

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCIÓN DE TECNOLOGÍA MÉDICA
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN:

DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CIPROFLOXACINA EN CEPAS DE *Salmonella typhi*, EN EL CEPARIO DEL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA, POR EL MÉTODO EPSILOMÉTRICO (E-TEST) DURANTE EL PERÍODO DE JULIO A SEPTIEMBRE DE 2013.

PRESENTADO POR:

RUDIS CAROLINA ALEMÁN CRUZ
BRENDA AZUCENA ÁVALOS GRANADOS
CELIA MABEL ARGUETA ARGUETA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO

DOCENTE DIRECTOR:

LICENCIADA AURORA GUADALUPE GUTIÉRREZ DE MUÑOZ

NOVIEMBRE DE 2013

SAN MIGUEL, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES

INGENIERO MARIO ROBERTO NIETO LOVO.
RECTOR

MAESTRA ANA MARÍA GLOWER DE ARÉVALO.
VICERRECTORA ACADÉMICA

(PENDIENTE DE ELECCIÓN).
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

DOCTORA ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA.
SECRETARIA GENERAL

LICENCIADO FRANCISCO CRUZ LETONA.
FISCAL GENERAL

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCIÓN DE TECNOLOGÍA MÉDICA
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN:

DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A CIPROFLOXACINA EN CEPAS DE *Salmonella typhi*, EN EL CEPARIO DEL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA, POR EL MÉTODO EPSILOMÉTRICO (E-TEST) DURANTE EL PERÍODO DE JULIO A SEPTIEMBRE DE 2013.

PRESENTADO POR:

RUDIS CAROLINA ALEMÁN CRUZ
BRENDA AZUCENA ÁVALOS GRANADOS
CELIA MABEL ARGUETA ARGUETA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO

DOCENTE DIRECTOR:

LICENCIADA AURORA GUADALUPE GUTIÉRREZ DE MUÑOZ

NOVIEMBRE DE 2013

SAN MIGUEL, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES

INGENIERO MARIO ROBERTO NIETO LOVO.
RECTOR

MAESTRA ANA MARÍA GLOWER DE ARÉVALO.
VICERRECTORA ACADÉMICA

(PENDIENTE DE ELECCIÓN).
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

DOCTORA ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA.
SECRETARIA GENERAL

LICENCIADO FRANCISCO CRUZ LETONA.
FISCAL GENERAL

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL.
AUTORIDADES

MAESTRO CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ.
DECANO

LICENCIADO CARLOS ALEXANDER DÍAZ.
VICEDECANO

MAESTRO JORGE ALBERTO ORTEZ HERNÁNDEZ.
SECRETARIO

MAESTRA ELBA MARGARITA BERRIOS CASTILLO
DIRECTORA GENERAL DE PROCESO DE GRADUACIÓN

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DOCTOR FRANCISCO ANTONIO GUEVARA GARAY.
JEFE DEL DEPARTAMENTO

MAESTRA LORENA PATRICIA PACHECO HERRERA.
COORDINADORA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

MAESTRA OLGA YANETT GIRÓN DE VÁSQUEZ
COORDINADORA GENERAL DE PROCESO DE GRADUACIÓN DE LA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

ASESORES

LICENCIADA AURORA GUADALUPE GUTIÉRREZ DE MUÑOZ

DOCENTE DIRECTOR

LICENCIADO SIMÓN MARTÍNEZ DÍAZ

ASESOR DE ESTADÍSTICA

MAESTRA ELBA MARGARITA BERRIOS CASTILLO

ASESORA DE METODOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO: Por darnos la sabiduría, conocimiento e iluminado en todo nuestro estudio universitario, si su ayuda no hubiéramos llevado acabo nuestro proyecto de investigación.

A NUESTROS FAMILIARES Y AMIGOS: Por su apoyo, consejos y cariño, que de una u otra manera fue de gran ayuda y beneficio en nuestras vidas.

A NUESTROS ASESORES: **Licda. Aurora Guadalupe de Muñoz, Maestra Elba Margarita Berríos y Lic. Simón Martínez,** con mucho respeto, cariño, por sus sabios consejos y ser partícipes de éste proceso de formación.

A la Licda. Teresa Guadalupe Imbers de Rubio: por su valiosa ayuda, ya que fue una de las impulsadoras para que éste proyecto de graduación se hiciera realidad, gracias por sus sugerencias y brindarnos su ayuda.

A LA MINISTRA DE SALUD: Dra. María Isabel Rodríguez, con mucho respeto, por concedernos el permiso de poder realizar nuestra investigación en el Laboratorio Nacional de Referencia.

AL PERSONAL QUE LABORA EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: Con mucha admiración, cariño y respeto, por su gran colaboración en la ejecución del proyecto de investigación.

A NUESTROS MAESTROS: Por compartir sus conocimientos y orientarnos a la práctica de valores.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO: Por ser mi guía, mi sostén y mi fortaleza en momentos de prueba, por brindarme la sabiduría necesaria para tomar las mejores decisiones, y no desampararme en momentos de dificultad, por mostrarme su amor incondicional cada momento de mi vida y permitirme culminar con satisfacción las metas propuestas.

A MIS PADRES: José Oscar Argueta y Mercedes Mabel Argueta, por todo su amor incondicional, comprensión, ayuda y todo el apoyo que a diario recibo de ustedes, sin el cual no hubiese sido posible haber culminado mis estudios. También por todos sus consejos, con los cuales he aprendido a valorar la vida, respetando a los demás y tratando de ser mejor cada día. Gracias por levantarme tantas veces sin importar nada...no sé cómo pagarles tanto, solo quiero decirles que los amo y eso nunca va a cambiar.

A MI HERMANO: Oscar Alberto Argueta, por su apoyo y comprensión, ya que me ha sido de mucha ayuda en momentos difíciles y siempre ha estado cuando más lo necesito.

A MI CUÑADA: Ester Chica, por su ayuda y comprensión, ya que ha sido una gran amiga en tiempos difíciles.

A MI SOBRINITA: Mélida Dayana Argueta Chica, por ser tan especial, llenar tantos vacíos y con tu presencia alegrarme la vida... te quiero mucho chiquita.

A MIS FAMILIARES: Porque a lo largo de mi formación académica siempre han estado pendiente de mí, y colaborándome de una u otra forma para que las cosas siempre salgan bien.

A MI NOVIO: Carlos Antonio Argueta Luna, por su comprensión y amor, ya que ha estado siempre dispuesto a ayudarme en todo lo que él pueda.

A MI ASESORA DE TESIS: Licda. Aurora Guadalupe Gutiérrez de Muñoz, gracias por toda su paciencia, comprensión, ayuda y esmero que nos brindó durante todo éste proceso. Siempre nos recibió con una sonrisa y nos motivó a salir adelante, fue un honor haber sido su grupo de tesis, siempre la recordaremos y ocupará un lugar especial en nuestros corazones.

A LICDA. MARITA MELGAR: Por brindarme su amistad, aportar de sus conocimientos en la elaboración de éste proyecto de investigación y darme su apoyo en momentos difíciles de ésta carrera.

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS: Brendita y Carito, por su amistad y cariño a lo largo de nuestra carrera, que aunque hubieron momentos difíciles, ellas siempre estuvieron ahí para brindarme su comprensión y apoyarme cuando las necesitaba. Gracias por aguantarme...son tantos los momentos que compartimos, que a lo largo de mi vida los tendré presentes, nunca las olvidare.

A MIS MAESTROS: Por todas sus enseñanzas y consejos a lo largo de mi formación académica, ya que gracias a ellas he subido otro peldaño más y siempre les estaré agradecida por toda su dedicación.

AL PERSONAL QUE LABORA EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: Licda. de Fuentes, gracias por no negarse a ayudarnos cuando creímos que todas las puertas se nos cerraban, usted fue una de las personas que confió en nosotros y nos dio la oportunidad de demostrarnos a nosotras mismas que cuando se tiene la disposición y la voluntad todo se puede...

Licda. María José, no encuentro las palabras adecuadas para agradecerle todo el apoyo, cariño, y comprensión que me brindó, sé que aunque compartimos poco tiempo, hay lazos de amistad que el tiempo ni la distancia pueden romper y usted ocupa un lugar muy especial en mi corazón.

Licda. Esmeralda, le agradezco por haber compartido sus conocimientos conmigo y enseñarme que para lograr una meta en la vida es necesario hacer sacrificios, muchas veces difíciles, pero que al final valen la pena, además que siento una gran admiración por todos sus logros.

Lic. Cardoza, gracias por la paciencia brindada y por lo que compartimos en lo que duró la ejecución, gracias por hacernos sonreír, en momentos difíciles.

Celia Mabel Argueta Argueta

DEDICATORIA.

Una vez finalizado mi formación académica agradezco y dedico este triunfo a todas aquellas personas que de una u otra forma sé que formaron parte de este proceso y en especial a:

A DIOS TODOPODEROSO: Ser supremo, por haberme regalado la sabiduría necesaria cuando se la pedí, ser mi amigo y refugio en los momentos más difíciles de mi vida, por escuchar mis suplicas, ser mi consuelo cuando me sentía derrotada y así mismo haber guiado mis pasos por el camino del bien para llegar al final de mi carrera; sé que sin tu ayuda no hubiese sido posible mil gracias.

A MI MADRE DEL CIELO EN ADVOCACIÓN DE LA REINA DE LA PAZ: Por interceder siempre a su hijo por mí y protegerme siempre con su manto protector por donde quiera que iba.

A MIS PADRES: Carlos Humberto Avalos y María Inés Granados: por haberme brindado su enorme apoyo incondicional tanto económico como moral, por todas sus oraciones y sabios concejos que sé que fueron de mucha ayuda, ser mis amigos y regalarme su valioso amor, haberme inculcado buenos valores, gracias por haber creído y confiar en mí que si podía; este es mi mejor regalo ya que fueron mi mayor inspiración para luchar todos los días y lograr mi meta, éste triunfo es de ustedes y sé que los haré felices, gracias papás los adoro un montón.

A MIS HERMANAS: Norma y Verónica, por ser mis mejores amigas y brindarme su confianza y estar conmigo cuando las necesité en los momentos duros de mi vida, sé que también rezaron mucho por mí; y de forma especial a mi hermano Carlos, por su gran aporte económico y su amistad incondicional, gracias hermanito, aun de lejos estuviste apoyándome incondicionalmente; los quiero.

A MIS AMIGOS Y FAMILIARES: por su amistad desinteresadamente y estar siempre apoyándome.

A MIS SOBRINOS: Zuraida, Ernesto, Christopher y mi chiquitín Emerson. Aun en su pequeñez formaron una parte muy importante en mi vida, llenaron de gran alegría tantos momentos tristes en mi carrera, gracias mis niños.

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS: Celia y Carolina, por ser mis grandes amigas, hermanas y las mejores compañeras que tuve, compartimos todas las alegrías y tristezas, convivimos como hermanas y aunque sé que pasamos momentos muy difíciles en los que creímos ya no poder nos mantuvimos unidas apoyándonos mutuamente y si alguna vez las ofendí.... Perdón! Me llevo grandes y bonitos recuerdos de ustedes, las quiero mucho amigas gracias por su amistad.

A UNA AMIGA: Licda. Marita; en tan poco tiempo pude darme cuenta que es una mujer muy valiosa y sincera, gracias por su amistad, consejos, sugerencias y estar muy de cerca en la realización de este proyecto, sepa que siempre le guardaré mucho aprecio.

A MI ASESORA DE TESIS: Licda. Aurora Guadalupe de Muñoz, por su gran aporte de conocimientos y también por haber sido gran parte de toda mi formación académica.

AL PERSONAL QUE LABORA EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: Con mucho cariño Licda. Esmeralda, Lic. Cardoza, Licda. María José (nuestro angelito); gracias por haber compartido sus grandes conocimientos y haber ayudado a que realizáramos este proyecto satisfactoriamente y formar parte de él, gracias por su paciencia; Licda. De Fuentes: muchísimas gracias por haber permitido tener acceso al Laboratorio que DIOS la bendiga siempre por ser una gran mujer. Siempre los llevaré en mi corazón.

Brenda Azucena Avalos Granados.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO: Gracias mi Dios, porque por tu amor y tu misericordia he logrado llegar hasta aquí. Gracias por haberme regalado sabiduría, por dar de tu Gracia en mi vida, por abrir las puertas que yo jamás pensé se abrirían, por ser mi roca y fortaleza en cada momento de dificultad; tu palabra es fiel ya que: que los que aman a Dios todas las cosas les ayudan a bien; por rodearme de personas tan especiales, que de una manera u otra formaron parte de este paso que di en la vida. Jamás podré pagar tus favores. TE AMO MI DIOS.

A MIS PADRES: Dora Alemán Hernández y Marcos Antonio Cruz, porque a pesar de la distancia siempre su amor y apoyo a estado ahí, gracias por sus consejos, por enseñarme que cada paso quede debe ser guía por Dios. Que Dios me los bendiga siempre. Les amo mucho.

A MIS ABUELOS: gracias abuela Inés Hernández de Alemán y abuelo (Q.D.D.G.) Santos Alemán porque para mí fueron mis padres, que me vieron crecer, fueron ustedes quienes formaron mi carácter, mi personalidad gracias por enseñarme a ser una persona humilde, abuelo sé que a pesar que no estás conmigo te sientes muy orgulloso de tu niña.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS: gracias por su amor y cariño, yo sé que siempre desearon lo mejor para mí y le pedían a Dios que mi ayudara en todo y abriera puertas para salir y terminar con triunfo mi carrera.

A LA LICDA. MARITA YESSSENIA MELGAR FLORES: te agradezco por todo tu amor, cariño, consejos, recuerdo tus palabras cuando comencé a estudiar en la universidad, y me decías Dios premiara tu esfuerzo, gracias por estar ahí, por darme ánimo, recuerdo que muchos momentos me viste llorar y nunca escuche de ti una palabra de desaliento, siempre hubo un consejo sabio y una solución, te quiero mucho. GRACIAS MI MAMITA.

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS: Celia y Brenda, gracias por su amistad, su cariño y por ser las mejores compañeras, sé que pasamos momentos difíciles en los cuales pensamos que jamás veríamos un rayito de luz en nuestro camino, lloramos, reímos pero lo más importante es que siempre nos mantuvimos firmes en que alcanzaríamos la meta con la ayuda de Dios; deseo que Dios conceda todos los deseos de sus corazones y que les bendiga, siempre adelante mis niñas.

A MI ASESORA DE TESIS: Licda. Aurora Guadalupe Muñoz, por su paciencia, por su conocimiento y apoyo en la realización de nuestro proyecto, que Dios la bendiga siempre.

A la Licda. Teresa Guadalupe Imbers de Rubio: gracias por ser una de las personas que me motivo para realizar este trabajo de investigación. Gracias por sus enseñanzas y consejos, por ser una excelente maestra conmigo, que Dios la bendiga siempre.

AL PERSONAL DEL ÁREA DE BACTERIOLOGÍA DEL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: agradezco a Dios por permitirme conocer a excelentes personas.

Con respeto y admiración Licda. Zandra de Fuentes, una excelente profesional y mujer con muchas virtudes, le agradezco infinitamente por permitir realizar nuestra tesis, en tan poco tiempo aprendí mucho de su persona, siendo usted un ejemplo a seguir, siempre recordare sus palabras “cada día debemos ponernos retos y ser mejores”.

Licda. María José Luna Boza, Licda. Esmeralda Villatoro, Lic. Roberto Cardoza les agradezco por su paciencia y enseñanza, ya que ustedes también fueron parte fundamental de nuestro proyecto de investigación, gracias por sus palabras, y la confianza que depositaron en nosotras.

Dios les bendiga siempre, y estaré eternamente agradecida, los llevo en mi corazón.

Rudis Carolina Alemán Cruz

TABLA DE CONTENIDO

Cont.	Pág.
TABLA DE CONTENIDO.....	xiii
LISTA DE TABLA.....	xiv
LISTA DE GRAFICAS	xv
LISTA DE ANEXOS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	xx
1.1 Antecedentes del fenómeno de estudio.....	22
1.2 Enunciado del problema.....	23
1.3 Justificación de la investigación.....	23
1.4 Objetivos de la investigación.....	25
2. MARCO TEÓRICO.....	26
3. SISTEMA DE HIPÓTESIS.....	72
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	76
5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	87
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	98
7-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE TABLAS

Cont.	Pág.
TABLA N°1: Características morfológica de <i>Salmonella typhi</i>	88
TABLA N°2: Lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico.....	90
TABLA N°3: Clasificación de la susceptibilidad según CLSI.....	92
TABLA N°4: Comparación del método Epsilométrico con el Kirby-Bauer.....	94

LISTA DE GRÁFICOS

Cont.	Pág.
GRÁFICA N°1: características morfológica de <i>Salmonella typhi</i>	89
GRÁFICA N°2: lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico.....	91
GRÁFICA N°3: clasificación de la susceptibilidad según CLSI.....	93
GRÁFICA N°4: comparación del método Epsilométrico Vrs Kirby-Bauer.....	95

LISTA DE ANEXOS

Cont.	Pág.
ANEXO N°1: Cronograma de actividades.....	103
ANEXO N°2: Cronograma de actividades específicas.....	104
ANEXO N°3: Presupuesto y financiamiento.....	105
ANEXO N°4: Hoja de registro de cepas.....	106
ANEXO N° 5: Tabla de CLSI.....	107
ANEXO N°6: Carta de solicitud de permisos.....	108
ANEXO N°7: Cotización de precios de tiras E-Test.....	110
ANEXO N°8: Hoja de control de calidad del autoclave.....	111
ANEXO N°9: Hoja de control de calidad de medios de cultivo.....	112

LISTA DE FIGURAS

Cont.	Pág.
FIGURA N° 1: Morfología de bacterias.....	114
FIGURA N° 2: Morfología y reacción al gram de <i>Salmonella typhi</i>	115
FIGURA N° 3: Medio TSI.....	116
FIGURA N° 4: Medio Citrato.....	117
FIGURA N° 5: Agar Mac Conkey.....	118
FIGURA N° 6: Agar Mueller-Hinton.....	119
FIGURA N° 7: Método de dilución en caldo.....	120
FIGURA N° 8: Método de difusión en agar.....	121
FIGURA N° 9: Método Epsilométrico.....	122
FIGURA N° 10: Preparación de agar Tripticasa Soya.....	123
FIGURA N° 11: Vertida de agar MC y TSA.....	124
FIGURA N° 12: Vertida de agar Mueller-Hinton.....	125
FIGURA N° 13: Control de crecimiento de agar Mac Conkey.....	126
FIGURA N° 14: Medición de pH de agar Mac Conkey.....	127
FIGURA N° 15: Medición de pH de agar Mueller-Hinton.....	128

FIGURA N° 16: Medición de grosor de Mueller-Hinton.....	129
FIGURA N° 17: Preparación de materiales.....	130
FIGURA N° 18: Cepas en leche descremada al 10%.....	131
FIGURA N° 19: Inoculación de medios.....	132
FIGURA N° 20: Inoculación en medio TSI.....	133
FIGURA N° 21: Inoculación en medio Movilidad.....	134
FIGURA N° 22: Preparación del inóculo.....	135
FIGURA N° 23: Comparación del inóculo con la escala de Mac Farland.....	136
FIGURA N° 24: Método Epsilométrico.....	137
FIGURA N° 25: Incubación de placas.....	138
FIGURA N° 26: Lecturas de placas.....	139
FIGURA N° 27: Personal del área de bacteriología del LNR.....	140

RESUMEN

En algunos países se reportan cepas de *Salmonella typhi*, resistentes a la ciprofloxacina, en tanto que algunos la reportan como sensibilidad disminuida, esto condicionado con factores, como por ejemplo la automedicación, las mutaciones bacterianas, el uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana, el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes bacterias. Éste trabajo de investigación tiene como **objetivo:** Determinar la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test) durante el periodo de julio-septiembre de 2013. **Metodología:** La investigación es de tipo retrospectivo, debido a que por medio de esta, se permitió conocer el mecanismo de susceptibilidad que presentó *Salmonella typhi* frente a la ciprofloxacina, ya que con anterioridad éstas cepas mostraban sensibilidad disminuida a la ciprofloxacina por otro método de susceptibilidad diferente al E-Test, que en su totalidad fueron 40 cepas tomada como muestra a las que se les realizó el estudio, así se implementaron criterios de inclusión que sirvieron para clasificar solamente a las muestras que cumplan con los requisitos siguientes: que pertenezca a la especie *typhi*, que la cepa sea aislada del año 2013, que la cepa en estudio no presente ninguna contaminación, que no interese el tipo de muestra de donde fue aislado y todas aquellas cepas a las cuales no se les ha realizado la susceptibilidad por el método Epsilométrico (E-test), para la recolección de los datos se utilizó la hoja de registro. **Resultados:** De las 40 muestra seleccionada, 34 cepas resultaron con **susceptibilidad intermedia** coincidiendo en su totalidad con las del método de Kirby-Bauer, y 6 cepas mostraron **sensibilidad** a la ciprofloxacina, también coincidiendo las 6 cepas con el método de comparación. Por los resultados obtenidos que representan el 85% con susceptibilidad intermedia, se acepta la hipótesis alterna que dice: Existe susceptibilidad intermedia al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

Palabras clave: *Salmonella typhi*, resistencia bacteriana, susceptibilidad, sensibilidad, sensibilidad intermedia, antibiótico, ciprofloxacina, cepa bacteriana, método Epsilométrico, método de Kirby-Bauer.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un mecanismo que desarrollan las bacterias por diferentes factores genéticos que generan mutaciones a nivel estructural, lo cual dificulta el tratamiento para el control de enfermedades causadas por bacterias.

Salmonella es un género de bacterias que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *Salmonella typhi*), ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Emplean la glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa y no producen ureasa. No tienen metabolismo fermentativo.

Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar. *Salmonella typhi* causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospedantes.

Algunos de los agentes antimicrobianos tales como amoxicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol generan resistencia y se notifica con más frecuencia entre los aislamientos de *Salmonella typhi*; la resistencia a quinolonas ha sido notificada en la India y el sudeste asiático. La determinación de los patrones de resistencia a los antimicrobianos es esencial para recomendar tratamientos. En lugares donde la resistencia a estos agentes es común entre las cepas circulantes de *Salmonella typhi*, las fluoroquinolonas y cefalosporinas parenterales de tercera generación probablemente sean la mejor opción de tratamiento empírico de la fiebre tifoidea.

En nuestro país la resistencia a la ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* ha sido poco estudiado, debido a su alto costo, ya que no todos los laboratorios de la red de salud pública cuentan con el área de bacteriología ni con los equipos necesarios para realizar estos procedimientos. Es así que como grupo de estudiantes egresados de la carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico pretende hacer una investigación sobre: Determinación de la sensibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-Test), durante el período de julio a septiembre de 2013.

En este documento se presenta como está estructurada dicha investigación, la cual se detalla de la siguiente manera:

En el planteamiento del problema se describen los antecedentes de la problemática en investigación, además se menciona generalidades de *Salmonella typhi* y su resistencia a la ciprofloxacina en países como la India, Centro América y El Salvador. También forma parte de este apartado, la justificación en la cual se manifiesta el porqué de la investigación, y su finalidad, el enunciado del problema, mediante una interrogante a la cual el grupo trató de dar respuesta al finalizar la investigación. Además se detallan los objetivos en donde se exponen los parámetros que guiaron a la elaboración del trabajo de investigación con el fin de tener una visión específica de los diferentes puntos que se pretende investigar, para dar una respuesta a la problemática en estudio.

En el marco teórico conceptual, se describe generalidades de la bacteria, los medios de cultivo, los antibióticos y mecanismos de resistencia de la bacteria, como también la definición de términos que serán de ayuda al lector.

También presenta el sistema de hipótesis de la investigación, el cual incluye una hipótesis de trabajo, su respectiva hipótesis nula y una hipótesis alterna. Así como también las unidades de análisis, variables e indicadores involucrados en el estudio, y operacionalización de las variables.

Además en la metodología de la investigación, se describe el tipo de estudio, la población y muestra, los criterios de inclusión y exclusión, el tipo de muestreo, técnicas e instrumentos de recolección de datos, técnicas de laboratorio, equipo, material y reactivos y las etapas que son: etapa de planificación y ejecución, también incluye los riesgos y beneficios.

Posteriormente se detallan los resultados que se obtuvieron en el desarrollo de la investigación, donde se inicia con la presentación de los resultados obtenidos, seguido de un análisis e interpretación de los mismos con su respectiva prueba de hipótesis.

Finalmente las conclusiones y recomendaciones que el grupo investigador aporta, según los resultados obtenidos en el estudio, se presenta la bibliografía que se consultó para estructurar el trabajo de investigación y se detallan cada uno de los anexos, material que contribuye a una mejor comprensión de éste estudio.

1.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

La bacteria *Salmonella* serotipo *typhi*, agente etiológico de la fiebre tifoidea, causa alrededor de 16,6 millones de casos y 600.000 muertes al año en todo el mundo.

La enfermedad se caracteriza por la aparición insidiosa y sostenida de fiebre, cefalea intensa, malestar general, anorexia, relativa bradicardia, estreñimiento o diarrea (principalmente en niños), y hepato-esplenomegalia (aumento de tamaño del hígado y del bazo). Sin embargo pueden ocurrir infecciones atípicas y poco severas.

Es clásico dividir las manifestaciones clínicas de la fiebre tifoidea de acuerdo a su evolución en semanas o septenarios. Se sabe que la *Salmonella* tiene un período de incubación que se calcula en aproximadamente 10 días. La enfermedad tiene un período inicial de una semana caracterizado por la aparición de fiebre, en forma escalonada y progresiva asociada a cefalea intensa, astenia y anorexia en la cual los hemocultivos son positivos. En el segundo período correspondiente a la segunda y tercera semanas, los síntomas se acentúan, la fiebre se estabiliza, la cefalea es continua, el estado de conciencia se altera y el paciente está delirante e indiferente (típhus), presenta diarrea profusa y signos de deshidratación, identificándose a la bacteria en los coprocultivos siendo estos positivos¹

Las fluoroquinolonas son una de las clases de agentes antimicrobianos más útiles empleados hoy en día en medicina humana, debido a su espectro y a sus propiedades fisicoquímicas. El uso de quinolonas en humanos es un asunto de especial preocupación porque podría contribuir a la adquisición de resistencia en bacterias transmitidas por alimentos (tales como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli*) y esto, a su vez, podrá conducir a una reducción en la eficacia de tales componentes en el tratamiento de infecciones en los seres humanos.

Las quinolonas originales (ácidos nalidíxico, oxolínico y pipemidico) fueron introducidas en la década de los 60 del pasado siglo. Estos antibióticos inhiben la actividad de la ADN girasa bacteriana (topoisomerasa II) y son efectivos frente a bacterias aerobias gram-negativas. En la actualidad las quinolonas originales son poco utilizadas debido al desarrollo de resistencias y a su toxicidad, especialmente para el sistema nervioso central.

La resistencia a los antimicrobianos de primera línea (ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol) se define como multiresistencia. La acetiltransferasa inactiva el cloranfenicol por el agregado de dos grupos acetilos. Un segundo mecanismo de resistencia al cloranfenicol se basa en la pérdida de una proteína de membrana externa. La resistencia a ampicilina está mediada por la producción de beta lactamasas (inhibida por ácido clavulánico), en tanto que a resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, por la alteración de la enzima blanco, dihidrofolato reductasa y dihidropteroato sintasa.

¹Libro: Koneman DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO sexta edición Editorial Medica Panamericana 2008.

En 1972 se detectó la resistencia de *Salmonella typhi* al cloranfenicol y en 1987 se describieron cepas multirresistentes al cloranfenicol, la ampicilina y el cotrimoxazol en la India, el sureste asiático, Oriente Medio, África y otros países como España, donde la mayoría de los casos eran importados. Las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de tercera generación se convirtieron en el tratamiento de elección para las infecciones causadas por estas cepas.

La incidencia de cepas resistentes aumentó en todo el mundo. Desde 1989, luego de la aparición de cepas resistentes a ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, la ciprofloxacina se convirtió en el agente de primera línea tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Por otro lado, con los años se observó una disminución en las cepas resistentes a cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol.

Posteriormente, en 1990 se detectaron cepas de *Salmonella typhi* resistentes al ácido nalidíxico en la India, Vietnam, Japón, Pakistán y otras zonas; alrededor de la mitad de éstas cepas eran multirresistentes.

En los países en vías de desarrollo, como la India, la ciprofloxacina continúa siendo la base del tratamiento de la fiebre entérica, ya que es eficaz por vía oral, además de económica. Sin embargo, hay informes de cepas de *Salmonella typhi* con resistencia a ciprofloxacina de alto grado en muchos centros de la India.

El Salvador en la actualidad es uno de los países en el cual se ha reportado disminución en la sensibilidad a ciprofloxacina por cepas de *Salmonella typhi*, las cuales han sido aisladas por diferentes métodos de diagnóstico en los distintos laboratorios de la red nacional que cuentan con el área de bacteriología, siendo estos casos confirmados por el Laboratorio Nacional de Referencia.

1.2 ENUNCIADO DEL PROBLEMA

De la problemática antes descrita se deriva el problema que se enuncia de la siguiente manera:

¿Existirá susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-test) durante el periodo de julio a septiembre de 2013?

1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

El género *Salmonella*, definido por su conjunto de características bioquímicas, reúne cerca de 2.000 tipos serológicos. Cada tipo serológico a su vez está caracterizado por antígenos específicos que pueden ser identificados mediante pruebas serológicas. Los antígenos que caracterizan los tipos serológicos de las salmonellas son los antígenos O

(somáticos), y los antígenos H (flagelares); algunos presentan un tercer tipo el denominado antígeno Vi (capsular).

En la actualidad se dispone de varios antimicrobianos útiles para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella*, dentro de las cuales están el cloramfenicol, la ampicilina, la amoxicilina, el trimetoprim-sulfametoxazol, las cefalosporinas de tercera generación, como la cefotaxima, la cefoperazona, la ceftriaxona; y las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina y la ofloxacina. Sin embargo, hay informes de cepas de *Salmonella typhi* con resistencia a ciprofloxacina de alto grado.

La sensibilidad a la ciprofloxacina es poco conocida a nivel de los laboratorio de Salud Pública en El Salvador, ya que no todos los laboratorios disponen del área de bacteriología y tampoco cuentan con los recursos económicos ni materiales para realizar las pruebas de sensibilidad a cepas bacterianas de *Salmonella typhi*, aisladas de diferentes tipos de muestras, provenientes de centros hospitalarios, es por ello que estos aislamientos son referidos al Laboratorio Nacional de Referencia para la confirmación y determinación de la susceptibilidad bacteriana.

Esta investigación surgió en vista a la necesidad de conocer la resistencia a la ciprofloxacina por *Salmonella typhi*, ya que a nivel mundial se están reportando cepas multirresistentes², siendo este antibiótico uno de los de primera línea utilizados para el tratamiento contra dicha bacteria recomendados por la CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute).

Con esta investigación se dio un aporte en cuanto al manejo de agentes antimicrobianos ya que la elección del tratamiento depende de los patrones de resistencia y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Salmonella typhi*, siendo la ciprofloxacina el tratamiento de elección, pero los pacientes infectados con cepas de *Salmonella typhi* con sensibilidad disminuida pueden no responder en forma adecuada al tratamiento, de esta manera se benefició así a los pacientes en cuanto a su rápida recuperación, reducción de costos hospitalarios y dar a conocer nuevos datos estadísticos sobre la sensibilidad existente de *Salmonella typhi* a la ciprofloxacina. Ya que con métodos automatizados es difícil detectar concentraciones mínimas; por ejemplo con el Vitek se detectan concentraciones de 0.5 ug/ml ya que este valor es su límite de detección aunque la bacteria sea sensible a concentraciones menores.

² Patrones de Resistencia Antimicrobiana de *Salmonella typhi* autores: Harish B, Menezes G. Comité de Redacción Científica de SIIC CITA : Indian Journal of Medical Microbiology 29(3):223-229, Jul 2011 [HTTP://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm](http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm)

1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-test) durante el periodo de julio-septiembre de 2013.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar siembras de cepas de *Salmonella typhi* en el medio de cultivo nutritivo agar Tripticasa Soya y medio selectivo-diferencial agar Mac Conkey.
- Observar las características morfológicas de las colonias de *Salmonella typhi* con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina, en agar Tripticasa Soya y agar Mac Conkey.
- Preparar agar Mueller-Hinton cumpliendo con la norma establecida por CLSI.
- Elaborar una estandarización del inóculo utilizando la escala de Mac Farland 0.5.
- Determinar en forma directa la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método Epsilométrico (E-Test).
- Comparar los resultados de susceptibilidad a ciprofloxacina obtenidos por el método Epsilométrico (E-test) con Kirby-Bauer.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS

La Bacteriología es una disciplina de la Microbiología, que ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad. Las bacterias son responsables de millones de muertes de personas a nivel mundial. Entre algunas enfermedades infecciosas bacterianas, causantes de grandes epidemias que han afectado a la población, se encuentran: la difteria, cólera, tuberculosis, sífilis, tétanos, tos ferina, y fiebre tifoidea. Sin embargo, también existen infecciones bacterianas que aunque están asociadas en menor frecuencia como causa de muerte, son un problema de salud pública en países en vías de desarrollo como el nuestro, entre las que podemos mencionar: diarreas (causadas por *Shigella* o *Escherichia coli*), infecciones de vías urinarias, faringoamigdalitis, gonorrea, tracoma y brucelosis.

Otro aspecto de primordial importancia en bacteriología es la microbiota del cuerpo humano, en especial del tracto gastrointestinal. Se estima que en el intestino de un ser humano adulto, existe un billón de microorganismos por mililitro de contenido fecal y alberga entre 500 y 1000 diferentes especies bacterianas.

La mayoría de esos microorganismos pertenecen al Dominio *Bacteria*, que incluye tanto a bacterias gramnegativas como grampositivas. La microbiota intestinal difiere de una persona a otra y esa diversidad se ha visto en la composición del lumen (heces) y de la mucosa (epitelial). La microbiota intestinal está implicada en una gran variedad de funciones en el hospedero, involucrando cambios en el epitelio intestinal, modulación inmune, movimiento intestinal y el metabolismo de algunas drogas.

microbiota también está involucrada en la degradación de algunas toxinas y carcinógenos que se ingieren en la dieta, síntesis de micronutrientes, fermentación de sustancias del alimento, ayuda en la absorción de electrolitos y minerales; asimismo afecta el desarrollo y diferenciación de los enterocitos, a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta. Finalmente, la microbiota previene la colonización del intestino por bacterias patógenas como: *Salmonella*, La cepas de *Escherichia coli* productoras de cuadros clínicos gastrointestinales como por ejemplo:

Escherichia coli enteropatogena

Escherichia coli enteroinvasiva

Escherichia coli enterohemorrágica

Escherichia coli enterotoxigenica

Escherichia coli enteroagregativa

Las actividades metabólicas de la microbiota intestinal, facilitan la extracción de calorías de los alimentos ingeridos y el almacenaje de esas calorías en el tejido adiposo del hospedero, para su posterior utilización y proveen energía y nutrimentos para el desarrollo

y proliferación microbiana. Las diferencias en la recuperación de energía en los individuos puede ofrecer una explicación fisiológica del porqué algunos pacientes presentan obesidad, pero no comen en abundancia.

Por otra parte, las bacterias presentan un metabolismo tan diverso que les permite llevar a cabo funciones tales como: fijación de nitrógeno (conversión de nitrógeno gaseoso a amonio), la fijación de una cantidad importante de CO₂, la metanogénesis (producción biológica de metano), así como la reducción de azufre y hierro.

