que no debe retirarse la tira luego de haber sido colocada (1,2).

c. Limitaciones

La prueba de Bauer y Kirby, modificada por el NCCLS, ha sido aceptada como la técnica estándar para la realización de las pruebas de susceptibilidad por difusión con discos; en la mayoría de los casos brinda información útil. Hay, sin embargo, algunas limitaciones: 1) La prueba sólo debiera aplicarse a especies bacterianas que han sido cuidadosamente evaluadas, 2) Las bacterias que crecen con lentitud, las que necesitan nutrientes especiales, o las que requieren CO₂ o condiciones anaerobias para su desarrollo no deben probarse, a menos que la validez del procedimiento haya sido comprobada (1).

D. Susceptibilidad a los patógenos nosocomiales

Las infecciones nosocomiales típicamente afectan a los pacientes inmunocomprometidos debido a su edad, a enfermedades subyacentes o a tratamientos médicos o quirúrgicos. El "envejecimiento" de nuestra población (más en países desarrollados que en otros como el nuestro) y las intervenciones médicas y terapéuticas cada vez más agresivas, como lo son los implantes de cuerpos extraños, los trasplantes de órganos y los xenotrasplantes, han creado un grupo de pacientes especialmente vulnerables a infecciones nosocomiales. Como resultado de lo anterior, los más altos índices de infección recaen en los pacientes de cuidados intensivos: los índices de infecciones nosocomiales en las unidades de cuidados intensivos de adultos y en las pediátricas se triplican en comparación a las infecciones en el resto de las unidades hospitalarias. Es importante recalcar que la localización de la infección y el tipo de patógenos involucrados se relacionan directamente con los procedimientos terapéuticos que se realizan en cuidados intensivos. En estas áreas, los pacientes con catéteres vasculares y con equipos de monitoreo invasivos presentan más infecciones hematógenas por estafilococos coagulasa negativo. De hecho, la mayoría de los casos de bacteremia oculta en cuidados intensivos se debe a las infecciones relacionadas al "acceso vascular". Las infecciones urinarias fúngicas también se presentan frecuentemente en los pacientes de cuidados intensivos, probablemente debido a la larga exposición a antibióticos de amplio espectro. Según el National Nosocomial Infections Surveillance System, la *Candida spp.* es la causa más común de infección urinaria nosocomial en la unidad de cuidados intensivos (25,27).

1. Emergencia de las infecciones nosocomiales

Existen tres fuerzas importantes que involucran a las infecciones nosocomiales. La primera es el uso de antimicrobianos relacionado a una larga estancia intrahospitalaria. El creciente interés en las infecciones por bacilos Gram negativos durante 1970 y 1980 conllevó al exagerado uso de cefalosporinas. Al volverse éstos resistentes a las primeras generaciones de cefalosporinas, nuevas generaciones de cefalosporinas fueron creadas. El uso indiscriminado de cefalosporina se considera una de las causas del surgimiento de enterococos como patógenos nosocomiales. El uso prolongado de antimicrobianos y la transferencia de pacientes de manera intra y extrahospitalaria, han creado un reservorio importante de cepas resistentes en acilos para ancianos (27).

En segundo lugar, el personal hospitalario no sigue al pie de la letra los métodos de control de infecciones, como lo es el lavarse las manos entre paciente y paciente. En las unidades de cuidados intensivos, la emergencia muchas veces se antepone a la asepsia (27).

En tercer lugar, cada vez más pacientes hospitalarios se hallan inmunocomprometidos. La nueva medicina ambulatoria hace que los pacientes más vulnerables sean los que permanecen internados en el hospital. Este cambio ha provocado el dominio de infecciones hematógenas asociadas al "acceso vascular" y a neumonías relacionadas a los ventiladores (27).

Muchos otros factores precipitantes se deben al "manejo" intrahospitalario. Los trasplantes son un arma de doble filo debido a los efectos combinados de la inmunosupresión en los pacientes transplantados y a las enfermedades infecciosas que conlleva el trasplante de órganos. La transfusión sanguínea seguirá siendo una fuente importante de enfermedades infecciosas. De igual manera, la necesidad de remodelaciones en las infraestructuras hospitalarias creará más diseminación aérea de hongos u otros patógenos (como la *Legionella*) por polvos y esporas liberadas durante la demolición y construcción (27).

2. Prevención y control de las infecciones nosocomiales

Como siempre, el control de las infecciones puede ser muy costoso. Aproximadamente una tercera parte de las infecciones nosocomiales se pueden prevenir, y sobrepasar, para lo cual se deben realizar una serie de estrategias simultáneas (22). Antes que nada, debe buscarse la mejora de la vigilancia nacional de infecciones nosocomiales para que, de esta manera, se obtengan datos más representativos. Debemos estudiar la sensibilidad y especificidad de nuestro sistema de vigilancia y establecer parámetros para hacer diagnósticos difíciles de infecciones como neumonías asociadas al ventilador. De igual modo, deben desarrollarse sistemas de vigilancia de aquellas infecciones "nosocomiales" que ocurren fuera del hospital, donde gran parte del cuidado de la salud se realiza, hoy en día (28).

En segundo lugar, debemos asegurarnos que nuestros sistemas de vigilancia sean válidos. La iniciativa del ORYX del Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organization para monitorizar, tanto los procedimientos del cuidado de la salud como sus resultados, producirán indicadores mundiales importantes. Sucesivamente, la vigilancia extrahospitalaria se incrementará, lo cual provocará un sistema mundial de vigilancia eficiente (25,28).

En tercer lugar, el éxito del control de las infecciones nosocomiales recae en la mejora del diseño del equipo invasivo. Esto es particularmente importante debido al incremento significativo de las infecciones hematógenas asociadas a los métodos de "acceso vascular", específicamente en los pacientes de cuidados intensivos. Dada la opción de cambiar el comportamiento humano (como el mejorar las técnicas de asepsia) o el diseñar un mejor equipo, la última opción siempre será la más exitosa. Es de suma importancia el desarrollo de métodos no invasivos de monitoreo y de técnicas quirúrgicas de invasión mínima que eviten el alto riesgo asociado al traspaso de las barreras de defensa naturales del huésped (como lo son la piel y la mucosa) (28).

En cuarto lugar, el resistir la era postantibiótica requerirá de programas agresivos de control de antibióticos (12). El riesgo de cepas resistentes a antibióticos también puede reducirse en el futuro al controlar su colonización mediante la adecuada inmunización así como flora competente (28).

En quinto lugar, los problemas de resistencia antimicrobiana y el advenimiento de los xenotransplantes enfatizan la importancia de nuevos métodos microbiológicos. La electroforesis por gel se ha convertido en una herramienta epidemiológica de rutina para la investigación de patógenos resistentes a la politerapia. Asimismo, el análisis epidemiológico molecular puede ayudarnos a comprender mejor ciertos factores que conllevan al surgimiento de nuevas cepas resistentes (28).

En sexto lugar, el control de la tuberculosis en los hospitales estadounidenses, es un excelente ejemplo de la colaboración exitosa del control extrahospitalario, mediante la participación del CDC y de ciertas agencias que regulan el cuidado de la salud (28).

Por último, el control de la infección es una parte integral de cualquier servicio de asistencia del personal hospitalario. Un programa eficaz protegerá al personal frente a la adquisición de infecciones laborales, así como a los pacientes y a otros miembros del personal hospitalario frente a un empleado infectado. La organización y las operaciones de un servicio de asistencia la personal variarán de acuerdo al tamaño de la institución, al número de empleado y a las diversas necesidades de las agencias reguladoras. Sin embargo, se requieren determinados elementos para todos los programas, como los son los siguientes: la adecuada detección de la enfermedad, con una vigilancia rutinaria del estado inmunológico del personal; la inmunización, para proteger a los empleados de las infecciones laborales y a los pacientes del personal infectado; el control de las exposiciones, como lo serían normas donde se efectúe el seguimiento de los pinchazos de aguja y otras lesiones; y el tratamiento de la enfermedad aguda en el personal hospitalario. Al trabajar en asociación, el equipo para el control de las infecciones y el servicio de asistencia la personal pueden proporcionar un entorno sin riesgos y seguro tanto para trabajadores de asistencia sanitaria como para los pacientes.

IV. JUSTIFICACIÓN

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno biológico natural, pero se ve amplificado muchas veces debido al mal uso que hace el hombre de los antimicrobianos y a la indiferencia demostrada a las consecuencias de ese hecho. Es posible modificar la velocidad con que se desarrolla la resistencia, por medio de diversas medidas tales como el uso racional de los medicamentos y la educación de los pacientes. Otra estrategia importante es la selección adecuada del régimen antibiótico, para lo cual es importante conocer la microbiota predominante y la prevalencia de cepas resistentes a un determinado fármaco, en la comunidad o en la institución de salud correspondiente.

En nuestro país no se conocen con exactitud las dimensiones de la resistencia bacteriana, por lo que la terapia antibiótica empírica ha tomado auge ante la ausencia de estudios de susceptibilidad antibiótica que ha sido condicionado por la falta de recursos y el poco valor que el clínico le atribuye a las pruebas de laboratorio, por lo que se hace necesario establecer sistemas de vigilancia locales que permitan cuantificar el hecho, almacenar y analizar la información, con el objeto de escoger una terapia empírica inicial apropiada para el lugar en particular. Es en este sentido en que la vigilancia activa de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana constituye una de nuestras principales armas de defensa contra la diseminación de resistencia en un Hospital, en una comunidad y en una región.

Anteriormente en el laboratorio de microbiología del Hospital Regional de Occidente se contaba únicamente con procedimientos manuales básicos para la identificación de especies y determinación de la susceptibilidad antibiótica de éstas, a partir de muestras clínicas lo que no permitía caracterizar correctamente a un microorganismo y se tenían muchos errores en el procedimiento de susceptibilidad antimicrobiana por la técnica de Bauer-Kirby que innegablemente cuestionan la validez del procedimiento y la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Con el presente estudio se pretende identificar correctamente a las Enterobacterias que con mayor frecuencia son causantes de infecciones, - que podrían estar involucrados en complicaciones nosocomiales- y establecer sus patrones de susceptibilidad antibiótica, mediante la utilización de un sistema automatizado que permite la exclusión del factor humano como fuente de error; de ésta forma, pueden obtenerse datos más cercanos a la realidad epidemiológica del Hospital Regional de Occidente a fin de que sean utilizados con propósitos de vigilancia.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Identificar las cepas de Enterobacterias aisladas en el Hospital Regional de Occidente *San Juan de Dios* -HROSJD- y determinar sus patrones de susceptibilidad antimicrobiana.

2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar la frecuencia de los géneros de Enterobacterias aisladas de muestras clínicas en el laboratorio clínico del Hospital Regional de Occidente *San Juan de Dios*-HROSJD-.

VI. HIPÓTESIS

Debido a que el estudio es de tipo descriptivo y transversal no se formula hipótesis para esta investigación.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

El universo de estudio comprendió a todos los pacientes internados en el Hospital Regional de Occidente –HRO- “San Juan de Dios”, Quetzaltenango.

B. Muestra

Se tomaron 211 cultivos positivos para cepas de Enterobacterias.

C. Recursos

1. Humanos

Pc. Velvet Anabella Pérez Juárez (tesista)

Licenciado José Manuel Arriaga (asesor)

Licenciado Jorge Luis de León (asesor estadístico)

Personal técnico del Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional de Occidente *San Juan de Dios* –HROSJD-.

2. Institucionales

Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional de Occidente *San Juan de Dios*, Quetzaltenango.

3. Físicos

Equipo

Incubadora a 35° C

Microscopio

Mechero Bunsen

Lector MICROSCAN ®

Placas para el equipo de MICROSCAN ®

D. Metodología

Las muestras que se analizaron fueron todos los cultivos positivos para Enterobacterias, según las pruebas básicas como características de la colonias, tinción de Gram, etc., aislados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional de Occidente *San Juan de Dios* -HROSJD- a partir de muestras clínicas de pacientes internos en este centro hospitalario. Los cultivos que cumplieron con el requisito anterior, fueron sometidos pruebas de identificación y determinación de su patrón de susceptibilidad por el sistema semiautomatizado Microscan®.