Hay bacterias con capacidad para metabolizar los plaguicidas clorados e hidrocarburos. Actualmente se trabaja en la producción de polímeros bacterianos biodegradables para sustituir a los plásticos sintéticos. Además, mediante procesos vigentes a nivel industrial, las bacterias se utilizan en la producción de antibióticos (bacitracina, cefalosporina, cloranfenicol, cicloheximida, lincomicina, nistatina, penicilina, polimixina B, estreptomina, son algunos de ellos); vitaminas tales como la vitamina B12 y la riboflavina, cuya síntesis es más fácil por fermentación; aminoácidos, por fermentación directa o síntesis enzimática, entre ellos el ácido aspártico y la fenilalanina (ingredientes del aspartame), el ácido glutámico (empleado como saborizante bajo la forma de glutamato monosódico), las aplicaciones prácticas de las bacterias en la ingeniería genética incluyen: vacunas virales (citomegalovirus, hepatitis B, sarampión, rabia); proteínas y péptidos (insulina, factor estimulante del crecimiento, interferón alfa, interferón beta, factor de necrosis tumoral y otros que aún no se encuentran en el mercado); vegetales y animales transgénicos; regulación y terapia génicas.³

2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS:

2.1.1.1 Según su morfología

La microscopía óptica permite reconocer a las bacterias de distintas formas:

- Las bacterias esféricas o ligeramente ovoides se denominan cocos.
- Las bacterias con forma de bastón se denominan bacilos.
- Los bacilos de corto tamaño que pueden confundirse con un coco se denominan cocobacilos. Algunos bacilos tienen extremos afinados y reciben el nombre de bacilos fusiformes, mientras que otros poseen forma de clava.
- Los bacilos cortos curvos, con forma de coma reciben el nombre de vibrios.
- Las bacterias espiraladas se llaman comúnmente espirilos cuando son rígidas y espiroquetas si son más flexibles y ondulantes.

2.1.1.2 Según su agrupación:

Algunos géneros bacterianos se agrupan de una manera característica. Esta agrupación se debe a la tendencia de las células hijas a permanecer parcialmente adheridas después de la división celular.

³ Generalidades de bacterias, Universidad Nacional Autónoma de México Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>.

Los cocos pueden disponerse de la siguiente manera:

- En pares y se les llama diplococos
- Si se disponen en cadena se llaman Estreptococos
- Cuatro células esféricas conforman una tétrada
- En forma de racimo o irregular se llaman estafilococos
- En paquetes cúbicos se denominan sarcinas

Los bacilos pueden disponerse:

- Aislados
- Adosados a lo largo, de forma paralela formando una agrupación en empalizada (*Haemophilus*).
- Pueden quedar adheridos por sus extremos y tomar apariencias de letras chinas (*Corynebacterium*). (Ver Fig.1).

2.1.1.3 Según su reacción tintorial

Las bacterias se clasifican en dos grandes grupos teniendo en cuenta el comportamiento de las mismas frente al procedimiento de coloración de Gram:

- Gram positivas: G (+), se tiñe de color violeta.
- Gram negativas: G (-), se tiñen de color rojo o rosado.

2.1.1.4 Según su requerimiento de oxígeno

Otro aspecto a tener en cuenta en la clasificación de bacterias es la necesidad de oxígeno para poder vivir. Dependen en buena medida de la disponibilidad de las enzimas eliminadoras de peróxidos y superóxidos.

- **Aerobias estrictas:** Dependen de O₂ para su crecimiento.
- **Anaerobias estrictas:** se desarrollan en ausencia total de O₂, utilizan aceptores finales distintos del oxígeno: CO₂, H₂ y N₂, o poseen metabolismo estrictamente fermentativo.
- **Anaerobias Facultativas:** pueden desarrollarse en presencia o ausencia de O₂, aunque predominan en medios anaeróbicos.
- **Microaerófilas:** sólo se pueden desarrollar en presencia de bajas tensiones de O₂ (menor del 12% en lugar del 20% que es la atmosférica) y altas tensiones de CO₂.

2.1.1.5 Según su temperatura óptima de crecimiento

Según la temperatura óptima de crecimiento las bacterias se clasifican en:

- **Termófilas:** se desarrollan entre 25°C y 80°C, óptima 50°C y 60°C.
- **Mesófilas:** se desarrollan entre 10°C y 45°C, óptima 20 °C y 40°C.
- **Psicrófilas:** se desarrollan entre -5°C y 30°C, óptima 10 °C y 20°C.
- **Criófilas:** que son resistentes al frío o que necesitan de el para vivir

2.1.1.6 Según el pH en que se desarrollan

Las bacterias se clasifican en:

- **Acidófilas:** Se desarrollan a pH entre 1.0 y 5.0
- **Neutrófilas:** Se desarrollan a pH entre 5.5 y 8.5
- **Basófilas:** Se desarrollan a pH entre 9

2.1.1.7 Por su forma de nutrición

Según su metabolismo interno, las bacterias presentan requerimientos nutricionales diversos y se clasifican en:

- **Autótrofas quimiosintéticas o fotosintéticas.** Las autótrofas fotosintéticas utilizan la luz del sol y el bióxido de carbono para fabricar su alimento. Las autótrofas quimiosintéticas utilizan compuestos inorgánicos, por ejemplo, el azufre para fabricar su alimento y su fuente de energía es el CO₂.
- **Heterótrofas.** (por absorción) pueden utilizar fuente de carbono orgánico para su alimentación.

2.1.1.8 Según el requerimiento de NaCl.

- **Halófilas:** son organismos que muestran afinidad por la sal, por lo que viven en ambientes hipersalinos.

2.1.2 FAMILIA *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias son una familia de bacterias gramnegativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocobacilos.

Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en la tierra, en plantas o en animales acuáticos.

Mueren con relativa facilidad con desinfectantes comunes, incluido el cloro. Con frecuencia se utilizan especies de *Enterobacteriaceae* en la bio-industria: para la fermentación de quesos y productos lácteos, alcoholes, tratamientos médicos, producción de toxinas en el uso de cosméticos, fabricación de agentes antivirales de la industria farmacéutica, etc.

2.1.2.1 Características de la familia *Enterobacteriaceae*

En la definición clásica de una *Enterobacteriaceae* se usan siete criterios básicos, adicional a la aparición de nuevos métodos taxonómicos para incluir a ciertos géneros que no cumplen con todos los siguientes criterios, pero que forman parte de esta familia:

- Son bacterias gramnegativas, la mayoría bacilos, otros cocobacilos y otros pleomórficos.
- No son exigentes, son de fácil cultivo.
- Son oxidasa negativo (excepto *Plesiomonas*, que es oxidasa positivo), es decir, carecen de la enzima citocromo oxidasa.
- Son capaces de reducir nitratos a nitritos.
- Son anaerobios facultativos
- Son fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin la producción de gas (en especial glucosa y lactosa), y oxidadores de una amplia gama de sustratos en condiciones aeróbicas.
- Muchos géneros tienen un flagelo que sirve para desplazarse, aunque algunos géneros no son móviles.

Adicional a ello, las *Enterobacteriaceae* no forman esporas, algunas producen toxinas y pueden ser encapsuladas y son organismos catalasa positivos. Son quimioheterótrofos, y necesitan para su crecimiento compuestos simples de carbono y nitrógeno, generalmente sólo con D-glucosa, aunque algunas requieren aminoácidos y vitaminas. La temperatura óptima de crecimiento es de entre 22 °C y 37 °C.

Las diferencias entre los nombres de los diversos géneros provienen de criterios más precisos, como la fermentación de los diferentes azúcares, la producción o no de azufre, la presencia de enzimas metabólicas (β -galactosidasa, desaminasas, descarboxilasas), etc. Los serotipos de importancia médica y sanitaria pueden distinguirse entre sí por la presencia o ausencia de antígenos en su constitución celular, tales como en el lipopolisacárido (antígeno O), el antígeno flagelar (antígeno H) o el antígeno capsular (antígeno K).

2.1.3 GÉNERO: *Salmonella*

Es un género de bacterias patógenas descubiertas por el veterinario estadounidense Daniel Elmer Salmon en 1885. Las salmonellas son bacterias gram negativas, no esporuladas y móviles, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Con excepción de *Salmonella typhi*, que afecta a los seres humanos y produce la fiebre tifoidea, la mayoría son patógenas tanto para el hombre como para los animales.

2.1.3.1 Características del género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, se compone de bacterias que se multiplican en el intestino, siendo varios los géneros de Enterobacterias que incluye especies patógenas. Además de *Salmonella*, también se transmite por los alimentos *Escherichia*, *Shigella* y *Yersinia*.

Al igual que todos los géneros de *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* está formada por bacterias gramnegativas flageladas y forma bacilar (Ver Fig. 2). Las *Salmonellas* son microorganismos anaerobios facultivos, presentando las dos rutas metabólicas, la oxidativa y la fermentativa. Son oxidasa negativos, fermentan la glucosa generando ácido y gas, crecen en citrato como única fuente de energía, descarboxilan la lisina y la ornitina suele producir sulfuro de hidrógeno y no hidroliza la urea. Una de las características de este género es que la mayor parte de sus integrantes no pueden fermentar la lactosa ni la sacarosa.

Hasta el momento se distinguen las siguientes especies:

- *Salmonella bongori*
- *Salmonella choleraesuis*
- *Salmonella entérica*
- *Salmonella enteritidis*
- *Salmonella nyanza*
- *Salmonella paratyphi*
- *Salmonella typhi*
- *Salmonella typhimurium*
- *Salmonella virginia*.

De las anteriores, *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella enteritidis*, son las especies que hasta el momento se reconocen como patógenas a su vez, según la serotipificación de Kauffman y White, eran clasificadas en más de 2,200 serotipos en base a los antígenos flagelares H (proteicos) y antígenos somáticos O (fracción polisacárida del lipopolosacárido bacilar). *Salmonella typhi* posee además un antígeno de virulencia. *Salmonella spp* es un microorganismo que se adapta muy bien a los animales y a las personas.

Cuando llega a los alimentos es capaz de multiplicarse en cualquier producto fresco a una velocidad muy elevada, ya que puede duplicar su número cada 15 ó 20 minutos si la temperatura es elevada (superior a 20° C). Si los alimentos no se refrigeran rápidamente y

a baja temperatura (el límite de crecimiento está en 6° C) el microorganismo se multiplica, con el consiguiente riesgo para los consumidores. Sin embargo, posee una escasa capacidad de multiplicación si no existe oxígeno.

2.1.3.2 Nomenclatura del genero *Salmonella*

Desde 1996, la Organización Mundial de la Salud (OMS) comenzó a denominar a los serotipos solo en subespecies I y abandonó todos los nombres de serotipos existentes en las subespecies. Los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) siguen esta práctica y utilizan nombres de los serotipos en subespecie I y las fórmulas antigénicas para los serotipos sin nombre descrito después de 1966 en las subespecies II, IV y VI. Para los serotipos que no son especies separadas, el nombre serotipo no se escribe en cursiva y la primera letra se pone en mayúscula. En la primera mención de un serotipo el nombre del género se da seguido por la palabra “serotipo” o por la abreviatura “ser” y luego el nombre del serotipo o ser. Anteriormente el nombre se puede escribir con el género seguido directamente por el nombre de serotipo *Salmonella typhimurium*.

Los nombres de los miembros del género *Salmonella* se han reducido en la actualidad a una especie única *Salmonella* entérica⁴ y los nombres previos de las especies han quedado relegados al estado de serotipos.

A continuación se presenta las diferentes nomenclatura de *Salmonella typhi*

NOMENCLATURA TRADICIONAL	NOMENCLATURA POR EL CDC	NOMENCLATURA FORMAL
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>typhi</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>typhi</i>
<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>Paratyphi</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>paratyphi</i>
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>gallinarum</i>
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>pullorum</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>pullorum</i>
<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>arizonae</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>arizonae</i>

⁴ LIBRO: Koneman Diagnostico Microbiológico texto y atlas en color, Buenos Aires Argentina Editorial Medica Panamericana 2008, sexta edición

<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>enteritidis</i>
-------------------------------	---	--

2.1.3.3 Identificación de *Salmonella typhi*

El informe preliminar de tifoidea debe ser enviado a los clínicos tan pronto como se obtenga una identificación presuntiva de *Salmonella typhi*. Los métodos para el aislamiento de *Salmonella typhi* de sitios normalmente estériles (ej. sangre, médula ósea y orina).

Las muestras de sangre, médula ósea u orina obtenidas de un paciente con sospecha de fiebre tifoidea o con diagnóstico de fiebre de origen desconocido y enviadas a un laboratorio deben ser cultivadas en agar sangre o chocolate. Además, si los recursos permiten el uso de más de un medio, se debe inocular agar Mac Conkey (AMC).

Las muestras fecales deben ser cultivadas en medios selectivos de agar (por ejemplo, agar bismuto sulfito (BS) o agar Desoxicolato Citrato (ADC). Los aislamientos de sangre, médula ósea u orina deben teñirse con coloración de gram, mientras que los aislamientos obtenidos de muestras de heces no.

En la mayoría de las situaciones, la identificación presuntiva se fundamenta en la reacción de aislamiento en agar hierro Kligler (KIA) agar hierro triple azúcar (TSI) y una reacción serológica positiva en los antisueros Vi o D de *Salmonella*.

Si los cultivos de bacilos gramnegativos se han obtenido de muestras de sitios normalmente estériles o si los cultivos dan colonias incoloras en agar Mac Conkey, se debe inocular TSI/KIA. Los aislamientos que tienen una reacción típica de *Salmonella typhi* en TSI/KIA deben entonces someterse a prueba con antisueros Vi y D.

Apariencia típica de las colonias de *Salmonella typhi* en los diferentes medios:

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar Mac Conkey	Colonias lisas, transparentes e incoloras; 2 a 3 mm.
Agar Salmonella-Shigella	Colonias incoloras, transparentes, ámbar rosado, con pigmento color negro; 1 a 2 mm.
Agar Hektoen	Colonias verdes - azuladas (con o sin centro color negro) o amarillo, con el centro negro; 1 a 2 mm.
Agar Sulfito Bismuto	Negra, rodeada por una zona negra o amarronada con brillo metálico; 1 a 3 mm.

Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato	Rojo (con o sin el centro negro) o amarillo con el centro negro; 1 a 2 mm.
--	--

Los resultados de la prueba serológica deben notificarse inmediatamente a las autoridades de salud e inocularse en agar Mueller-Hinton para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos. Para cualquier aislamiento de sangre, no debe demorarse la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por esperar la identificación bioquímica o serológica.

Aunque el médico tratante no esté necesariamente esperando el resultado de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, ni la verificación de la identificación, el laboratorio de referencia debe confirmar la identificación del agente patógeno por caracterización bioquímica y serológica, registrar estos; y los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos además de la información demográfica de los pacientes, con fines epidemiológicos.

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar (TSI)

Las colonias sospechosas deben trasladarse cuidadosamente de los medios de cultivo en placas a un medio de tamizaje, como agar hierro de Kligler, agar hierro triple azúcar o cualquier medio de agar no selectivo, e incubarse toda la noche.

Se selecciona una de las colonias bien aisladas en cada placa. Con un asa de inoculación en punta se toca ligeramente solo el centro de la colonia, sin tocar el resto de la colonia, ni la superficie de la placa, ya que se podría tomar contaminantes que estuvieran presentes en la superficie del agar. Si la habilidad de seleccionar una colonia aislada y pura es cuestionable, se debe purificar la colonia sospechosa y estriarla para aislar en otra placa de agar antes de inocular la colonia en el bisel de agar TSI/KIA.

El TSI/KIA se inocula puncionando el fondo del tubo y estriando la superficie inclinada del agar (bisel) en el tubo. Se deben aflojar el tapón del tubo antes de la incubación. Después de una incubación de 24 horas a 35°C–37°C, se debe observar la superficie inclinada del TSI o KIA para ver las reacciones típicas de *Salmonella*. En el bisel de TSI o de KIA, *Salmonella typhi* produce característicamente una superficie alcalina (roja, “K”), un fondo ácido (amarillo, “A”) y una pequeña porción ennegrecida del agar (H₂S, +. Ácido sulfhídrico) en el sitio de la punción del bisel y en la línea de la punción no se produce gas (G). (Ver Fig. 3)

Es importante notar que algunas veces los aislamientos de *Salmonella typhi* no producen H₂S (ácido sulfhídrico). Los aislamientos de *Salmonella paratyphi* en TSI o KIA son comúnmente K/A G- y no producen H₂S. La mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* producen una reacción de K/A G+, que indica que la glucosa está fermentada con producción de gas y H₂S (ácido sulfhídrico).

2.1.3.4 Análisis bioquímicos adicionales para la identificación de *Salmonella typhi*

Los aislamientos de *Salmonella* pueden identificarse con medios tradicionales en tubos o sistemas bioquímicos comerciales.

Agar hierro lisina

El agar hierro lisina es un medio útil de detección, porque la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* descarboxilan la lisina y producen H₂S, mientras la producción de gas varía por serotipo.

Para inocular este medio se debe puncionar el fondo del agar en el tubo, y luego se procede a estriar la superficie del bisel, después de una incubación a 35°C–37°C durante 24 horas se realiza la lectura e interpretación.

En el agar hierro lisina, las cepas de *Salmonella* dan una reacción alcalina típica (púrpura) en el bisel y el fondo del tubo, de igual manera puede producir gas y H₂S (ennegreciendo el medio).

Cuando la reacción en el bisel del tubo es alcalina, la lisina está descarboxilada y el aislamiento se denomina “positivo a lisina”. A diferencia de la mayoría de otras *Salmonella*, los aislamientos de *Salmonella paratyphi* son negativos a lisina y aparecen amarillos en agar hierro lisina. Si se sospecha que hay infección por *Salmonella typhi* y se necesita hacer un diagnóstico rápido para identificar el tratamiento apropiado, se deben investigar los aislamientos sospechosos con antisueros antes de hacer la identificación bioquímica.

Agar movilidad

El agar movilidad debe ser inoculado con un asa de inoculación en punta en el medio de cultivo y con una sola punción de aproximadamente 1–2 cm de profundidad. La superficie del agar movilidad debe estar seca cuando se use, ya que la humedad puede producir el crecimiento de un microorganismo no móvil por lados del agar, creando una nube de crecimiento y apareciendo como móvil. El agar movilidad puede ser inoculado con el crecimiento de los tubos de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar que muestran una reacción típica de *Salmonella typhi*.

Otra opción es inocular el agar movilidad al mismo tiempo que el bisel de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar, usando la misma aguja de inoculación sin tocar de nuevo la colonia.

La movilidad está indicada por la presencia de un crecimiento difuso (el medio aparece como nublado) fuera de la línea de inoculación. Los microorganismos no móviles no crecen fuera de la línea de inoculación. Los laboratorios sin mucha experiencia pueden tener dificultad para leer las reacciones de movilidad; por ello, se deben comparar las reacciones con cepas control positiva y negativa. Las cepas de *Salmonella typhi* comúnmente son móviles (97%).

Medio de Citrato

El principio de la prueba de la utilización del citrato es la determinación de la capacidad del microorganismo para usar el citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones de amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del

indicador de pH. *Salmonella typhi* no utiliza el citrato como fuente de energía por lo tanto es citrato negativo. (Ver Fig.4)

Medio de urea

El medio de urea descubre microorganismos productores de ureasa (Por ejemplo, *Klebsiella* y *Proteus*). Se inocula el agar urea en abundancia sobre toda la superficie del bisel, se afloja el tapón antes de incubar toda la noche a 35 °C– 37 °C. Los cultivos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio, que muestra un color entre rosáceo y rojo. Los microorganismos ureasa negativos no cambian el color del medio, el cual es entre amarillo pálido y rosado. *Salmonella typhi* siempre es ureasa negativa.

Serología en lámina para la identificación de *Salmonella typhi*

Los cultivos de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar que se sospecha que son *Salmonella typhi* deben analizarse serológicamente con antisueros de *Salmonella* “Vi” y “O” del grupo D. Debido a que Vi es un antígeno capsular, si está presente puede enmascarar la reacción del grupo somático “O”. Por ello, los aislamientos de *Salmonella typhi* serán normalmente positivos tanto para Vi como para el antisuero D (es posible que la positividad sea débil en ambos).

Las pruebas de aglutinación serológicas pueden realizarse en una placa de petri o en una lámina de cristal limpia.

a) Se debe tomar una porción del crecimiento de la superficie del agar KIA, agar TSI, agar hierro lisina u otro medio de agar no selectivo con un asa de inoculación estéril.

b) Luego se emulsifica el crecimiento en tres pequeñas gotas de solución salina estéril y se debe mezclar completamente.

c) Se Añade una pequeña gota de antisuero O del grupo D a una de las suspensiones y una pequeña gota de antisuero Vi a una segunda. En la tercera suspensión se usa *Salmonella* serotipo *typhi* como control para la autoaglutinación (rugosidad). Por lo regular, se mezclan volúmenes aproximadamente iguales de antisuero y crecimiento, pero el volumen de la suspensión puede ser más del doble del volumen del antisuero. Para conservar antisuero, se pueden utilizar volúmenes muy pequeños, como 10 µl. Se puede utilizar un asa curva de inoculación para dispensar pequeñas cantidades de antisuero si no se dispusiera de micropipetas.

d) Finalmente se debe mezclar la suspensión y el antisuero completamente y realizar movimientos de vaivén en la lámina repetidamente para observar la aglutinación. Será más fácil verla con la lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro. Si la reacción es positiva, entre 30 segundos y 1 minuto aparecerá un precipitado.

Se debe examinar la suspensión salina para estar seguro de su uniformidad y de que no muestra grumos causados por la autoaglutinación. Si hubiera autoaglutinación, el cultivo es “rugoso” y no puede ser serotificado. Las reacciones fuertes de aglutinación se leen como positivas. Los cultivos que tienen reacciones típicas de TSI/KIA de *Salmonella typhi*

y que reaccionan serológicamente tanto con Vi o con el antisuero D pueden ser identificados como presuntas cepas *Salmonella typhi*.⁵

2.1.4 CUADRO CLÍNICO

Gastroenteritis

Es la manifestación más frecuente, que varía desde una diarrea leve hasta una fulminante, acompañada por fiebre leve y grados variados de náusea y vómitos.

El período de incubación de esta infección es de 8 a 48 horas después de la exposición, y suele ser de corta duración, entre 3-6 días.

Bacteriemia

Etapa que no posee síntomas gastrointestinales mayores, caracterizada por fiebre alta en picos y hemocultivos positivos, debido al paso de las bacterias desde el tracto digestivo hacia la sangre. El riesgo de esta situación consiste en la posibilidad de que el germen infecte otras estructuras, sobre todo en pacientes con cierta predisposición, como neonatos, ancianos, pacientes con prótesis, alteraciones de la inmunidad (SIDA, trasplantes) patología reumática, valvular o vascular.

Fiebre tifoidea

La especie responsable es la *Salmonella typhi*. La fiebre tifoidea se caracteriza por un cuadro clínico que aparece tras un período de incubación variable entre 3 y 60 días, donde predominan una fiebre elevada con disminución del nivel de conciencia, dolor abdominal y aparición de lesiones cutáneas en tronco en forma de manchas circulares de color rosa, que desaparecen con la presión y se mantiene durante pocos días. En este período temprano de una a dos semanas de duración con fiebre y constipación, durante el cual los cultivos de sangre son positivos y los cultivos de materia fecal son negativos; seguido por una segunda fase (diarreica) durante la cual, los cultivos de sangre que se toman son negativos y los de materia fecal son positivos. Otros datos de importancia para el diagnóstico son la esplenomegalia (crecimiento del bazo) y la leucopenia con importante desviación a la izquierda. Dada a su evolución natural, la enfermedad dura entre 4 y 8 semanas, pero este tiempo se ha acortado notablemente en la era antibiótica

Estado portador

Etapa en la cual las personas con infecciones previas, especialmente con *Salmonella typhi* pueden continuar excretando el microorganismo en sus heces hasta un año después de la remisión de los síntomas.⁶

⁵ Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Editorial Organización mundial para la Salud 2005 pag. 150.

⁶ Libro: Jawetz, décima edición

2.1.5 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El médico examinará al paciente en búsqueda de signos y síntomas de intoxicación alimentaria y también hará preguntas acerca de los alimentos que la persona ha ingerido recientemente. Los exámenes del vómito, la sangre, las heces y cualquier alimento sobrante pueden identificar la causa de la infección. Los exámenes son:

- Cultivo de heces (coprocultivo) para *Salmonella*
- Cultivos de sangre (hemocultivo) si se sospecha bacteriemia.
- Aglutininas frías/febriles (examen para anticuerpos específicos)

2.1.6 TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento es reponer los líquidos y electrolitos (sal y minerales) que se pierden a causa de la diarrea. Por lo general, no se administran medicamentos antidiarreicos ya que pueden prolongar el proceso infeccioso.

Una de las medidas de cuidados personales para evitar la deshidratación es la ingestión de soluciones electrolíticas para restituir los líquidos perdidos por la diarrea, las cuales se pueden conseguir sin prescripción. Se puede recomendar la terapia con antibióticos en personas con síntomas graves.

Las personas con diarrea (especialmente los niños) quienes no puedan tomar líquidos por vía oral debido a la náusea, pueden requerir de atención médica y de líquidos intravenosos. La fiebre y el dolor se pueden tratar con acetaminofén o con ibuprofeno. Cuando se presenta diarrea, es posible que las personas que tomen diuréticos deban suspenderlos durante el episodio agudo. Al respecto se le deben solicitar instrucciones al médico. Podría ser conveniente realizar modificaciones en la dieta durante un episodio de diarrea: restringir los productos lácteos, consumir banano, arroz, manzanas, tostada (dieta BRAT en inglés). Los bebés deben continuar con la lactancia materna y recibir soluciones de reposición electrolítica como lo sugiera el médico.

El uso de antibióticos se limita a los pacientes con fiebre tifoidea, con bacteriemia y a aquellos que tienen un mayor riesgo de producir complicaciones, como los ancianos, neonatos, portadores de prótesis e inmunodeprimidos. El tratamiento de elección es el cloranfenicol, teniendo como alternativas la ampicilina, amoxicilina, las cefalosporinas de tercera generación y las quinolonas. Para erradicar el germen en los portadores crónicos, se prefiere la amoxicilina.

2.1.7 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas. Según lo que se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.

El objetivo de la utilización del medio de cultivo es: el antibiograma, identificación, y multiplicación de los microorganismos.

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 °C. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos.

El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras (el rojo fenol se usa como indicador ya que es rojo en pH básico y amarillo en pH

ácido. La violeta de genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias grampositivas.

2.1.7.1 Clasificación de los medios de cultivo

Según su estado físico (consistencia).

- **Medios líquidos:** Se denominan caldo por su estado líquido. El medio líquido más utilizado es el llamado caldo nutritivo, compuesto principalmente de extracto de carne, peptona y agua. Se utiliza fundamentalmente cuando se pretende la obtención de una suspensión bacteriana de una determinada concentración.
- **Medios sólidos:** Se preparan a partir de los medios líquidos, agregándoles un agente gelificante. Los más utilizados son la gelatina y el agar.

Gelatina: Es una proteína animal obtenida de los huesos. Tiene el inconveniente de que es hidrolizada por muchas bacterias, y además su uso está muy limitado porque su punto de fusión es bajo (licúa a temperatura ambiente) razón por la que no puede utilizarse para cultivos a 37°C, que es la temperatura óptima de crecimiento para muchos microorganismos.

Agar-agar: Es un polímero de azúcares obtenido de algas marinas. Se trata de una molécula insoluble en agua pero soluble en agua caliente; una solución al 1.5% p/v forma un gel firme entre 32 °C y 39°C y no se funde por debajo de 85°C. Funde a 90°C y solidifica una vez fundido alrededor de los 45°C. Tiene el inconveniente de que introduce compuestos orgánicos indefinidos que pueden falsear los resultados de las necesidades nutritivas de un microorganismo.

Medios semisólidos: Se preparan a partir de los medios líquidos, agregando a éstos un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus usos es la investigación de la movilidad de las bacterias.

Según su utilización.

- **Medios comunes:** Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de bacterias que no necesiten requerimientos especiales. El medio más conocido de este grupo es el agar nutritivo o agar común, que resulta de la adición de agar al caldo nutritivo. Otros representantes de este grupo son el agar Tripticasa Soya, el agar Columbia, etc.
- **Medios de enriquecimiento:** Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes. Este enriquecimiento se hace por adición de sangre u otros productos biológicos (sangre, suero, leche, huevo, bilis, etc.) que aportan

dichos factores. En ocasiones es posible añadir suplementos artificiales a los medios para producir un enriquecimiento del mismo (por ejemplo. Polivitex, Isovitalex, etc.) El gonococo, por ejemplo, necesita cistina y cisteína para su crecimiento. Estas sustancias son aportadas por la sangre calentada adicionada al medio de cultivo (agar chocolate).

- **Medios selectivos:** Son medios utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias contenidas en una población polimicrobiana. El fundamento de estos medios consiste en facilitar nutricionalmente el crecimiento de una población microbiana específica. Un ejemplo de medio selectivo es el caldo selenito, que se utiliza para favorecer el crecimiento de *Salmonella* y frenar el del resto de Enterobacterias.
- **Medios inhibidores:** Cuando las sustancias añadidas a un medio selectivo impiden totalmente el crecimiento de una población microbiana, se denomina inhibidor. Los medios inhibidores podrían considerarse como una variante más restrictiva de los medios selectivos. Los medios inhibidores se consiguen habitualmente por adición de sustancias antimicrobianas o de cualquier otra que inhiba completamente el desarrollo de una población determinada. Un medio inhibidor es el Mac Conkey que permite el crecimiento de los gérmenes gramnegativos e impide el crecimiento de los grampositivos.
- **Medios diferenciales:** Se utilizan para poner en evidencia características bioquímicas que ayuden a diferenciar géneros o especies. La adición de un azúcar fermentable o un sustrato metabolizable se utilizan para este fin. El medio Mac Conkey es un medio diferencial porque permite distinguir los gérmenes que fermentan la lactosa de aquellos que no lo hacen. También lo son el C.L.E.D. (lactosa positiva/lactosa negativa), el agar sangre (tipo de hemólisis), el *Salmonella-Shigella* (que es doblemente diferencial), etc.
- **Medios de identificación:** Son los destinados a comprobar alguna cualidad específica que puede servirnos para reconocer la identidad de un microorganismo. Estos medios han de poseer los elementos necesarios para asegurar el crecimiento de los microorganismos, el sustrato específico que vaya a ser metabolizado y el indicador que nos muestre el resultado. El agar Kligler, el medio de Simmons y en general, cualquier medio al que se le haya añadido un elemento diferencial de un microorganismo, son medios utilizados en identificación.
- **Medios de multiplicación:** Sirven para obtener una gran cantidad de células a partir de un microorganismo ya aislado. Se emplean en la obtención de vacunas, en la investigación y en la industria. Los medios más adecuados para la multiplicación suelen ser líquidos. El caldo-infusión cerebro-corazón (BHI), es un ejemplo típico de estos medios.
- **Medios de conservación:** Se utilizan para conservar una cepa que, por diversas razones nos interese mantener. Fundamentalmente se utilizan como controles de calidad de las pruebas y reactivos utilizados en Microbiología. En el laboratorio se pueden conservar las cepas de tres formas:

- a. Haciendo pases periódicos de placa a placa,

- b. Mediante liofilización de una suspensión bacteriana.
 - c. Congelando las cepas en leche descremada estéril al 10%.
- **Medios de transporte:** Se usan para el transporte de muestras clínicas que no pueden sembrarse inmediatamente. Su utilización debe hacerse introduciendo la torunda con la que se obtuvo la muestra en el interior del medio (generalmente en un tubo). Son ejemplos típicos de este grupo los medios de Stuart-Amies, Cary-Blair.

Según su origen o composición.

Según las sustancias que entren a formar parte en su composición, los medios de cultivo pueden ser clasificados en:

- **Medios complejos:** Se preparan a partir de tejidos animales, y más raramente de vegetales. Su composición no es exactamente definida, y por consiguiente no es rigurosamente constante. Esto puede tener ciertos inconvenientes en condiciones experimentales, donde la reproductibilidad no podrá ser exacta.
- **Medios sintéticos:** Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua destilada en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida.
- **Medios semisintéticos:** En este caso se aportan los factores de crecimiento bajo la forma de un extracto orgánico complejo (extracto de levadura, extracto de tejidos, etc.). Ciertos gérmenes no crecen en ningún medio por muy enriquecido que esté éste, haciéndolo exclusivamente en células vivas con unas características determinadas. Ejemplos de este tipo son, aparte de los virus, las *Chlamydias*, *Rickettsias*, etc.

2.1.7.2 AGAR MAC CONKEY

El agar Mac Conkey es un tipo de gelatina que se produce de unas algas rojas. Se usa ampliamente en microbiología por sus propiedades al utilizarse para el aislamiento y cultivo de bacilos gramnegativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos.

Adicionalmente sirve como selector de bacterias lactosafilas en muestras clínicas, de agua y alimentos. La razón de la selección es que de bacterias grampositivas no admiten la lactosa que se encuentran en el medio. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Componentes

Los ingredientes necesarios para este medio son los siguientes: sales biliares (medio inhóspito para el crecimiento de bacterias grampositivas, excepto *Enterococcus* y algunas especies de *Staphylococcus*), cristal violeta colorante (inhóspito para cierto tipo de bacterias grampositivo), colorante rojo neutro (el cual marca microorganismos que fermenten la lactosa), lactosa y peptona. (Ver Fig.5).

Usos

Sirve como un indicador visual de pH, distinguiendo así las bacterias gramnegativas que pueden fermentar la lactosa (lactosa positiva) y las que no pueden (lactosa negativa).

Fermentadores de lactosa

Al utilizar la lactosa en el medio, bacterias Lactosa positiva como *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella* producen acidez, lo cual baja el pH bajo 6.8 lo que tiene como consecuencia la aparición de colonias de color rosadas o rojas.

No fermentadores

Bacterias que no fermentan la lactosa como *Salmonella*, *Proteus* y *Shigella* utilizan peptona en su lugar, formando amonio, lo cual incrementa el pH del agar, formando colonias incoloras.

2.1.7.3 AGAR MUELLER-HINTON

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Commite for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad, su bajo contenido de sustancias inhibitoras y el crecimiento satisfactorio que presentan la mayoría de los patógenos no fastidiosos. Con este medio se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de *Streptococcus*. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Componentes

En éste medio la infusión de carne y la peptona de caseína proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos. El almidón es agregado para absorber cualquier metabolito tóxico y el agar es adicionado como agente solidificante. (Ver Fig. 6).

Usos

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

2.1.7.4 AGAR TRIPTICASA SOYA

Es un medio nutritivo que garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológico tanto grampositivos como gramnegativo, hongos y levaduras puede ser utilizado para el monitoreo microbiológico de áreas y superficies y para el mantenimiento de cepas ATCC.

Componentes

Este medio contiene: polisorbato, histidina, peptona de soya, sodio tiosulfato, lecitina, peptona de caseína, cloruro de sodio y agar.

Usos

Este medio es de nutrición para las bacterias de crecimiento rápido.

2.1.8 HISTORIA DE LOS ANTIBIÓTICOS

A pesar de que los potentes compuestos antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas causadas por bacterias, tales como la tuberculosis, peste bubónica o la lepra, no se aislaron e identificaron hasta el siglo XX, el uso más remoto de los antibióticos tuvo lugar en China hace más de 2500 años. Se sabía entonces que la aplicación de la cuajada mohosa de la soya sobre ciertas infecciones traía beneficios terapéuticos.

Muchas otras culturas antiguas, entre ellos los antiguos egipcios y griegos usaban moho y ciertas plantas para el tratamiento de infecciones debido a que contenían antibióticos.

Este fenómeno recibe del nombre de antibiosis. El principio de antibiosis fue descrito en 1877 cuando Louis Pasteur y Robert Koch observaron que un bacilo en el aire podía inhibir el crecimiento de la bacteria *Bacillus anthracis*.

El primer antibiótico descubierto fue la penicilina, en 1897 por Ernest Duchesne, en Francia, quien trabajaba con hongos del género *Penicillium*, aunque su trabajo no recibió

la atención de la comunidad científica. La investigación en el campo de la terapéutica antibiótica moderna comenzó en Alemania, con el desarrollo del antibiótico de corto espectro Salvarsan por Paul Ehrlich en 1909. Ese descubrimiento permitió el tratamiento efectivo de la sífilis, un amplio problema de Salud Pública en la época. Ése medicamento, efectivo también para combatir otras infecciones por espiroquetas, ya no se emplea en el presente. Más adelante Alexander Fleming (1881-1955), un médico británico, estaba cultivando una bacteria (*Staphylococcus aureus*) en un plato de agar, el cual fue contaminado accidentalmente por hongos. Luego él advirtió que el medio de cultivo alrededor del moho estaba libre de bacterias, sorprendido, comenzó a investigar la causa, Fleming ya había trabajado previamente en las propiedades antibacterianas de la lisozima, y por ello pudo hacer una interpretación correcta de lo que vio, que el hongo estaba secretando algo que inhibía el crecimiento de la bacteria. Aunque no pudo purificar el material obtenido (el anillo principal de la molécula no era estable frente a los métodos de purificación que utilizó), informó del descubrimiento en la literatura científica. Debido a que el hongo era del género *Penicillium* (concretamente *Penicillium notatum*), denominó al producto penicilina.

Más de 10 años después, Ernest Chain y Howard Walter Florey se interesaron en el trabajo de Fleming y produjeron una forma purificada de la penicilina. Un antiguo alumno de Fleming, Cecil George Paine, realizó las primeras experiencias clínicas con penicilina en neonatos aquejados de oftalmía neonatal logrando el éxito en 1930. Paine no publicó estos resultados, cosa que sí hicieron Chain y Florey más adelante. Los tres investigadores, Fleming, Chain y Florey, compartieron el premio Nobel de Medicina en 1945.

En 1939, René Dubos aisló la gramicidina, uno de los primeros antibióticos usados fabricados comercialmente e indicado en el tratamiento de heridas y úlceras. Debido a la necesidad imperiosa de tratar las infecciones provocadas por heridas durante la II Guerra Mundial, se invirtieron muchos recursos en investigar y purificar la penicilina, y un equipo liderado por Howard Florey tuvo éxito en producir grandes cantidades del principio activo puro en 1940. Los antibióticos pronto se hicieron de uso generalizado desde el año 1943.

En marzo de 2000, médicos del hospital San Juan de Dios de San José (Costa Rica) publicaron manuscritos de Clodomiro Picado que explican sus experiencias entre 1915 y 1927 acerca de la acción inhibitoria de los hongos del género *Penicillium* en el crecimiento de *Staphylococcus* y *Streptococcus* infecciosos, motivo por el cual es reconocido como uno de los precursores del antibiótico, penicilina, descubierta por Fleming en 1928. El informe con los resultados de los tratamientos realizados con la penicilina por Picado fueron publicados por la Sociedad de Biología de París en 1927.

El descubrimiento de los antibióticos, así como de la anestesia y la adopción de prácticas higiénicas por el personal sanitario (por ejemplo, el lavado de manos y utilización de instrumentos estériles), revolucionó la sanidad y se convirtió en uno de los grandes avances de la historia en materia de salud. A los antibióticos se les denomina frecuentemente "*balas mágicas*", término usado por Ehrlich, por hacer blanco en los microorganismos sin perjudicar al huésped.

2.1.8.1 Generalidades de antibióticos

Un antibiótico es una sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintética de ella que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias.

Los antibióticos se utilizan en medicina humana, animal y horticultura para tratar infecciones provocadas por gérmenes. Normalmente los antibióticos presentan toxicidad selectiva, siendo muy superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan, aunque ocasionalmente puede producirse una reacción adversa medicamentosa, como afectar a la flora bacteriana normal del organismo. Los antibióticos generalmente ayudan a las defensas de un individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección. Un antibiótico es bacteriostático si impide el crecimiento de los gérmenes, y bactericida si los destruye, pudiendo generar también ambos efectos, según los casos.

En términos estrictos o históricos, un antibiótico es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros microorganismos. El término antibiótico fue utilizado por primera vez por Selman Waksman en 1942 para describir ciertas influencias antibióticas, es decir, aquellas formulaciones antagonistas al crecimiento de microorganismos y que son derivadas de otros organismos vivos. Esa definición, por ende, excluye a aquellas sustancias naturales, como el jugo gástrico y el peróxido de hidrógeno, que pueden matar a un microorganismo y que no son producidos por otros microorganismos.

En la actualidad la definición de un antibiótico está siendo usada para incluir a los antibióticos sintéticos o quimioterapéuticos antimicrobianos, como las quinolonas, sulfamidas y otros agentes antimicrobianos derivados de productos naturales y aquellos con propiedades antibióticas descubiertas empíricamente.

El objetivo del tratamiento con antibióticos es conseguir la erradicación del microorganismo patógeno. Para ello es necesario seguir una posología que consiga que en el foco de la infección se alcance una concentración del medicamento superior a la mínima concentración capaz de inhibir al microorganismo durante el tiempo suficiente. La automedicación con antibióticos supone un serio problema de salud pública, pues la inadecuada elección del antibiótico y, especialmente, una incorrecta posología, puede generar poblaciones de bacterias resistentes a dicho antibiótico. Por otro lado, los antibióticos y antimicrobianos son totalmente inefectivos en las enfermedades virales, por lo que su uso debe evitarse en estos casos.

2.1.8.2 Mecanismos de acción de los antibióticos

Debido a que los antibióticos tienen efectos sobre una diversidad de bacterias, sus mecanismos de acción difieren basados en las características vitales de cada organismo y que, por lo general, son objetivos que no existen en las células de mamíferos.

Pared celular

Algunos antibióticos ejercen su función en regiones y orgánulos intracelulares, por lo que son ineficaces en bacterias que contengan una pared celular, a menos que se logre inhibir la síntesis de esta estructura exterior, presente en muchas bacterias, pero no en animales. Muchos antibióticos van dirigidos a bloquear la síntesis, exportación, organización o formación de la pared celular, específicamente los enlaces cruzados del peptidoglicano, el principal componente de la pared celular, sin interferir con los componentes intracelulares. Esto permite alterar la composición intracelular del microorganismo por medio de la presión osmótica. Como la maquinaria intracelular permanece intacta, ello aumenta la presión interna sobre la membrana hasta el punto en que ésta cede, el contenido celular se libera al exterior, y la bacteria muere. También permiten la entrada de otros agentes antimicrobianos que no pueden atravesar la pared celular. Algunos ejemplos clásicos son:

- La bacitracina: del grupo de los péptidos, inhibe al transportador lipídico del peptidoglicano hacia el exterior de la célula.
- La penicilina: en el grupo de los betalactámicos, inhibe la transpeptidación, una reacción en la que se producen los enlaces cruzados de la pared celular y bloquea los inhibidores de las autolisinas.
- Las cefalosporinas: otro tipo de moléculas que inhiben la transpeptidación, por unión a las proteínas PBPs, implicadas en la última fase de la formación de la pared celular.

Membrana celular

Ciertos antibióticos pueden lesionar directa o indirectamente, al inhibir la síntesis de los constituyentes, la integridad de la membrana celular de las bacterias y de ciertos hongos. Las polimixina por ejemplo, son antibióticos que actúan como surfactante o detergente que reacciona con los lípidos de la membrana celular de las bacterias. Ello destruye la integridad de la permeabilidad de la membrana. Los elementos hidrosolubles y algunos que son tóxicos para el germen, pueden así entrar sin restricción al interior celular. La gramicidina A forma poros o canales en las bicapas lipídicas

Acción sobre ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas

Algunos antibióticos actúan bloqueando la síntesis del ADN, ARN, ribosomas, ácidos nucleicos o las enzimas que participan en la síntesis de las proteínas, resultando en proteínas defectuosas. La mitomicina es un compuesto con estructura asimétrica y que se fija a las hélices del ADN e inhibe o bloquea la expresión de la enzima ADN polimerasa y,

por ende, la replicación del ADN y el ensamblaje de las proteínas. La actinomicina, por su parte, ejerce su mecanismo en la misma manera que la mitomicina, solo que es una molécula simétrica.

Las sulfamidas son análogos estructurales de moléculas biológicas y tienen parecido a las moléculas normalmente usadas por la célula diana. Al hacer uso de estas moléculas farmacológicas, las vías metabólicas del microorganismo son bloqueadas, provocando una inhibición en la producción de bases nitrogenadas y, eventualmente, la muerte celular

Las quinolonas y fluoroquinolonas actúan sobre enzimas del tipo girasas y topoisomerasas de ADN, responsables de la topología de los cromosomas, alterando el control celular sobre la replicación bacteriana y produciendo una alteración en la lectura del mensaje genético.

Acción sobre los ribosomas

Aproximadamente la mitad de los antibióticos actúan por inhibición de los ribosomas bacterianos, los orgánulos responsables de la síntesis de proteínas y que son distintos en composición de los ribosomas en mamíferos. Algunos ejemplos incluyen los aminoglucósidos (se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma), las tetraciclinas (bloquean la unión del ARNt aminoacil al complejo ARNm-ribosoma), eritromicina (se fijan de manera específica a la porción 50S de los ribosomas bacterianos) y la doxiciclina.

2.1.8.3 Generalidades de las quinolonas: ciprofloxacina.

La primera quinolona: Es el ácido nalidíxico, específico contra bacterias gramnegativas, fue presentado en 1962. Desde entonces las modificaciones estructurales han dado como resultado fluoroquinolonas de segunda, tercera y cuarta generación, que han ampliado la cobertura a organismos grampositivos.

Mecanismo de acción de las quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano. Actúan en el ADN cromosómico bacteriano, uniéndose a algunas de las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, por desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico.

En gramnegativos, las topoisomerasas que inhiben principalmente es la ADN-girasa, que tiene una subunidad A y una subunidad B. La función más importante de la ADN-girasa es mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. También libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP. En la girasa las quinolonas interaccionan con aminoácidos de las alfa-hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del ADN. En grampositivos la principal diana es la

topoisomerasa IV, que tiene dos subunidades, ParC y ParE. La topoisomerasa IV separa las hebras de ADN tras cada replicación. También tiene una actividad relajante sobre la cadena de ADN.

Un paso importante en el mecanismo de acción de las quinolonas es la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN que contiene ADN roto. La unión de una quinolona a la ADN-girasa provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN responsable de la inhibición de la enzima. La topoisomerasa IV formaría complejos similares a los que se forman con la girasa. Su acción sobre las topoisomerasas, aunque necesaria, no explica por sí sola su acción bactericida. Deben tener lugar acontecimientos posteriores, pero su mecanismo íntimo se desconoce.

Espectro antimicrobiano

Las quinolonas se han dividido en cuatro generaciones sobre la base de actividad antimicrobiana, agentes de primera generación, que son usados muy poco actualmente, tienen moderada actividad gramnegativa y una distribución sistémica mínima.

Las quinolonas de segunda generación han ampliado la actividad contra gramnegativo y contra agentes patógenos atípicos, pero tiene limitada acción grampositivo. Estos agentes son más activos contra los bacilos gramnegativo aeróbicos. La ciprofloxacina es la quinolona más activa contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Las quinolonas de tercera generación conservan la actividad gramnegativa y amplían su actividad contra bacterias intracelulares atípicas, además de mejorar la actividad contra grampositivos.

Los agentes de cuarta generación mejoran la acción contra grampositivos, mantienen la cobertura de gramnegativos, y adquieren acción contra bacterias anaeróbicas. La menor susceptibilidad y la resistencia adquirida a las quinolonas de segunda generación limitan su uso en el tratamiento de infecciones estafilocócicas y estreptocócicas. Las fluorquinolonas actualmente disponibles con actividad in vitro contra *Streptococcus pneumoniae* (incluyendo las variedades penicilina -resistentes) son levofloxacina, sparfloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, y trovafloxacina. levofloxacina y sparfloxacina presentan actividad estreptocócica in vitro inferior comparado con gatifloxacina, moxifloxacina y trovafloxacina. gatifloxacina es dos a cuatro veces más activo que la levofloxacina contra *Streptococcus pneumoniae* in vitro, y moxifloxacina es cuatro a ocho veces más activo. Comparado con ciprofloxacina y levofloxacina, las fluorquinolonas gatifloxacina, moxifloxacina, y trovafloxacina tienen actividad in vitro mayor contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*.

GENERACIÓN DE QUINOLONAS	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
PRIMERA GENERACIÓN	
Ácido nalidixico Cinoxacina Ácido pipemidico	Enterobacterias
SEGUNDA GENERACIÓN	
Clase I : Lomefloxacina Norfloxacina Enoxacina	Enterobacterias
Clase II : Ofloxacina Ciprofloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (solo ciprofloxacina)
TERCERA GENERACIÓN	
Levofloxacina Sparfloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, <i>Streptococcus</i>
CUARTA GENERACIÓN	
Trovafloxacina	Enterobacterias patógenos atípicos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , anaerobios

Resistencia a las quinolonas

La resistencia a quinolonas tiene mecanismos múltiples y un impacto clínico importante. Las mutaciones pueden ocurrir rápidamente durante la terapia con fluoroquinolonas y convertirse en el factor más importante que limite uso de estos antimicrobianos.

Los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas se pueden resumir en tres principales:

- Mutación de la enzima. Se produce por producción de mutaciones cromosómicas que alteran la topoisomerasa del ADN bacteriano.

- Alteración de la permeabilidad. Se presenta como una disminución de la permeabilidad bacteriana por alteración de las porinas (poros).
- Bomba de eflujo. Por un mecanismo de eflujo, mediante el cual se excreta de manera activa a las quinolonas hacia el exterior bacteriano como una bomba de agua que saca el líquido desde una inundación hacia fuera.

2.1.9 EL ANTIBIOGRAMA

El primer objetivo del antibiograma es el de medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales.

El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país, es como puede adaptarse la antibioterapia empírica, revisarse regularmente los espectros clínicos de los antibióticos y adoptarse ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales.

Sensibilidad bacteriana a los antibióticos

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas.

Hay diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de rutina, y de manera semicuantitativa, las concentraciones inhibitorias mínimas (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Estos diferentes métodos de rutina permiten categorizar una cierta cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. Esta cepa se denomina Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico.

Para un determinado antibiótico, una cepa bacteriana es, según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

- **Sensible:** si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.

- **Resistente:** si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- **Intermedia:** cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

Ciertas moléculas son representativas de un grupo de antibióticos. Los resultados (Sensible, Intermedio y Resistente) obtenidos con estas moléculas pueden ser ampliados a los antibióticos del grupo, que en ese caso no es necesario ensayar (Ejemplo: Equivalencia entre La cefalotina que se ensaya y las restantes cefalosporinas de 1ª generación que no es necesario probar, ya que el resultado puede deducirse del obtenido en la cefalotina).

Este hecho permite ensayar un número reducido de antibióticos, sin limitar por ello las posibilidades terapéuticas. Para considerar a una bacteria susceptible o resistente a cualquier antimicrobiano se debe poner atención, a su estructura química, por lo que se clasifican de la siguiente manera:

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS AGRUPADOS POR ESTRUCTURA			
Nombre genérico	Usos frecuentes	Posibles efectos adversos	Mecanismo de acción
Aminoglucósidos			
Amikacina Gentamicina Neomicina Netilmicina Estreptomycinina Tobramicina	Infecciones severas causadas por bacterias gramnegativas como <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> .	-Sordera (especialmente en combinación con diuréticos de asa) -Vértigo -Daño renal (especialmente con Cefalosporina).	Se une a la unidad 30S del ribosoma provocando una alineación y reconocimiento anormal por el ARN, por lo que inhibe la síntesis de proteínas.
Carbacefen			
Loracarbef	Infecciones respiratorias altas e infecciones urinarias	-Ocasionalmente trombocitopenia	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.
Carbapenem			
Ertapenem	Bactericidas para las grampositivas y	-Malestar estomacal y diarrea.	Mecanismo betalactámico:

Doripenem Imipenem/Cistatina Meropenem	gramnegativas por lo que se usa para cobertura de amplio espectro de manera empírica.	-Nauseas. -Dolor de cabeza. -Rash y alergias.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular, aunque son menos sensibles a las betalactamasas.
Cefalosporinas de primera generación.			
Cefadroxilo Cefazolina Cefalotina Cefaloxina Cefradina	Al igual que las penicilinas, todas las cefalosporinas tienen un anillo betalactámico, por lo que son también antibióticos bactericidas. Cocos grampositivos, <i>Proteus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> .	-Malestar estomacal y diarrea. -Nauseas. -Reacción alérgicas.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular, aunque son menos sensibles a las betalactamasas.
Cefalosporinas de segunda generación			
Cefaclor Cefamandol Cefoxitina Ceprozil Cefuroxina	Son más eficaces que la penicilina frente a los bacilos gramnegativos, e igual frente a los cocos grampositivos, <i>Enterobacter</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> .	-Malestar estomacal. -Náuseas y diarreas. -Reacciones alérgicas.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular.
Cefalosporinas de tercera generación.			
Cefixima Cefdinir Cefditoren Cefoperazona Cefotaxima Ceftazidima	Las cefalosporinas se emplean en el tratamiento de serias infecciones por organismos resistentes a otros betalactámicos,	-Malestar estomacal. -Náuseas y diarrea. -Reacción alérgica.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular.

Cefibuten Cefizoxima Ceftriaxona	como ciertas presentaciones de meningitis.		
Cefalosporina de cuarta generación.			
Cefepime Cefaclidina	Mayor cobertura en contra de <i>Pseudomonas</i> y organismos grampositivos.	-Igual que las otras Cefalosporinas.	Impiden la síntesis de peptidoglicano.
Cefalosporinas de quinta generación.			
Ceftobiprol	Actividad adicional contra el <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina.	-Igual que otras cefalosporinas.	Impiden la síntesis de peptidoglicanos.
Glicopéptidos			
Teicoplanina Vancomicina	Pacientes críticamente enfermos y con sensibilidad demostrada a los betalactámicos.	Reversibles: -Alergias y dolor. -Nefrotoxicidad. -Neutropenia. -Sordera	Actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglucano en un paso metabólico, inhibe la síntesis de ARN
Macrólidos			
Azitromicina Claritromicina Diritromicina Eritromicina Telitromicina Espectinomina	Infecciones por <i>Streptococcus</i> , sífilis, infecciones respiratorias, infección por <i>Mycoplasma</i> . neumonía, y activo contra gonococos	-Náuseas y diarreas (especialmente en altas dosis). -Ictericia. -Trastornos visuales.	Se une al ribosoma, unidad 50s por lo que inhibe la síntesis de proteínas.

Monobactámicos			
Aztreonam	Activo frente a bacterias gramnegativas aeróbicas, como las Enterobacterias y las especies <i>Yersinia</i> , <i>Plesiomonas</i> y <i>Neisseria</i> inactivo frente a cocos grampositivos anaerobios y <i>Acinetobacter</i> .	-Rash cutáneo -Alteración de ciertas funciones hepáticas.	Igual que los otros Betalactámicos: interrumpen la síntesis de peptidoglicano.
Penicilinas			
Amoxicilina Ampicilina Azlocilina Carbenicilina Dicloxacilina Meticilina Oxacilina Penicilina Piperacilina Ticarcilina	Amplia gama de infecciones, penicilina aún se indica en infecciones estreptococcicas, Sífilis y enfermedad de Lyme.	-Malestar gastrointestinal y diarrea. -Alergias con serias reacciones anafilácticas. -Raramente daño renal o cerebral.	Igual que los otros betalactámicos: interrumpen la síntesis de peptidoglicano.
Polipéptidos			
Bacitracina Colistin Polimixina B	Infecciones del ojo, oído y vejiga.	Daño renal y ciertos nervios (cuando sea inyectado)	Inhibe la síntesis de componentes del peptidoglicano en la pared celular bacteriana, interactúa con la membrana plasmática bacteriana.
Quinolonas			
Ciprofloxacina Gatifloxacina Levofloxacina Lomefloxacina Nofloxacina Ofloxacina	Infecciones del tracto urinario, prostatitis bacteriana, neumonía adquirida en la comunidad, diarrea bacteriana, infecciones	-Nauseas -Tendinosis.	Inhibe la Topoisomerasa, ADN girasa y otras enzimas bacterianas inhibiendo la replicación y transcripción de ADN.

Trovafloxacina Moxifloxacina Enoxacina	por <i>Mycoplasma</i> , Gonorrea.		
Sulfonamidas			
Prontosol Sulfocetamida Sulfametizol Sulfanilimida Trimetoprin Trimetropin- sulfametoxazol	Infecciones urinarias (con la excepción de sulfametacida)	-Náuseas y diarreas. -Alergias. -Cristales en orina -Insuficiencia renal. -Disminución del número de glóbulos blancos.	Inhibición de la síntesis de ácido fólico, entre otras funciones inhibitorias de la síntesis de ADN y ARN.
Tetraciclinas			
Democlociclina Doxiciclina Oxitetraciclina Tetraciclina	Sífilis, infecciones por <i>Chlamydia</i> , <i>Mycoplasma</i> y <i>Rickettsia</i> .	-Malestar gastrointestinal -Manchas en los dientes. -Toxico para la madre y el feto durante el embarazo.	Se une a la unidad 30s del ribosoma por lo que inhibe la síntesis de proteínas.

Cualquier agente aprobado para uso clínico tuvo que haber demostrado in vitro su capacidad para inhibir el crecimiento de algunos blancos de bacterias en concentraciones que pueden alcanzarse con riesgo de toxicidad aceptables, lo que significa que la concentración inhibitoria mínima (CIM) puede rebasarse cómodamente con dosis que siguen siendo tolerables para los pacientes.

Una vez que se establecen estos factores, la selección rutinaria del tratamiento puede basarse en las características conocidas o esperadas de los microorganismos y las características farmacológicas de los antimicrobianos. Con respecto a los microorganismos el uso del término susceptible (sensible) implica que su CIM está en un nivel alcanzable en la sangre y otros líquidos corporales apropiados con la dosis recomendada. Lo contrario de susceptible, resistente significa que la CIM no se basa con los niveles alcanzables en condiciones normales. Como en todos los sistemas biológicos, la CIM de algunos microorganismos se encuentra entre los niveles susceptibles y resistentes. Las cepas limítrofes se llaman intermedias, moderadamente sensibles o moderadamente resistentes, según los valores exactos y las convenciones de sistema en que se informa. Para el tratamiento de enfermedades por estos microorganismo pueden usarse agentes antimicrobianos, pero en dosis mayores, para llegar a compartimientos corporales en los

que se concentran los patógenos. Por ejemplo la administración masiva de antimicrobianos no tóxicos, como penicilinas y Cefalosporinas, inhibe a algunos patógenos que en condiciones normales se considerarían resistentes in vitro

Las características farmacológicas importantes de los antimicrobianos incluyen la dosis, vías y frecuencias de administración.

La naturaleza aparentemente perfecta de los antimicrobianos, al principio considerado como “fármacos maravillosos”, se ha erosionado de manera constante por la aparición de cepas resistentes a su actividad. Esta resistencia puede ser inherente al microorganismo o aparecer por mutación o adquisición de nuevos genes. Los mecanismos por los cuales las bacterias desarrollan resistencia y la manera en que estas se disemina son de gran interés para el uso continuo de los agentes actuales y para el desarrollo de antimicrobianos nuevos.

2.1.10 FORMAS PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA

Existen dos formas para determinar la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos:

2.1.10.1 Método base de dilución en caldo

En los métodos de dilución en caldo, base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller-Hinton suplementado con los cationes magnesio y calcio. (Ver Fig. 7).

El antibiótico se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.

Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. Luego de la incubación adecuada (usualmente de un día para el otro) se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un microorganismo (CMB) se debe realizar la prueba de actividad bactericida, que emplea el mismo sistema de dilución en caldo que para medir la sensibilidad.

Al mismo tiempo que la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento, inmediatamente después de ser sembrado, y se inoculara también en una placa de agar para determinar el

número real de unidades formadoras de colonias (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la incubación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación por el factor de dilución. Por ejemplo, usando un asa calibrada de 0,01 ml para sembrar la placa y contando unas 250 colonias, en 1 ml del tubo original habrá 250/0,01 UFC/ml.

Una vez determinada la CIM, se siembra una cantidad conocida de inóculo de cada uno de los tubos de caldo que no presentaban turbidez en placas de agar (la pequeña cantidad del agente antimicrobiano que es llevada junto con el inóculo se elimina por dilución en el agar), y el número de colonias que crece en estos subcultivos, después de incubar durante la noche, se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. Dado que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0,1 % del inóculo original se denomina concentración bactericida mínima (CBM) o Concentración Letal Mínima (CLM).

Las CIM y las CMB de un agente antimicrobiano pueden ser determinadas, con este método o con alguna variante, para cualquier bacteria que crezca en un medio líquido.

2.1.10.2 Método de difusión en agar (Kirby- Bauer)

Una vez demostradas las grandes ventajas de las técnicas de dilución en caldo, el paso siguiente, pensando sobre todo en poder realizar fácilmente pruebas de sensibilidad de un microorganismo frente a múltiples antibióticos a la vez, consistió en buscar la manera de aplicar la idea directamente a las placas de agar. (Ver Fig. 8)

Las primeras pruebas se realizaron inoculando la superficie de una placa de agar con el microorganismo en estudio, colocando pequeñas cubetas (de metal o vidrio) sobre el agar y agregando las soluciones de los diferentes antimicrobianos dentro de dichas cubetas. Los agentes antimicrobianos difundían en el medio en forma radial alrededor de la cubeta e inhibían el desarrollo del microorganismo en la zona donde su concentración era suficientemente alta. Las áreas de inhibición grandes indicaban una actividad antimicrobiana más efectiva.

Este método fue modificado en 1947 por Bondi y cols. incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel de filtro. Fue un paso adelante gigantesco ya que el uso de los discos de papel permitía preparar un gran número de pruebas idénticas y almacenarlas para uso futuro.

En 1966, después de los estudios realizados por Bauer, Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad fue estandarizado y correlacionado definitivamente con las CMI correspondientes.

Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido, y aun es, uno de los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo.

La técnica de Kirby-Bauer siempre debe de efectuarse con el agar Mueller-Hinton, el grosor de la placa, concentración del inóculo, humedad, temperatura, y otros factores deben estar estandarizados. Esta técnica solo sirve para efectuar el antibiograma de las siguientes bacterias aerobias o facultativas de crecimiento rápido:

- *Staphylococcus aureus*
- Enterobacterias
- *Pseudomonas*

El antibiograma para *Haemophilus* spp y *Neisseria* spp debe de hacerse en Mueller-Hinton con 5% de sangre “achocolatado”.

Para *Streptococcus pneumoniae* Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero.

Estandarización del método de Kirby –Bauer

La principal mejoría en la guía de laboratorio de las pruebas de sensibilidad en las últimas décadas ha provenido del desarrollo de procedimientos estandarizados que han sido adoptados ampliamente. Es muy importante cumplir con los protocolos recomendados por la CLSI para lograr resultados reproducibles.

Los siguientes parámetros son algunas de las importantes facetas de las pruebas de sensibilidad que han sido estandarizadas:

- **Medio de cultivo:**

Se ha seleccionado caldo y agar de Mueller-Hinton para evaluar las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Estas fórmulas se aproximan más estrechamente a los criterios de un medio reproducible. Contienen infusión de carne de vaca deshidratada, digerido, ácido de caseína y almidón de maíz. La mayoría de los patógenos crecen satisfactoriamente y los medios tienen un efecto inhibitor mínimo sobre sulfamidas, trimetoprim y tetraciclinas. Se presentan grandes cantidades de timina en algunos lotes de medios. Algunos microorganismos pueden utilizar la timina para evitar el mecanismo de acción de trimetoprim, y crecer aun cuando sean innatamente resistentes al antibiótico.

- **pH:**

El pH del medio debe estar entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.

- **Concentración de cationes.**

La concentración de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} afecta los resultados de la sensibilidad cuando se evalúan ciertas combinaciones de especies bacterianas y antibióticos.

- **Atmósfera.** Se incuba el agar en una estufa de incubación con aire ambiental. No se debe utilizar una estufa con CO_2 para pruebas de rutina. El ácido carbónico formado sobre la superficie del agar puede producir una disminución en el pH, que puede afectar la actividad antibacteriana de ciertos antibióticos.

- **Temperatura.**

Las placas deben ser incubadas a $35\text{ }^\circ\text{C}$.

- **Inóculo.**

En general, el inóculo se prepara a partir de un cultivo en caldo que ha sido incubado de 4 a 6 horas, cuando se considera que el crecimiento está en fase logarítmico. Se deben tomar muestras de varias colonias de aspecto similar para reducir la variación en la población bacteriana. La densidad de la suspensión se ajusta hasta aproximadamente 10^8 Unidades formadoras de colonias (UFC) por milímetro, comparando la turbidez con un estándar de BaSO_4 de Mc Farland de 0.5.

- **Escala de Mac Farland.**

Este se utiliza para la preparación del inóculo, se compara el grado de turbidez del inóculo con la escala de Mac Farland con concentración 0.5.

Preparación de la turbidez estándar de Mac Farland

La turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland preparada comercialmente está disponible de varios fabricantes. Además, la turbidez estándar de 0,5 de Mac Farland se prepara añadiendo 0,5 ml de cloruro de una solución de bario deshidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1,175% (p/vol) a 99,5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (vol/vol). La turbidez estándar se divide en alícuotas, se coloca en tubos de prueba idénticos a aquellos utilizados para preparar la suspensión del inóculo.

Se sella los tubos de turbidez estándar de Mac Farland con cera, Parafilm u otros medios para prevenir la evaporación. La turbidez estándar de Mac Farland se guarda hasta 6 meses en la oscuridad a temperatura ambiente (22°C – 25°C); descártela después de 6 meses o antes si pierde algún volumen. (Se marca el tubo para indicar el nivel del líquido y verificar antes de utilizarlo para estar seguro que no ha ocurrido evaporación, si esto ocurre, debe prepararse una turbidez estándar fresca.) Antes de utilizarlos, se debe agitar bien el tubo que contiene la turbidez estándar, de manera que el precipitado blanco fino de sulfato de bario se mezcle en el tubo.

- **Almacenamiento de los discos de antibióticos.**

Las existencias de trabajo de discos de antimicrobianos deben guardarse en un refrigerador (a 4°C). Al sacar los discos del refrigerador, el paquete que contiene los cartuchos debe permanecer cerrado a temperatura ambiente por aproximadamente una hora, para que la temperatura se equilibre; esto reduce la condensación en los discos.

Si se usa un dispensador de discos, este debe tener una tapa bien ajustada, debe guardarse en el refrigerador y se debe dejar a temperatura ambiente antes de usarse.

Se aplica los discos de antimicrobianos a las placas lo más pronto posible, pero no pasados los 15 minutos después de la inoculación. La superficie de la placa debe estar seca, sin líquido remanente. Se debe colocar los discos uno por uno con pinzas estériles o con un aparato dispensador mecánico y se debe presionar suavemente en el agar hacia abajo. En general, no deben ponerse más de 12 discos en una placa de 150mm ni más de cuatro en una placa de 100 mm, para prevenir la superposición de las zonas de inhibición y posibles errores en las mediciones. La difusión del antibiótico en el disco comienza inmediatamente, por lo cual, una vez que el disco toque la superficie del agar, no debe moverse.

2.1.11 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella typhi*

El tratamiento con un agente antimicrobiano apropiado es fundamental para el paciente con tifoidea.

Los resultados de informes recientes han dado a conocer un aumento en el grado de resistencia de cepas de *Salmonella typhi* a uno o más agentes antimicrobianos, por lo cual es necesario someter los aislamientos a pruebas de susceptibilidad lo antes posible. Sin embargo, cualquier desviación en los métodos puede invalidar los resultados. Por esta razón, si los laboratorios no cuentan con recursos para realizar la prueba de difusión en disco exactamente como se describe, deben enviar los aislamientos a otros laboratorios donde se realice la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

2.1.11.1 Prueba de difusión en disco para *Salmonella typhi*.

El medio de agar Mueller-Hinton es el único validado por el CLSI para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

2.1.11.2 Preparación del inóculo.

Cada cultivo que se va a analizar debe ser estriado en un medio de agar no inhibitorio (por ejemplo, agar sangre, agar infusión cerebro corazón o agar Trypticase Soya) para obtener colonias aisladas. Después de incubar durante toda la noche a 35°C, se debe seleccionar con un asa de inoculación de cuatro o cinco colonias bien aisladas y se transfiere el crecimiento a un tubo de solución salina estéril o de caldo no selectivo (por ejemplo, caldo de Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o caldo de Trypticase Soya) y se ponen en un mezclador vórtex.

La suspensión bacteriana debe compararse con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland. La turbidez estándar debe agitarse en un mezclador vórtex inmediatamente antes de usarla. Si la suspensión bacteriana no parece tener la misma densidad que la turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland, reduzca la turbidez añadiéndole salina estéril o caldo; para aumentarla, añádale más crecimiento bacteriano.

2.1.11.3 Procedimiento para la inoculación

A los 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se debe introducir un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Se presiona firmemente contra la pared interior del tubo, justo sobre el nivel del líquido, rote el hisopo para quitar el exceso del líquido. Se estría tres veces el hisopo sobre toda la superficie del medio, rotando la placa con un giro de aproximadamente 60 grados después de cada aplicación, para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Por último, se pasa el hisopo alrededor de todo el borde de la superficie del agar.

2.1.11.4 Control de calidad

Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son confiables, se debe incluir al menos un microorganismo de control con cada prueba. (ATCC 25922 es la cepa de control de *Escherichia coli* usada cuando se prueba *Salmonella typhi* y otras cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.) Los diámetros de zona obtenidos para la cepa ATCC 25922 se deben comparar con los límites publicados por el CLSI. Si las zonas producidas por la cepa control están fuera de los rangos esperados, es necesario considerar posibles fuentes de error. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se ven afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio puede ser una fuente de error si no cumple con las recomendaciones del CLSI. Por ejemplo, si el agar contiene timidina o timina en exceso, pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim y causar que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o se distingan menos. Los microorganismos pueden presentarse como resistentes a estas drogas cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm, puede afectar el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los medicamentos.

También afecta la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos el hecho de que el inóculo no sea un cultivo puro o no contenga una concentración de bacterias que se aproxime a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero.

También, si las colonias del medio de agar sangre se usan para preparar la suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas del trimetoprim o sulfonamida pueden trasladarse y producir una nube de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetoprim y sulfametoxazol, al igual que cuando los aislamientos que se prueban son susceptibles. Si los discos de antimicrobianos no se almacenan correctamente o se usan después de la fecha en que caducan, su potencia puede disminuir, lo que quedará demostrado por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición que está alrededor de la cepa control.

2.1.12 OTROS TIPOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA IN VITRO

2.1.12.1 Método Epsilométrico (E-test)

Se trata de una técnica cuantitativa en placa que permite obtener una lectura directa de CIM en $\mu\text{g/ml}$, ya que se emplean tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antibiótico indicadas en una escala graduada sobre la propia tira.

Una de sus grandes ventajas, dadas sus características, es que resulta un método ideal para estudiar cualquier tipo de microorganismo, aerobio o anaerobio, incluyendo aquellos llamados "fastidiosos" o los que tengan requerimientos especiales para crecer.

Fundamento

Consiste en una tira de plástico no poroso de 6cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.