E. Procedimiento

1. Preparación de la suspensión bacterial

- Remover la tapadera de las botellas de preparación del inóculo.
- Seleccionar 3 colonias representativas y tomarlas, en forma perpendicular, con el capilar provisto para ello. Tener cuidado de únicamente tocar la superficie de cada colonia, no atravesarlas ni perforar el medio.
- Introducir el capilar dentro de la botella, cerrarla y agitarla vigorosamente de 8 a 10 veces. La suspensión obtenida puede utilizarse dentro de un lapso de horas.
- Colocar la suspensión en la placa de inoculación.
- Instalar el pipeteador (RENOK) en una charola de inoculación (sistema de transferencia), colocarlos sobre la placa de inoculación y aspirar la suspensión, presionando el botón de aspiración / liberación.
- Colocar el sistema de transferencia sobre un panel para Gram negativo de MICROSCAN y expeler (inocular) la suspensión, presionando, otra vez, el botón de aspiración / liberación.
- Agregar aceite a los pozos en los que se necesita una atmósfera aeróbica
- Cubrir el panel con la tapadera e incubar a 35 ° C por 16 a 42 hrs.
- Sacarlo de la incubadora y añadir los reactivos de peptidasa, Kovacs, cloruro férrico, N-N-dimetil-N-acetilamina, ácido sulfhídrico, hidróxido de potasio y alfa naftol a los respectivos pozos.
- Introducir los datos del paciente a la computadora, colocar la placa y esperar los resultados.

2. Interpretación de los resultados

El resultado de la identificación se obtuvo en una hoja de papel impresa por la máquina, la cual contiene el nombre de la bacteria identificada, y los patrones de susceptibilidad hacia cada antibiótico, comparado con los parámetros de la NCCLS.

A. Análisis Estadístico

1. Análisis de Datos

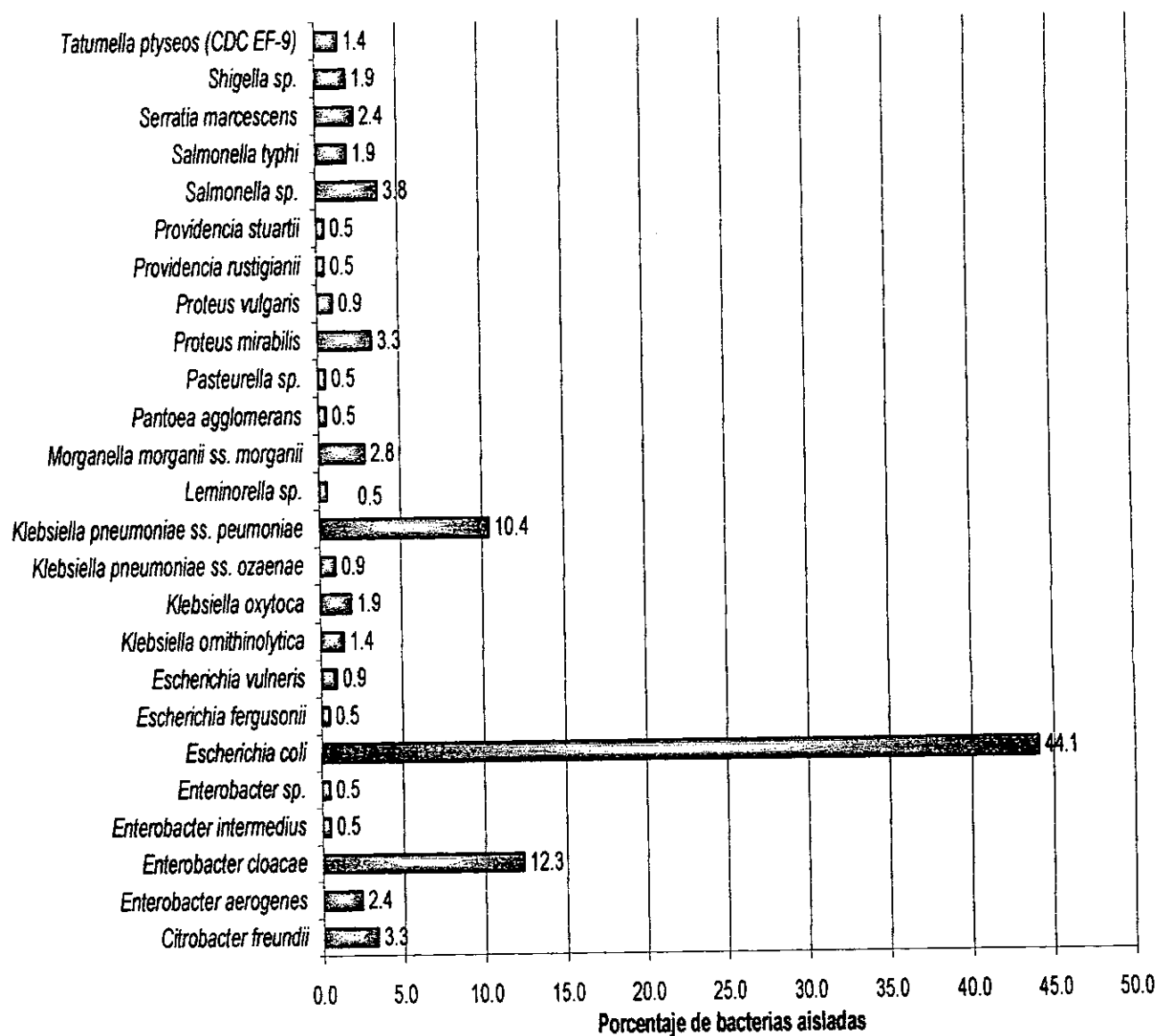
- Tipo de estudio: Descriptivo, transversal.
- Población: Pacientes internados en el Hospital Regional de Occidente *San Juan de Dios* -HROSJD-.
- Tamaño de la muestra: 211 cultivos positivos para diferentes cepas de Enterobacterias, el tamaño de la muestra fue determinado por conveniencia, debido a los recursos disponibles en la institución.

2. Análisis Estadístico

Se llevó a cabo por medio del programa Whonet versión 5.1 que realiza un análisis de frecuencia para la descripción de la población, los resultados se presentaron por medio de gráficas con porcentajes para determinar la frecuencia de cada especie y sus patrones de resistencia.

VIII. RESULTADOS

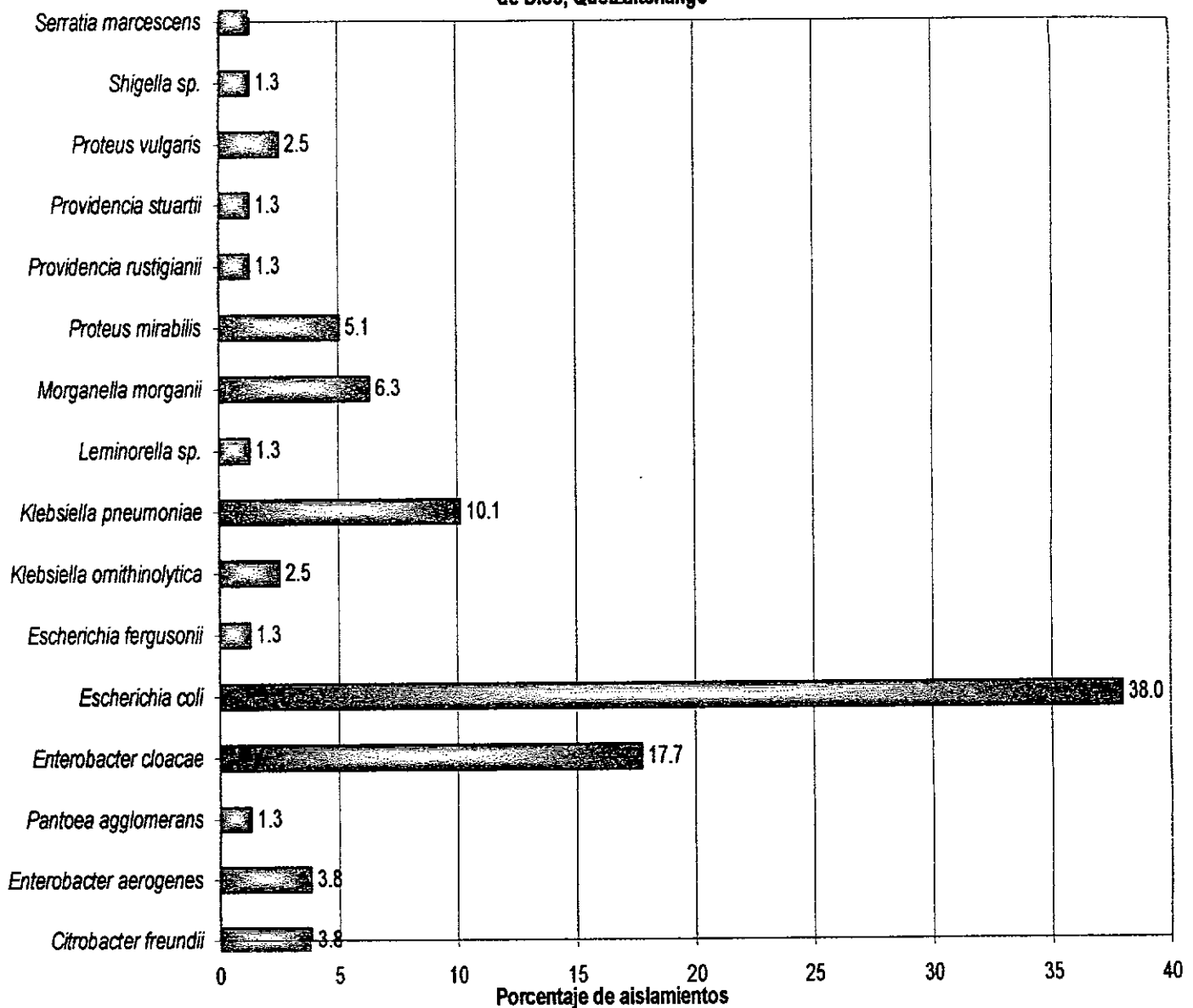
Grafica No. 1 Frecuencia de cada tipo de Enterobacteria aislada en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos experimentales

Esta gráfica demuestra que en todas las muestras de este estudio la Enterobacteria más frecuentemente aislada fue *E. coli*, seguida de *E. cloacae* y *K. pneumoniae* ss. *pneumoniae*.

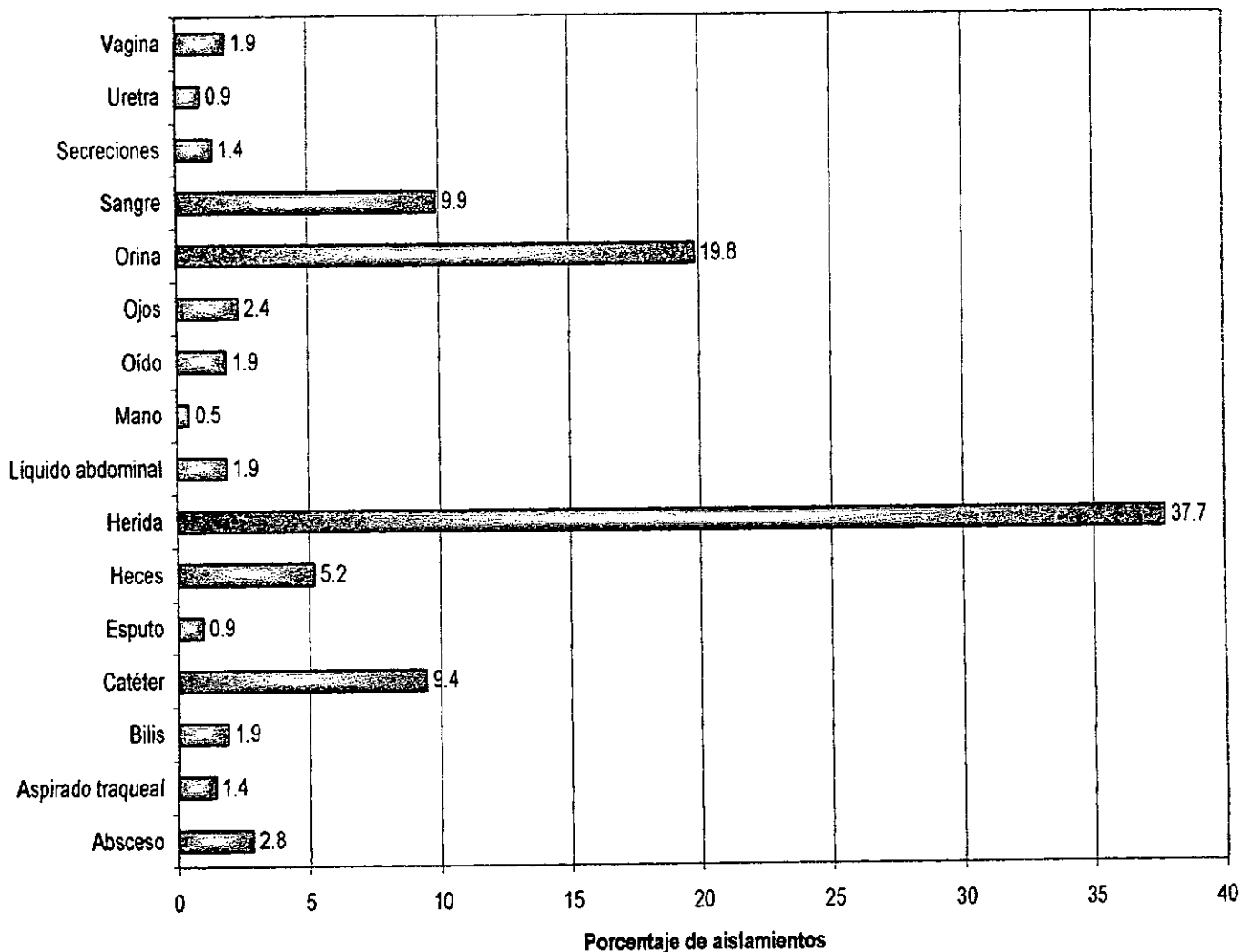
Grafica No. 2 Frecuencia de Enterobacterias aisladas en heridas en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos experimentales

Se puede observar en esta gráfica que en las muestras provenientes de heridas la bacteria más aislada también fue *E. coli*, seguida de *E. cloacae* y *K. pneumoniae*.

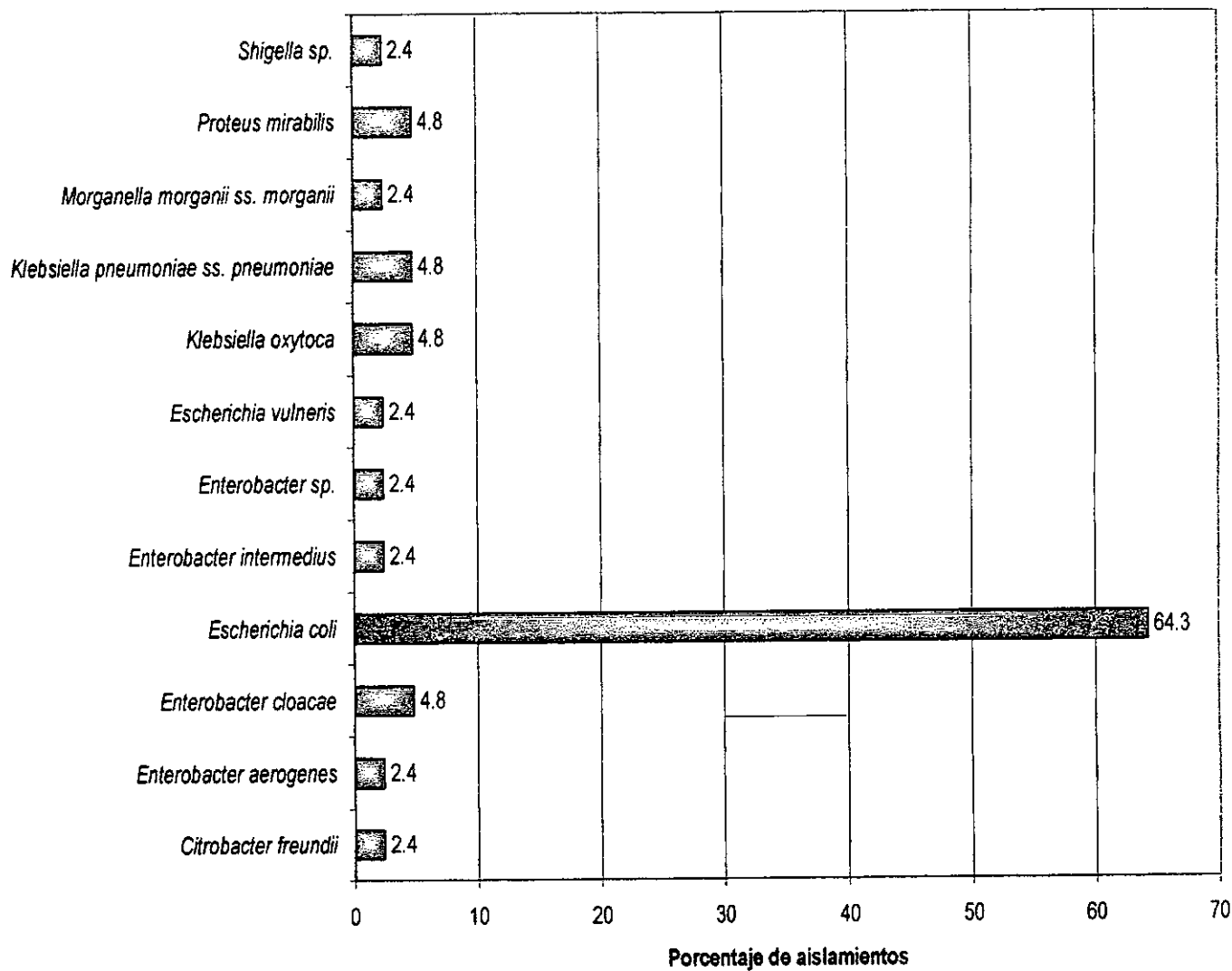
Gráfica No. 3 Porcentaje de aislamientos de Enterobacterias según el tipo de muestra aisladas en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

En esta gráfica se observan todas las muestras en donde se aislaron Enterobacterias siendo las heridas en donde se aislaron en un mayor porcentaje seguidas de las muestras provenientes de orina y catéter.

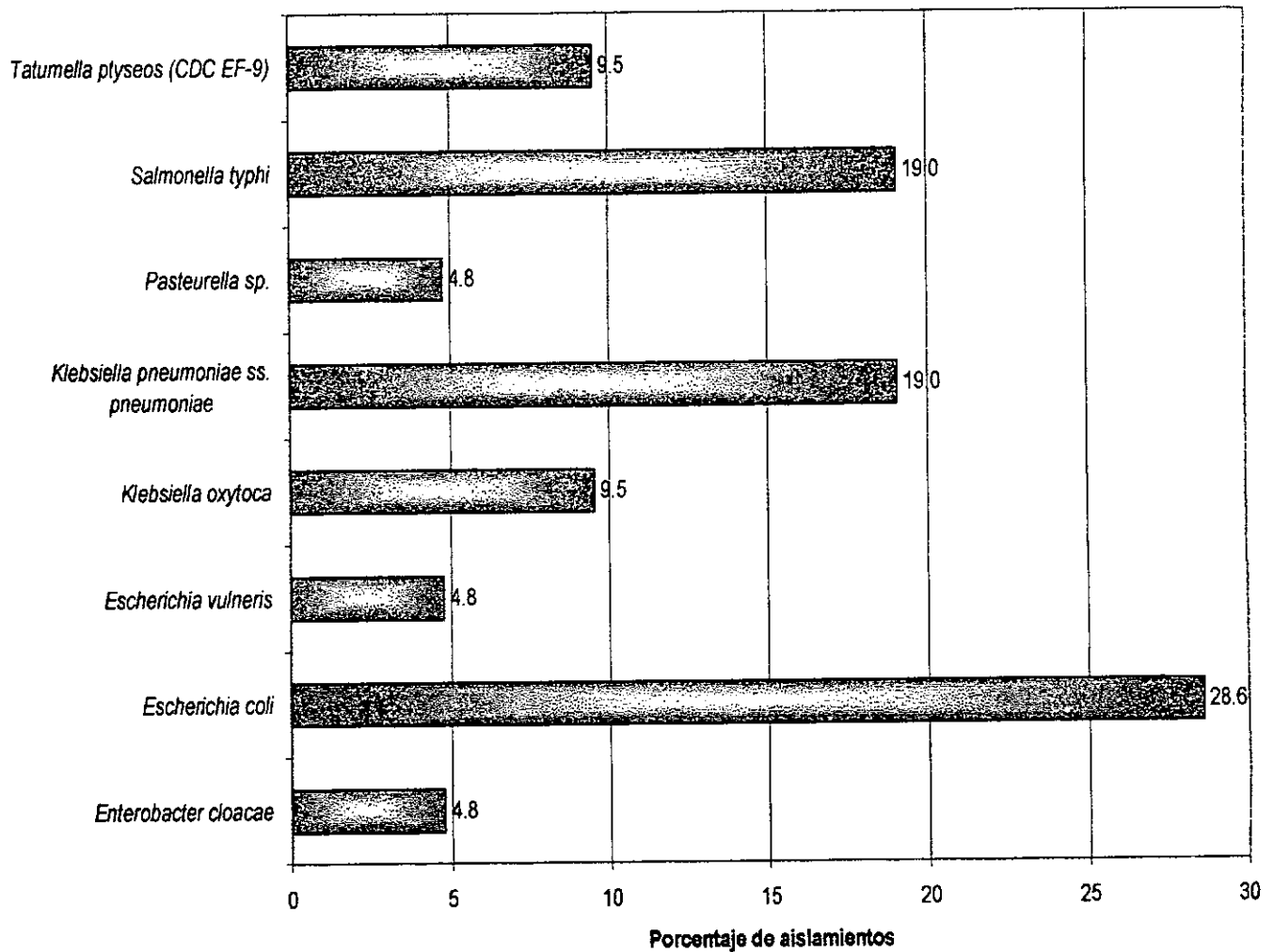
Grafica No. 4 Frecuencia de Enterobacterias aisladas en orina en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

En esta gráfica que se puede observar que en las muestras provenientes de orina la bacteria más frecuentemente aislada fue *E. coli* en un alto porcentaje comparado con las demás Enterobacterias aisladas.