El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en agar. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CIM será el valor obtenido en el punto que el extremo de inhibición intersecciona con la tira. (Ver Fig. 9).

Indicaciones y limitaciones

Debe tenerse en cuenta que si se coloca la tira al revés no se observa elipse de inhibición ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. El E-test se ha utilizado para determinar la CIM de diversos antibióticos en una amplia gama de bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus* nutricionalmente deficientes, *Enterococcus* con resistencia elevada a aminoglicósidos. En algunos casos como vancomicina y *Streptococcus pneumoniae*, la CIM es más alta utilizando el E-test que la obtenida por los métodos de microdilución, produciendo resultados que se encuentran en el rango superior de aislamientos susceptibles y con resultados de control de calidad por encima de los límites aceptables.

El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM.

Método del E-test.

- De la técnica disco-placa. Se deja absorber el inóculo de 10 a 15 minutos para asegurarse que la superficie del agar está completamente seca antes de aplicar las tiras. Este punto es crítico para optimizar la realización del E-test.
- Dispensación de las tiras. Tanto si se utiliza el aplicador de las tiras como las pinzas, nos debemos asegurar que la escala de CIM está orientada hacia arriba y que la concentración máxima está cercana al extremo de la placa de petri.
- Se debe asegurar que la tira haga contacto completamente con la superficie del agar. Si es necesario, eliminar las gotas de aire que puedan encontrarse por debajo de la tira presionándola ligeramente con las pinzas.

Es importante no mover las tiras una vez que han sido colocadas en la superficie del agar ya que el antibiótico empieza a difundir rápidamente. Cuando se utiliza una placa de petri de 100 mm depositar solo una tira por placa y poner la tira en el centro de la placa, mientras que cuando se utiliza una placa de 150 mm no se deben colocar más de 6 tiras.

Incubación.

Por regla general las placas son incubadas inmediatamente durante 16 a 24 horas a una temperatura de 35 °C.

Lectura de los resultados.

La CIM se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presente crecimiento.

Control de calidad

Las cepas de control utilizadas serán las recomendadas por la CLSI para la determinación de la CIM por métodos de dilución. Los valores de CIM esperados deberán estar comprendidos entre los rangos establecidos para cada antibiótico.

Interpretación de resultados.

Después de la incubación se observa una zona de inhibición en forma de elipse, el valor de CIM es el punto de intersección de la elipse con la tira y está indicada en la escala impresa sobre la superficie de la tira.

2.1.12.2 Métodos automatizados

La mayoría de estos novedosos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o

fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica del técnico a través de un visor invertido de espejo.

Su manipulación suele ser fácil y rápida, generalmente automatizada o semiautomatizada, lo que los convierte en métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales.

Este sistema no puede emplearse para las pruebas de sensibilidad de las cepas fastidiosas; sin embargo, es esperable que en pocos años se pueda desarrollar un medio de cultivo que soporte el crecimiento de este tipo de cepas.

Uno de estos es el sistema Vitek, el cual está hecho para las pruebas de sensibilidad de los microorganismos de crecimiento rápido y es aquí donde se ha sentido su impacto.

2.1.13 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA.

Los principales mecanismos de resistencia bacteriana son:

- Acumulación de barreras para un antimicrobiano por impermeabilidad o salida activa.
- Alteración de un blanco antimicrobiano que lo vuelve susceptible
- Desactivación de un antimicrobiano por efecto de una enzima que produce el microorganismo⁷.

Los cambios en las vías metabólicas se traducen en resistencia en una cuantas combinaciones antimicrobianos –microorganismos.

- **Acumulación de barreras para un antimicrobiano por impermeabilidad o salida activa.**

Un antimicrobiano efectivo debe entrar a la célula bacteriana y alcanzar concentraciones suficientes para actuar sobre objetivos. La pared celular de las bacterias gramnegativas, en particular la membrana externa representa una barrera formidable para el ingreso al interior de la célula. Los canales en una proteína (porina) de la membrana externa permiten el ingreso de moléculas según su tamaño, carga, grado de hidrofobia o configuración molecular. Esta es una de las principales razones de resistencia inherente a los antimicrobianos, pero dicha características de transporte pueden cambiar incluso en especies susceptibles típicas a causa de mutaciones en las proteínas porinas. Diversas

⁷ Libro: Sherris, MICROBIOLOGIA MÉDICA cuarta edición

especies bacterianas tienen mecanismos de salida que dependen de la energía que bombean a las tetraciclinas o flouoroquinolonas para expulsarla de la célula.

- **Alteración de un blanco antimicrobiano que lo vuelve susceptible**

Una vez dentro de la célula, los antimicrobianos actúan mediante la unión y desactivación de su blanco, que casi siempre es una enzima crucial o un sitio del ribosoma. Si el blanco se modifica de tal manera que su afinidad por el antimicrobiano disminuye, el efecto inhibitor se reduce de manera proporcional. Si la modificación de un solo sitio del blanco hace que el microorganismo no sea susceptible al fármaco, la mutación a la resistencia puede ocurrir en un solo paso, incluso durante el tratamiento. Esto ocurrió con los primeros aminoglucósidos (estreptomina), que se unía a un solo sitio de los ribosomas, y con la primera quinolona (ácido nalidíxico), que se adhería solo con una de las cuatro subunidades de la topoisomerasa. En la actualidad de los nuevos agentes de cada una de esas clases se unen en múltiples sitios del blanco, lo que hace improbable la mutación a la resistencia.

- **Desactivación de un antimicrobiano por efecto de una enzima que produce el microorganismo**

La desactivación enzimática del antimicrobiano invasor es el mecanismo de resistencia más potente y sólido. Literalmente, cientos de enzimas distintas producidas por las bacterias resistentes pueden desactivar al antimicrobiano dentro de la célula, en el espacio periplasmático o fuera de la célula.

Pueden actuar sobre la molécula de antimicrobiano por interrupción de su estructura o al catalizar una reacción que modifique su estructura química.

B -Lactamasa

Es un término general que se refiere a cualquiera de los cientos de enzimas bacterianas capaces de abrir el anillo betalactámico y desactivar a varios integrantes del grupo betalactámico. La primera de ellas se descubrió cuando surgieron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina que desactivaban a la penicilina in vitro.

La enzima se llamó penicilinas, pero con el crecimiento de la familia de los lactámicos beta y la resistencia concomitante, quedó claro que la situación es bastante compleja; cada beta lactamasa es una enzima distinta, con características físicas y perfil de sustratos propios. Por ejemplo, la penicilinas estafilocócica original también tiene actividad contra ampicilina, pero no contra metilina ni cualquiera de las cefalosporinas.

Las bacterias que producen de manera constitutiva betalactamasa casi siempre tienen un alto nivel de resistencia, con CIM fuera del espectro terapéutico. Incluso los productores débiles de betalactamasa beta se consideran resistentes porque el resultado de las pruebas de susceptibilidad (y tal vez de los sitios infectados) depende mucho de la cantidad de bacterias que existen.

Enzimas modificadoras.

Las modificaciones ocurren en el citoplasma o en estrecha relación con la membrana citoplasmática. La resistencia que confieren estas acciones casi siempre es alta; el aminoglucósido modificado ya no se une con el ribosoma. La mayoría actúa mediante la modificación química de la molécula del antimicrobiano en forma similar a las enzimas modificadoras de aminoglucósido. Las enzimas con mayor importancia clínica confieren resistencia a la eritromicina y al cloranfenicol.

2.1.13.1 Genética de la resistencia

- **Resistencia intrínseca**

Llamada también cromosómica, en este tipo de resistencia las especies tienen rasgos que los hacen susceptibles, como barreras de permeabilidad, falta de susceptibilidad de la pared celular o blancos ribosomales.

- **Resistencia adquirida**

Cuando una especie que al principio era susceptible desarrolla resistencia, esta resistencia adquirida puede ser resultado de una mutación o provenir de otro microorganismo mediante algunos de los mecanismos de intercambio genético. De éstas la conjugación y la transposición son los más importantes y a menudo suceden.

- **Resistencia por mutación**

La resistencia adquirida puede ocurrir cuando se produce una mutación crucial en el blanco del antimicrobiano o en las proteínas relacionadas con el acceso al blanco.

- **Plásmidos conjugación**

La transferencia de plásmidos por conjugación fue el primer mecanismo descubierto para adquirir nuevos genes de resistencia y aun es el más importante.

Los genes de resistencia en los plásmidos pueden determinar la resistencia a uno o varios antimicrobianos que actúan por distintos mecanismos. Después de la conjugación, los genes de resistencia pueden permanecer en un plásmido que recupera su forma circular o, menos a menudo, se integran en el cromosoma por recombinación.

2.1.13.2 Origen de las cepas resistentes

Es posible que las cepas resistentes existan desde antes de la introducción de un antimicrobiano, pero con una frecuencia tan baja que es improbable detectarlas. Por ejemplo *Staphylococcus aureus* productor de penicilinas se encontró en colecciones de cultivos previos al desarrollo en el empleo de este antimicrobiano. Bajo la presión selectiva que ejerce el uso del antimicrobiano, es probable que las clonas resistentes aumenten y si son virulentas se diseminen.

2.1.13.3 Factores que contribuyen al aumento de la resistencia bacteriana.

Entre los factores que han contribuido a la resistencia bacteriana tenemos:

- La presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos.
- La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad.

2.1.13.4 Resistencia de *Salmonella typhi* a la ciprofloxacina

El uso masivo de fluoroquinolonas también se asoció con la disminución en la susceptibilidad y aumento de las tasas de resistencia. Los pacientes con fiebre entérica causada por aislamientos con susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina tienen más probabilidad de tener fiebre por períodos más prolongados y altas tasas de fracaso terapéutico. También se comunicaron casos de susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina entre los aislamientos de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*.

La resistencia a quinolonas de salmonella en general se asocia con mutaciones en el sitio blanco, la ADN girasa, más frecuentemente en la región determinante de resistencia a las quinolonas de la subunidad A. En las especies de *Salmonella* no *typhi* se describieron genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, *qnr* y *aac(6')-Ib-cr*. El mecanismo exacto de resistencia no se ha dilucidado por completo, pero diversas investigaciones demostraron que las mutaciones puntuales en el gen *gyrA* de la región determinante de resistencia a las quinolonas confieren resistencia al ácido nalidíxico y susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas. La resistencia de alto grado a la

ciprofloxacina puede deberse al impacto acumulado de mutaciones en múltiples genes, a la disminución de la permeabilidad de la membrana, a las bombas activas de salida y a la presencia de genes *qnr* codificados por plásmidos.

Emergencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación

La aparición de resistencia a las fluoroquinolonas y de cepas con susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina motivó el uso de cefalosporinas de tercera generación para el tratamiento de las salmonelosis. Los plásmidos que portan el gen *qnr* o *aac(6′)-Ib-cr* pueden contener un gen de resistencia a cefalosporinas de espectro ampliado. Hay informes esporádicos de resistencia de alto grado a ceftriaxona en *Salmonella typhi*, con beta lactamasas de espectro extendido CTX-M-15 y SHV-12. Recientemente, se descubrieron cepas de *Salmonella typhi* productoras de AmpC beta lactamasas ACC-1. La diseminación de beta lactamasas de espectro extendido limita las opciones terapéuticas y deja solamente como opciones de segunda línea a los carbapenémicos y a la tigeciclina.

2.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.

- **Agar:** esta gelatina es un polisacárido sin ramificación obtenidas de la pared celular de varias especies de algas géneros *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria* entre otros resultando según la especie de un color característico. La palabra agar viene del malayo agar-agar, que significa jalea
- **Aglutinación:** fenómeno en el que las bacterias o las células en suspensión en un líquido precipitan cuando se añaden anticuerpos; éstos se unen a sus antígenos y originan complejos del tipo células antígenos anticuerpos en forma de grumos visibles.
- **Aminoglucósidos:** glucósidos en los que existen varios grupos amino, especialmente una familia de antibióticos, de los cuales la estreptomicina fue el primero en ser descubierto y que son producidos por diferentes hongos del género de los *Streptomyces*.
- **Antibiótico:** es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros microorganismos.
- **Antimicrobiano:** sustancia que actúa contra microorganismos parásitos como bacterias, virus, u hongos matando o inhibiendo su crecimiento. Según el agente microbiano que ataca se habla de antibiótico, antifúngico, antiviral, etc.
- **ATCC:** American Type Culture Collection.
- **Bacteria:** organismo microscópico unicelular procariota, carente de núcleo, que se multiplica por división celular sencilla o por esporas: algunas bacterias son importantes agentes en la putrefacción o la fermentación (por ejemplo, para la

elaboración de quesos), producen antibióticos (como la estreptomicina) o causan enfermedades (como el tífus, el cólera y la tuberculosis).

- **Bacteriología:** ciencia que estudia las bacterias, sus clases, formas de reproducción y métodos para controlarlas o destruirlas.
- **Blanco:** solución que contiene todos los reactivos necesarios para el análisis de una sustancia excepto la sustancia investigada.
- **CDC:** Centro de Control para la Prevención de Enfermedades.
- **Cefalosporinas:** nombre bajo el que agrupa una familia de antibióticos beta lactámicos, derivados del ácido cefalosporánico producido por un hongo, el *Cephalosporum acremonium*. Se han obtenido a partir del mismo numerosos derivados, activos por vía oral y parenteral.
- **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima.
- **CMB:** Concentración Mínima Bactericida.
- **CLM:** Concentración Letal Mínima.
- **CLSI:** Clinical Laboratory Estandar Institute.
- **Control de calidad:** método de repetición de ensayos de materiales estándar conocidos y de monitorización de los parámetros de reacción para garantizar la precisión y la exactitud.
- **Enterobacteria:** son una familia de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes y de otros del ser humano y de otras especies animales).
- **Enzima:** molécula orgánica de naturaleza proteica que interviene en todas las reacciones del metabolismo acelerando su velocidad y favoreciendo las transformaciones bioquímicas. Son sustancias muy solubles y globulares.
- **Gérmen:** microorganismo, en especial el que puede provocar alguna enfermedad en el hombre.
- **Intoxicación:** conjunto de alteraciones provocadas por la penetración de una sustancia tóxica capaz de alterar los procesos vitales en el organismo. Las sustancias que pueden ocasionar una intoxicación son de origen muy diverso.
- **Inoculación:** introducción en el organismo de forma accidental o voluntaria de los gérmenes productores de una enfermedad, a través de una herida en los tegumentos.
- **Medio de cultivo:** son una mezcla equilibrada de nutrientes que en concentraciones adecuadas y con condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Contienen una base mineral; fuente de carbono, nitrógeno y azufre; atmósfera adecuada y los factores de crecimiento necesarios.
- **Microbiota:** también conocida como *microflora* es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano.

- **Mutación:** alteración en el material hereditario de un DNA cromosómico, producida de forma espontánea o a causa de un agente físico, químico o incluso biológico. Si afecta a las células germinales puede ser heredada por la siguiente generación.
- **Patógeno:** es todo agente (o cualquier “ente” en otras áreas fuera de la biología) que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea este humano, animal o vegetal.
- **PBPs:** son proteína de anclaje de las Penicilinas.
- **Péptidoglicano:** el péptidoglucano o mureína es un copolímero formado por una secuencia alternante de N- acetil glucosamina y el ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces β 1,4.
- **Plásmido:** son moléculas de ADN extracromosómicos circular o lineal, que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico.
- **Quinolonas:** son unos antimicrobianos que actúan bloqueando la actividad de la ADN girasa y de la topoisomerasa bacteriana. Tienen una acción bactericida rápida, que es dosis dependiente (en relación con la concentración).
- **Resistencia bacteriana:** capacidad de ciertas cepas de bacterias para desarrollar tolerancia a antibióticos específicos.
- **Susceptibilidad:** calidad de ser más vulnerable de lo normal a una enfermedad, trastorno o una acción.⁸
- **Topoisomerasa:** son enzimas capaces de actuar sobre la topología del ADN.
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.

⁸ Diccionario Mosby de Medicina

3. SISTEMA DE HIPÓTESIS

3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hi: Existe susceptibilidad al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

3.2 HIPÓTESIS NULA

Ho: No existe susceptibilidad al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

3.3 HIPÓTESIS ALTERNA

Ha: Existe susceptibilidad intermedia al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

HIPÓTESIS	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES
<p>Hi: Existe susceptibilidad al antibiótico ciprofloxacina en cepas de <i>Salmonella typhi</i> en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia.</p>	<p>Susceptibilidad a ciprofloxacina a cepas de <i>Salmonella typhi</i>, por el Método Epsilométrico (E-test).</p>	<p>-Susceptibilidad bacteriana: Es la capacidad de un antibiótico para combatir la infección desarrollada por microorganismos patógenos.</p> <p>-</p>	<p>-E-test: Es una expansión de técnica de difusión en disco que incluye una tira plástica no porosa, con un gradiente predefinido de antimicrobiano que equivale a quince diluciones.</p>	<p>-Prueba bacteriológica elipsoidales para detectar en forma directa la Concentracion Inhibitoria Mínima</p> <p>-Preparación de la suspensión bacteriana.</p>	<p>-Lectura de las elipses utilizando las tablas de identificación por medio de las cuales se dará a conocer si la bacteria es sensible, intermedia o resistente.</p>

HIPÓTESIS	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES
			<p>- <i>Salmonella typhi</i> Es una bacteria gram negativa, no esporulada, móvil, flagelada en forma de bacilo que pertenece a la familia <i>Enterobacteriaceae</i> que causa la enfermedad llamada fiebre tifoidea.</p>	<p>-Comparación del inculo con el estándar de la escala de Mac Farland 0.5.</p>	

HIPÓTESIS	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES
			<p>-Antibiótico: sustancia química producida por un ser vivo o derivado, sintético que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacteria.</p>	<p>- Siembra del inóculo por estrías en tres direcciones opuestas en el agar Mueller-Hinton.</p>	

4. DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

CUANTITATIVO: porque se cuantificó la información registrada de cada una de las cepas en estudio.

De acuerdo al desarrollo de los acontecimientos y recolección de los datos; la investigación fue:

- **RETROSPECTIVA:** debido a que por medio de esta investigación, se permitió conocer el mecanismo de susceptibilidad que presentó *Salmonella typhi* frente a la ciprofloxacina.

De acuerdo al período y a la secuencia del estudio fue:

- **TRANSVERSAL:** debido a que se ejecutó el procedimiento en un solo período comprendido de julio a septiembre de 2013.

De acuerdo al análisis y alcance de los resultados:

- **DESCRIPTIVO:** Ya que la mayoría de las cepas presentaron mecanismos de sensibilidad disminuida a la ciprofloxacina, las cuales se pudieron evidenciar a través de los diferentes métodos de susceptibilidad antimicrobiana entre ellos el E-test, además se realizó resiembra en agar Tripticasa Soya y agar Mac Conkey para su posterior inoculación en Agar Mueller-Hinton y se interpretaron los resultados, de acuerdo a tablas ya establecidas por la CLSI, debido a que cada uno de los resultados obtenidos se interpretó con valores estándares del método.
- **EXPERIMENTAL:** Fue experimental ya que para su ejecución se necesitó la manipulación intencional del antibiótico (ciprofloxacina) para determinar la sensibilidad bacteriana.

4.2 POBLACIÓN

Para realizar ésta investigación la población estaba conformada por las cepas estudiadas en el Laboratorio Nacional de Referencia, que en su totalidad son 250 cepas de *Salmonella typhi*, durante el año 2013.

4.3 MUESTRA

La conformaron las cepas que presentaron sensibilidad disminuida a ciprofloxacina empleando el método de Kirby-Bauer en el Laboratorio Nacional de Referencia siendo en su totalidad una muestra de 40 cepas de *Salmonella typhi*.

4.4 CRITERIOS PARA ESTABLECER LA MUESTRA

4.4.1 Criterios de inclusión

- Que pertenezca a la especie *typhi*.
- Que la cepa sea aislada del año 2013.
- Que la cepa en estudio no presente ninguna contaminación.
- Que no interese el tipo de muestra de donde fue aislado.
- Todas aquellas cepas a las cuales no se les ha realizado la susceptibilidad por el método Epsilométrico (E-test).

4.4.2 Criterios de exclusión

- Todas aquellas cepas que hayan sido aisladas en años anteriores.
- Aquellas cepas que no pertenezcan a la especie *typhi*.
- Cepas con signos visibles de contaminación.

4.5 TIPO DE MUESTREO.

No probabilístico por conveniencia: ya que no se basa en la teoría de las probabilidades, y por conveniencia ya que se incluyeron cepas aisladas recientemente del año 2013, y la cantidad de muestras seleccionadas se debió a que cada una de las tiras para realizar las pruebas de susceptibilidad, tiene un alto costo económico, por lo que se redujo la cantidad de cepas tomadas en cuenta.

4.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Técnicas.

- **Documental bibliográfica:**
Mediante el cual se recopiló la información necesaria para la base teórica de la investigación. Ejemplo libros, diccionarios especializados y tesis.
- **Documental de información electrónica:**
Por medio de la cual se obtuvo información actualizada. Ejemplo páginas web.

4.7 INSTRUMENTOS.

- Boleta de registro de las cepas en estudio (VER ANEXO 4).
- Tablas de referencia para susceptibilidad antimicrobiana según la CLSI. (VER ANEXO 5).

4.8 TÉCNICAS DE LABORATORIO

- Siembra de las cepas en estudio en el medio selectivo y diferencial agar Mac Conkey para constatar morfología.
- Siembra en agar Trypticase Soya para la preparación del inóculo.
- Estandarización del inóculo por medio de la escala de Mac Farland 0.5.
- Siembra del inóculo en el medio de Mueller-Hinton por el método de estría en tres direcciones opuestas.
- Colocación de las tiras del antibiótico e incubación de las placas.
- Lectura e interpretación de resultados.

4.8.1 Técnica de aislamiento primario

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales, preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo, y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo

- Se mezcla suavemente el vial que contenía la cepa bacteriana en estudio, cerca del mechero, se flamea la boca de éste y con un hisopo estéril se introduce verticalmente, tomando la cantidad de muestra necesaria.
- Se coloca el inóculo en ATS.

- Inmediatamente se estria con un asa en argolla estéril, por agotamiento de estrías.
- Después, se incuban las siembras a una temperatura de $\pm 36^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se realiza la lectura de las placas, evaluando morfología y descartando aquellas con signos de contaminación.

4.8.2 Técnicas de identificación

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten, en distintos test químicos, aplicados a medios biológicos, los cuales conocida su reacción, nos permiten identificar microorganismos presentes.

Agar TSI (Tres Azúcares y Hierro)

- Se inocula el medio de TSI con un asa en punta estéril, partiendo de ATS.
- Se toma una colonia aislada con el asa, y se punciona en el tubo, de 3-5 mm.
- Tras puncionar con el asa se estrió el bisel del medio, con movimiento de un lado hacia otro.
- Se incuban el medio con el tapón flojo, a 36°C por 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación se realizan las lecturas de los tubos.

Agar movilidad

- Se inocula el medio movilidad con un asa en punta.
- Se toma una de las colonias más aisladas partiendo de ATS.
- Luego se introduce el asa en el medio sin tocar el fondo.
- Después se saca el asa con sumo cuidado.
- Se incuban los tubos con el tapón flojo, a 36°C por 24 horas.
- Después de la incubación se realizan las lecturas del medio movilidad.

4.9 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS.

Material.

- Pinzas estéril.
- Hisopos estériles.
- Placas de Petri 99X100mm.
- Gabacha.

- Guantes de látex.
- Medios de cultivo.
- Papel toalla.
- Jabón antiséptico.
- Tubos.
- Espátula.
- Asa bacteriológica.
- Erlenmeyer
- Probeta
- Tubos con tapón de rosca
- Jeringa
- Chispero

Equipo.

- Balanza granataría.
- pHmetro.
- Autoclave.
- Cocina de gas.
- Mechero de Bunsen.
- Refrigerador.
- Incubadora
- Rotador Vortex
- Tabla Cebra para la escala de Mac Farland.
- Vernier

Reactivos.

- Solución salina estéril.
- Soluciones buffer para calibrar pHmetro.
- Tiras de E-test.
- Escala de Mac Farland 0.5.

4.10 PROCEDIMIENTOS

4.10.1 Planeación.

El proceso de graduación inició con una reunión general con estudiantes egresados de la carrera de tecnología médica con la coordinadora metodológica, con el objeto de informar acerca del proceso de grado, además se definieron las fases que se llevarían a cabo

en el trabajo de investigación, así también se dieron a conocer los grupos de tesis con su respectivo asesor.

Luego se procedió a una reunión con el respectivo docente director para dar a conocer el tema seleccionado a desarrollar.

Seguidamente se solicitaron los permisos necesarios a la Señora Ministra de Salud Dra. María Isabel Rodríguez para tener acceso e ingreso al área de bacteriología , para realizar la ejecución; así como también solicitar la asesoría y aporte de material al personal del Laboratorio Nacional de Referencia.(VER ANEXO6).

Posteriormente se realizó la cotización de precios unitarios y mayorista de las tiras E-test con diferentes casas comerciales y demás materiales a utilizar. (VERANEXO 7).

4.10.2 Ejecución.

Para iniciar se hizo una visita al Laboratorio Nacional de Referencia, con el objetivo de obtener información de la sensibilidad bacteriana disminuida de cepas de *Salmonella typhi*, que se encuentran identificadas en ésta institución, al mismo tiempo se solicitó la colaboración del personal que labora en el área de bacteriología en dicho establecimiento.

Luego se procedió a la preparación de los medios de cultivo tales como, agar Tripticasa Soya, agar Mac Conkey, agar Mueller Hinton, agar TSI y agar Movilidad, dos días antes de iniciar la selección de las muestras, en el Laboratorio Nacional de Referencia con la supervisión de un profesional del área de bacteriología. A los medios de cultivo se les realizó control de calidad. Todos estos procedimientos se detallan a continuación:

4.10.3 Preparación de medios de cultivo según instrucciones del fabricante:

Preparación de agar Tripticasa Soya (ATS):

Preparar 1500 ml de ATS

40mg-----1000ml

x-----1500ml = 60mg/ml

- Una vez calibrada la balanza, se procedió a pesar 60 mg de ATS.
- Luego se midió el agua destilada en una probeta.
- Se colocó una pequeña cantidad de agua destilada en un erlenmeyer estéril.
- Posteriormente se agregó el ATS pesado a un Erlenmeyer.
- Después se agregó el agua destilada restante, para disolverlo por completo, agitándolo suavemente.
- Luego se llevó a ebullición. (Ver Fig. 10).
- A continuación se le colocó la cinta testigo y se llevó a autoclave a 121⁰C con 100 libras de presión por 15 minutos.

- Transcurrido éste tiempo, se dejó enfriar el medio a 51⁰C, en baño de maría.
- Finalmente se vertió el medio en las placas de petri estériles, cerca del mechero, se dejaron solidificar, y se rotularon con fecha de preparación y nombre del medio, después se almacenan en refrigeración, en forma invertida, (Ver Fig.11).
- El medio agar Mac Conkey y agar Mueller Hinton se prepararon de igual forma, a excepción del agar Mueller Hinton que se deben medir los ml del medio, según el tamaño de la placa, que para éste caso fueron 25 ml para una placa de 99x100mm.(Ver Fig. 12).

CONTROL DE CALIDAD DEL AUTOCLAVE.

Antes de llevar los medios a su esterilización en el autoclave, se debe realizar el control de calidad de la manera siguiente:

Se realizó utilizando una ampolla que contiene caldo nutritivo, azúcar, un indicador de pH, así como esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (de esporulación optimada) como organismo de ensayo apatógeno. La termorresistencia está ajustada de tal manera que las esporas mediante calentamiento en vapor a presión tras 15 minutos a no menos de 121 °C± 0.5°C, experimentan una destrucción total. A temperatura más baja o tiempo de acción más breve las esporas sobreviven al menos parcialmente.

Las ampollas se agregan al material de carga. Después de haber tenido lugar el autoclavaje se controla el éxito de la esterilización mediante incubación de las ampollas: si no existe crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* queda demostrado una esterilización suficiente, mientras que la existencia de crecimiento, indica una esterilización insuficiente (VER ANEXO 8).

4.10.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

El control de calidad de los medios se realiza para garantizar la esterilidad, funcionalidad y actividad del medio.

Control de calidad de agar Mac Conkey.

Se inició el control de calidad comprobando la esterilidad, incubando una placa por 24 y 48 horas en la incubadora a 36 ± 1⁰C; obteniendo una esterilidad optima a las 24 y 48 horas de incubación.

Posteriormente se realizó el control de calidad de crecimiento/inhibición, utilizando las siguientes cepas control:

- *Escherichia coli* ATCC 25922.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Salmonella typhi* muestra confirmada.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Escherichia coli ATCC 25922: crecimiento satisfactorio (colonias lactosa positiva)

Staphylococcus aureus ATCC 25923: crecimiento satisfactorio (no hubo crecimiento bacteriano)

Salmonella typhi muestra confirmada: crecimiento satisfactorio (colonias lactosa negativa) (Ver Fig. 13).

Así mismo se realizó la medición de pH. (Ver Fig. 14).

De igual manera se realizó el control de calidad a los demás medios (TSA, TSI y Movilidad).

Control de calidad de agar Mueller-Hinton.

- Primeramente se realizó el control de calidad de esterilización, colocando una placa en la incubadora por 24 y 48 horas a 36 ± 1 °C. Obteniendo una esterilidad óptima a las 24 y 48 horas de incubación.
- Después se procedió a controlar el pH del medio con el pHmetro, el cual es de 7.2-7.4; obteniendo un pH de 7.2. (Ver Fig.15)
- Luego se midió el grosor del medio con la ayuda del vernier, partiendo el medio en cinco cuadrantes y medir cada una de ellos para ver la uniformidad del medio y que debe oscilar en los rangos normales (4 mm) aceptándose un margen de error de ± 0.2 mm.(Ver Fig.16).

Control de timina- timidina.

Éste se realiza cada vez que se adquiera un nuevo lote de medio de cultivo.

- El contenido de timina-timidina debe ser escaso o nulo en el medio de cultivo.
- Concentraciones elevadas dan falsa resistencia, de las sulfonamidas.
- Se utilizó una cepa control de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, frente al disco se SXT (Trimetoprim/sulfametoxazol) 25 ug, el halo debe ser ≥ 20 mm.
- El exceso de timina-timidina debe corregirse con plasma de caballo al 3%, que contiene timidina fosforilasa.

Control de calidad de los cationes.

Éste se realiza cada vez que se cambia de lote.

- La concentración de cationes en el medio de cultivo debe de ser la siguiente: Ca de 20-25mg/L, Mg de 10-12.5mg/L; concentraciones mayores de éstos cationes afectará a colistin, tetraciclinas, aumentando su actividad, y en los aminoglucósidos disminuyéndola.
- Concentraciones menores, producen efecto contrario con los mismos antibióticos.
- Para evaluar las concentraciones se utilizó ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*, frente a gentamicina, el halo debe medir entre 16- 21mm.

Teniendo listo el material a utilizar, se procedió a realizar la siembra de las cepas de *Salmonella typhi* identificadas para obtener cultivos puros, se sembró la bacteria en medio nutritivo (TSA). (Ver Fig. 17).

4.10.5 Procesamiento de cepas

Procedimiento de siembra

Las cepas en estudio se encontraban almacenadas en viales de 1ml de leche descremada al 10%, a -70⁰C. (Ver Fig.18)

- Se mezcló suavemente el vial que contenía la cepa bacteriana en estudio, cerca del mechero, se flameó la boca de éste y con un hisopo estéril se introdujo verticalmente, tomando la cantidad de muestra necesaria,
- Se colocó el inoculó en ATS,
- Inmediatamente se estrió con un asa en argolla estéril, por agotamiento de estrías.
- Después, se incubaron las placas a una temperatura de $\pm 36^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de las placas, evaluando morfología y descartando aquellas con signos de contaminación.
- Se realizó un segundo pase inoculando primero en ATS y luego agar Mac Conkey, para mejorar el metabolismo de las bacterias en estudio, realizando el mismo procedimiento antes descrito,(se sembró en agar Mac Conkey para observar la morfología de las bacterias en éste medio) ése mismo día se realizó la técnica de identificación procediendo de la siguiente forma: (Ver Fig. 19)

Agar TSI (Tres Azúcares y Hierro)

- Se inocularon los tubos de TSI con una asa en punta estéril, partiendo de ATS,
- Se tomó una colonia aislada con el asa, y se introdujo en el tubo, de 3-5 mm sin tocar el fondo.

- Tras retirar el asa se estrió el bisel del tubo, con movimiento de un lado hacia otro,
- Se incubaron los tubos con el tapón flojo, a 36⁰C por 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación se realizó las lecturas de los tubos. (Ver Fig. 20).

Agar Movilidad

- Se inoculó el medio con un asa en punta.
- Se tomó una de las colonias más aisladas partiendo de ATS.
- Luego se introdujo el asa en el medio sin tocar el fondo.
- Después se sacó el asa con sumo cuidado.
- Se incubaron los tubos con el tapón flojo, a 36⁰C por 24 horas.
- El día después de la incubación se realizó las lecturas de los tubos (Ver Fig.21).

Procedimiento de preparación del inóculo.

- Consistió en que se tomaron de 3 a 4 colonias aisladas de igual morfología, partiendo de ATS
- Se suspendió el inóculo en un tubo que contenía 8ml de solución salina estéril al 0.85%.
- Se mezcló la suspensión en el rotador vórtex. (Ver Fig. 22)
- Después se estandarizó con la escala de Mac Farland 0.5, comparando la turbidez con la escala de Mac Farland, mediante la ayuda de la tabla cebra, (Ver Fig. 23).

Método Epsilométrico (e-test)

- Una vez estandarizado el inóculo con un hisopo estéril se introdujo en el tubo que contenía la suspensión bacteriana, exprimiendo el hisopo por las paredes del tubo para eliminar el exceso de humedad.
- Seguidamente se estrió en 3 direcciones opuestas en el medio agar Mueller Hinton, finalmente se rotó el hisopo alrededor de los bordes de la placa.
- Se esperó un tiempo de 10 a 15 minutos para colocar las tiras impregnadas con el antibiótico de ciprofloxacina, presionando suavemente para evitar la formación de burbujas, (Ver Fig. 24).

Además se aplicó el control para las cepas en estudio utilizando la cepa de *Salmonella* ATCC 14024,

A continuación se incubaron las siembras en placas de Mueller Hinton a 36⁰C de 18-24 horas. (Ver Fig. 25)

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de la zona de inhibición, que nos indicó la CIM. (Ver Fig. 26)

PLAN DE ANALISIS

Interpretación de resultados según la CLSI

Puntos de corte de CLSI 2013. (Tabla 2 A Enterobacterias M02 and M07)

Las cepas con una CIM de $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ se reportan como **sensibles**.

Las cepas con una CIM de **0.12 a 0.5 $\mu\text{g/ml}$** se reportan como **intermedios**.

Las cepas con una CIM de $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, se reportan como **resistentes**

4.11 RIESGOS Y BENEFICIOS

Riesgos

- No hay riesgos directamente relacionados a la participación en ésta investigación.
- El grupo investigador tomó las medidas necesarias para el manejo y manipulación de las muestras, así como también para la preparación de los medios de cultivo, su inoculación y las pruebas bioquímicas.

Beneficios

- Los resultados que se generaron con ésta investigación fueron de gran importancia tanto para el Ministerio de Salud como para el personal que labora en el Laboratorio Nacional de Referencia en el área de bacteriología, ya que por medio del método Epsilométrico, se conoció directamente la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la bacteria a la cual ésta es sensible y se realizó una comparación con el método de Kirby Bauer.
- Así para el Ministerio de Salud los resultados fueron de gran utilidad, ya que al conocer la Concentración Inhibitoria Mínima del antibiótico a la cual la bacteria en estudio es susceptible, se reducirán los costos hospitalarios, proporcionando la dosis correcta al paciente.

5 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Éste capítulo contiene los datos obtenidos en la investigación que se realizó sobre la determinación de la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* del cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método epsilométrico (E-test).

Dichos resultados fueron recopilados del procesamiento de 40 cepas de *Salmonella typhi*, a las cuales se les realizó la siembra en los medios: agar Trypticase Soya, agar MacConkey, agar TSI y agar Movilidad, para observar las características morfológicas de la bacteria y así mismo evidenciar que las bacterias trabajadas pertenecían a la especie *typhi*.

Se realizó la susceptibilidad en el medio Mueller-Hinton por el método epsilométrico para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a la cual la bacteria muestra susceptibilidad frente al antibiótico de ciprofloxacina.

Además se tabularon los datos recolectados en la hoja de registro de las cepas, en la cual se registró la lectura de la elipse formada por la tira del antibiótico, y para su análisis e interpretación se utilizó el programa estadístico “SPSS Statistics v19”, donde se elaboró el cuadro de porcentaje.

Los resultados obtenidos se presentan en una serie de cuadros y gráficos; en los cuales se demuestra si la hipótesis era una afirmación razonable o no sobre el estudio realizado.

5.1 TABULACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

CUADRO N° 1

Características morfológicas de *Salmonella typhi* en los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Características		Frecuencia	%
Agar Mac Conkey	Fermentador de Lactosa	Positiva	0	0.0
		Negativa	40	100.0
		Total	40	100.0
Agar Trypticasa Soya	bordes lisos, amarillentas y cremosas	Si	40	100.0
		No	0	0.0
		Total	40	100.0
Tres Azucres y Hierro (TSI)	K/A	Positivo	40	100.0
		Negativo	0	0.0
		Total	40	100.0
	Producción de ácido Sulphídrico	Positivo	40	100.0
		Negativo	0	0.0
		Total	40	100.0
	Producción de Gas	Positivo	0	0.0
		Negativo	40	100.0
		Total	40	100.0
Medio Movilidad	Movilidad	Positivo	40	100.0
		Negativo	0	0.0
		Total	40	100.0

Fuente: Hoja de registro de cepas

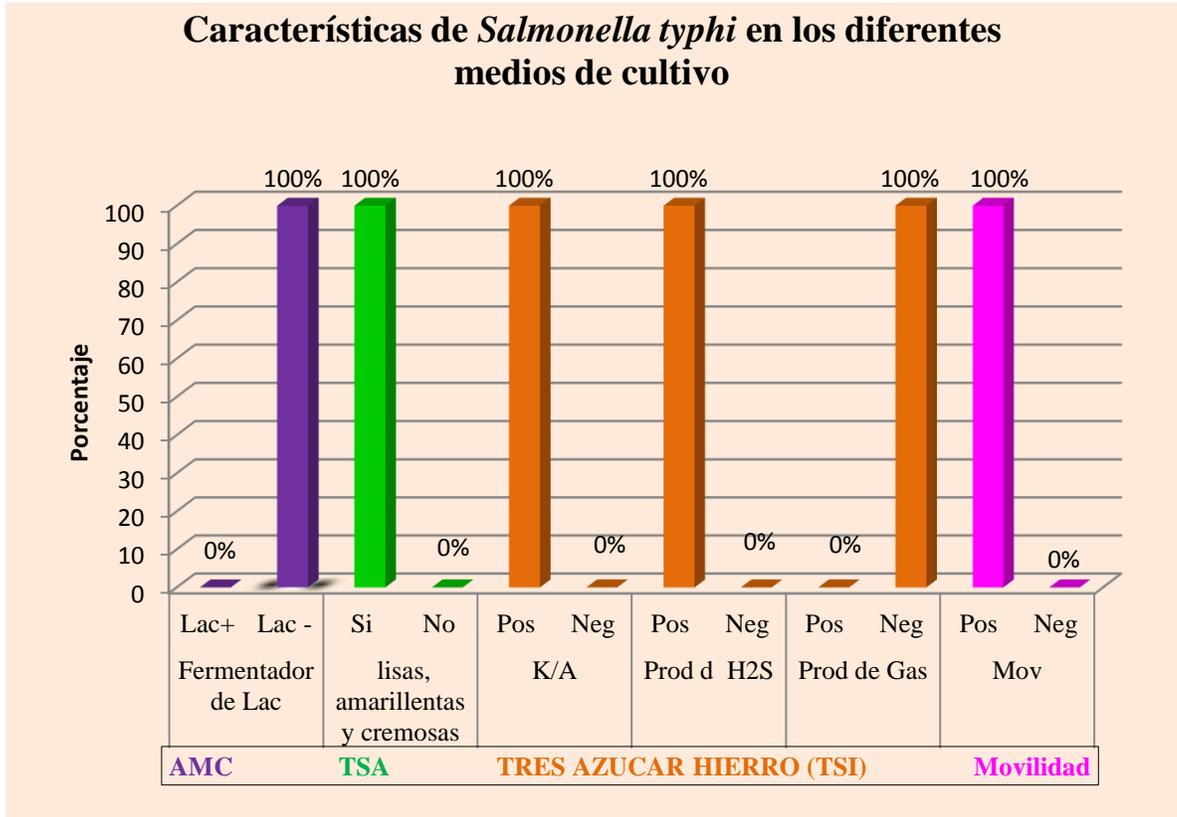
Análisis:

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar que la totalidad de las cepas estudiadas, mostraron una morfología compatible con *Salmonella typhi*: en agar Mac Conkey el 100% de las cepas eran lactosa negativa, agar Trypticasa Soya el 100% de las cepas mostró colonias con la siguiente morfología: bordes lisos, amarillentas y cremosas, en el medio TSI el 100% mostraron la siguiente reacción: K/A, producción de ácido sulfhídrico y sin producción de gas, mientras en el medio de movilidad el 100% mostro una movilidad negativa.

Interpretación:

De acuerdo con los datos obtenidos a través del estudio realizado en los diferentes medios de cultivo se muestra que todas las cepas, tenían una morfología compatible con la bacteria *Salmonella typhi*.

GRÁFICA N° 1



Fuente: Hoja de registro de cepas

TABLA N° 2
Lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico (E-test)

Concentración $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacina (CIM)	Frecuencia	%
0.008 $\mu\text{g/ml}$	6	15%
0.12 $\mu\text{g/ml}$	31	77.5%
0.15 $\mu\text{g/ml}$	1	2.5%
0.25 $\mu\text{g/ml}$	2	5%
Total	40	100%

Fuente: método Epsilométrico

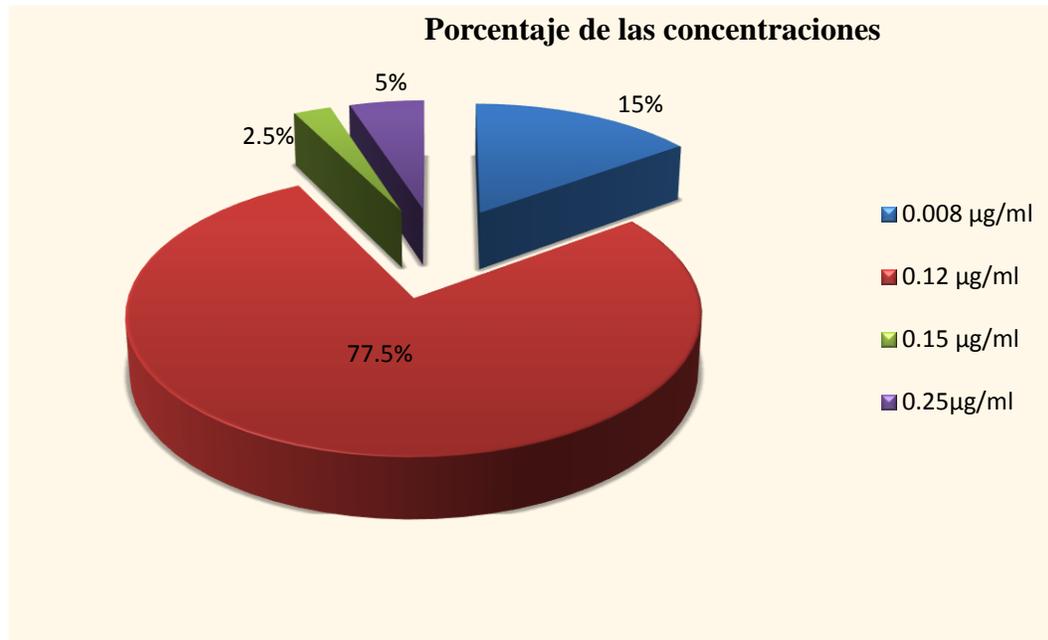
Análisis:

En el siguiente cuadro muestra las diferentes lecturas de las concentraciones que dieron las elipses con el antibiótico ciprofloxacina, un 15% de las cepas mostraron una concentración de 0.008 $\mu\text{g/ml}$, mientras que un 77.5% una concentración de 0.12 $\mu\text{g/ml}$, un 2.5% una concentración de 0.15 $\mu\text{g/ml}$ y un 5% una concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$, sumando un total de 100%.

Interpretación:

De los datos anteriores se interpreta que el 15% de las cepas en estudio mostraron una concentración 0.008 $\mu\text{g/ml}$ siendo esta una CIM baja con la cual la bacteria puede ser sensible, mientras que el 2.5%, 5% y el 77.5% tiene una (CIM) alta en la cual la bacteria puede ser intermedia según la CLSI, siendo predominante en el 77.5% lo cual nos confirma que la mayoría de bacterias en estudio tienen una susceptibilidad intermedia con una Concentración Inhibitoria Mínima de 0.12 $\mu\text{g/ml}$.

CUADRO N°2
Lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico (E-test)



Fuente: método Epsilométrico.

CUADRO N° 3
Clasificación de la susceptibilidad según la CLSI

CLSI	Método Epsilométrico (E-test)	
	Frecuencia	%
Sensible ≤ 0.06 $\mu\text{g/ml}$	6	15.0
Intermedio 0.12-0.05 $\mu\text{g/ml}$	34	85.0
Resistente ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$	0	0.0
Total	40	100.0

Fuente: Tabla de interpretación de la CLSI

Análisis:

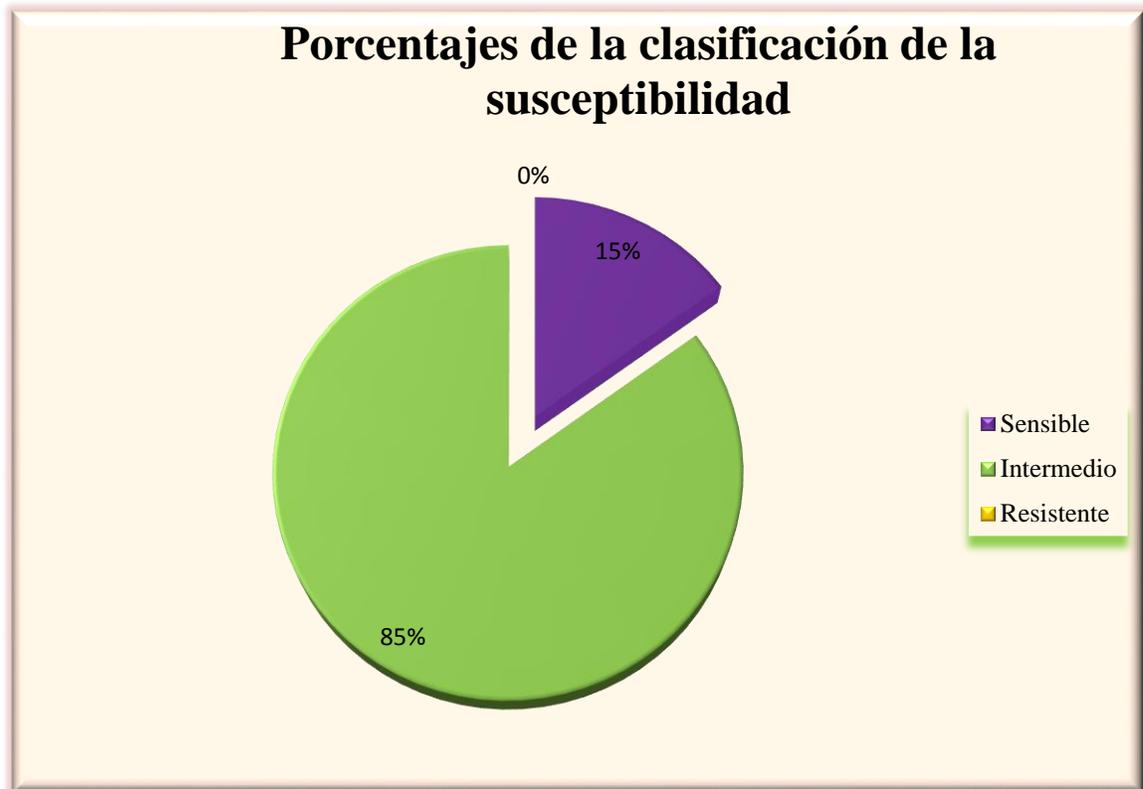
Según los datos obtenidos en el cuadro anterior se obtuvo un total de 15% de las cepas con sensibilidad, mientras que un 85% muestra susceptibilidad intermedia, sumando un total 100%.

Interpretación:

De los datos obtenidos anteriormente se interpreta que el 15% de las cepas de *Salmonella typhi* estudiadas son sensible al antibiótico de ciprofloxacina, mientras que el 85% muestra sensibilidad intermedia, esto puede deberse a factores externos que promueven la sensibilidad disminuida a ciertos antibióticos, en éste caso a la ciprofloxacina.

GRÁFICO N° 3

Clasificación de la susceptibilidad por el método Epsilométrico según CLSI



Fuente: Tabla de interpretación de la CLSI

CUADRO N° 4
COMPARACIÓN E-TEST vs. KIRBY-BAUER.

CLSI	Método					
	E-test		Kirby-Bauer		Total	
	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
S	6	15.0	6	15.0	12	15.0
I	34	85.0	34	85.0	68	85.0
R	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Total	40	100.0	40	100.0	80	100.0

Fuente: hoja de registro de bacterias y datos de Laboratorio Nacional de Referencia

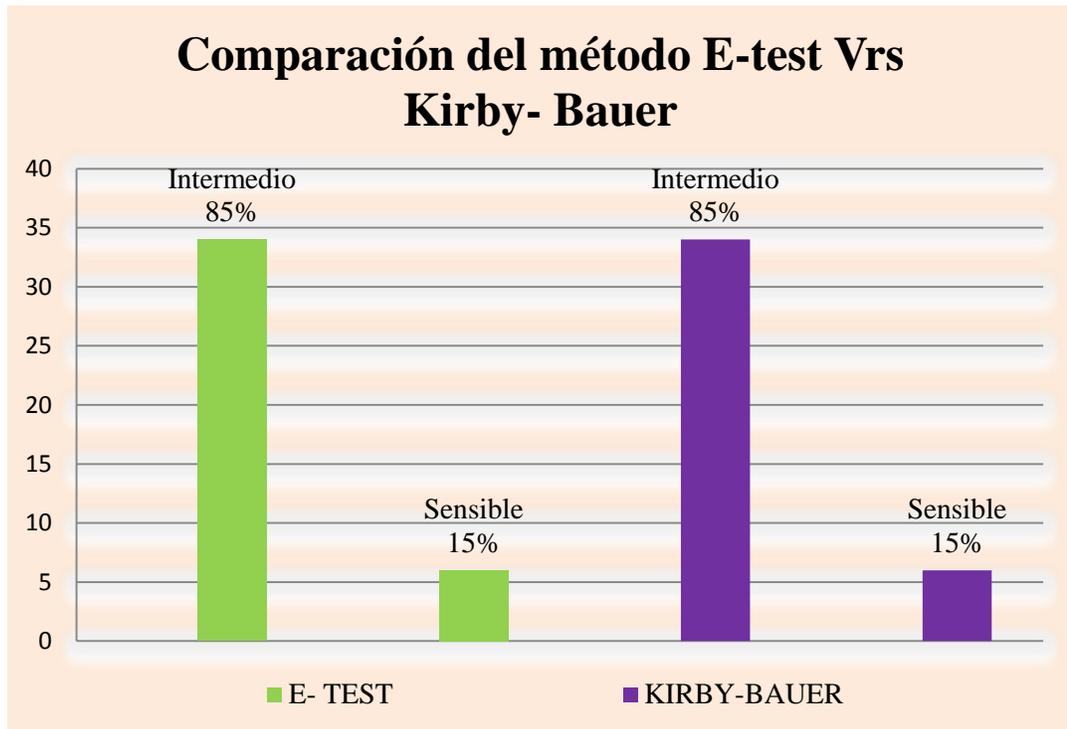
Análisis:

En cuadro N°4 se presenta la frecuencia del método Epsilométrico con relación al método de Kirby-Bauer, en el cual el en método Epsilométrico un 15% de las cepas muestran sensibilidad, mientras un 85% muestran sensibilidad intermedia, y en el método de Kirby-Bauer un 15% de las cepas en estudio presentaron sensibilidad, y un 85% tiene sensibilidad intermedia.

Interpretación:

De los datos anteriores del cuadro anterior muestra que las cepas en estudio un 15% tiene sensibilidad al antibiótico ciprofloxacina, mientras que un 85% son intermedias; correlacionando los métodos Kirby- Bauer con el Epsilométrico, se dice que los datos obtenido coinciden en su totalidad, con una ventaja que el método Epsilométrico se conoce la (CIM), mientras que en el método de Kirby-Bauer se debe de interpretar la medición de halo del disco utilizado.

GRÁFICA N°4



Fuente: hoja de registro de bacterias y datos de Laboratorio Nacional de Referencia

5.2 PRUEBA DE HIPÓTESIS

Dado que se realizó la determinación de la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test). Entonces en este caso hablamos de una proporción y además como $n > 30$, entonces se utiliza el estadístico de proporciones para una distribución normal, para ello se realizan los siguientes pasos:

Comprobación de la hipótesis alterna

1. Establecimiento de la hipótesis alterna de trabajo

En donde:

\hat{p} = Proporción obtenida con los datos de la muestra.
 P = Proporción establecida según los registros del Laboratorio Nacional de Referencia.

$H_0 = P = 0.33$. $\sigma_{\hat{p}}$ = Error cometido al calcular la proporción muestral

Z_t = Valor crítico generado por la tabla al 95% de confianza. Éste es 1.65.
 Z_c = Valor de Z obtenido con los datos de la muestra
 n = Tamaño de muestra.

2. Calculando el valor de Z_t para una confianza del 95% esto es $Z_t = 1.96$
3. Obteniendo Z para los datos de la muestra (Z_c)

$$Z_c = \frac{\hat{p} - P}{\sigma_{\hat{p}}} \quad \text{Donde } \sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{0.33(1 - 0.33)}{40}}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{0.33(0.67)}{40}}$$

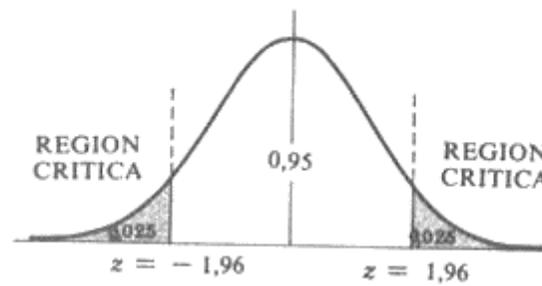
$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{0.2211}{40}}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{0.00552}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = 0.074.$$

Entonces:

$$Z_c = \frac{\frac{34}{40} - 0.33}{0.074} = \frac{0.85 - 0.33}{0.074} = \frac{0.52}{0.074} \quad Z_c = 7.03.$$



4. Regla de decisión:

Si $Z_c > Z_t$ o $Z_c < Z_t$, entonces se acepta la Hai

Si $Z_c = Z_t$ entonces se acepta H_0 .

6 Decisión estadística:

Hemos observado que el valor $Z_c = 7.03$ y es mayor a $Z_t = 1.96$, entonces se acepta H_1 , es decir que la sensibilidad intermedia supera el 33% proporcionados por los datos del Laboratorio Nacional de Referencia para toda la población de cepas.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el estudio sobre la Determinación de la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi*, en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-Test), durante el período de julio a septiembre de 2013, se obtuvieron las conclusiones siguientes:

- En ésta investigación se muestrearon 40 cepas, a las cuales se les realizó la susceptibilidad por el método Epsilométrico (E-Test) del cual se obtuvieron resultados de 34 cepas con susceptibilidad intermedia, que equivale al 85% y 6 cepas sensibles, que equivale al 15% de las cepas estudiadas.
- Las cepas con susceptibilidad intermedia predominante tienen una concentración de 0.12 µg/ml que equivale a un 77.5%, esto se debe a factores externos como la automedicación que generan sensibilidad disminuida.
- Al comparar los resultados obtenidos por el método Epsilométrico (E-Test), con los datos registrados en el Laboratorio Nacional de Referencia por el método de Kirby-Bauer, se verifica que coinciden en su totalidad, en cuanto a la clasificación de la susceptibilidad de las cepas en estudio.
- Al obtener los resultados de las pruebas bioquímicas (agar TSI, agar Movilidad) se confirmó que todas las cepas en estudio pertenecían a *Salmonella typhi*.
- La determinación de la susceptibilidad a cepas bacterianas a través del método Epsilométrico (E-Test) es el más indicado para la realización del antibiograma, ya que por medio de éste se conoce directamente la Concentración Inhibitoria Mínima a la cual la bacteria es sensible, ayudando así al diagnóstico oportuno del paciente, como a reducir costos hospitalarios.

- Al final de ésta investigación se concluye que se acepta la hipótesis alterna que dice, “Existe susceptibilidad intermedia al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-test), ya que en los resultados obtenidos la frecuencia total de cepas con susceptibilidad intermedia fue de 34, con un porcentaje del 85%, confirmando así la hipótesis alterna.

6.2 RECOMENDACIONES

Al Ministerio de Salud:

- Que con la nueva ley de los medicamentos, tomen estricta vigilancia en cuanto a la automedicación y al uso correcto de los medicamentos, ya que con el mal manejo de éstos lo que estamos promoviendo es el aumento de la resistencia bacteriana.
- Monitorear los antibióticos que se les proveen a los centros hospitalarios, como a las unidades de salud, para que así se cuenten con los medicamentos correctos al momento de dar una receta a los pacientes.
- Evaluar si el personal de salud tiene óptimo conocimiento de los antibióticos a utilizar frente a las diferentes enfermedades, incluyendo a las causadas por bacterias.

Al Laboratorio Nacional de Referencia

- Que sigan trabajando con la calidad que están realizando todos los procedimientos microbiológicos, y así brinden datos estadísticos como país, para formar parte de las estadísticas de la OMS.
- Evaluar al personal de los diferentes centros hospitalarios, en cuanto a conocimientos que tienen acerca de la resistencia bacteriana y cuáles son los mecanismos que la generan.

- Continuar capacitando al personal de los diferentes laboratorios clínicos, pertenecientes a la red de salud, en cuanto al manejo de los diferentes métodos utilizados para determinar la susceptibilidad bacteriana.

A las nuevas generaciones de Profesionales de Laboratorio Clínico.

- Continuar investigando sobre los mecanismos de resistencia que están presentando las bacterias actualmente en nuestro país, y así ayudar a los médicos en el tratamiento eficaz de los pacientes.
- Investigar el mecanismo de resistencia que presenta *Salmonella typhi* frente a otros medicamentos utilizados en el cuadro básico de la red hospitalaria, como las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona).

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Editorial Organización mundial para la Salud 2005 pag. 150.
- 2- Sherris MICROBIOLOGÍA MÉDICA cuarta edición Editorial McGraw-Hill 2004.
- 3- Koneman DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO sexta edición Editorial Medica Panamericana 2008.
- 4- Patrones de Resistencia Antimicrobiana de Salmonella typhi autores: Harish B, Menezes G. Comité de Redacción Científica de SIIC CITA : Indian Journal of Medical Microbiology 29(3):223-229, Jul 2011 [HTTP://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm](http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm) (consultada 12 de marzo de 2013).
- 5- Generalidades de bacterias, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.htm> (consultada 16 de marzo de 2013)
- 6- Familia *Enterobacteriaceae* – Microbióloga Ciencia y Biología
<http://www.cienciaybiología.com/microbiología/familia-Enterobacteriaceae.php>

ANEXOS

ANEXO N°2

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES ESPECÍFICAS A DESARROLLAR EN EL PROCESO DE GRADUACIÓN.

N°	MESES ACTIVIDADES	MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPT				OCT			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
		1	Solicitud de permiso de acceso a cepas																														
2	solicitud de permiso para realizar ejecución en el LNR																																
3	Cotización de materiales																																
4	Cotización de Tiras E-test de ciprofloxacina																																
5	Presentación con autoridades de LNR																																
6	Preparación de materiales																																
7	Siembra de cepas																																
8	Procesamiento de cepas																																

ANEXO N° 3

PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1500	Págs. De papel bond	\$ 0.02 ctvs.	\$ 30.00
60	Tiras E-test	\$ 7.67	\$ 780.70
200	Placas de Petri	\$ 0.43	\$ 86
3	Frascos de medio de cultivo (agar Tripticasa Soya, agar Mac Conkey y agar Mueller-Hinton)	\$58.50	\$ 175.50
3	Plumones permanentes	\$ 1.05	\$3.15
1	Caja de guantes de látex	\$ 0.07 ctvs.	\$ 7.00
1	Caja de mascarillas	\$ 0.10 ctvs	\$ 5.00
3	Gorros	\$ 0.60	\$ 1.80
6	Horas de Telefonía celular	\$ 0.20	\$ 72
22	Viajes a San Salvador	\$ 20	\$ 1320
3	Pinzas estériles	\$ 5	\$ 15
2	Litro de solución salina	\$ 3.73	\$ 7.46
3	Agua destilada	\$ 6	\$ 18
1	Libro de texto	\$ 24	\$ 24
3	Lentes de protección	\$ 2.75	\$ 8.25
3	Lápices de carbón	\$ 0.15 ctvs.	\$ 0.45 ctvs.
3	Sacapuntas de metal	\$ 0.40 ctvs.	\$ 1.20
3	Borradores	\$ 0.25 ctvs.	\$ 0.75 ctvs.
3	Reglas milimetradas	\$ 0.65 ctvs.	\$ 1.95
100	Horas de internet	\$ 0.75 ctvs.	\$ 75
1	Tinta negra	\$7	\$7
1	Tinta de color	\$15	\$15
	Fotocopias y anillados	\$40	\$40
TOTAL			\$2695.21

ANEXO 4

HOJA DE REGISTRO DE LAS CEPAS ESTUDIADAS (MÉTODO DE E-TEST Y MÉTODO DE KIRBY- BAUER), AÑO 2013.

No. De cepa	Registro	CIM (E-test)	Interpretación (CLSI)	Lectura del halo (Kirby-Bauer)	Interpretación (CLSI)
1	06-13	0.12µg/ml	Intermedio	24mm	Intermedio
2	10-13	0.12µg/ml	Intermedio	28.5mm	Intermedio
3	55-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
4	60-13	0.25µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
5	73-13	0.12µg/ml	Intermedio	28mm	Intermedio
6	74-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
7	75-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.7mm	Intermedio
8	77-13	0.008µg/ml	Sensible	37.2mm	Sensible
9	78-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30mm	Intermedio
10	79-13	0.008µg/ml	Sensible	36.4mm	Sensible
11	80-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.4mm	Intermedio
12	81-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28.6mm	Intermedio
13	82-13	0.25µg/ml	Intermedio	29.6mm	Intermedio
14	84-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
15	86-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.5mm	Intermedio
16	100-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.5mm	Intermedio
17	102-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
18	107-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30mm	Intermedio
19	109-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28.5mm	Intermedio
20	110-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.7mm	Intermedio
21	112-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0 mm	Intermedio
22	113-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
23	115-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.0mm	Intermedio
24	117-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
25	118-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
26	119-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
27	120-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.0mm	Intermedio
28	121-13	0.008 µg/ml	Sensible	28.0mm	Sensible
29	156-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.4mm	Intermedio
30	157-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.7mm	Intermedio
31	158-13	0.008µg/ml	Sensible	39mm	Sensible
32	159-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28.8mm	Intermedio
33	160-14	0.12 µg/ml	Intermedio	29.6mm	Intermedio
34	164-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.0mm	Intermedio
35	167-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
36	169-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
37	170-13	0.15 µg/ml	Intermedio	30.3mm	Intermedio
38	230-13	0.008µg/ml	Sensible	36.2mm	Sensible
39	238-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28mm	Intermedio
40	244-13	0.008 µg/ml	Sensible	37.0mm	Sensible

Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
FLUOROQUINOLONES									
(31) NOTE: Reevaluation of fluoroquinolones is ongoing. See comment (2).									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4	(32) For testing and reporting against Enterobacteriaceae other than <i>S. typhi</i> and extraintestinal <i>Salmonella</i> spp.
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8	
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥31	21-30	≤20	≤0.06	0.12-0.5	≥1	(33) For reporting against <i>S. typhi</i> and extraintestinal <i>Salmonella</i> spp. only.
U	Lomefloxacin or ofloxacin	10 µg	≥22	19-21	≤18	≤2	4	≥8	(34) Because of limited clinical experience in the treatment of infections caused by <i>S. typhi</i> and extraintestinal <i>Salmonella</i> spp. with ciprofloxacin MICs or zone diameters in the intermediate range, clinicians may wish to use maximal oral or parenteral dosage regimens. See comment (36).
U	Ofloxacin	5 µg	≥16	13-15	≤12	≤2	4	≥8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥17	13-16	≤12	≤4	8	≥16	
O	Enoxacin	10 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gemifloxacin	5 µg	≥20	16-19	≤15	≤0.25	0.5	≥1	
O	Grepafoxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤1	2	≥4	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8	(35) FDA-approved for <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
QUINOLONES									
O	Cinoxacin	100 µg	≥19	15-18	≤14	≤16	32	≥64	See comment (21).
O	Nalidixic acid	30 µg	≥19	14-18	≤13	≤16	-	≥32	(36) In addition to testing urine isolates, nalidixic acid may be used to test for reduced fluoroquinolone susceptibility in isolates from patients with extraintestinal <i>Salmonella</i> infections. Strains of <i>Salmonella</i> that test resistant to nalidixic acid may be associated with clinical failure or delayed response in fluoroquinolone-treated patients with extraintestinal salmonellosis. However, nalidixic acid may not detect all mechanisms of fluoroquinolone resistance. Therefore, <i>Salmonella</i> strains may also be tested with ciprofloxacin and reported using the <i>Salmonella</i> spp. interpretive criteria above. See comments (32) and (33). See comments (21) and (31).
FOLATE PATHWAY INHIBITORS									
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	≤2/58	-	≥4/76	See comment (2).
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≥17	13-16	≤12	≤256	-	≥512	(37) Sulfisoxazole can be used to represent any of the currently available sulfonamide preparations.
U	Trimethoprim	5 µg	≥16	11-15	≤10	≤8	-	≥16	

ANEXO N°6

CARTA DE SOLICITUD DE PERMISO A LA MINISTRA DE SALUD, PARA TENER ACCESO A CEPAS Y REALIZAR LA EJECUCIÓN EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCION DE LABORATORIO CLINICO



Ciudad Universitaria de Oriente, 4 de Marzo de 2013

Dra. María Isabel Rodríguez
Ministra de Salud
Presente

Respetable Dra. Rodríguez:

Reciba un afectuoso saludo de nuestra parte y deseándole muchos éxitos en sus labores cotidianas.
Por medio de la presente nosotras las estudiantes egresadas de la Carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico de la Facultad Multidisciplinaria Oriental:

- Celia Mabel Argueta Argueta Carné AA02084
- Brenda Azucena Avalos Granados Carné AG08035
- Rudis Carolina Alemán Cruz Carné AC08032

Solicitamos su autorización para tener acceso a cepas de *Salmonella typhi* del Laboratorio Nacional de Referencia, para realizar nuestro trabajo de graduación para optar al Título de Licenciada en Laboratorio Clínico con el tema denominado "Determinación de la sensibilidad a cepas de *Salmonella typhi* del cepario del Laboratorio Nacional de Referencia durante el período de Julio a Septiembre de 2013.

Asimismo hacer de su conocimiento que contaremos con la ayuda y colaboración de Profesionales del Área de Bacteriología del Hospital Nacional San Juan de Dios del Departamento de San Miguel, pretendemos con la ejecución de éste trabajo lograr un aporte en cuanto al manejo de agentes antimicrobianos, reducción de costos hospitalarios tanto para el Laboratorio Central, como para el Personal de Salud que labora en el Hospital San Juan de Dios de San Miguel.

Esperando una respuesta pronta y favorable a nuestra petición para iniciar con nuestro trabajo de graduación.

Nos suscribimos

Muy atentamente



"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"

2205-7165

2205-7208

Yadira Ramírez

Celia Mabel Argueta Argueta

Brenda Azucena Avalos Granados

Rudis Carolina Alemán Cruz

Vo.Bo. Lidia Lidiana Patricia Pacheco Herrera
Coordinadora Sección de Laboratorio Clínico
Facultad Multidisciplinaria Oriental



Vo.Bo. Lidia Aurora Guadalupe Gutiérrez
Asesora de Tesis
Facultad Multidisciplinaria Oriental

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCION DE LABORATORIO CLINICO



Ciudad Universitaria de Oriente, 16 de Mayo de 2013

Dra. María Isabel Rodríguez
Ministra de Salud
Presente

Respetable Dra. Rodríguez:

Reciba un afectuoso saludo de nuestra parte y deseándole muchos éxitos en sus labores cotidianas.
Por medio de la presente nosotras las estudiantes egresadas de la Carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico de la Facultad Multidisciplinaria Oriental:

- Celia Mabel Argueta Argueta Carné AA02084
- Brenda Azucena Avalos Granados Carné AG08035
- Rudis Carolina Alemán Cruz Carné AC08032

Solicitamos nos conceda su autorización para poder ingresar al Laboratorio Nacional de Referencia, para la ejecución práctica del trabajo de investigación de nuestro proceso de graduación para optar al Título de Licenciada en Laboratorio Clínico con el tema denominado **"Determinación de la sensibilidad a 40 cepas de *Salmonella typhi* del cepario del Laboratorio Nacional de Referencia durante el período de Julio a Septiembre de 2013.**

Asimismo hacer de su conocimiento que contamos con el apoyo del personal que labora en dicha institución,

Esperando una respuesta pronta y favorable a nuestra petición para iniciar con nuestro trabajo de graduación.

Nos suscribimos

Muy atentamente

"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"

RECIBIDO
17 MAY 2013
FECHA
NOMBRE Sandra
HORA 8:25 am
DESPACHO MINISTERIAL
MINSAL

RECIBIDO
FECHA 17 MAY 2013
NOMBRE
HORA
DESPACHO MINISTERIAL
MINISTERIO DE SALUD

001-22057165
7208

Celia Mabel Argueta Argueta

Brenda Azucena Avalos Granados

Rudis Carolina Alemán Cruz

Vo.Bo. Licha. Lohana Patrieta Pacheco Herrera
Coordinadora Sección de Laboratorio Clínico
Facultad Multidisciplinaria Oriental



Vo.Bo. Licha. Aurora Guadalupe Gutiérrez
Asesora de Tesis
Facultad Multidisciplinaria Oriental

ANEXO N° 7

COTIZACIÓN DE PRECIOS DE TIRAS E-TEST DE CIPROFLOXACINA

ESERSKI HERMANOS, S.A. DE C.V.