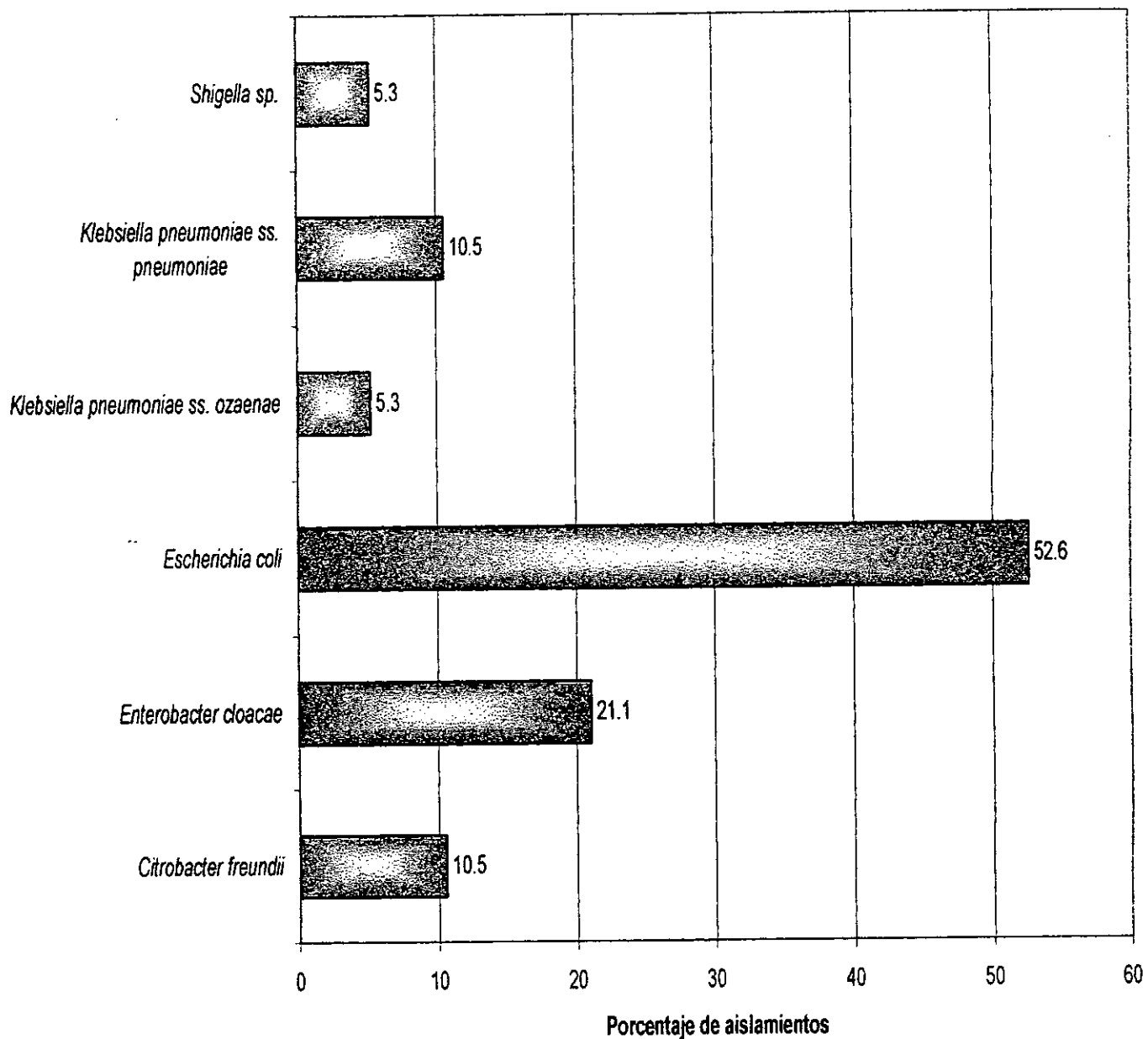
Gráfica No. 5 Frecuencia de Enterobacterias aisladas en sangre en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

Se observa en esta gráfica que la *E. coli* fue la bacteria más aislada en sangre, seguida por *S. typhi* y *K. pneumoniae*

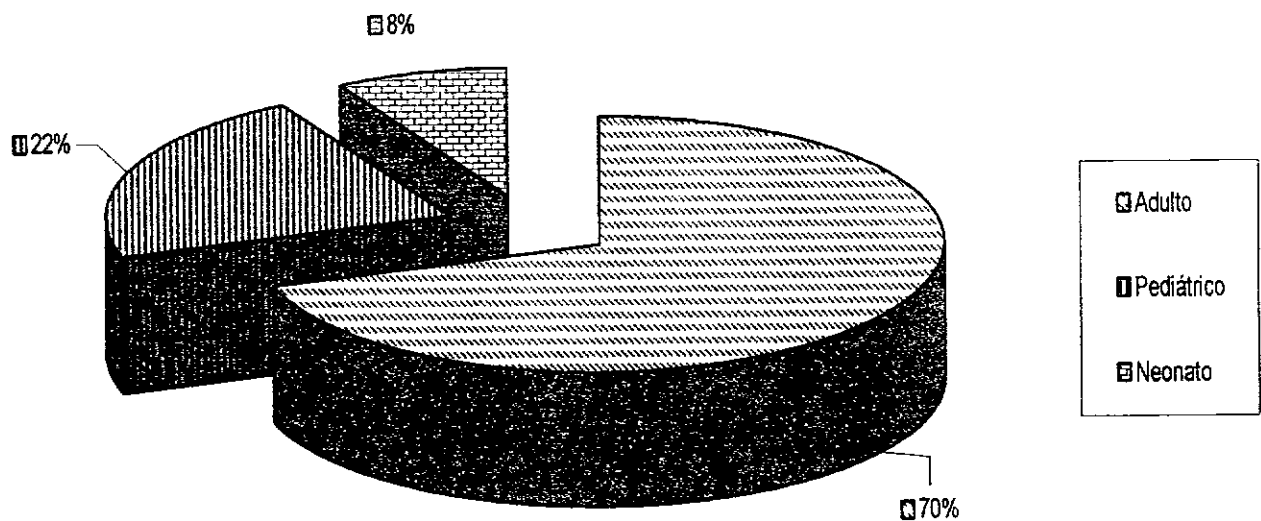
Gráfica No. 6 Frecuencia de Enterobacterias aisladas en catéteres en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

En catéteres se puede observar que también *E. coli* fue la Enterobacteria más frecuentemente aislada seguida de *E. cloacae*, *C. freundii* y *K. pneumoniae ss. pneumoniae*.

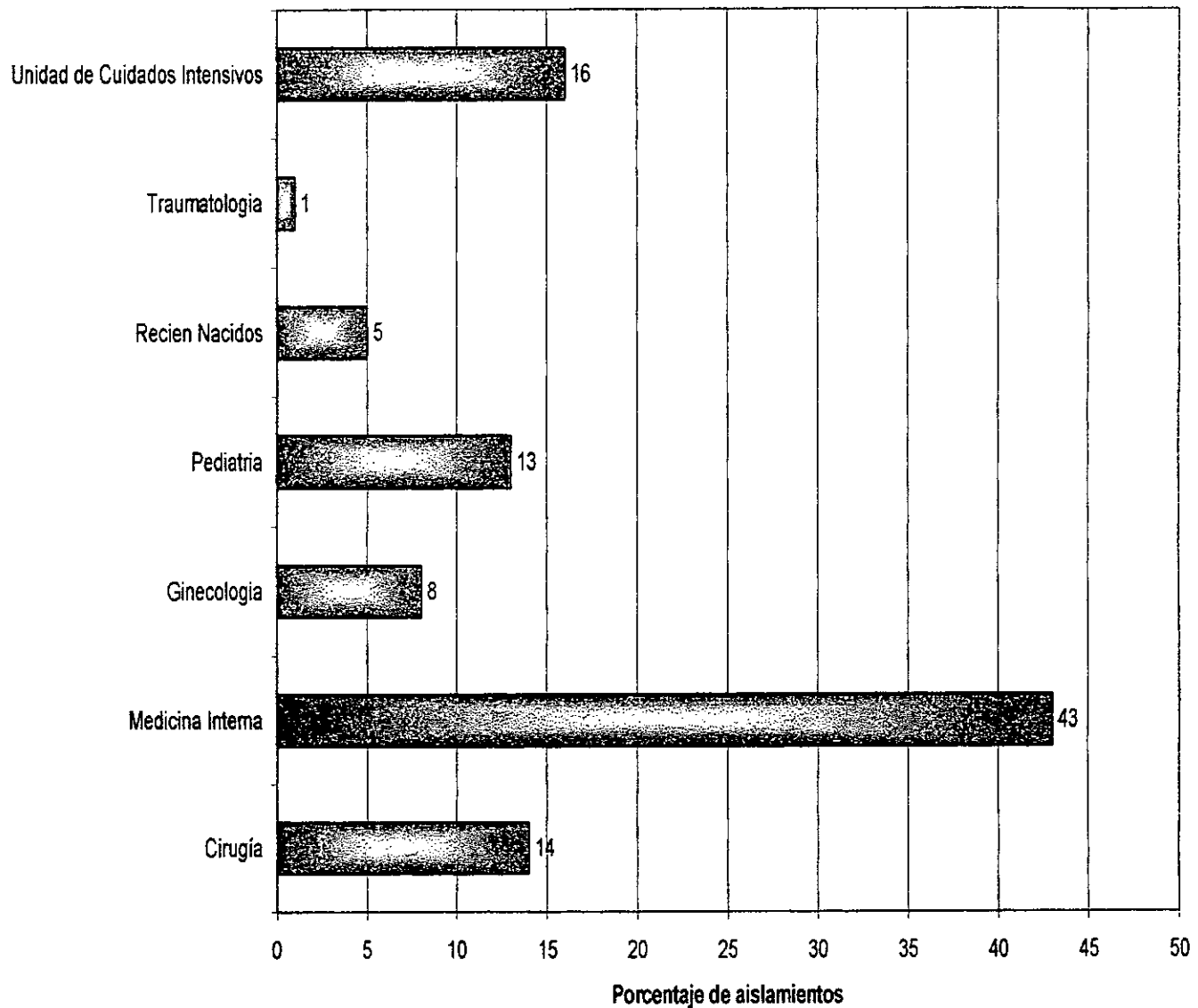
Gráfica No. 7 Porcentaje de aislamiento de Enterobacterias en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango según el tipo de paciente



Fuente: Datos Experimentales

Se puede observar en esta gráfica que en las muestras provenientes de pacientes adultos fue en donde se aislaron Enterobacterias comparado con pacientes pediátricos y neonatos.

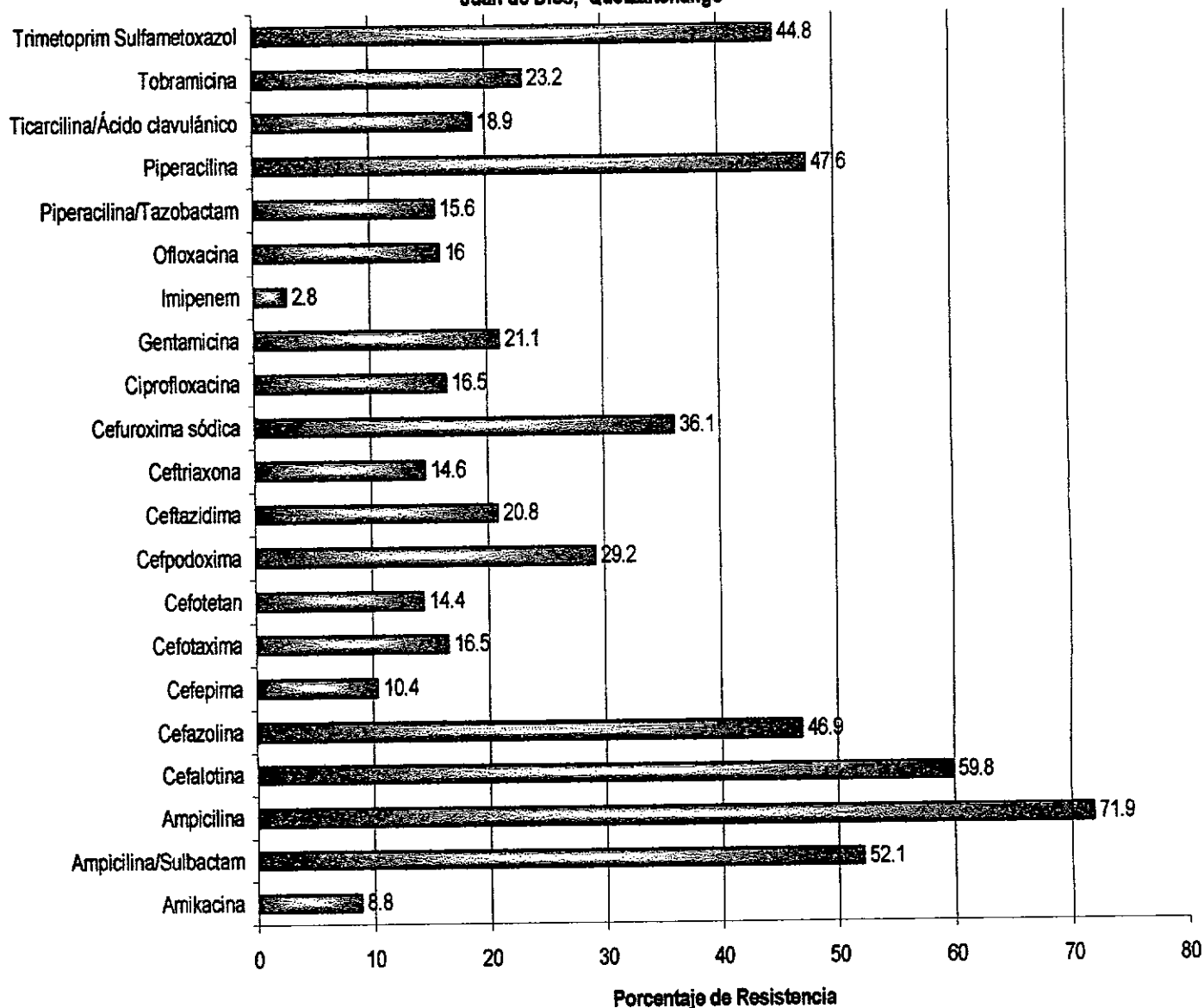
Gráfica No. 8 Porcentaje de aislamientos de Enterobacterias según los servicios en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

Se observa en esta gráfica que en el servicio del Hospital donde más se obtuvieron aislamientos de Enterobacterias fue el servicio de Medicina Interna, seguido de la Unidad de Cuidados Intensivos, Cirugía y Pediatría.

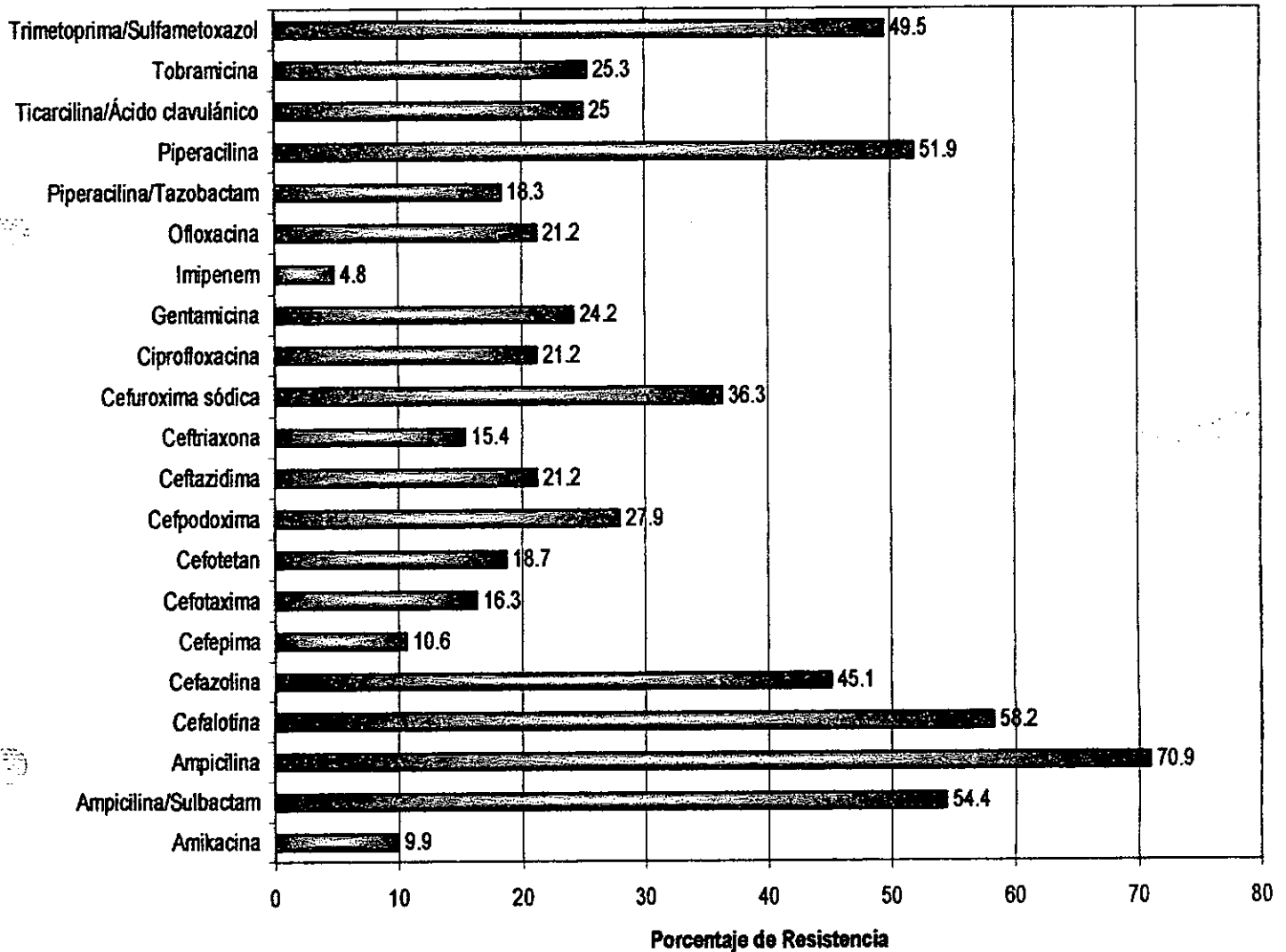
Gráfica No. 9 Porcentaje de Resistencia de Enterobacterias aisladas en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

En esta gráfica se observa que el antibiótico al que se tiene más resistencia en las Enterobacterias aisladas fue la ampicilina, seguido de cefalotina, ampicilina/sulbactam, piperacilina, cefazolina y trimetoprim sulfametoxazol.

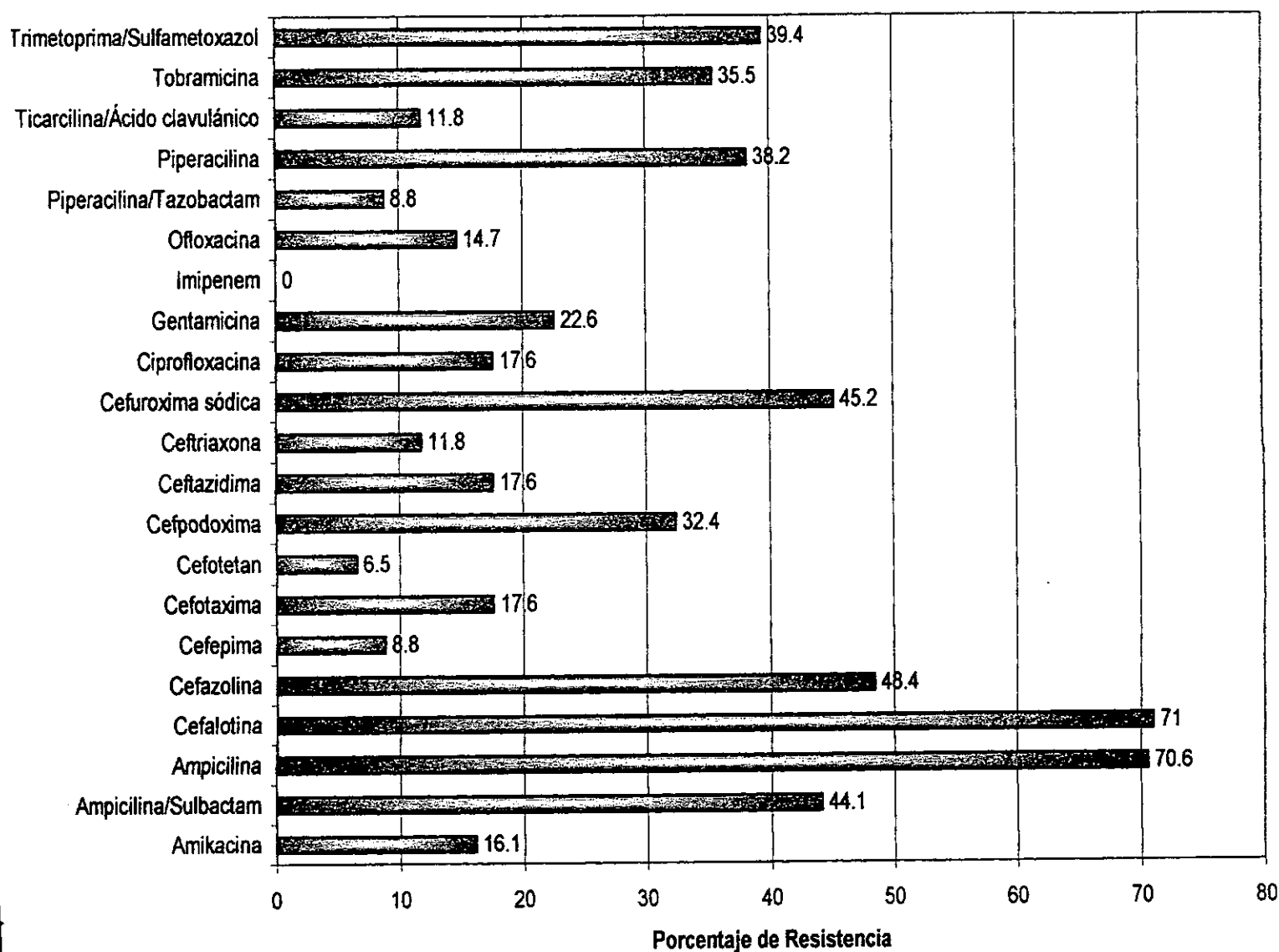
Gráfica No. 10 Porcentaje de Resistencia antibiótica de Enterobacterias aisladas en el servicio de medicina interna en el Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

En el Servicio de Medicina Interna se observa una tendencia similar de resistencia de las Enterobacterias a los antibióticos, siendo la Ampicilina el antibiótico con un porcentaje mayor de resistencia, seguido de cefalotina y ampicilina/sulbactam.

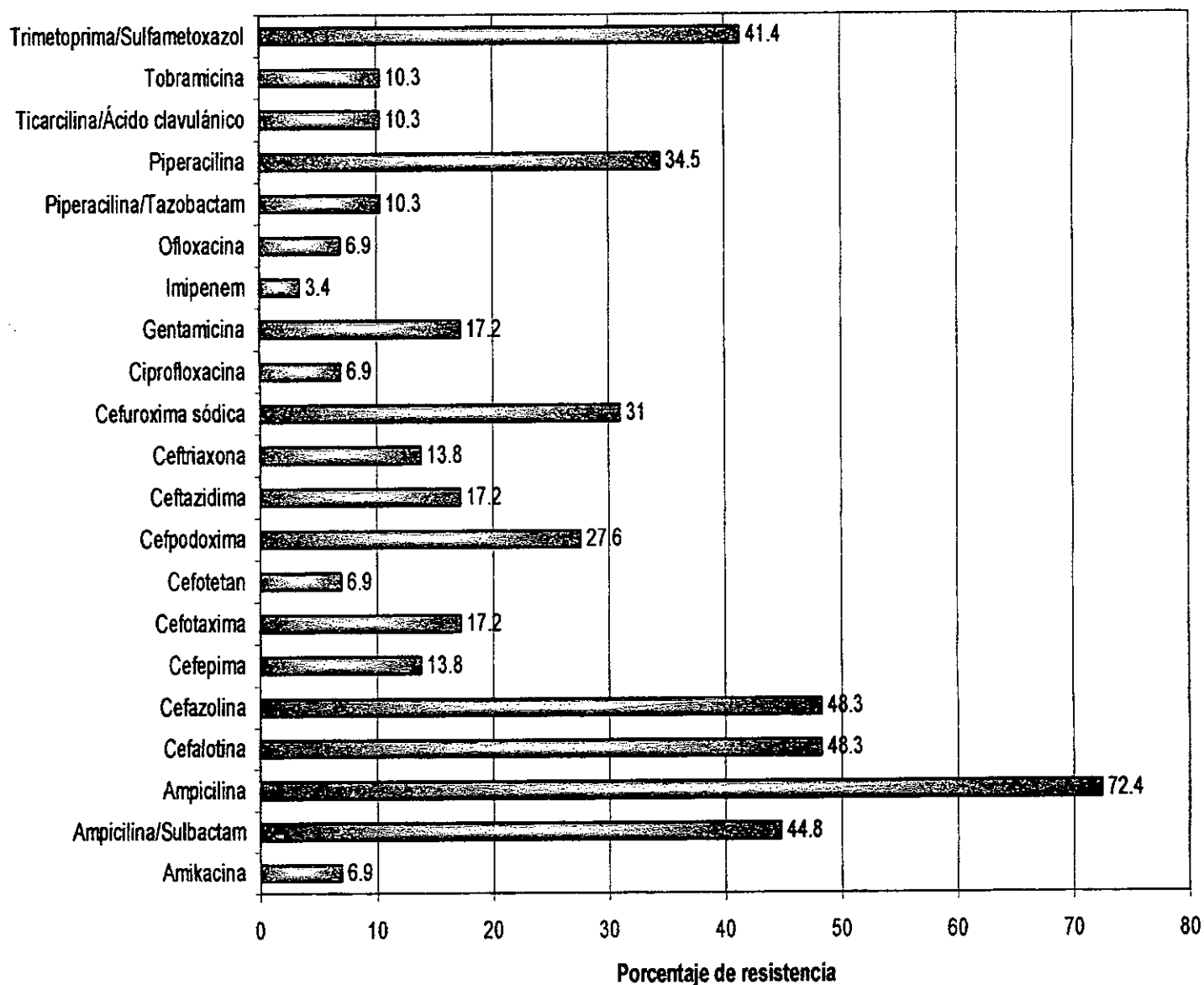
Gráfica No. 11 Porcentaje de Resistencia Antibiótica de Enterobacterias aisladas en unidad de cuidados intensivos en el Hospital Regional de Occidente San Juan Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

En esta gráfica se observa que en la Unidad de Cuidados Intensivos los antibióticos cefalotina y ampicilina fueron a los que las Enterobacterias presentaron una mayor resistencia seguido de cefazolina y cefuroxima sódica.