Antigua Calle Ferrocarril # 1522, Colonia Cucumacayan, San Salvador, El Salvador

Telefax: 2271-4349, 2271-6018, 2271-5801

NIT # 0614-180357-001-7

e-mail: eserskihermanos@yahoo.com

Cotización No. **224/2013**

San Salvador, 2 de Julio de 2013

Licenciada
Carolina Alemán
Presente

Estimada Licda. Alemán

Reciban un atento y muy cordial saludo.
A continuación sometemos a su consideración nuestra propuesta de lo siguiente:

Cantidad	Descripción el Producto	Precio Unitario	Precio Total
1	Tira para la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria Ciprofloxacina (CIP) 32-0.002 µg/mL (M.I.C.E.)	\$363.80	\$363.80
	Presentación: Caja de 50 Tiras		
	Código Fabricante: MA0104F		
	Marca: Oxoid/Remel/ Thermo Fisher Scientific		
	Origen: Inglaterra		
	Vence: De 6 a 8 Meses		
	Tiempo de Entrega: 35 Días Hábiles después de recibir la O.C.		
1	Tira para la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria Ciprofloxacina (CIP) 32-0.002 µg/mL (M.I.C.E.)	\$96.78	\$96.78
	Presentación: Caja de 10 Tiras		
	Código Fabricante: MA0104D		
	Marca: Oxoid/Remel/ Thermo Fisher Scientific		
	Origen: Inglaterra		
	Vence: De 6 a 8 Meses		
	Tiempo de Entrega: 35 Días Hábiles después de recibir la O.C.		
	Total		\$460.58

Precios Incluyen IVA
Forma de Pago: Contado

En espera de sus agradables ordenes.

Atentamente,
ESERSKI HERMANOS, S.A. DE C.V.
Lic. Federico Ruiz de Castilla Eserski
Vice presidente



Aprobada
Rudis Carolina Alemán Cruz
Egresada en Laboratorio Clínico
No. PROVISIONAL 3136

ANEXO N° 8

CONTROL DE CALIDAD DEL AUTOCLAVE

	FORMULARIO DE VERIFICACION DE ESTERILIZACION	
Seccion: _____		

REGISTRO DE CONTROL BIOLOGICO DE AUTOCLAVES

1	9	2
	7	
3	10	4
	8	
5	11	6

EQUIPO	
NUMERO DE EQUIPO	
FECHA DE ESTERILIZACION	
HORA DE ESTERILIZACION	
NUMERO DE POSICIONES	
INDICADOR BIOLOGICO	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953
FECHA DE LECTURA	
RESULTADO	
CONTROL POSITIVO RESULTADO	

RESPONSABLE: _____

OBSERVACIONES: _____

ANEXO 9

HOJA DE CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS




**BOLETA CONTROL PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVOS
SECCION BACTERIOLOGIA**

MEDIO PREPARADO: _____
 FECHA PREPARACION DIA: _____ MES: _____ AÑO: _____
 FECHA VENCIMIENTO DIA: _____ MES: _____ AÑO: _____
 CANTIDAD: _____ mL No TUBOS: _____ C/U: _____ mL No CAJAS: _____ C/U: _____ mL

BASE: _____ MARCA: _____ LOTE No: _____ F.V. / / _____
 FECHA APERTURA: / / _____

FORMULA			
MATERIA PRIMA	MARCA	GRAMOS/LITROS	CANTIDAD TOTAL

ESTERILIZACION

AUTOCLAVE: _____ LIBRAS DE PRESION/TIEMPO _____
 FILTRACION: _____ MICRAS DE MEMBRANA _____

CONTROL DE CALIDAD

FECHA DE CONTROL DIA: _____ MES: _____ AÑO: _____

pH	ASPECTO	CONSISTENCIA	VOLUMEN	HUMEDAD	ESTERILIDAD (24 HORAS)	ESTERILIDAD (48 HORAS)

CANTIDAD DE PLACAS CONTROLADAS

CANTIDAD DE PLACAS	%	OBSERVACION

CONTROL DE CRECIMIENTO/INHIBICION

CEPA CONTROL	SATISFACTORIO	INSATISFACTORIO

CONTROL DE HEMOLISIS

CEPA CONTROL	Beta	Alfa	Gamma

CONTROL DE MUELLER HINTON

ESPESOR	TIMINA-TIMIDINA	CATIONES
Centro: I: III:		
II: IV:		

LOTE ACEPTADO: _____ LOTE RECHAZADO: _____
 OBSERVACIONES: _____
 FIRMA DEL RESPONSABLE: _____

LISTA DE FIGURAS

MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS

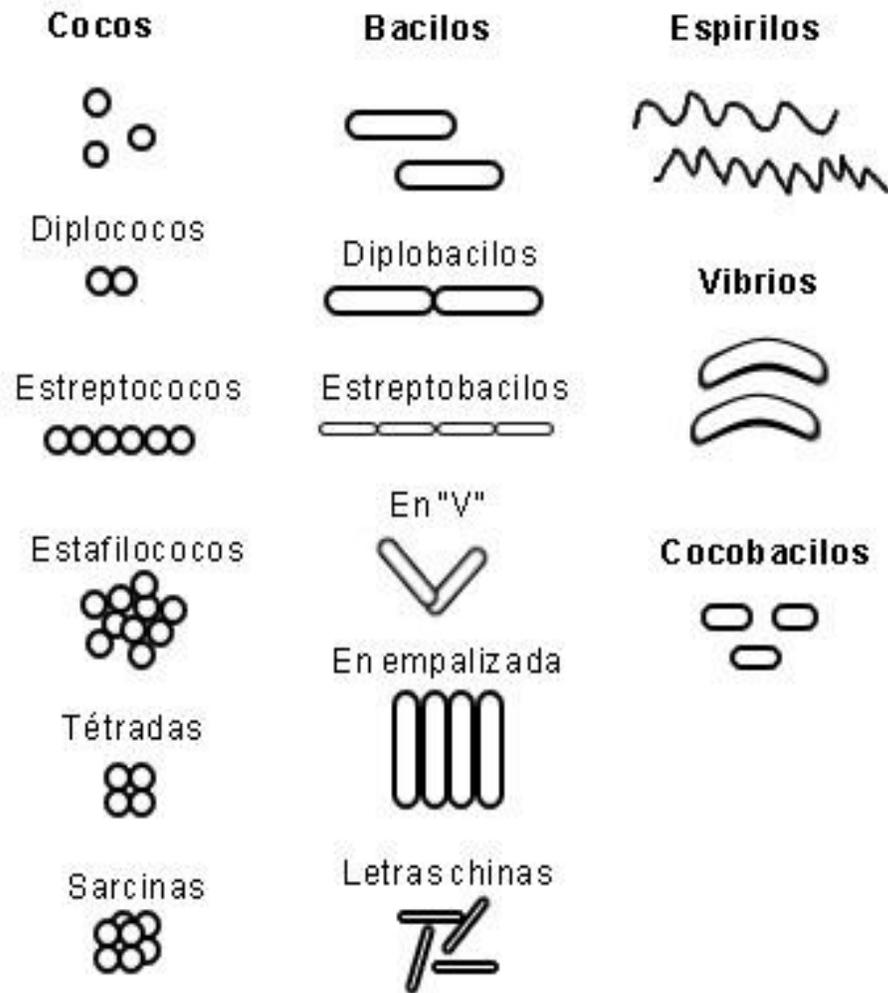


Fig.1: En la imagen obsérvese cada una de la morfología que presentan las bacterias

MORFOLOGÍA Y REACCIÓN AL GRAM DE *Salmonella typhi*

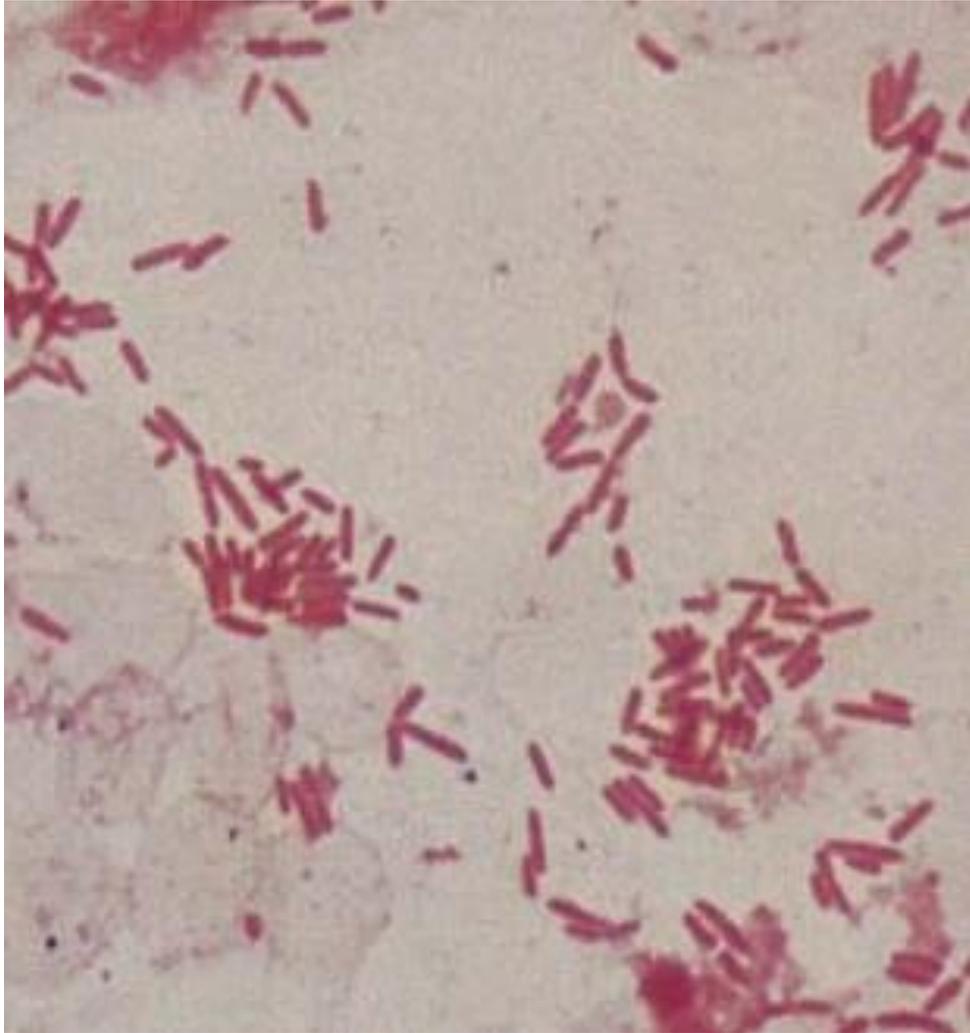


Fig. 2: En la siguiente imagen se observa la morfología y reacción al gram de *Salmonella typhi*, siendo esta un bacilo gram negativo.

MEDIO TSI



Fig. 3. Medio TSI inoculado (con *Salmonella typhi*)



Fig. 3: Medio TSI sin inocular.

MEDIO DE CITRATO NEGATIVO



Positivo

Negativo

Fig. 4: En la imagen se observa las diferentes reacciones que presentan el medio de citrato.

AGAR MAC CONKEY SIN INOCULAR

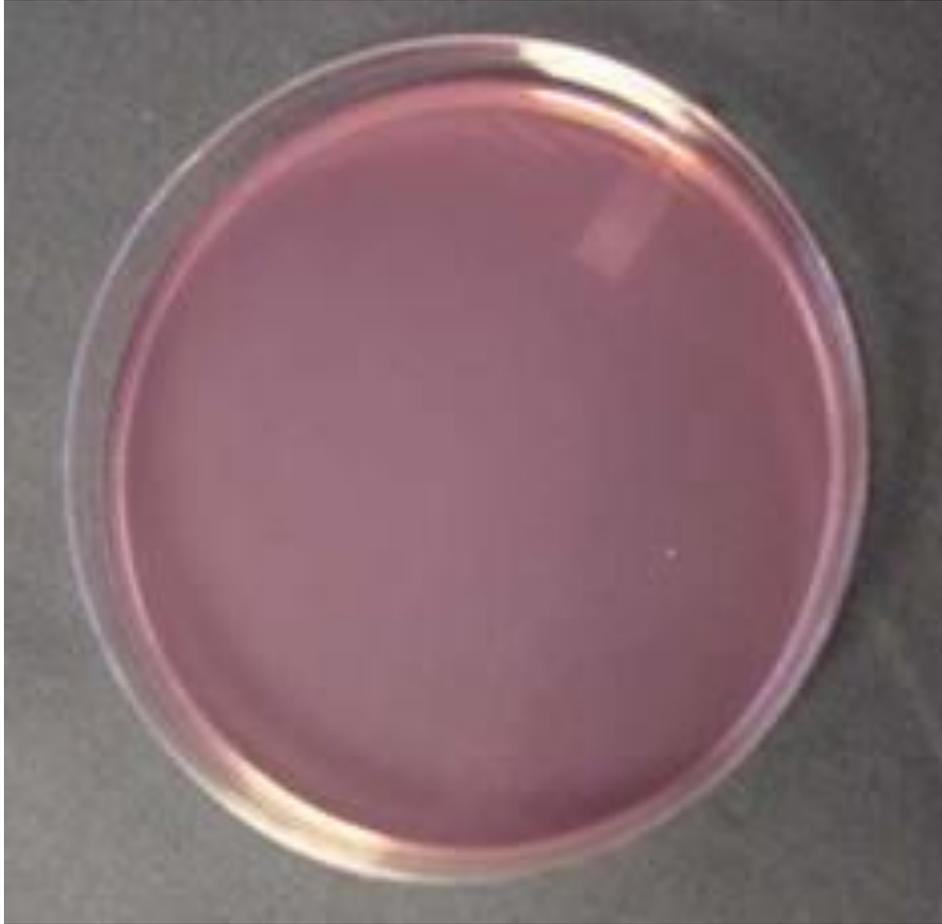


Fig. 5: Medio de Mac Conkey sin inocular.

AGAR MUELLER-HINTON SIN INOCULAR

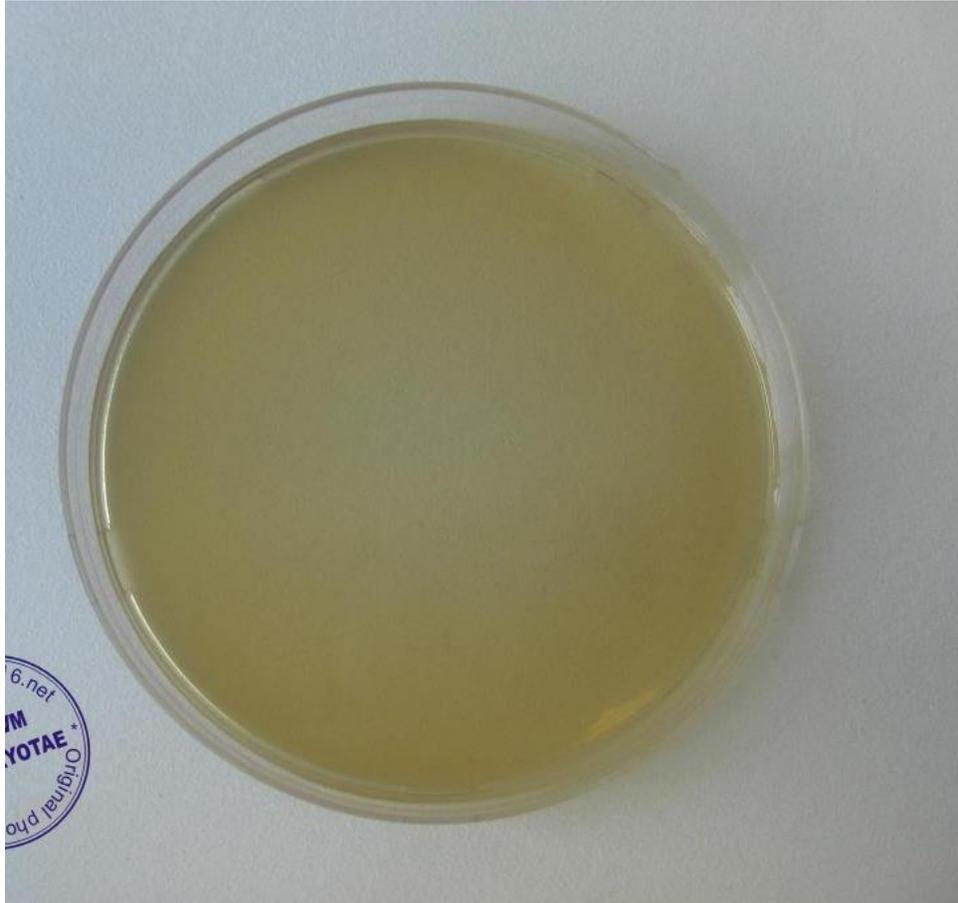


Fig. 6: Medio de agar Mueller-Hinton sin inocular.

METODO DE DILUCIÓN EN DISCO

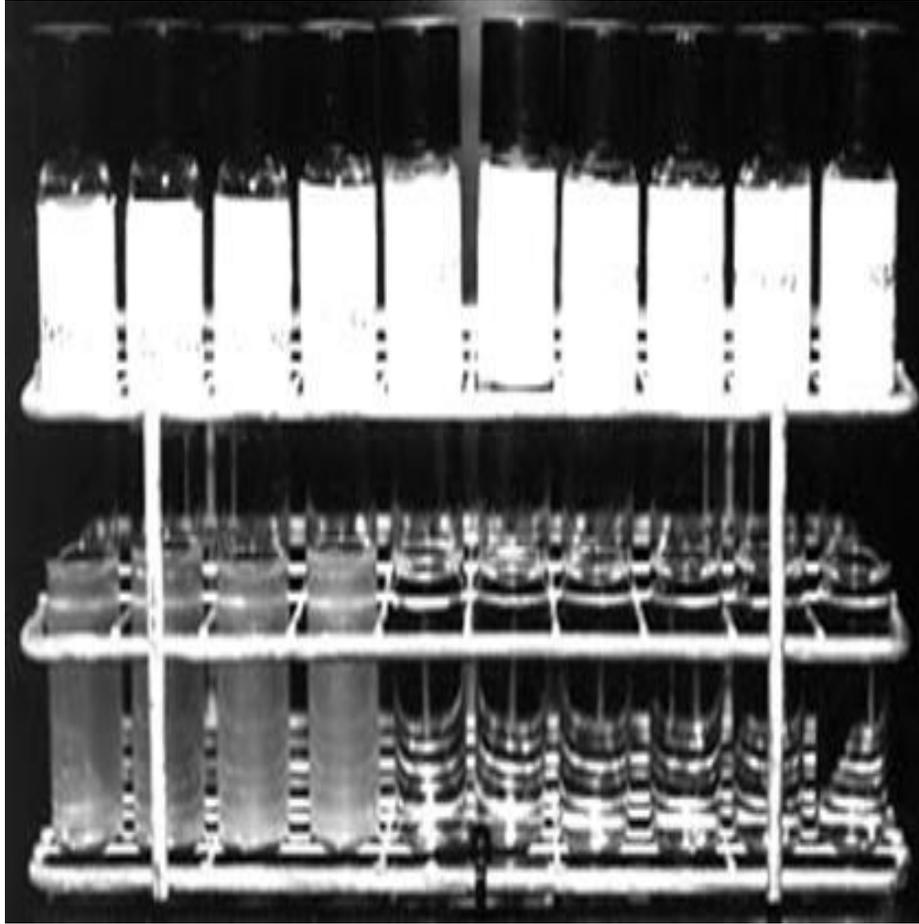


Fig.7: En la siguiente imagen se muestra el método de dilución en caldo con diferentes concentraciones.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

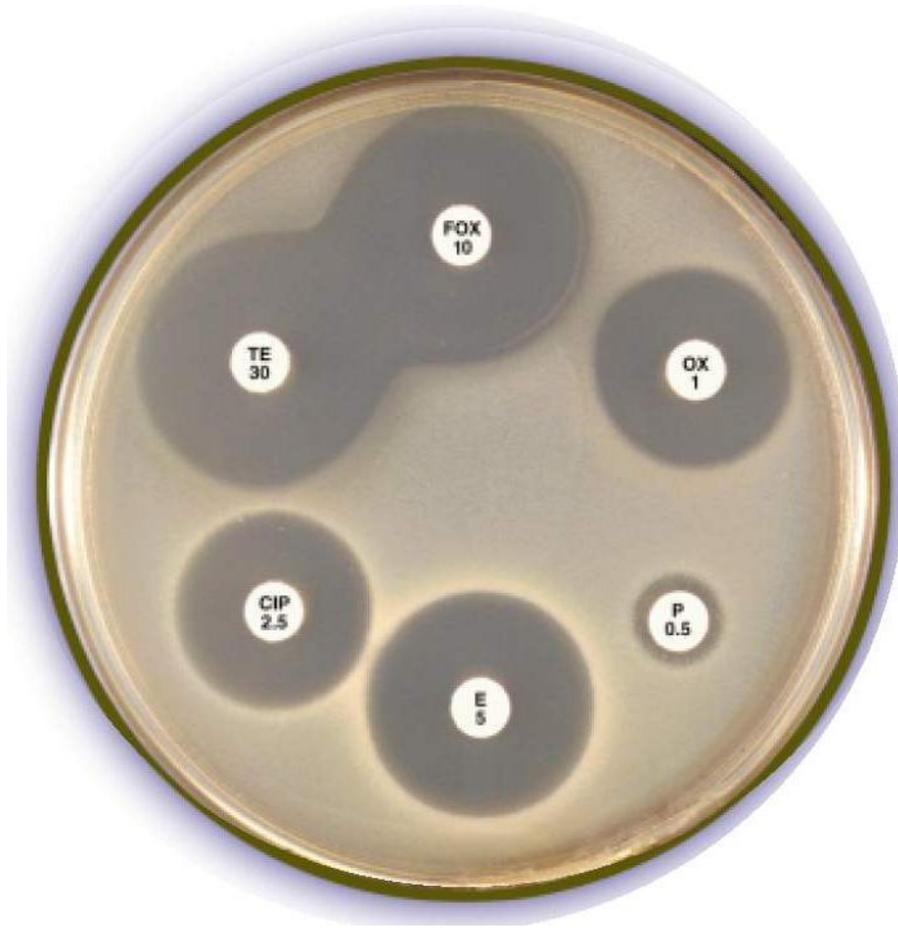


Fig. 8: En la siguiente imagen se observa la disposición de los discos de los antibióticos en el medio de agar Mueller-Hinton.

MÉTODO EPSILÓMETRICO

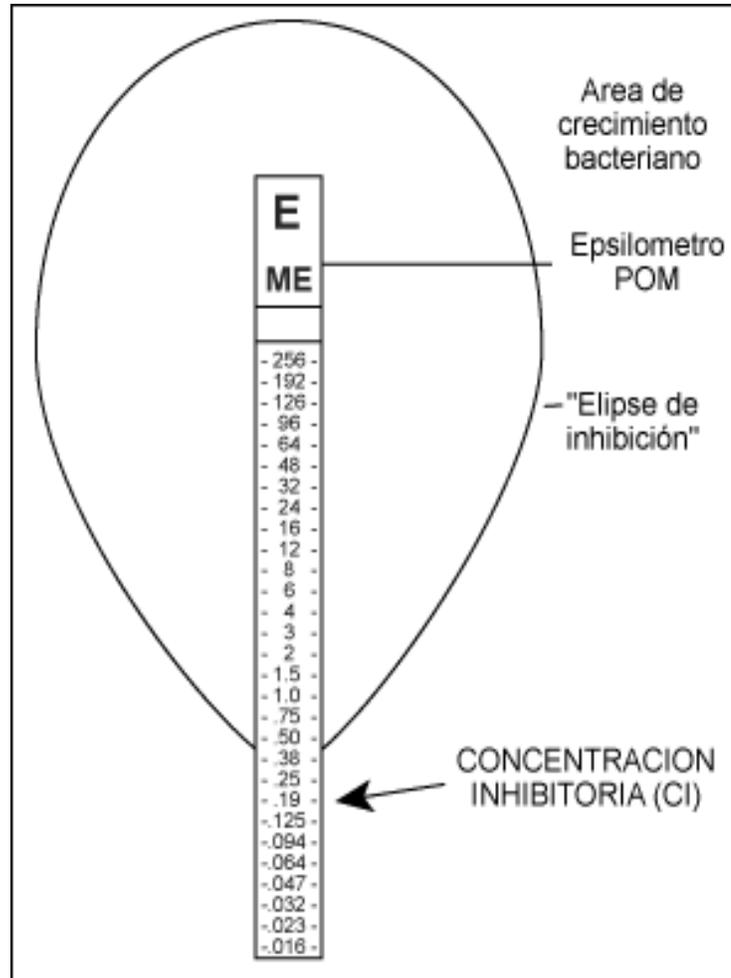


Fig. 9: En la siguiente imagen se muestra la formación de la elipse con diferentes CIM.

PREPARACIÓN DE AGAR TRIPTICASA SOYA



Fig. 10: En ésta imagen se muestra el procedimiento para la preparación de agar Tripticasa Soya antes de llevar a ebullición.

VERTIDA DE AGAR MAC CONKEY Y AGAR TRIPTICASA SOYA



Fig.11: Los medios de cultivo se deben almacenar en refrigeración a una temperatura de 4°C.

VERTIDA DE AGAR MUELLER-HINTON



Fig. 12: Para la vertida del agar Mueller-Hinton se debe tomar en cuenta la medida de la placa en la cual se vertirá el medio, que para este caso se utilizó una placa de 99x100 mm agregando 25ml del medio.

CONTROL DE CRECIMIENTO/INHIBICIÓN DE AGAR MAC CONKEY



Fig. 13: Obsérvese las colonias lactosa positiva (*Escherichia coli* ATCC 25922) , y lactosa negativa *Salmonella typhi*.

MEDICIÓN DE pH DE AGAR MAC CONKEY

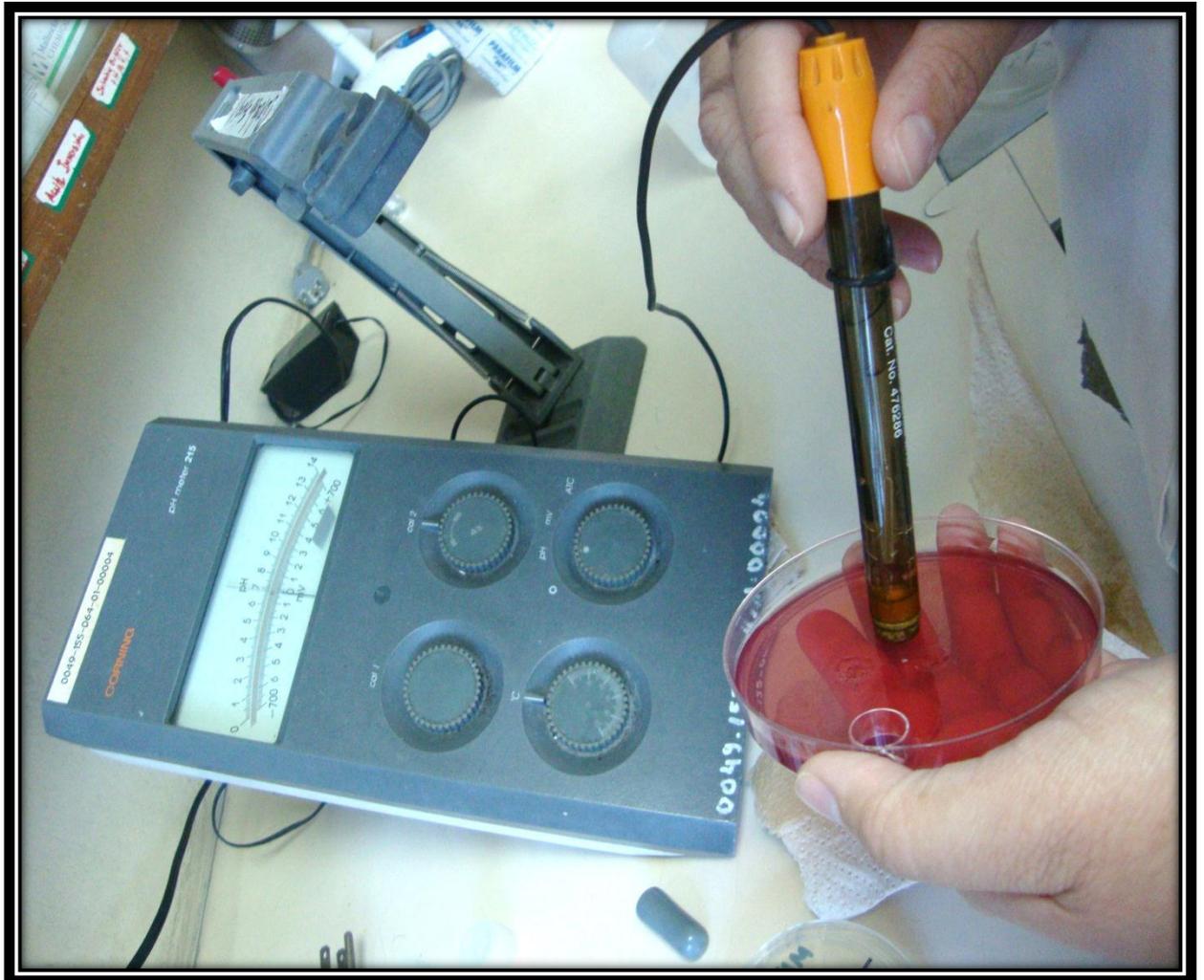


Fig. 14: En la siguiente imagen se muestra la forma de medir los pH de los medios.

MEDICIÓN DE pH DE AGAR MUELLER HINTON



Fig. 15: En la siguiente imagen se muestra la forma de medir los pH del medio Mueller-Hinton

MEDICIÓN DEL GROSOR DE MUELLER-HINTON

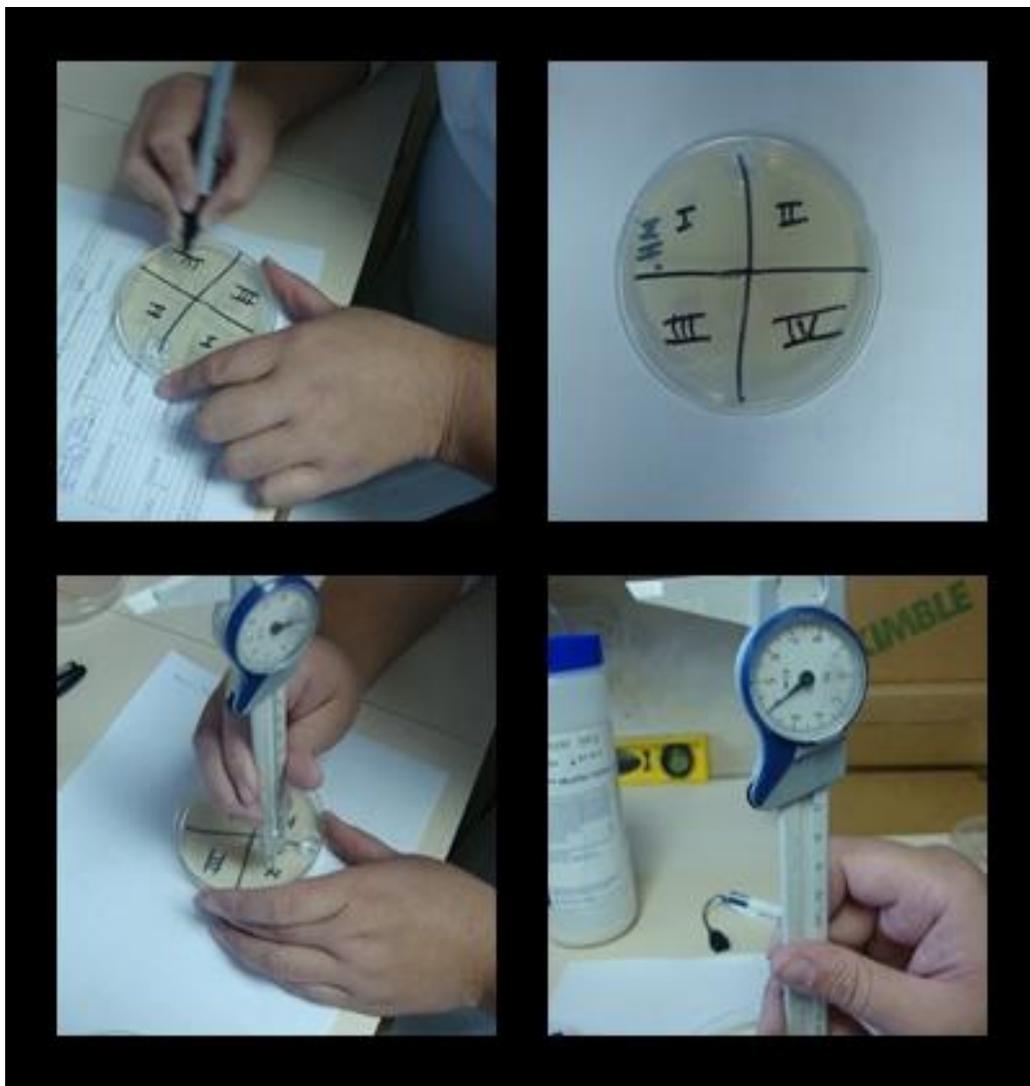


Fig. 16: En éste procedimiento se debe dividir la placa en cinco cuadrantes y medir el grosor de cada uno de ellos, con la ayuda del vernier para sacar la media.

PREPARACIÓN DE MATERIALES



Fig. 17: Hisopos estériles, solución salina estéril 0.85% y pruebas bioquímicas

CEPAS CONSERVADAS EN LECHE DESCREMADA AL 10%

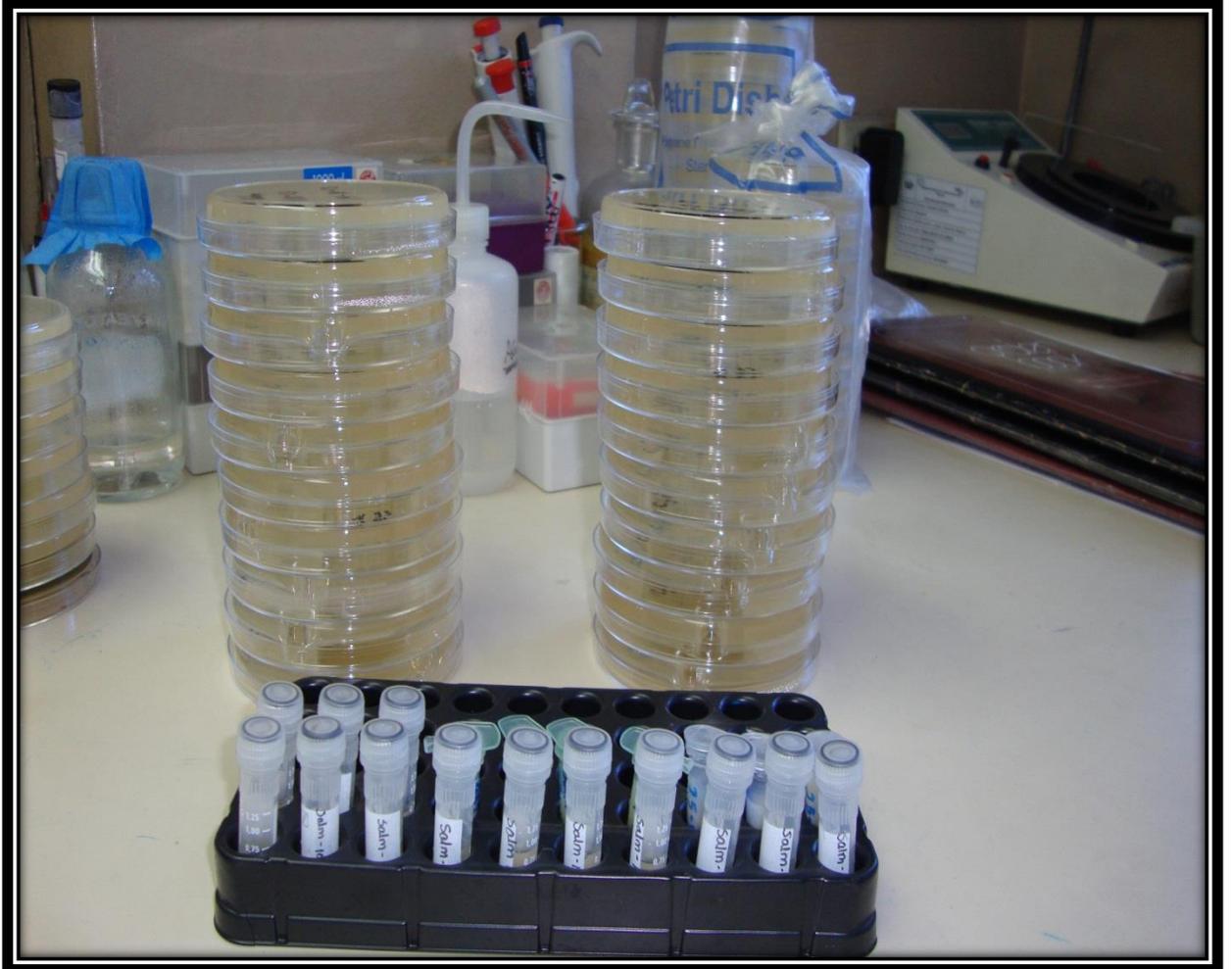


Fig. 18: Las cepas de *Salmonella typhi*, estaban almacenadas en viales de 1 ml que contenían leche descremada y conservadas a una temperatura de -70°C .