Gráfica No. 12 Porcentaje de Resistencia antibiótica de Enterobacterias aisladas en el servicio de Cirugía del Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango



Fuente: Datos Experimentales

En el servicio de Cirugía se observó la misma tendencia de los demás servicios, las Enterobacterias presentaron una alta resistencia a ampicilina, cefalotina y cefazolina.

Tabla No. 1. Porcentaje de Resistencia de Enterobacterias aisladas en el HROSJD¹, Quetzaltenango

Microorganismo	#AIs	AMK %R	SAM %R	AMP %R	CEP %R	CZO %R	FEP %R	CTX %R	CTT %R	CPD %R	CAZ %R	CRO %R	CXM %R	CIP %R	GEN %R	IPM %R	OFX %R	TZP %R	PIP %R	TCC %R	TOB %R	SXT %R
<i>Escherichia coli</i>	93	8	57	75	50	30	5	3	10	15	10	1	16	23	14	2	22	5	62	15	17	55
<i>Citrobacter freundii</i>	7	29	86	86	100	71	14	29	57	71	57	43	71	43	43	14	43	57	71	57	43	71
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	0	80	100	100	100	20	0	20	60	60	20	60	0	0	0	0	20	60	20	0	0
<i>Paratuberculosis (Enterobacter) agglomerans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Empedobacter brevis</i>	1	0			100	100	0	100	100	100	0	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	26	8	81	88	96	88	19	62	48	62	54	46	76	15	52	8	15	31	54	50	56	46
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	0	100	0
<i>Escherichia vulneris</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50
<i>Enterobacter sp.</i>	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	3	0	0	100	33	33	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	67
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0	0	50	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae ss. ozaenae</i>	2	0	50	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100
<i>Klebsiella pneumoniae ss. pneumoniae</i>	22	27	46	100	46	41	23	41	0	41	41	41	41	18	32	0	18	36	59	32	41	50
<i>Lemnorea sp.</i>	1	0	0	0	100	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
<i>Morganella morganii ss. morganii</i>	6	0	100	100	100	100	17	0	0	83	17	0	100	0	50	0	0	17	17	0	0	50
<i>Pasteurella sp.</i>	1	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	7	0	0	29	14	14	14	14	0	14	14	14	0	0	0	0	0	14	0	0	0	14
<i>Providencia rustigianii</i>	1	0	100	100	100	100	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella sp.</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella sp.</i>	4	0	50	75	75	75	25	50	0	50	50	50	50	50	50	25	50	50	25	25	25	50
<i>Serratia marcescens</i>	5	0	80	80	80	100	0	0	0	40	0	0	100	20	0	0	20	40	0	0	0	0
<i>Tatumella ptyseos</i>	3	0	33	33	33	0	33	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios
 AMK=Ampikacina, SAM=Ampicilina-Subactam, AMP=Ampicilina, CEP=Cefalotina, CZO=Cefazolina, FEP=Cefepima, CTX=Cefotaxima, CTT=Cefotetan,
 CPD=Cefpodoxima, CAZ=Ceftazidima, CRO=Ceftriaxona, CXM=Cefuroxima, CIP=Ciprofloxacina, GEN=Gentamicina, IPM=Imipenem, OFX=Ofloxacina,
 TZP=Piperacilina-Tazobactam, PIP=Piperacilina, TCC=Ticarcilina-ácido clavulánico, TOB=Tobramicina, SXT=Trimetoprim.

Tabla No.2 Porcentaje de Susceptibilidad de Enterobacterias aisladas en el HROSJD¹, Quetzaltenango

Microorganismo	#Ais	AMK %S	SAM %S	AMP %S	CEP %S	CZO %S	FEP %S	CTX %S	CTT %S	CPD %S	CAZ %S	CRO %S	CXM %S	CIP %S	GEN %S	IPM %S	OFX %S	TZP %S	PIP %S	TCC %S	TOB %S	SXT %S	
<i>Escherichia coli</i>	93	89	26	22	37	61	94	91	88	78	90	88	78	75	84	98	77	81	29	60	74	45	
<i>Citrobacter freundii</i>	7	71	14	14	0	14	86	57	43	14	43	43	29	57	57	86	57	43	29	14	57	29	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	80	0	0	0	0	80	40	40	20	40	40	40	80	100	100	80	40	20	20	100	100	
<i>Pantoea (Enterobacter) agglomerans</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
<i>Empedobacter brevis</i>	1	100			0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	26	68	12	12	0	12	73	38	36	27	46	42	20	85	48	85	85	38	31	31	40	54	
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	100	100
<i>Escherichia vulneris</i>	1		100	100				100				100			100		100				100	100	100
<i>Enterobacter sp.</i>	2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	3	100	67	0	67	67	100	100	100	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100	67	100	100	33
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	100	100	0	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae ss. ozaenae</i>	2	100	50	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	50	100	0
<i>Klebsiella pneumoniae ss. pneumoniae</i>	22	59	50	0	50	59	68	54	96	59	59	54	59	82	68	100	82	54	23	54	54	59	50
<i>Lemnoraella sp.</i>	1	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	100	0	100
<i>Morganella morganii ss. morganii</i>	6	100	0	0	0	0	83	100	100	0	83	100	0	67	50	100	67	83	50	100	100	67	50
<i>Pasteurella sp.</i>	1	100	100	100	0	0	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i>	7	100	100	71	86	71	86	71	100	86	71	86	100	86	100	100	100	100	86	86	100	86	86
<i>Providencia rustigianii</i>	1	100	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
<i>Providencia stuartii</i>	1	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Proteus vulgaris</i>	2	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100
<i>Salmonella sp.</i>	8		100	100			100	100		88	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Salmonella typhi</i>	4		100	100			100	100		100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Shigella sp.</i>	4		25	25			50	50		50	50	50		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<i>Serratia marcescens</i>	5	100	20	20	0	0	100	100	100	20	100	100	0	80	100	100	80	60	60	100	100	100	100
<i>Talurella plyseos</i>	3	100	67	67	100	100	67	100	100	67	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

¹Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios

AMK=Ampicilina, SAM=Ampicilina-Subactam, AMP=Ampicilina, CEP=Cefalotina, CZO=Cefazolina, FEP=Cefepima, CTX=Cefotaxima, CTT=Cefotetan, CPD=Cefpodoxima, CAZ=Ceftazidina, CRO=Ceftroxona, CXM=Cefuroxima, CIP=Ciprofloxacina, GEN=Gentamicina, IPM=Imipenem, OFX=Ofloxacina, TZP=Piperacilina-Tazobactam, PIP=Piperacilina, TCC=Ticarclina-ácido clavulánico, TOB=Tobramicina, SXT=Trimetoprim.

Tabla No. 3 Porcentaje de No Susceptibilidad (%R+%) de Enterobacterias aisladas en el HROSJD¹, Quetzaltenango

Microorganismo	#ais	AMK %NS	SAM %NS	AMP %NS	CEP %NS	CZO %NS	FEP %NS	CTX %NS	CTT %NS	CPD %NS	CAZ %NS	CRO %NS	CXM %NS	CIP %NS	GEN %NS	IPM %NS	OFX %NS	TZP %NS	PIP %NS	TCC %NS	TOB %NS	SXT %NS	
<i>Escherichia coli</i>	93	11	74	78	63	39	6	9	12	22	10	12	22	25	16	2	23	19	71	40	26	55	
<i>Citrobacter freundii</i>	7	29	86	86	100	86	14	43	57	86	57	57	71	43	43	14	43	57	71	86	43	71	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	20	100	100	100	100	20	60	60	80	60	60	60	20	0	0	20	60	80	80	80	0	0
<i>Parathea (Enterobacter) agglomerans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Empedobacter brevis</i>	1	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	26	32	88	88	100	88	27	62	64	73	54	58	80	15	52	15	15	62	69	69	60	46	100
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	50
<i>Escherichia vulneris</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	3	0	33	100	33	33	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0	0	100	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae ss. ozaenae</i>	2	0	50	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	50	0	100
<i>Klebsiella pneumoniae ss. pneumoniae</i>	22	41	50	100	50	41	32	46	4	41	41	46	41	18	32	0	18	46	77	46	41	50	0
<i>Lemnirella sp.</i>	1	100	0	100	100	100	0	100	100	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0
<i>Morganella morganii ss. morganii</i>	6	0	100	100	100	100	17	0	0	100	17	0	100	33	50	0	33	17	50	0	0	33	50
<i>Pasteurella sp.</i>	1	0	0	0	100	100	0	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	7	0	0	29	14	29	14	29	0	14	29	14	0	14	0	0	0	14	14	14	0	14	14
<i>Providencia rustigianii</i>	1	0	100	100	100	100	0	0	100	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0
<i>Salmonella sp.</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella sp.</i>	4	0	75	75	75	0	50	50	0	50	50	50	50	50	25	50	50	50	50	50	50	50	50
<i>Serratia marcescens</i>	5	0	80	80	100	100	0	0	0	80	0	0	100	20	0	0	0	20	40	40	0	0	0
<i>Tatumella pyseos</i>	3	0	33	33	0	0	33	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Hospital Regional de Occidente San Juan de Dios

AMK=Aminikacina, SAM=Ampicilina-Sulbactam, AMP=Ampicilina, CEP=Cefalotina, CZO=Cefazolina, FEP=Cefepima, CTX=Cefotaxima, CTT=Cefotetan, CPD=Cefpodoxima, CAZ=Ceftazidima, CRO=Ceftriaxona, CXM=Cefuroxima, CIP=Ciprofloxacina, GEN=Gentamicina, IPM=Imipenem, OFX=Ofloxacina, TZP=Piperacilina-Tazobactam, PIP=Piperacilina, TCC=Ticarcilina-ácido clavulánico, TOB=Tobramicina, SXT=Trimetropim.

En la Tabla No. 1 se observa que de todas las Enterobacterias, *E. coli* fue la que más frecuentemente se aisló ya que de 211 cultivos positivos para Enterobacterias en 93 cultivos se aisló *E. coli*, también se puede observar que esta Enterobacteria sigue la tendencia de las demás, ya que presenta una alta resistencia a los antibióticos ampicilina, piperacilina y ampicilina/sulbactam.

Se observa también que *E. cloacae* fue la segunda Enterobacteria más aislada con 26 cultivos positivos para la misma, presentando una alta resistencia a cefalotina, ampicilina y cefazolina.

K. pneumoniae ss. pneumoniae presentó una resistencia del 100% a la ampicilina, resistencia que es de tipo constitutiva, seguida de piperacilina y cefalotina.

En la Tabla No. 2 se observan los porcentajes de susceptibilidad de las Enterobacterias aisladas, siendo para *E. coli* el imipenem, cefepima, cefotaxima y amikacina los antibióticos a los que la misma presenta una mayor susceptibilidad. Para *E. cloacae* el imipenem, ofloxacina y amikacina fueron los antibióticos en donde se obtuvo un mayor porcentaje de susceptibilidad, y para *K. pneumoniae ss. pneumoniae* el imipenem, cefotetan y ciprofloxacina.

En la tabla No. 3 se presenta el porcentaje de no susceptibilidad de las Enterobacterias siendo para *E. coli* el más alto para la ampicilina, seguido de ampicilina-sulbactam y piperacilina, similar al porcentaje de resistencia observado anteriormente. *E. cloacae* presentó un alto porcentaje de no susceptibilidad a cefalotina, ampicilina, ampicilina/sulbactam y cefazolina. Para *K. pneumoniae ss. pneumoniae* el porcentaje más alto fue para la ampicilina, piperacilina, ampicilina/sulbactam y cefalotina.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La vigilancia en el comportamiento de los microorganismos y su susceptibilidad antimicrobiana es una de las principales armas de defensa contra la diseminación de resistencia en los hospitales y en la comunidad.

En el presente estudio se analizó un total de 211 cultivos positivos para Enterobacterias de diversos orígenes, aisladas de pacientes internos del Hospital regional de occidente San Juan de Dios, Quetzaltenango con el fin de identificarlas y determinar sus patrones de susceptibilidad antibiótica.

Como se puede observar en la Gráfica No. 1, del total de Enterobacterias aisladas el 67% corresponden a *Escherichia coli* (44.1%), seguida de *Enterobacter cloacae* (12.3%) y *Klebsiella pneumoniae* ss *pneumoniae* (10.4%), por lo que se determinó que estas Enterobacterias son frecuentes en la mayoría de procesos infecciosos. Sin embargo, no se debe descartar a las demás Enterobacterias aisladas en menor proporción, que también pueden ser importantes como agentes infecciosos.

En la Gráfica No. 2 se puede observar el aislamiento de *Enterobacter intermedius* proveniente de una herida, este aislamiento es bastante raro ya que, según la literatura, este microorganismo sólo se aísla de muestras provenientes de agua y tierra, y no se reportan aislamientos en humanos, por lo que se puede inferir que este aislamiento es producto de contaminación en la toma de muestra (1).

En la Gráfica No. 3 se observa que con respecto al origen de la muestra, se encontró el 38% de aislamientos corresponden a heridas, seguido por cultivos de orina (20%), sangre (10%) y cultivos de catéter (9%). En las Gráficas No. 2, 4, 5 y 6 se puede observar que en estas muestras la bacteria que predominó fue *Escherichia coli*, resultados que concuerdan con la literatura, ya que *Escherichia coli* está presente en el tracto gastrointestinal y es la Enterobacteria que con más frecuencia causa sepsis bacteriana, meningitis neonatal, infección del tracto urinario y enfermedades de tipo oportunista y por lo tanto es frecuente aislarla de dichas muestras (4).

Con respecto a los aislamientos obtenidos en catéteres, en la Gráfica No. 3 se observa que constituyen un 9% de los aislamientos en el Hospital, resultados que permiten inferir que existe un alto grado de contaminación del personal hospitalario hacia el paciente debido al incumplimiento de las normas básicas de higiene y bioseguridad, al momento de realizar curaciones y procesos invasivos al paciente como cambio y retiro del catéter, lo que provoca que se desarrollen infecciones intrahospitalarias que afectan la salud ya deteriorada del paciente.

En los aislamientos provenientes de orina la Enterobacteria más frecuentemente aislada es *Escherichia coli*, en un 64%, como se puede observar en la gráfica No. 4, lo cual concuerda con estudios anteriores realizados en el hospital y en otros hospitales latinoamericanos en donde reportan a este microorganismo como el más frecuentemente aislado en los urocultivos en similar porcentaje (10,29)

En la gráfica No. 7 se observa que en este estudio el tipo de paciente en el que más frecuentemente se aislaron Enterobacterias fue en adultos con un 70%, seguido de niños 22 % y neonatos con un 8 %.

De los servicios que se analizaron, en la gráfica No. 8 se evidencia que en los servicios de Medicina Interna, Intensivo de Adultos y Cirugía fue en los que se obtuvieron los porcentajes más altos de aislamiento, 43%, 16% y 14%, respectivamente, lo que evidencia que, además de los procesos infecciosos provocados por las Enterobacterias, existe un grado alto de contaminación de paciente a paciente o del personal hacia el paciente, lo que se puede atribuir a diversos factores, entre ellos la falta de supervisión del personal por los jefes de servicio, falta de capacitación y educación del mismo en las precauciones que se deben tomar al momento de realizar procesos y al tratar al paciente y otras causas como el hacinamiento en las salas debido a la falta de recursos, lo que hace que los pacientes compartan el mismo ambiente y los mismos materiales.

La resistencia de las Enterobacterias y de otras bacterias Gram negativo, está fundamentalmente asociada con la producción de enzimas hidrolizantes a nivel del puente B-lactámico del anillo 7 aminocefalosporínico, particularmente de la clase 1 de las B-lactamasas cromosomales y plásmido dependiente, así como las consideradas B-lactamasas de espectro ampliado. Muchas de estas bacterias poseen otros

mecanismos de resistencia, como puede ser, una membrana celular impermeable (30,31)

Con respecto a los patrones de susceptibilidad encontrados hacia los distintos antibióticos, en la gráfica No. 9 se observó que, independientemente del origen de la muestra, se encontró un porcentaje alto de resistencia de las Enterobacterias hacia la ampicilina (71.9%), cefalotina (59.8%) y cefazolina (46.9%), lo que no concuerda con la literatura ya que estos antibióticos se consideran tratamientos de elección para las Enterobacterias y, en este caso, el tratamiento con los mismos, resultaría ineficaz. Esto es reflejo del uso irracional que tienen estos medicamentos, los que son recetados muchas veces de manera empírica en la comunidades, ya que en la mayoría de farmacias son vendidos sin receta e incluso también en hospitales. Aunado a ello se encuentra la falta de políticas definidas, acordes a la realidad epidemiológica de la institución, referentes a la utilización de antibióticos en el Hospital y la ausencia de estudios de vigilancia de los patrones de susceptibilidad antibiótica, lo que trae como consecuencia que se utilicen, como primera elección, antibióticos a los que las bacterias en un alto porcentaje ya no son susceptibles.

Los antibióticos a los que las Enterobacterias presentaron menor resistencia son imipenen, amikacina, cefepime y piperacilina-tazobactam, por lo que deben ser tomados en cuenta para el tratamiento de las mismas.

Con respecto al porcentaje de resistencia encontrado en la bacteria más frecuentemente aislada *Escherichia coli*, en la Tabla No. 1 se observa que un alto porcentaje de resistencia se obtuvo frente a ampicilina (75%), piperacilina (62%), ampicilina-sulbactam (57%) y cefalotina (50%), en la Tabla No. 2 se puede observar que se encontró alto porcentaje de susceptibilidad a imipenem (98%), cefepima (94%), ceftazidima (90%) y amikacina (89%), datos similares a los obtenidos en estudios realizados anteriormente en el Hospital (10).

El *Enterobacter cloacae* presentó un alto porcentaje de resistencia a ampicilina, ampicilina sulbactam, cefazolina y a la mayoría de cefalosporinas de tercera generación, lo que concuerda con estudios en donde se documenta que este microorganismo es usualmente resistente a ampicilina y pueden ser resistente a cefalosporinas por la producción constitutiva de cefalosporinasas activas sobre

antibióticos de amplio espectro. En base a ello, es de esperarse una asociación entre la exposición intensiva a B-lactámicos y el desarrollo de infecciones de importancia clínica con este microorganismo. Este microorganismo presentó un menor porcentaje de resistencia a cefepima, esto se explica debido a que este antibiótico es uno de los más recientes en nuestro país; cabe mencionar que esta cefalosporina de cuarta generación posee bondades en su estructura que la posicionan con ventajas sobre las cefalosporinas de tercera generación como lo son entre otras, la capacidad de penetrar a través de los canales porínicos de *Escherichia coli*, y *Enterobacter cloacae* con mayor rapidez que la ceftazidima y cefotaxima, además que es más estable a los efectos de las B-lactamasas (32,33).

De particular interés es el resultado que se observa en la Tabla No. 1 con respecto a la resistencia antibiótica de *E. coli* y *Klebsiella sp.* a ceftazidima y ceftriaxona, la que va de un 15 a un 41%, lo que refleja, según estudios realizados, la producción de B-lactamasas de espectro ampliado, indicación de resistencia a todas las cefalosporinas de tercera generación. Este hallazgo debe alertar hacia el uso más restringido y controlado de las cefalosporinas de tercera generación para limitar la diseminación de resistencia de las mismas (34).

Cabe resaltar que en la mayoría de aislamientos el porcentaje de no susceptibilidad (Porcentaje de resistencia + Porcentaje de susceptibilidad intermedia), fue evidentemente más alto que el porcentaje de resistencia, como se observa en la Tabla No. 3, lo que nos debe alertar sobre un aumento progresivo de la resistencia antibiótica, ya que este porcentaje involucra el porcentaje de susceptibilidad intermedia, en donde es necesario altas dosis de antibiótico para que sea eficaz el tratamiento.

También se llevó a cabo una comparación entre los servicios que con mayor frecuencia presentan multiresistencia, encontrándose, como se puede observar en las Gráficas No. 10 y 11, que en los servicios de Medicina Interna y Cuidados Intensivos de adultos, la ampicilina, cefazolina y ampicilina-sulbactam presentan el mayor porcentaje de resistencia y la menor resistencia fue hacia imipenem y cefepima. Dado que en el servicio de Medicina Interna es donde existe mayor contacto con el paciente, por consiguiente es mayor el riesgo de infectar a los otros pacientes. Por otro lado, en el servicio de cuidados intensivos existen otros factores de riesgo como: pacientes ventilados, utilización de procesos invasivos en los pacientes como catéteres vasculares

y soluciones endovenosas; lo que aumenta el riesgo de contaminación con microorganismo que ya son resistentes a estos antibióticos.

Como se puede observar en la Gráfica No. 12, en el servicio de Cirugía se encontró un patrón similar en los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia, siendo estos ampicilina, cefazolina, cefalotina y ampicilina-sulbactam y encontrándose una menor resistencia a imipenem, cefotetan, ciprofloxacina, y amikacina. Esto se atribuye a la manipulación de material quirúrgico contaminado, alto consumo de antibióticos, alto contacto del paciente con el personal del Hospital en procesos de curaciones, intervenciones quirúrgicas, etc.

El patrón de resistencia en las diferentes salas, es comparable a los obtenidos en Hospitales de Referencia en Guatemala como los son el Hospital Roosevelt y el Hospital San Juan de Dios (34).

Los estudios de susceptibilidad antibiótica como el presente resultan muy importantes desde el punto de vista epidemiológico. Ellos permiten la elaboración de políticas de antibióticos para el uso adecuado y racional de los mismos, aumentar la calidad de atención al paciente, proteger la vida útil de estas drogas, observar la tendencia de la etiología de las bacteremias y de la resistencia de las cepas aisladas en pacientes con diferentes patologías para definir estrategias de prevención ante la emergencia de cepas resistentes. El uso racional y limitado de los nuevos antibióticos debe ser la tendencia actual para tratar de disminuir la selección de cepas resistentes y multirresistentes, por lo tanto hay que estructurar equipos multidisciplinarios enfocados en prevenir la aparición de cepas intratables a través de la utilización con equidad de los antibióticos.



X. CONCLUSIONES

1. Del total de Enterobacterias aisladas, del 67% corresponden a *Escherichia coli* (44.1%), seguida de *Enterobacter cloacae* (12.3%) y *Klebsiella pneumoniae* ss *pneumoniae* (10.4%).
2. Con respecto al origen de la muestra, los aislamientos más frecuentes fueron en heridas (38%), seguido por cultivos de orina (20%), sangre (10%) y catéter (9%).
3. En todas las muestras la Enterobacteria aislada en mayor porcentaje fue *Escherichia coli*.
4. Los tipos de pacientes en los que se aisló Enterobacterias con mayor frecuencia fueron, en su orden adultos (70%), seguidos de niños (22) y neonatos (8%).
5. En los servicios de Medicina Interna, Cuidados Intensivos y Cirugía fueron en los que se obtuvo los porcentajes más altos de aislamiento de Enterobacterias 43%, 16% y 14% respectivamente.
6. Independientemente del origen de la muestra, se encontró un porcentaje alto de resistencia de las Enterobacterias hacia la ampicilina cefalotina y cefazolina y menor resistencia a imipenen, amikacina, cefepime y piperacilina-tazobactam.
7. En la bacteria más frecuentemente aislada, *Escherichia coli*, se observó que un alto porcentaje de resistencia frente a ampicilina, piperacilina, ampicilina-sulbactam y cefalotina,
8. *Enterobacter cloacae* presentó un alto porcentaje de resistencia a ampicilina, ampicilina sulbactam, cefazolina y a la mayoría de cefalosporinas de tercera generación.