INOCULACIÓN DE AGAR TRIPTICASA SOYA Y AGAR MAC CONKEY

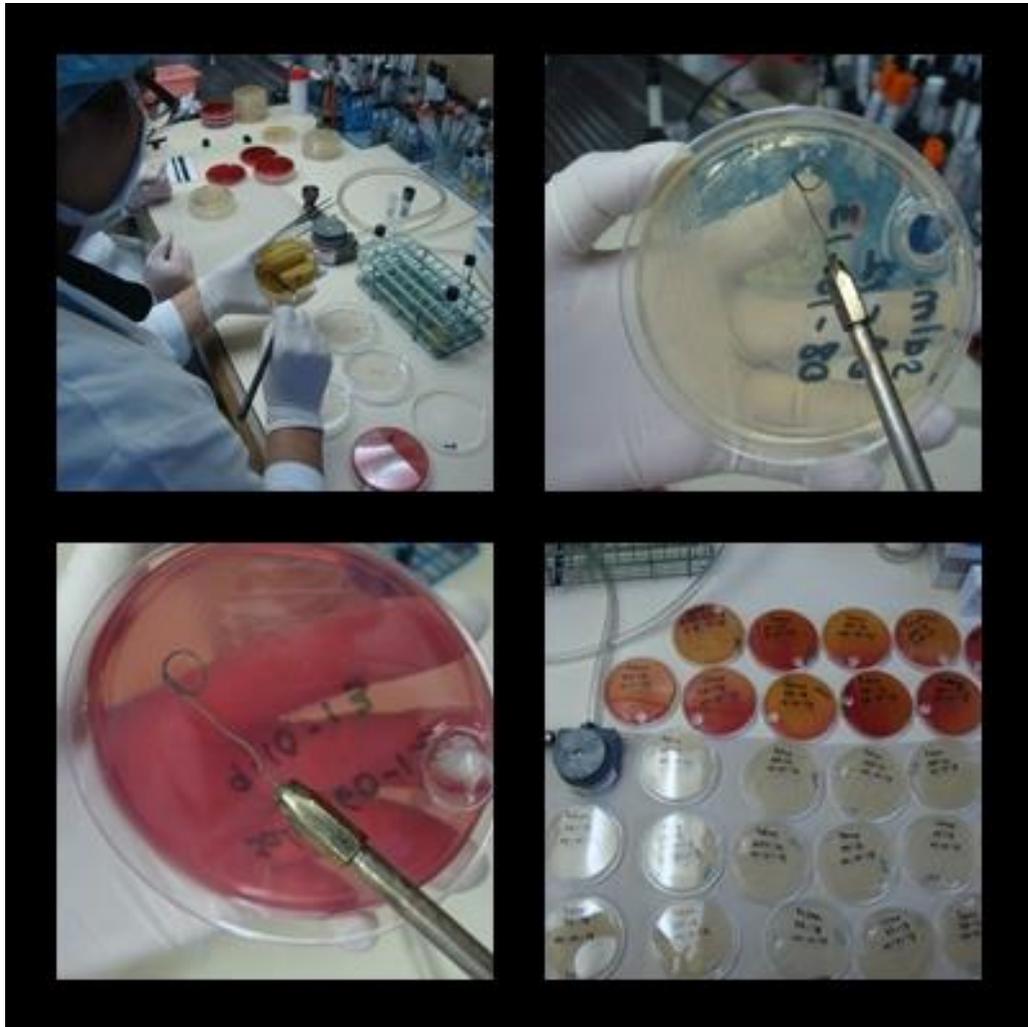


Fig. 19: En la siguiente imagen se muestra la inoculación de las cepas en el agar Mac Conkey y agar Tripticasa Soya.

INOCULACIÓN EN EL MEDIO TSI



Fig. 20: En la siguiente imagen se muestra la inoculación del TSI, el cual debe hacerse con un asa bacteriológica en punta.

INOCULACIÓN EN EL MEDIO MOVILIDAD



Fig.21: En la siguiente imagen se muestra la inoculación del medio de Movilidad, el cual se debe hacer con asa en punta.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO



Fig. 22: En siguiente imagen se muestran los pasos para la preparación del inóculo, la cual se debe preparar con colonias aisladas a partir del medio Trypticase Soya.

COMPARACIÓN DEL INOCULO CON LA ESCALA DE MAC FARLAND 0.5.

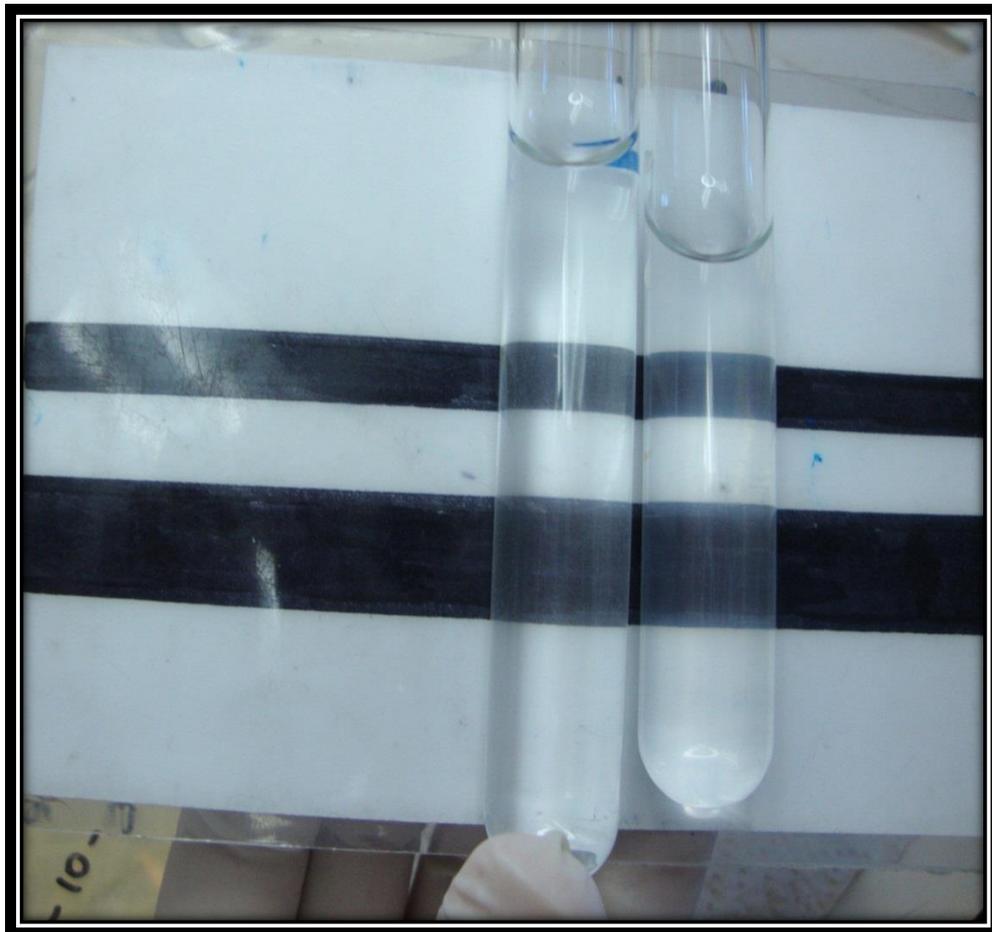


Fig. 23: Obsérvese la comparación del inóculo con la escala de Mac Farland 0.5, la cual se debe de realizar con la tabla cebra.

MÉTODO EPSILOMÉTRICO

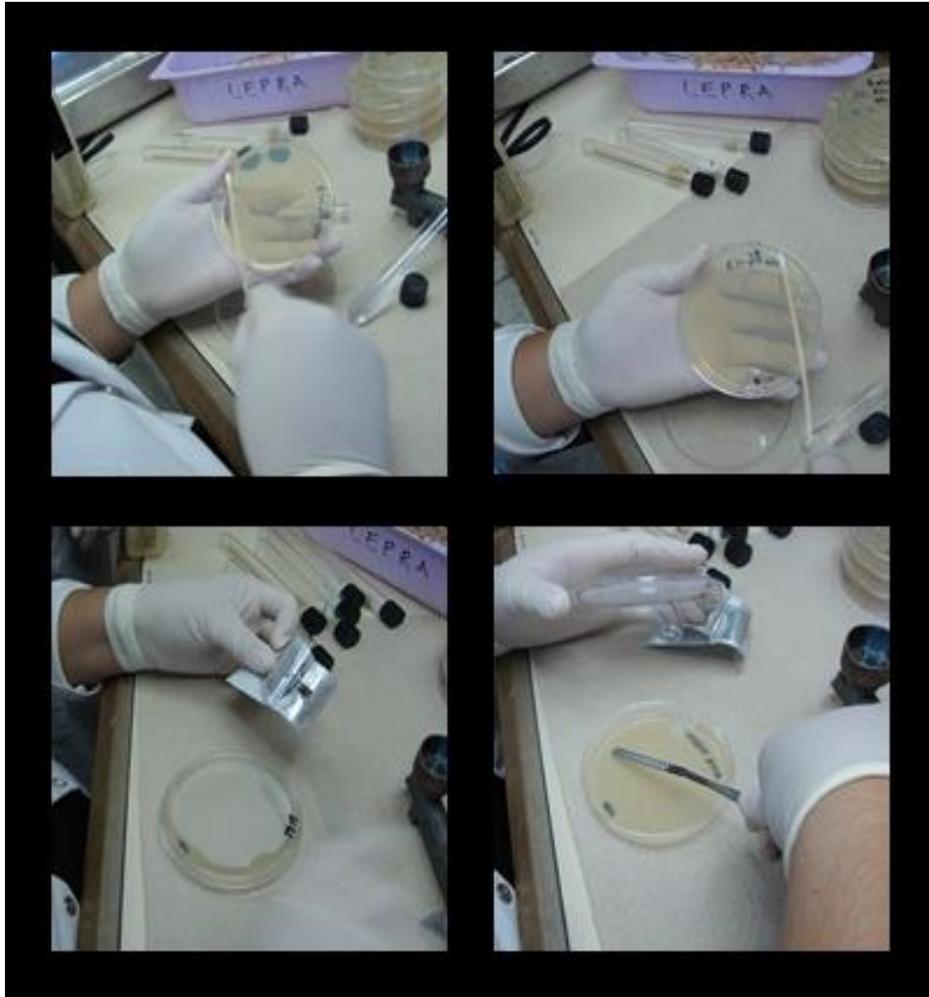


Fig. 24: Obsérvese el estriado en tres direcciones opuestas, y la colocación de la tira E-test que contiene el antibiótico de ciprofloxacina.

INCUBACIÓN DE LAS PLACAS



Fig. 25: Las placas deben ser incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

LECTURA DE PLACAS

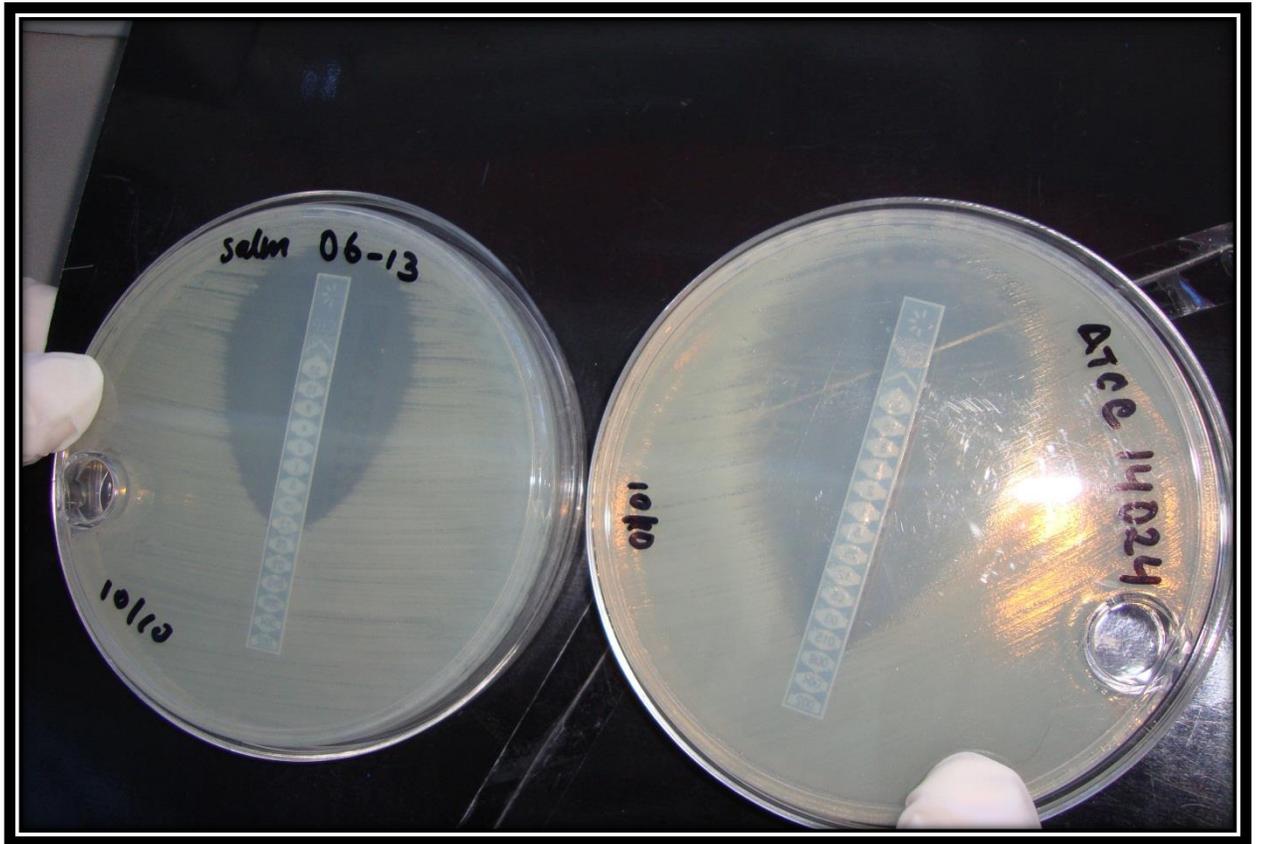


Fig. 26: Se debe leer la CIM de las placas por medio de la observación directa, detrás de un fondo oscuro y clasificar según las tablas de la CLSI.



Fig. 27: Personal del área de bacteriología, de izquierda a derecha: Jefe Licda. Zandra de Fuentes, Lic. Roberto Cardoza, Licda. Esmeralda Villatoro y Licda. Maria José Luna Boza y grupo investigador.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL.
AUTORIDADES

MAESTRO CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ.
DECANO

LICENCIADO CARLOS ALEXANDER DÍAZ.
VICEDECANO

MAESTRO JORGE ALBERTO ORTEZ HERNÁNDEZ.
SECRETARIO

MAESTRA ELBA MARGARITA BERRIOS CASTILLO
DIRECTORA GENERAL DE PROCESO DE GRADUACIÓN

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DOCTOR FRANCISCO ANTONIO GUEVARA GARAY.
JEFE DEL DEPARTAMENTO

MAESTRA LORENA PATRICIA PACHECO HERRERA.
COORDINADORA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

MAESTRA OLGA YANETT GIRÓN DE VÁSQUEZ
COORDINADORA GENERAL DE PROCESO DE GRADUACIÓN DE LA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

ASESORES

LICENCIADA AURORA GUADALUPE GUTIÉRREZ DE MUÑOZ

DOCENTE DIRECTOR

LICENCIADO SIMÓN MARTÍNEZ DÍAZ

ASESOR DE ESTADÍSTICA

MAESTRA ELBA MARGARITA BERRIOS CASTILLO

ASESORA DE METODOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO: Por darnos la sabiduría, conocimiento e iluminado en todo nuestro estudio universitario, si su ayuda no hubiéramos llevado acabo nuestro proyecto de investigación.

A NUESTROS FAMILIARES Y AMIGOS: Por su apoyo, consejos y cariño, que de una u otra manera fue de gran ayuda y beneficio en nuestras vidas.

A NUESTROS ASESORES: **Licda. Aurora Guadalupe de Muñoz, Maestra Elba Margarita Berríos y Lic. Simón Martínez,** con mucho respeto, cariño, por sus sabios consejos y ser partícipes de éste proceso de formación.

A la Licda. Teresa Guadalupe Imbers de Rubio: por su valiosa ayuda, ya que fue una de las impulsadoras para que éste proyecto de graduación se hiciera realidad, gracias por sus sugerencias y brindarnos su ayuda.

A LA MINISTRA DE SALUD: Dra. María Isabel Rodríguez, con mucho respeto, por concedernos el permiso de poder realizar nuestra investigación en el Laboratorio Nacional de Referencia.

AL PERSONAL QUE LABORA EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: Con mucha admiración, cariño y respeto, por su gran colaboración en la ejecución del proyecto de investigación.

A NUESTROS MAESTROS: Por compartir sus conocimientos y orientarnos a la práctica de valores.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO: Por ser mi guía, mi sostén y mi fortaleza en momentos de prueba, por brindarme la sabiduría necesaria para tomar las mejores decisiones, y no desampararme en momentos de dificultad, por mostrarme su amor incondicional cada momento de mi vida y permitirme culminar con satisfacción las metas propuestas.

A MIS PADRES: José Oscar Argueta y Mercedes Mabel Argueta, por todo su amor incondicional, comprensión, ayuda y todo el apoyo que a diario recibo de ustedes, sin el cual no hubiese sido posible haber culminado mis estudios. También por todos sus consejos, con los cuales he aprendido a valorar la vida, respetando a los demás y tratando de ser mejor cada día. Gracias por levantarme tantas veces sin importar nada...no sé cómo pagarles tanto, solo quiero decirles que los amo y eso nunca va a cambiar.

A MI HERMANO: Oscar Alberto Argueta, por su apoyo y comprensión, ya que me ha sido de mucha ayuda en momentos difíciles y siempre ha estado cuando más lo necesito.

A MI CUÑADA: Ester Chica, por su ayuda y comprensión, ya que ha sido una gran amiga en tiempos difíciles.

A MI SOBRINITA: Mélida Dayana Argueta Chica, por ser tan especial, llenar tantos vacíos y con tu presencia alegrarme la vida... te quiero mucho chiquita.

A MIS FAMILIARES: Porque a lo largo de mi formación académica siempre han estado pendiente de mí, y colaborándome de una u otra forma para que las cosas siempre salgan bien.

A MI NOVIO: Carlos Antonio Argueta Luna, por su comprensión y amor, ya que ha estado siempre dispuesto a ayudarme en todo lo que él pueda.

A MI ASESORA DE TESIS: Licda. Aurora Guadalupe Gutiérrez de Muñoz, gracias por toda su paciencia, comprensión, ayuda y esmero que nos brindó durante todo éste proceso. Siempre nos recibió con una sonrisa y nos motivó a salir adelante, fue un honor haber sido su grupo de tesis, siempre la recordaremos y ocupará un lugar especial en nuestros corazones.

A LICDA. MARITA MELGAR: Por brindarme su amistad, aportar de sus conocimientos en la elaboración de éste proyecto de investigación y darme su apoyo en momentos difíciles de ésta carrera.

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS: Brendita y Carito, por su amistad y cariño a lo largo de nuestra carrera, que aunque hubieron momentos difíciles, ellas siempre estuvieron ahí para brindarme su comprensión y apoyarme cuando las necesitaba. Gracias por aguantarme...son tantos los momentos que compartimos, que a lo largo de mi vida los tendré presentes, nunca las olvidare.

A MIS MAESTROS: Por todas sus enseñanzas y consejos a lo largo de mi formación académica, ya que gracias a ellas he subido otro peldaño más y siempre les estaré agradecida por toda su dedicación.

AL PERSONAL QUE LABORA EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: Licda. de Fuentes, gracias por no negarse a ayudarnos cuando creímos que todas las puertas se nos cerraban, usted fue una de las personas que confió en nosotros y nos dio la oportunidad de demostrarnos a nosotras mismas que cuando se tiene la disposición y la voluntad todo se puede...

Licda. María José, no encuentro las palabras adecuadas para agradecerle todo el apoyo, cariño, y comprensión que me brindó, sé que aunque compartimos poco tiempo, hay lazos de amistad que el tiempo ni la distancia pueden romper y usted ocupa un lugar muy especial en mi corazón.

Licda. Esmeralda, le agradezco por haber compartido sus conocimientos conmigo y enseñarme que para lograr una meta en la vida es necesario hacer sacrificios, muchas veces difíciles, pero que al final valen la pena, además que siento una gran admiración por todos sus logros.

Lic. Cardoza, gracias por la paciencia brindada y por lo que compartimos en lo que duró la ejecución, gracias por hacernos sonreír, en momentos difíciles.

Celia Mabel Argueta Argueta

DEDICATORIA.

Una vez finalizado mi formación académica agradezco y dedico este triunfo a todas aquellas personas que de una u otra forma sé que formaron parte de este proceso y en especial a:

A DIOS TODOPODEROSO: Ser supremo, por haberme regalado la sabiduría necesaria cuando se la pedí, ser mi amigo y refugio en los momentos más difíciles de mi vida, por escuchar mis suplicas, ser mi consuelo cuando me sentía derrotada y así mismo haber guiado mis pasos por el camino del bien para llegar al final de mi carrera; sé que sin tu ayuda no hubiese sido posible mil gracias.

A MI MADRE DEL CIELO EN ADVOCACIÓN DE LA REINA DE LA PAZ: Por interceder siempre a su hijo por mí y protegerme siempre con su manto protector por donde quiera que iba.

A MIS PADRES: Carlos Humberto Avalos y María Inés Granados: por haberme brindado su enorme apoyo incondicional tanto económico como moral, por todas sus oraciones y sabios concejos que sé que fueron de mucha ayuda, ser mis amigos y regalarme su valioso amor, haberme inculcado buenos valores, gracias por haber creído y confiar en mí que si podía; este es mi mejor regalo ya que fueron mi mayor inspiración para luchar todos los días y lograr mi meta, éste triunfo es de ustedes y sé que los haré felices, gracias papás los adoro un montón.

A MIS HERMANAS: Norma y Verónica, por ser mis mejores amigas y brindarme su confianza y estar conmigo cuando las necesité en los momentos duros de mi vida, sé que también rezaron mucho por mí; y de forma especial a mi hermano Carlos, por su gran aporte económico y su amistad incondicional, gracias hermanito, aun de lejos estuviste apoyándome incondicionalmente; los quiero.

A MIS AMIGOS Y FAMILIARES: por su amistad desinteresadamente y estar siempre apoyándome.

A MIS SOBRINOS: Zuraida, Ernesto, Christopher y mi chiquitín Emerson. Aun en su pequeñez formaron una parte muy importante en mi vida, llenaron de gran alegría tantos momentos tristes en mi carrera, gracias mis niños.

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS: Celia y Carolina, por ser mis grandes amigas, hermanas y las mejores compañeras que tuve, compartimos todas las alegrías y tristezas, convivimos como hermanas y aunque sé que pasamos momentos muy difíciles en los que creímos ya no poder nos mantuvimos unidas apoyándonos mutuamente y si alguna vez las ofendí.... Perdón! Me llevo grandes y bonitos recuerdos de ustedes, las quiero mucho amigas gracias por su amistad.

A UNA AMIGA: Licda. Marita; en tan poco tiempo pude darme cuenta que es una mujer muy valiosa y sincera, gracias por su amistad, consejos, sugerencias y estar muy de cerca en la realización de este proyecto, sepa que siempre le guardaré mucho aprecio.

A MI ASESORA DE TESIS: Licda. Aurora Guadalupe de Muñoz, por su gran aporte de conocimientos y también por haber sido gran parte de toda mi formación académica.

AL PERSONAL QUE LABORA EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: Con mucho cariño Licda. Esmeralda, Lic. Cardoza, Licda. María José (nuestro angelito); gracias por haber compartido sus grandes conocimientos y haber ayudado a que realizáramos este proyecto satisfactoriamente y formar parte de él, gracias por su paciencia; Licda. De Fuentes: muchísimas gracias por haber permitido tener acceso al Laboratorio que DIOS la bendiga siempre por ser una gran mujer. Siempre los llevaré en mi corazón.

Brenda Azucena Avalos Granados.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO: Gracias mi Dios, porque por tu amor y tu misericordia he logrado llegar hasta aquí. Gracias por haberme regalado sabiduría, por dar de tu Gracia en mi vida, por abrir las puertas que yo jamás pensé se abrirían, por ser mi roca y fortaleza en cada momento de dificultad; tu palabra es fiel ya que: que los que aman a Dios todas las cosas les ayudan a bien; por rodearme de personas tan especiales, que de una manera u otra formaron parte de este paso que di en la vida. Jamás podré pagar tus favores. **TE AMO MI DIOS.**

A MIS PADRES: Dora Alemán Hernández y Marcos Antonio Cruz, porque a pesar de la distancia siempre su amor y apoyo a estado ahí, gracias por sus consejos, por enseñarme que cada paso quede debe ser guía por Dios. Que Dios me los bendiga siempre. Les amo mucho.

A MIS ABUELOS: gracias abuela Inés Hernández de Alemán y abuelo (Q.D.D.G.) Santos Alemán porque para mí fueron mis padres, que me vieron crecer, fueron ustedes quienes formaron mi carácter, mi personalidad gracias por enseñarme a ser una persona humilde, abuelo sé que a pesar que no estás conmigo te sientes muy orgulloso de tu niña.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS: gracias por su amor y cariño, yo sé que siempre desearon lo mejor para mí y le pedían a Dios que mi ayudara en todo y abriera puertas para salir y terminar con triunfo mi carrera.

A LA LICDA. MARITA YESSSENIA MELGAR FLORES: te agradezco por todo tu amor, cariño, consejos, recuerdo tus palabras cuando comencé a estudiar en la universidad, y me decías Dios premiara tu esfuerzo, gracias por estar ahí, por darme ánimo, recuerdo que muchos momentos me viste llorar y nunca escuche de ti una palabra de desaliento, siempre hubo un consejo sabio y una solución, te quiero mucho. **GRACIAS MI MAMITA.**

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS: Celia y Brenda, gracias por su amistad, su cariño y por ser las mejores compañeras, sé que pasamos momentos difíciles en los cuales pensamos que jamás veríamos un rayito de luz en nuestro camino, lloramos, reímos pero lo más importante es que siempre nos mantuvimos firmes en que alcanzaríamos la meta con la ayuda de Dios; deseo que Dios conceda todos los deseos de sus corazones y que les bendiga, siempre adelante mis niñas.

A MI ASESORA DE TESIS: Licda. Aurora Guadalupe Muñoz, por su paciencia, por su conocimiento y apoyo en la realización de nuestro proyecto, que Dios la bendiga siempre.

A la Licda. Teresa Guadalupe Imbers de Rubio: gracias por ser una de las personas que me motivo para realizar este trabajo de investigación. Gracias por sus enseñanzas y consejos, por ser una excelente maestra conmigo, que Dios la bendiga siempre.

AL PERSONAL DEL ÁREA DE BACTERIOLOGÍA DEL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA: agradezco a Dios por permitirme conocer a excelentes personas.

Con respeto y admiración Licda. Zandra de Fuentes, una excelente profesional y mujer con muchas virtudes, le agradezco infinitamente por permitir realizar nuestra tesis, en tan poco tiempo aprendí mucho de su persona, siendo usted un ejemplo a seguir, siempre recordare sus palabras “cada día debemos ponernos retos y ser mejores”.

Licda. María José Luna Boza, Licda. Esmeralda Villatoro, Lic. Roberto Cardoza les agradezco por su paciencia y enseñanza, ya que ustedes también fueron parte fundamental de nuestro proyecto de investigación, gracias por sus palabras, y la confianza que depositaron en nosotras.

Dios les bendiga siempre, y estaré eternamente agradecida, los llevo en mi corazón.

Rudis Carolina Alemán Cruz

TABLA DE CONTENIDO

Cont.	Pág.
TABLA DE CONTENIDO.....	xiii
LISTA DE TABLA.....	xiv
LISTA DE GRAFICAS	xv
LISTA DE ANEXOS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	xx
1.1 Antecedentes del fenómeno de estudio.....	22
1.2 Enunciado del problema.....	23
1.3 Justificación de la investigación.....	23
1.4 Objetivos de la investigación.....	25
2. MARCO TEÓRICO.....	26
3. SISTEMA DE HIPÓTESIS.....	72
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	76
5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	87
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	98
7-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE TABLAS

Cont.	Pág.
TABLA N°1: Características morfológica de <i>Salmonella typhi</i>	88
TABLA N°2: Lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico.....	90
TABLA N°3: Clasificación de la susceptibilidad según CLSI.....	92
TABLA N°4: Comparación del método Epsilométrico con el Kirby-Bauer.....	94

LISTA DE GRÁFICOS

Cont.	Pág.
GRÁFICA N°1: características morfológica de <i>Salmonella typhi</i>	89
GRÁFICA N°2: lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico.....	91
GRÁFICA N°3: clasificación de la susceptibilidad según CLSI.....	93
GRÁFICA N°4: comparación del método Epsilométrico Vrs Kirby-Bauer.....	95

LISTA DE ANEXOS

Cont.	Pág.
ANEXO N°1: Cronograma de actividades.....	103
ANEXO N°2: Cronograma de actividades específicas.....	104
ANEXO N°3: Presupuesto y financiamiento.....	105
ANEXO N°4: Hoja de registro de cepas.....	106
ANEXO N° 5: Tabla de CLSI.....	107
ANEXO N°6: Carta de solicitud de permisos.....	108
ANEXO N°7: Cotización de precios de tiras E-Test.....	110
ANEXO N°8: Hoja de control de calidad del autoclave.....	111
ANEXO N°9: Hoja de control de calidad de medios de cultivo.....	112

LISTA DE FIGURAS

Cont.	Pág.
FIGURA N° 1: Morfología de bacterias.....	114
FIGURA N° 2: Morfología y reacción al gram de <i>Salmonella typhi</i>	115
FIGURA N° 3: Medio TSI.....	116
FIGURA N° 4: Medio Citrato.....	117
FIGURA N° 5: Agar Mac Conkey.....	118
FIGURA N° 6: Agar Mueller-Hinton.....	119
FIGURA N° 7: Método de dilución en caldo.....	120
FIGURA N° 8: Método de difusión en agar.....	121
FIGURA N° 9: Método Epsilométrico.....	122
FIGURA N° 10: Preparación de agar Tripticasa Soya.....	123
FIGURA N° 11: Vertida de agar MC y TSA.....	124
FIGURA N° 12: Vertida de agar Mueller-Hinton.....	125
FIGURA N° 13: Control de crecimiento de agar Mac Conkey.....	126
FIGURA N° 14: Medición de pH de agar Mac Conkey.....	127
FIGURA N° 15: Medición de pH de agar Mueller-Hinton.....	128

FIGURA N° 16: Medición de grosor de Mueller-Hinton.....	129
FIGURA N° 17: Preparación de materiales.....	130
FIGURA N° 18: Cepas en leche descremada al 10%.....	131
FIGURA N° 19: Inoculación de medios.....	132
FIGURA N° 20: Inoculación en medio TSI.....	133
FIGURA N° 21: Inoculación en medio Movilidad.....	134
FIGURA N° 22: Preparación del inóculo.....	135
FIGURA N° 23: Comparación del inóculo con la escala de Mac Farland.....	136
FIGURA N° 24: Método Epsilométrico.....	137
FIGURA N° 25: Incubación de placas.....	138
FIGURA N° 26: Lecturas de placas.....	139
FIGURA N° 27: Personal del área de bacteriología del LNR.....	140

RESUMEN

En algunos países se reportan cepas de *Salmonella typhi*, resistentes a la ciprofloxacina, en tanto que algunos la reportan como sensibilidad disminuida, esto condicionado con factores, como por ejemplo la automedicación, las mutaciones bacterianas, el uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana, el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes bacterias. Éste trabajo de investigación tiene como **objetivo:** Determinar la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test) durante el periodo de julio-septiembre de 2013. **Metodología:** La investigación es de tipo retrospectivo, debido a que por medio de esta, se permitió conocer el mecanismo de susceptibilidad que presentó *Salmonella typhi* frente a la ciprofloxacina, ya que con anterioridad éstas cepas mostraban sensibilidad disminuida a la ciprofloxacina por otro método de susceptibilidad diferente al E-Test, que en su totalidad fueron 40 cepas tomada como muestra a las que se les realizó el estudio, así se implementaron criterios de inclusión que sirvieron para clasificar solamente a las muestras que cumplan con los requisitos siguientes: que pertenezca a la especie *typhi*, que la cepa sea aislada del año 2013, que la cepa en estudio no presente ninguna contaminación, que no interese el tipo de muestra de donde fue aislado y todas aquellas cepas a las cuales no se les ha realizado la susceptibilidad por el método Epsilométrico (E-test), para la recolección de los datos se utilizó la hoja de registro. **Resultados:** De las 40 muestra seleccionada, 34 cepas resultaron con **susceptibilidad intermedia** coincidiendo en su totalidad con las del método de Kirby-Bauer, y 6 cepas mostraron **sensibilidad** a la ciprofloxacina, también coincidiendo las 6 cepas con el método de comparación. Por los resultados obtenidos que representan el 85% con susceptibilidad intermedia, se acepta la hipótesis alterna que dice: Existe susceptibilidad intermedia al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

Palabras clave: *Salmonella typhi*, resistencia bacteriana, susceptibilidad, sensibilidad, sensibilidad intermedia, antibiótico, ciprofloxacina, cepa bacteriana, método Epsilométrico, método de Kirby-Bauer.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un mecanismo que desarrollan las bacterias por diferentes factores genéticos que generan mutaciones a nivel estructural, lo cual dificulta el tratamiento para el control de enfermedades causadas por bacterias.

Salmonella es un género de bacterias que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* formado por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *Salmonella typhi*), ni esporas. Son bacterias móviles que producen ácido sulfhídrico (H₂S). Emplean la glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa y no producen ureasa. No tienen metabolismo fermentativo.

Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar. *Salmonella typhi* causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospedantes.

Algunos de los agentes antimicrobianos tales como amoxicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol generan resistencia y se notifica con más frecuencia entre los aislamientos de *Salmonella typhi*; la resistencia a quinolonas ha sido notificada en la India y el sudeste asiático. La determinación de los patrones de resistencia a los antimicrobianos es esencial para recomendar tratamientos. En lugares donde la resistencia a estos agentes es común entre las cepas circulantes de *Salmonella typhi*, las fluoroquinolonas y cefalosporinas parenterales de tercera generación probablemente sean la mejor opción de tratamiento empírico de la fiebre tifoidea.

En nuestro país la resistencia a la ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* ha sido poco estudiado, debido a su alto costo, ya que no todos los laboratorios de la red de salud pública cuentan con el área de bacteriología ni con los equipos necesarios para realizar estos procedimientos. Es así que como grupo de estudiantes egresados de la carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico pretende hacer una investigación sobre: Determinación de la sensibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-Test), durante el período de julio a septiembre de 2013.

En este documento se presenta como está estructurada dicha investigación, la cual se detalla de la siguiente manera:

En el planteamiento del problema se describen los antecedentes de la problemática en investigación, además se menciona generalidades de *Salmonella typhi* y su resistencia a la ciprofloxacina en países como la India, Centro América y El Salvador. También forma parte de este apartado, la justificación en la cual se manifiesta el porqué de la investigación, y su finalidad, el enunciado del problema, mediante una interrogante a la cual el grupo trató de dar respuesta al finalizar la investigación. Además se detallan los objetivos en donde se exponen los parámetros que guiaron a la elaboración del trabajo de investigación con el fin de tener una visión específica de los diferentes puntos que se pretende investigar, para dar una respuesta a la problemática en estudio.

En el marco teórico conceptual, se describe generalidades de la bacteria, los medios de cultivo, los antibióticos y mecanismos de resistencia de la bacteria, como también la definición de términos que serán de ayuda al lector.

También presenta el sistema de hipótesis de la investigación, el cual incluye una hipótesis de trabajo, su respectiva hipótesis nula y una hipótesis alterna. Así como también las unidades de análisis, variables e indicadores involucrados en el estudio, y operacionalización de las variables.

Además en la metodología de la investigación, se describe el tipo de estudio, la población y muestra, los criterios de inclusión y exclusión, el tipo de muestreo, técnicas e instrumentos de recolección de datos, técnicas de laboratorio, equipo, material y reactivos y las etapas que son: etapa de planificación y ejecución, también incluye los riesgos y beneficios.

Posteriormente se detallan los resultados que se obtuvieron en el desarrollo de la investigación, donde se inicia con la presentación de los resultados obtenidos, seguido de un análisis e interpretación de los mismos con su respectiva prueba de hipótesis.

Finalmente las conclusiones y recomendaciones que el grupo investigador aporta, según los resultados obtenidos en el estudio, se presenta la bibliografía que se consultó para estructurar el trabajo de investigación y se detallan cada uno de los anexos, material que contribuye a una mejor comprensión de éste estudio.

1.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

La bacteria *Salmonella* serotipo *typhi*, agente etiológico de la fiebre tifoidea, causa alrededor de 16,6 millones de casos y 600.000 muertes al año en todo el mundo.

La enfermedad se caracteriza por la aparición insidiosa y sostenida de fiebre, cefalea intensa, malestar general, anorexia, relativa bradicardia, estreñimiento o diarrea (principalmente en niños), y hepato-esplenomegalia (aumento de tamaño del hígado y del bazo). Sin embargo pueden ocurrir infecciones atípicas y poco severas.

Es clásico dividir las manifestaciones clínicas de la fiebre tifoidea de acuerdo a su evolución en semanas o septenarios. Se sabe que la *Salmonella* tiene un período de incubación que se calcula en aproximadamente 10 días. La enfermedad tiene un período inicial de una semana caracterizado por la aparición de fiebre, en forma escalonada y progresiva asociada a cefalea intensa, astenia y anorexia en la cual los hemocultivos son positivos. En el segundo período correspondiente a la segunda y tercera semanas, los síntomas se acentúan, la fiebre se estabiliza, la cefalea es continua, el estado de conciencia se altera y el paciente está delirante e indiferente (típhus), presenta diarrea profusa y signos de deshidratación, identificándose a la bacteria en los coprocultivos siendo estos positivos¹

Las fluoroquinolonas son una de las clases de agentes antimicrobianos más útiles empleados hoy en día en medicina humana, debido a su espectro y a sus propiedades fisicoquímicas. El uso de quinolonas en humanos es un asunto de especial preocupación porque podría contribuir a la adquisición de resistencia en bacterias transmitidas por alimentos (tales como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli*) y esto, a su vez, podrá conducir a una reducción en la eficacia de tales componentes en el tratamiento de infecciones en los seres humanos.

Las quinolonas originales (ácidos nalidíxico, oxolínico y pipemidico) fueron introducidas en la década de los 60 del pasado siglo. Estos antibióticos inhiben la actividad de la ADN girasa bacteriana (topoisomerasa II) y son efectivos frente a bacterias aerobias gram-negativas. En la actualidad las quinolonas originales son poco utilizadas debido al desarrollo de resistencias y a su toxicidad, especialmente para el sistema nervioso central.

La resistencia a los antimicrobianos de primera línea (ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol) se define como multiresistencia. La acetiltransferasa inactiva el cloranfenicol por el agregado de dos grupos acetilos. Un segundo mecanismo de resistencia al cloranfenicol se basa en la pérdida de una proteína de membrana externa. La resistencia a ampicilina está mediada por la producción de beta lactamasas (inhibida por ácido clavulánico), en tanto que a resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, por la alteración de la enzima blanco, dihidrofolato reductasa y dihidropteroato sintasa.

¹Libro: Koneman DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO sexta edición Editorial Medica Panamericana 2008.

En 1972 se detectó la resistencia de *Salmonella typhi* al cloranfenicol y en 1987 se describieron cepas multirresistentes al cloranfenicol, la ampicilina y el cotrimoxazol en la India, el sureste asiático, Oriente Medio, África y otros países como España, donde la mayoría de los casos eran importados. Las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de tercera generación se convirtieron en el tratamiento de elección para las infecciones causadas por estas cepas.

La incidencia de cepas resistentes aumentó en todo el mundo. Desde 1989, luego de la aparición de cepas resistentes a ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, la ciprofloxacina se convirtió en el agente de primera línea tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Por otro lado, con los años se observó una disminución en las cepas resistentes a cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol.

Posteriormente, en 1990 se detectaron cepas de *Salmonella typhi* resistentes al ácido nalidíxico en la India, Vietnam, Japón, Pakistán y otras zonas; alrededor de la mitad de éstas cepas eran multirresistentes.

En los países en vías de desarrollo, como la India, la ciprofloxacina continúa siendo la base del tratamiento de la fiebre entérica, ya que es eficaz por vía oral, además de económica. Sin embargo, hay informes de cepas de *Salmonella typhi* con resistencia a ciprofloxacina de alto grado en muchos centros de la India.

El Salvador en la actualidad es uno de los países en el cual se ha reportado disminución en la sensibilidad a ciprofloxacina por cepas de *Salmonella typhi*, las cuales han sido aisladas por diferentes métodos de diagnóstico en los distintos laboratorios de la red nacional que cuentan con el área de bacteriología, siendo estos casos confirmados por el Laboratorio Nacional de Referencia.

1.2 ENUNCIADO DEL PROBLEMA

De la problemática antes descrita se deriva el problema que se enuncia de la siguiente manera:

¿Existirá susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-test) durante el periodo de julio a septiembre de 2013?

1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

El género *Salmonella*, definido por su conjunto de características bioquímicas, reúne cerca de 2.000 tipos serológicos. Cada tipo serológico a su vez está caracterizado por antígenos específicos que pueden ser identificados mediante pruebas serológicas. Los antígenos que caracterizan los tipos serológicos de las salmonellas son los antígenos O

(somáticos), y los antígenos H (flagelares); algunos presentan un tercer tipo el denominado antígeno Vi (capsular).

En la actualidad se dispone de varios antimicrobianos útiles para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella*, dentro de las cuales están el cloramfenicol, la ampicilina, la amoxicilina, el trimetroprin-sulfametoxazol, las cefalosporinas de tercera generación, como la cefotaxina, la cefoperazona, la ceftriaxona; y las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina y la ofloxacina. Sin embargo, hay informes de cepas de *Salmonella typhi* con resistencia a ciprofloxacina de alto grado.

La sensibilidad a la ciprofloxacina es poco conocida a nivel de los laboratorio de Salud Pública en El Salvador, ya que no todos los laboratorios disponen del área de bacteriología y tampoco cuentan con los recursos económicos ni materiales para realizar las pruebas de sensibilidad a cepas bacterianas de *Salmonella typhi*, aisladas de diferentes tipos de muestras, provenientes de centros hospitalarios, es por ello que estos aislamientos son referidos al Laboratorio Nacional de Referencia para la confirmación y determinación de la susceptibilidad bacteriana.

Esta investigación surgió en vista a la necesidad de conocer la resistencia a la ciprofloxacina por *Salmonella typhi*, ya que a nivel mundial se están reportando cepas multirresistentes², siendo este antibiótico uno de los de primera línea utilizados para el tratamiento contra dicha bacteria recomendados por la CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute).

Con esta investigación se dio un aporte en cuanto al manejo de agentes antimicrobianos ya que la elección del tratamiento depende de los patrones de resistencia y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Salmonella typhi*, siendo la ciprofloxacina el tratamiento de elección, pero los pacientes infectados con cepas de *Salmonella typhi* con sensibilidad disminuida pueden no responder en forma adecuada al tratamiento, de esta manera se benefició así a los pacientes en cuanto a su rápida recuperación, reducción de costos hospitalarios y dar a conocer nuevos datos estadísticos sobre la sensibilidad existente de *Salmonella typhi* a la ciprofloxacina. Ya que con métodos automatizados es difícil detectar concentraciones mínimas; por ejemplo con el Vitek se detectan concentraciones de 0.5 ug/ml ya que este valor es su límite de detección aunque la bacteria sea sensible a concentraciones menores.

² Patrones de Resistencia Antimicrobiana de *Salmonella typhi* autores: Harish B, Menezes G. Comité de Redacción Científica de SIIC CITA : Indian Journal of Medical Microbiology 29(3):223-229, Jul 2011 [HTTP://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm](http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm)

1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-test) durante el periodo de julio-septiembre de 2013.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar siembras de cepas de *Salmonella typhi* en el medio de cultivo nutritivo agar Trypticase Soya y medio selectivo-diferencial agar Mac Conkey.
- Observar las características morfológicas de las colonias de *Salmonella typhi* con sensibilidad disminuida a ciprofloxacina, en agar Trypticase Soya y agar Mac Conkey.
- Preparar agar Mueller-Hinton cumpliendo con la norma establecida por CLSI.
- Elaborar una estandarización del inóculo utilizando la escala de Mac Farland 0.5.
- Determinar en forma directa la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método Epsilométrico (E-Test).
- Comparar los resultados de susceptibilidad a ciprofloxacina obtenidos por el método Epsilométrico (E-test) con Kirby-Bauer.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS

La Bacteriología es una disciplina de la Microbiología, que ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad. Las bacterias son responsables de millones de muertes de personas a nivel mundial. Entre algunas enfermedades infecciosas bacterianas, causantes de grandes epidemias que han afectado a la población, se encuentran: la difteria, cólera, tuberculosis, sífilis, tétanos, tos ferina, y fiebre tifoidea. Sin embargo, también existen infecciones bacterianas que aunque están asociadas en menor frecuencia como causa de muerte, son un problema de salud pública en países en vías de desarrollo como el nuestro, entre las que podemos mencionar: diarreas (causadas por *Shigella* o *Escherichia coli*), infecciones de vías urinarias, faringoamigdalitis, gonorrea, tracoma y brucelosis.

Otro aspecto de primordial importancia en bacteriología es la microbiota del cuerpo humano, en especial del tracto gastrointestinal. Se estima que en el intestino de un ser humano adulto, existe un billón de microorganismos por mililitro de contenido fecal y alberga entre 500 y 1000 diferentes especies bacterianas.

La mayoría de esos microorganismos pertenecen al Dominio *Bacteria*, que incluye tanto a bacterias gramnegativas como grampositivas. La microbiota intestinal difiere de una persona a otra y esa diversidad se ha visto en la composición del lumen (heces) y de la mucosa (epitelial). La microbiota intestinal está implicada en una gran variedad de funciones en el hospedero, involucrando cambios en el epitelio intestinal, modulación inmune, movimiento intestinal y el metabolismo de algunas drogas.

microbiota también está involucrada en la degradación de algunas toxinas y carcinógenos que se ingieren en la dieta, síntesis de micronutrientes, fermentación de sustancias del alimento, ayuda en la absorción de electrolitos y minerales; asimismo afecta el desarrollo y diferenciación de los enterocitos, a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta. Finalmente, la microbiota previene la colonización del intestino por bacterias patógenas como: *Salmonella*, La cepas de *Escherichia coli* productoras de cuadros clínicos gastrointestinales como por ejemplo:

Escherichia coli enteropatogena

Escherichia coli enteroinvasiva

Escherichia coli enterohemorrágica

Escherichia coli enterotoxigenica

Escherichia coli enteroagregativa

Las actividades metabólicas de la microbiota intestinal, facilitan la extracción de calorías de los alimentos ingeridos y el almacenaje de esas calorías en el tejido adiposo del hospedero, para su posterior utilización y proveen energía y nutrimentos para el desarrollo

y proliferación microbiana. Las diferencias en la recuperación de energía en los individuos puede ofrecer una explicación fisiológica del porqué algunos pacientes presentan obesidad, pero no comen en abundancia.

Por otra parte, las bacterias presentan un metabolismo tan diverso que les permite llevar a cabo funciones tales como: fijación de nitrógeno (conversión de nitrógeno gaseoso a amonio), la fijación de una cantidad importante de CO₂, la metanogénesis (producción biológica de metano), así como la reducción de azufre y hierro.

Hay bacterias con capacidad para metabolizar los plaguicidas clorados e hidrocarburos. Actualmente se trabaja en la producción de polímeros bacterianos biodegradables para sustituir a los plásticos sintéticos. Además, mediante procesos vigentes a nivel industrial, las bacterias se utilizan en la producción de antibióticos (bacitracina, cefalosporina, cloranfenicol, cicloheximida, lincomicina, nistatina, penicilina, polimixina B, estreptomina, son algunos de ellos); vitaminas tales como la vitamina B12 y la riboflavina, cuya síntesis es más fácil por fermentación; aminoácidos, por fermentación directa o síntesis enzimática, entre ellos el ácido aspártico y la fenilalanina (ingredientes del aspartame), el ácido glutámico (empleado como saborizante bajo la forma de glutamato monosódico), las aplicaciones prácticas de las bacterias en la ingeniería genética incluyen: vacunas virales (citomegalovirus, hepatitis B, sarampión, rabia); proteínas y péptidos (insulina, factor estimulante del crecimiento, interferón alfa, interferón beta, factor de necrosis tumoral y otros que aún no se encuentran en el mercado); vegetales y animales transgénicos; regulación y terapia génicas.³

2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS:

2.1.1.1 Según su morfología

La microscopía óptica permite reconocer a las bacterias de distintas formas:

- Las bacterias esféricas o ligeramente ovoides se denominan cocos.
- Las bacterias con forma de bastón se denominan bacilos.
- Los bacilos de corto tamaño que pueden confundirse con un coco se denominan cocobacilos. Algunos bacilos tienen extremos afinados y reciben el nombre de bacilos fusiformes, mientras que otros poseen forma de clava.
- Los bacilos cortos curvos, con forma de coma reciben el nombre de vibrios.
- Las bacterias espiraladas se llaman comúnmente espirilos cuando son rígidas y espiroquetas si son más flexibles y ondulantes.

2.1.1.2 Según su agrupación:

Algunos géneros bacterianos se agrupan de una manera característica. Esta agrupación se debe a la tendencia de las células hijas a permanecer parcialmente adheridas después de la división celular.

³ Generalidades de bacterias, Universidad Nacional Autónoma de México Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>.

Los cocos pueden disponerse de la siguiente manera:

- En pares y se les llama diplococos
- Si se disponen en cadena se llaman Estreptococos
- Cuatro células esféricas conforman una tétrada
- En forma de racimo o irregular se llaman estafilococos
- En paquetes cúbicos se denominan sarcinas

Los bacilos pueden disponerse:

- Aislados
- Adosados a lo largo, de forma paralela formando una agrupación en empalizada (*Haemophilus*).
- Pueden quedar adheridos por sus extremos y tomar apariencias de letras chinas (*Corynebacterium*). (Ver Fig.1).

2.1.1.3 Según su reacción tintorial

Las bacterias se clasifican en dos grandes grupos teniendo en cuenta el comportamiento de las mismas frente al procedimiento de coloración de Gram:

- Gram positivas: G (+), se tiñe de color violeta.
- Gram negativas: G (-), se tiñen de color rojo o rosado.

2.1.1.4 Según su requerimiento de oxígeno

Otro aspecto a tener en cuenta en la clasificación de bacterias es la necesidad de oxígeno para poder vivir. Dependen en buena medida de la disponibilidad de las enzimas eliminadoras de peróxidos y superóxidos.

- **Aerobias estrictas:** Dependen de O₂ para su crecimiento.
- **Anaerobias estrictas:** se desarrollan en ausencia total de O₂, utilizan aceptores finales distintos del oxígeno: CO₂, H₂ y N₂, o poseen metabolismo estrictamente fermentativo.
- **Anaerobias Facultativas:** pueden desarrollarse en presencia o ausencia de O₂, aunque predominan en medios anaeróbicos.
- **Microaerófilas:** sólo se pueden desarrollar en presencia de bajas tensiones de O₂ (menor del 12% en lugar del 20% que es la atmosférica) y altas tensiones de CO₂.

2.1.1.5 Según su temperatura óptima de crecimiento

Según la temperatura óptima de crecimiento las bacterias se clasifican en:

- **Termófilas:** se desarrollan entre 25°C y 80°C, óptima 50°C y 60°C.
- **Mesófilas:** se desarrollan entre 10°C y 45°C, óptima 20 °C y 40°C.
- **Psicrófilas:** se desarrollan entre -5°C y 30°C, óptima 10 °C y 20°C.
- **Criófilas:** que son resistentes al frío o que necesitan de el para vivir

2.1.1.6 Según el pH en que se desarrollan

Las bacterias se clasifican en:

- **Acidófilas:** Se desarrollan a pH entre 1.0 y 5.0
- **Neutrófilas:** Se desarrollan a pH entre 5.5 y 8.5
- **Basófilas:** Se desarrollan a pH entre 9

2.1.1.7 Por su forma de nutrición

Según su metabolismo interno, las bacterias presentan requerimientos nutricionales diversos y se clasifican en:

- **Autótrofas quimiosintéticas o fotosintéticas.** Las autótrofas fotosintéticas utilizan la luz del sol y el bióxido de carbono para fabricar su alimento. Las autótrofas quimiosintéticas utilizan compuestos inorgánicos, por ejemplo, el azufre para fabricar su alimento y su fuente de energía es el CO₂.
- **Heterótrofas.** (por absorción) pueden utilizar fuente de carbono orgánico para su alimentación.

2.1.1.8 Según el requerimiento de NaCl.

- **Halófilas:** son organismos que muestran afinidad por la sal, por lo que viven en ambientes hipersalinos.

2.1.2 FAMILIA *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias son una familia de bacterias gramnegativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocobacilos.

Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en la tierra, en plantas o en animales acuáticos.

Mueren con relativa facilidad con desinfectantes comunes, incluido el cloro. Con frecuencia se utilizan especies de *Enterobacteriaceae* en la bio-industria: para la fermentación de quesos y productos lácteos, alcoholes, tratamientos médicos, producción de toxinas en el uso de cosméticos, fabricación de agentes antivirales de la industria farmacéutica, etc.

2.1.2.1 Características de la familia *Enterobacteriaceae*

En la definición clásica de una *Enterobacteriaceae* se usan siete criterios básicos, adicional a la aparición de nuevos métodos taxonómicos para incluir a ciertos géneros que no cumplen con todos los siguientes criterios, pero que forman parte de esta familia:

- Son bacterias gramnegativas, la mayoría bacilos, otros cocobacilos y otros pleomórficos.
- No son exigentes, son de fácil cultivo.
- Son oxidasa negativo (excepto *Plesiomonas*, que es oxidasa positivo), es decir, carecen de la enzima citocromo oxidasa.
- Son capaces de reducir nitratos a nitritos.
- Son anaerobios facultativos
- Son fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin la producción de gas (en especial glucosa y lactosa), y oxidadores de una amplia gama de sustratos en condiciones aeróbicas.
- Muchos géneros tienen un flagelo que sirve para desplazarse, aunque algunos géneros no son móviles.

Adicional a ello, las *Enterobacteriaceae* no forman esporas, algunas producen toxinas y pueden ser encapsuladas y son organismos catalasa positivos. Son quimioheterótrofos, y necesitan para su crecimiento compuestos simples de carbono y nitrógeno, generalmente sólo con D-glucosa, aunque algunas requieren aminoácidos y vitaminas. La temperatura óptima de crecimiento es de entre 22 °C y 37 °C.

Las diferencias entre los nombres de los diversos géneros provienen de criterios más precisos, como la fermentación de los diferentes azúcares, la producción o no de azufre, la presencia de enzimas metabólicas (β -galactosidasa, desaminasas, descarboxilasas), etc. Los serotipos de importancia médica y sanitaria pueden distinguirse entre sí por la presencia o ausencia de antígenos en su constitución celular, tales como en el lipopolisacárido (antígeno O), el antígeno flagelar (antígeno H) o el antígeno capsular (antígeno K).

2.1.3 GÉNERO: *Salmonella*

Es un género de bacterias patógenas descubiertas por el veterinario estadounidense Daniel Elmer Salmon en 1885. Las salmonellas son bacterias gram negativas, no esporuladas y móviles, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Con excepción de *Salmonella typhi*, que afecta a los seres humanos y produce la fiebre tifoidea, la mayoría son patógenas tanto para el hombre como para los animales.

2.1.3.1 Características del género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, se compone de bacterias que se multiplican en el intestino, siendo varios los géneros de Enterobacterias que incluye especies patógenas. Además de *Salmonella*, también se transmite por los alimentos *Escherichia*, *Shigella* y *Yersinia*.

Al igual que todos los géneros de *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* está formada por bacterias gramnegativas flageladas y forma bacilar (Ver Fig. 2). Las *Salmonellas* son microorganismos anaerobios facultivos, presentando las dos rutas metabólicas, la oxidativa y la fermentativa. Son oxidasa negativos, fermentan la glucosa generando ácido y gas, crecen en citrato como única fuente de energía, descarboxilan la lisina y la ornitina suele producir sulfuro de hidrógeno y no hidroliza la urea. Una de las características de este género es que la mayor parte de sus integrantes no pueden fermentar la lactosa ni la sacarosa.

Hasta el momento se distinguen las siguientes especies:

- *Salmonella bongori*
- *Salmonella choleraesuis*
- *Salmonella entérica*
- *Salmonella enteritidis*
- *Salmonella nyanza*
- *Salmonella paratyphi*
- *Salmonella typhi*
- *Salmonella typhimurium*
- *Salmonella virginia*.

De las anteriores, *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella enteritidis*, son las especies que hasta el momento se reconocen como patógenas a su vez, según la serotipificación de Kauffman y White, eran clasificadas en más de 2,200 serotipos en base a los antígenos flagelares H (proteicos) y antígenos somáticos O (fracción polisacárida del lipopolosacárido bacilar). *Salmonella typhi* posee además un antígeno de virulencia. *Salmonella spp* es un microorganismo que se adapta muy bien a los animales y a las personas.

Cuando llega a los alimentos es capaz de multiplicarse en cualquier producto fresco a una velocidad muy elevada, ya que puede duplicar su número cada 15 ó 20 minutos si la temperatura es elevada (superior a 20° C). Si los alimentos no se refrigeran rápidamente y

a baja temperatura (el límite de crecimiento está en 6° C) el microorganismo se multiplica, con el consiguiente riesgo para los consumidores. Sin embargo, posee una escasa capacidad de multiplicación si no existe oxígeno.

2.1.3.2 Nomenclatura del genero *Salmonella*

Desde 1996, la Organización Mundial de la Salud (OMS) comenzó a denominar a los serotipos solo en subespecies I y abandonó todos los nombres de serotipos existentes en las subespecies. Los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) siguen esta práctica y utilizan nombres de los serotipos en subespecie I y las fórmulas antigénicas para los serotipos sin nombre descrito después de 1966 en las subespecies II, IV y VI. Para los serotipos que no son especies separadas, el nombre serotipo no se escribe en cursiva y la primera letra se pone en mayúscula. En la primera mención de un serotipo el nombre del género se da seguido por la palabra “serotipo” o por la abreviatura “ser” y luego el nombre del serotipo o ser. Anteriormente el nombre se puede escribir con el género seguido directamente por el nombre de serotipo *Salmonella typhimurium*.

Los nombres de los miembros del género *Salmonella* se han reducido en la actualidad a una especie única *Salmonella* entérica⁴ y los nombres previos de las especies han quedado relegados al estado de serotipos.

A continuación se presenta las diferentes nomenclatura de *Salmonella typhi*

NOMENCLATURA TRADICIONAL	NOMENCLATURA POR EL CDC	NOMENCLATURA FORMAL
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>typhi</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>typhi</i>
<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>Paratyphi</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>paratyphi</i>
<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>gallinarum</i>
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>pullorum</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>pullorum</i>
<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>arizonae</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>arizonae</i>

⁴ LIBRO: Koneman Diagnostico Microbiológico texto y atlas en color, Buenos Aires Argentina Editorial Medica Panamericana 2008, sexta edición

<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> serotipo <i>enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> entérica serotipo <i>enteritidis</i>
-------------------------------	---	--

2.1.3.3 Identificación de *Salmonella typhi*

El informe preliminar de tifoidea debe ser enviado a los clínicos tan pronto como se obtenga una identificación presuntiva de *Salmonella typhi*. Los métodos para el aislamiento de *Salmonella typhi* de sitios normalmente estériles (ej. sangre, médula ósea y orina).

Las muestras de sangre, médula ósea u orina obtenidas de un paciente con sospecha de fiebre tifoidea o con diagnóstico de fiebre de origen desconocido y enviadas a un laboratorio deben ser cultivadas en agar sangre o chocolate. Además, si los recursos permiten el uso de más de un medio, se debe inocular agar Mac Conkey (AMC).

Las muestras fecales deben ser cultivadas en medios selectivos de agar (por ejemplo, agar bismuto sulfito (BS) o agar Desoxicolato Citrato (ADC). Los aislamientos de sangre, médula ósea u orina deben teñirse con coloración de gram, mientras que los aislamientos obtenidos de muestras de heces no.

En la mayoría de las situaciones, la identificación presuntiva se fundamenta en la reacción de aislamiento en agar hierro Kligler (KIA) agar hierro triple azúcar (TSI) y una reacción serológica positiva en los antisueros Vi o D de *Salmonella*.

Si los cultivos de bacilos gramnegativos se han obtenido de muestras de sitios normalmente estériles o si los cultivos dan colonias incoloras en agar Mac Conkey, se debe inocular TSI/KIA. Los aislamientos que tienen una reacción típica de *Salmonella typhi* en TSI/KIA deben entonces someterse a prueba con antisueros Vi y D.

Apariencia típica de las colonias de *Salmonella typhi* en los diferentes medios:

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar Mac Conkey	Colonias lisas, transparentes e incoloras; 2 a 3 mm.
Agar Salmonella-Shigella	Colonias incoloras, transparentes, ámbar rosado, con pigmento color negro; 1 a 2 mm.
Agar Hektoen	Colonias verdes - azuladas (con o sin centro color negro) o amarillo, con el centro negro; 1 a 2 mm.
Agar Sulfito Bismuto	Negra, rodeada por una zona negra o amarronada con brillo metálico; 1 a 3 mm.

Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato	Rojo (con o sin el centro negro) o amarillo con el centro negro; 1 a 2 mm.
--	--

Los resultados de la prueba serológica deben notificarse inmediatamente a las autoridades de salud e inocularse en agar Mueller-Hinton para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos. Para cualquier aislamiento de sangre, no debe demorarse la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por esperar la identificación bioquímica o serológica.

Aunque el médico tratante no esté necesariamente esperando el resultado de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, ni la verificación de la identificación, el laboratorio de referencia debe confirmar la identificación del agente patógeno por caracterización bioquímica y serológica, registrar estos; y los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos además de la información demográfica de los pacientes, con fines epidemiológicos.

Agar hierro de Kligler y agar hierro triple azúcar (TSI)

Las colonias sospechosas deben trasladarse cuidadosamente de los medios de cultivo en placas a un medio de tamizaje, como agar hierro de Kligler, agar hierro triple azúcar o cualquier medio de agar no selectivo, e incubarse toda la noche.

Se selecciona una de las colonias bien aisladas en cada placa. Con un asa de inoculación en punta se toca ligeramente solo el centro de la colonia, sin tocar el resto de la colonia, ni la superficie de la placa, ya que se podría tomar contaminantes que estuvieran presentes en la superficie del agar. Si la habilidad de seleccionar una colonia aislada y pura es cuestionable, se debe purificar la colonia sospechosa y estriarla para aislar en otra placa de agar antes de inocular la colonia en el bisel de agar TSI/KIA.

El TSI/KIA se inocula puncionando el fondo del tubo y estriando la superficie inclinada del agar (bisel) en el tubo. Se deben aflojar el tapón del tubo antes de la incubación. Después de una incubación de 24 horas a 35°C–37°C, se debe observar la superficie inclinada del TSI o KIA para ver las reacciones típicas de *Salmonella*. En el bisel de TSI o de KIA, *Salmonella typhi* produce característicamente una superficie alcalina (roja, “K”), un fondo ácido (amarillo, “A”) y una pequeña porción ennegrecida del agar (H₂S, +. Ácido sulfhídrico) en el sitio de la punción del bisel y en la línea de la punción no se produce gas (G). (Ver Fig. 3)

Es importante notar que algunas veces los aislamientos de *Salmonella typhi* no producen H₂S (ácido sulfhídrico). Los aislamientos de *Salmonella paratyphi* en TSI o KIA son comúnmente K/A G- y no producen H₂S. La mayoría de los otros serotipos de *Salmonella* producen una reacción de K/A G+, que indica que la glucosa está fermentada con producción de gas y H₂S (ácido sulfhídrico).

2.1.3.4 Análisis bioquímicos adicionales para la identificación de *Salmonella typhi*

Los aislamientos de *Salmonella* pueden identificarse con medios tradicionales en tubos o sistemas bioquímicos comerciales.

Agar hierro lisina

El agar hierro lisina es un medio útil de detección, porque la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* descarboxilan la lisina y producen H₂S, mientras la producción de gas varía por serotipo.

Para inocular este medio se debe puncionar el fondo del agar en el tubo, y luego se procede a estriar la superficie del bisel, después de una incubación a 35°C–37°C durante 24 horas se realiza la lectura e interpretación.

En el agar hierro lisina, las cepas de *Salmonella* dan una reacción alcalina típica (púrpura) en el bisel y el fondo del tubo, de igual manera puede producir gas y H₂S (ennegreciendo el medio).

Cuando la reacción en el bisel del tubo es alcalina, la lisina está descarboxilada y el aislamiento se denomina “positivo a lisina”. A diferencia de la mayoría de otras *Salmonella*, los aislamientos de *Salmonella paratyphi* son negativos a lisina y aparecen amarillos en agar hierro lisina. Si se sospecha que hay infección por *Salmonella typhi* y se necesita hacer un diagnóstico rápido para identificar el tratamiento apropiado, se deben investigar los aislamientos sospechosos con antisueros antes de hacer la identificación bioquímica.

Agar movilidad

El agar movilidad debe ser inoculado con un asa de inoculación en punta en el medio de cultivo y con una sola punción de aproximadamente 1–2 cm de profundidad. La superficie del agar movilidad debe estar seca cuando se use, ya que la humedad puede producir el crecimiento de un microorganismo no móvil por lados del agar, creando una nube de crecimiento y apareciendo como móvil. El agar movilidad puede ser inoculado con el crecimiento de los tubos de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar que muestran una reacción típica de *Salmonella typhi*.

Otra opción es inocular el agar movilidad al mismo tiempo que el bisel de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar, usando la misma aguja de inoculación sin tocar de nuevo la colonia.

La movilidad está indicada por la presencia de un crecimiento difuso (el medio aparece como nublado) fuera de la línea de inoculación. Los microorganismos no móviles no crecen fuera de la línea de inoculación. Los laboratorios sin mucha experiencia pueden tener dificultad para leer las reacciones de movilidad; por ello, se deben comparar las reacciones con cepas control positiva y negativa. Las cepas de *Salmonella typhi* comúnmente son móviles (97%).

Medio de Citrato

El principio de la prueba de la utilización del citrato es la determinación de la capacidad del microorganismo para usar el citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones de amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del

indicador de pH. *Salmonella typhi* no utiliza el citrato como fuente de energía por lo tanto es citrato negativo. (Ver Fig.4)

Medio de urea

El medio de urea descubre microorganismos productores de ureasa (Por ejemplo, *Klebsiella* y *Proteus*). Se inocula el agar urea en abundancia sobre toda la superficie del bisel, se afloja el tapón antes de incubar toda la noche a 35 °C– 37 °C. Los cultivos ureasa positivos producen una reacción alcalina en el medio, que muestra un color entre rosáceo y rojo. Los microorganismos ureasa negativos no cambian el color del medio, el cual es entre amarillo pálido y rosado. *Salmonella typhi* siempre es ureasa negativa.

Serología en lámina para la identificación de *Salmonella typhi*

Los cultivos de agar hierro de Kligler o agar hierro triple azúcar que se sospecha que son *Salmonella typhi* deben analizarse serológicamente con antisueros de *Salmonella* “Vi” y “O” del grupo D. Debido a que Vi es un antígeno capsular, si está presente puede enmascarar la reacción del grupo somático “O”. Por ello, los aislamientos de *Salmonella typhi* serán normalmente positivos tanto para Vi como para el antisuero D (es posible que la positividad sea débil en ambos).

Las pruebas de aglutinación serológicas pueden realizarse en una placa de petri o en una lámina de cristal limpia.

a) Se debe tomar una porción del crecimiento de la superficie del agar KIA, agar TSI, agar hierro lisina u otro medio de agar no selectivo con un asa de inoculación estéril.

b) Luego se emulsifica el crecimiento en tres pequeñas gotas de solución salina estéril y se debe mezclar completamente.

c) Se Añade una pequeña gota de antisuero O del grupo D a una de las suspensiones y una pequeña gota de antisuero Vi a una segunda. En la tercera suspensión se usa *Salmonella* serotipo *typhi* como control para la autoaglutinación (rugosidad). Por lo regular, se mezclan volúmenes aproximadamente iguales de antisuero y crecimiento, pero el volumen de la suspensión puede ser más del doble del volumen del antisuero. Para conservar antisuero, se pueden utilizar volúmenes muy pequeños, como 10 µl. Se puede utilizar un asa curva de inoculación para dispensar pequeñas cantidades de antisuero si no se dispusiera de micropipetas.

d) Finalmente se debe mezclar la suspensión y el antisuero completamente y realizar movimientos de vaivén en la lámina repetidamente para observar la aglutinación. Será más fácil verla con la lámina bajo una luz brillante y sobre un fondo negro. Si la reacción es positiva, entre 30 segundos y 1 minuto aparecerá un precipitado.

Se debe examinar la suspensión salina para estar seguro de su uniformidad y de que no muestra grumos causados por la autoaglutinación. Si hubiera autoaglutinación, el cultivo es “rugoso” y no puede ser serotificado. Las reacciones fuertes