9. Se observó una resistencia considerable, tanto de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp. a ceftazidima y ceftriaxona, lo que refleja la posible producción de β -lactamasas de espectro ampliado.
10. En la mayoría de aislamientos, el porcentaje de no susceptibilidad fue evidentemente más alto que el porcentaje de resistencia, lo que debe alertar sobre un aumento progresivo de la resistencia antibiótica,
11. En el servicio de Medicina Interna y Cuidados Intensivos, la ampicilina, cefazolina y ampicilina-sulbactam presentan el mayor porcentaje de resistencia y la menor resistencia observada fue hacia imipenem y cefepima.
12. El patrón de resistencia antimicrobiana en los servicios de Cirugía fue similar al observado en los otros servicios, observándose mayor porcentaje de resistencia hacia ampicilina, cefazolina, cefalotina y ampicilina-sulbactam; mientras que la menor resistencia observada fue hacia imipenem, cefotetan, ciprofloxacina y amikacina.
13. La utilización de antibióticos de forma irracional, hace que el tratamiento del paciente se vuelva ineficaz, aumenten los costos de hospitalización y que la enfermedad se complique y se prolongue.
14. La falta de políticas definidas, acuerdo a la realidad epidemiológica de la institución, referentes a la utilización de antibióticos en el Hospital y la ausencia de estudios de vigilancia de los patrones de susceptibilidad antibiótica, incide en el uso, como primera elección, de antibióticos a los que las bacterias, en un alto porcentaje, ya no son susceptibles.
15. Los estudios de susceptibilidad antibiótica como el presente, permiten la elaboración de políticas para el uso adecuado y racional de los antibióticos, cuyo objetivo primordial sería disminuir la selección de cepas resistentes y multirresistentes, para, consecuentemente, evitar que aumente la resistencia antibacteriana.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar toma de muestras adecuadas para obtener resultados confiables y evitar contaminación de las muestras.
2. Evitar el uso indiscriminado de antibióticos dentro de los servicios del Hospital.
3. Proporcionar al paciente las indicaciones correctas sobre dosis y duración del tratamiento con antibióticos, con el objeto de evitar el aumento de la resistencia por uso inadecuado de los mismos.
4. Realizar programas de educación continua para el personal sobre las normas de higiene y bioseguridad que se tienen que seguir, con el fin de evitar el aumento de infecciones nosocomiales.
5. Efectuar estudios similares frecuentemente, con el fin de monitorear constantemente los cambios en los patrones de susceptibilidad antimicrobiana que se observan en los microorganismos con el tiempo.
6. Establecer protocolos de tratamiento, según el tipo de servicio, en base a estudios como el presente.
7. Estructurar equipos multidisciplinarios enfocados en prevenir la aparición de microorganismos multirresistentes.

XII. REFERENCIAS

1. Koneman EW., Diagnóstico Microbiológico. 5 ed. Estados Unidos: Editorial Médica Panamericana, 1999. 1359p. (172-250, 764-832)
2. Jawetz E., Manual de Microbiología Médica. 3 ed. México: El Manual Moderno, 1990 589p. (209-253).
3. Linton AH., General Microbiology and inmunity. 8 ed. Gran Bretaña: Vols. 2, vol 1. 683p. (232-250).
4. Murray P. et al. Microbiología Médica. Trad. Servicios integrales de edición. España: Mosby, 1995. 725p. (107-116).
5. Koneman EW., Color Atlas and textbook of diagnostic Microbiology. 4 ed. Philadelphia: JB. Lippincott Company, 1992. 1115p. (315-406).
6. Dulbecco, D. Tratado de Microbiología. 2ª Ed. Barcelona, España. Editorial Salvat. 1978. 1491 pp (796-804)
7. Horton, R. Bioquímica. 2ª. Ed. México. Prentice may Hispanoamericana. 1,995. 1536 pp. (12.2-12.25)
8. Bolows A., *et al.* Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C: 1992. 1289p. (222 - 238).
9. Yoklik W. Et al. Microbiología. 20 ed. Trad. Bosaca. Argentina. Editorial Medica Panamericana, 1997. 1,696 pp
10. Ramos Zepeda GA., Resistencia Bacteriana en Medicina Interna. Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas de Quetzaltenango) 2001. 89p
11. Cisneros, C. Mecanismos de farmacoresistencia en poblaciones y subpoblaciones bacterianas. México. 1,997. (18-25)
12. Har, CA. 1,998. Antibiotic resistance: an increasing problem?. BMJ , 25 Abr 316 pp 1255-1256

13. Levy, S. 1998. Multidrug Resistance: A Sign of the Times. *New Engl J Med*, 7 May; 338 pp 19
14. Levy SB. 1996. Editorial Response: antibiotic resistance worldwide-A Spanish Task Force responds. *Clinical Infectious Disease* 23 pp 824-826
15. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., & Nakamura S. 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: pp.1271.
16. Torroba, et al. 2000. Resistencia antimicrobiana y política de antibióticos: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/suple11.html>
17. Levy, Stuart. The Challenge of Antibiotic Resistance. *Scientific American*. <http://www.sciam.com/1998/0398issue/0398levy.html>
18. Ilczyszyn, G., Hurí, J. 1999. Resistencia antimicrobiana: Curva ascendente en Latinoamérica <http://www.healthiq.com/infecciones/congreso.html>
19. Acosta, G. et al. 1998. Reporte técnico de vigilancia. Volumen 3 No. 4 mayo. Publicación de análisis y unidades de tendencias. Ministerio de Salud. Cuba. http://bvs.sld.cu/uats/rtv_files/rtv0498.htm#tetraciclina
20. Philippon A., Labia R., & Jacoby G. 1989. Extended spectrum beta lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 pp 1131.
21. Jacoby G., Archer G. 1991. New Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *New Engl. J. Med.* pp 324: 601.
22. Alos JI, Carnicero M. 1997. Consumo de antibióticos y resistencia bacteriana a los antibióticos: "algo que te concierne". *Med Clin*, 109: pp 264-270.
23. Korfmann G., Wiedeman B. 1988. Genetic control of beta lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Rev. Infect. Dis.* 10 pp 793.
24. Barry, A.L. 1986. Procedure for testing antimicrobial agent in Agar Media: Therotical consideration in Loarian V. ed *Antibiotics in Laboratory Medicine 2* Baltimore. Williams and Wilkins.

25. Gaynes, R. 1997. Surveillance of Nosocomial Infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology* pp 18.
26. Centers for Disease Control. 1992. Public Health Focus: Surveillance, prevention, and control of Nosocomial Infections. *MMWR* 41:pp 783-787.
27. Scheckler WE, et al. 1998. Requirements for infrastructure and essential activities of infection control and epidemiology in hospitals: a consensus panel report. *Infect Control Hosp Epidemiol* ; 19: pp. 114-24.
28. Haley RW, Culver DH, et al. 1985. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in U.S. hospitals. *Am J Epidemiol* 121: pp. 182-205
29. Herrera, L. et al. 2000. Sensibilidad Antimicrobiana, Hospital de San José de Costa Rica de 1,995 a 1,999. *Revista de RECCAVIR* 1: pp.37-391
30. Sahm D, Tenover F. 1999. Surveillance for the emergente and dissemination of antimicrobial resistace in bacteria. *Infectious Disease Clinics of North américa.* 11: pp 782-783.
31. Shales D, et al. 1997. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America joint comite on the prevention of antimicrobial resistance: Guidelines for the prevention of resistance in hospitals. *Clinical Infectous Disease.* 25: pp 584-587.
32. Brown, A. 1993. The Changing epidemiology of infection at cancer hospitals. *Clinical Infectious Diseases.* 17: pp 322.
33. Bodey, G. et al. 1992. Bacteremia caused by *Enterobacter*. 15 years of experience in a cancer hospital. *Review of Infectious Disease.* 13: pp 550.
34. Cazali, I. et al. 2000. Resistencia de Gérmenes Gram negativo en un Hospital de Referencia de Guatemala. *Revista de RECCAVIR.* 1: pp 15-16.

XIII. ANEXOS**Anexo No. 1****Clasificación de las Enterobacterias de acuerdo a sus Propiedades Bioquímicas**

Familia	Metabolismo	Oxidasa
<i>Enterobacteriaceae</i>	Fermentativo	Negativa
<i>Vibrionaceae</i>	Fermentativo	Positiva
<i>Pseudomonadaceae</i>	Oxidativo	Positiva

Anexo No. 2**Mecanismos de resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos**

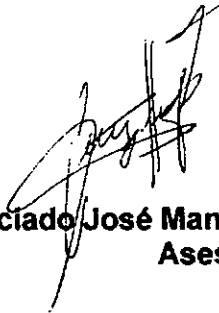
Mecanismo	Grupo antibiótico	Ejemplos
Inactivación enzimática	Betalactámicos	β -lactamasas: penicilinasas, cefalosporinas, carbapenemasas
	Aminoglicósidos	Enzimas modificadoras de aminoglicósidos de bacterias Gram negativo y Gram positivo.
Receptores alterados	Betalactámicos	Proteínas fijadoras de penicilina alteradas en bacterias gramnegativa y grampositiva.
	Alteraciones ribosómicas	Tetraciclinas, eritromicina, aminoglicósidos.
	Alteraciones de la ADN girasa	Quinolonas
	Enzimas bacterianas alteradas	Sulfametoxazol, trimetoprim
Transporte alterado del antibiótico	Alteraciones en las proteínas de la membrana externa (porinas)	Bacterias gramnegativa; flujo hacia el interior disminuído.
	Fuerza motora protónica disminuída	Aminoglicósidos y bacterias gramnegativa; flujo hacia el interior disminuido
	Transporte activo desde la célula bacteriana	Tetraciclinas; eritromicina, flujo hacia el exterior activo.

Anexo No. 3**Pruebas de susceptibilidad antibiótica**

Procedimiento	Definición	Muestras	Indicaciones
Concentración inhibitoria mínima (CIM, caldo o agar)	Mínima concentración del antibiótico que inhibe el desarrollo visible.	Aislamiento microbiano	Susceptibilidad de los aislamientos a los antimicrobianos, si se ha establecido el papel etiológico y la susceptibilidad no es pronosticable.
Difusión con discos		Aislamiento microbiano	Método simplificado para estimar la CIM, con correlatos interpretativos.
Concentración bactericida mínima	Concentración mínima de antibiótico que extermina el 99% del inóculo	Aislamiento microbiano	Endocarditis estreptocócica; potencialmente para osteomielitis; aislamientos posiblemente tolerantes si no responde al tratamiento.
Niveles de antimicrobianos	Concentración del antibiótico en suero ($\mu\text{g/ml}$)	Suero de nivel máximo Suero de nivel terminal	Niveles máximos impredecibles o peligro de toxicidad.
Títulos bactericidas del suero	Dilución de suero que mata el 99.9% del inóculo	Suero de nivel máximo Suero de nivel terminal Aislamiento microbiano	Endocarditis bacteriana, osteomielitis, sepsis por Gram negativos en pacientes inmunosuprimidos.
Pruebas de sinergia	Actividad sinérgica de varios antibióticos	Aislamiento microbiano	Procedimiento de investigación para el desarrollo de regímenes terapéuticos; raramente, confirmación de sinergia contra aislamientos individuales.




Velvet Anabella Pérez
Autor



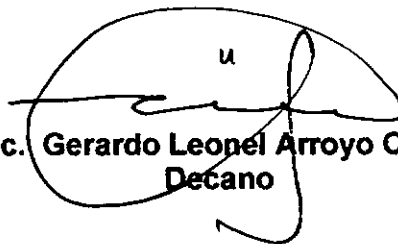
Licenciado José Manuel Arriaga Romero
Asesor



Licenciado Martín Gil Carrera
Revisor



Licenciada Alba Marina Valdés Ruiz de García
Directora



M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano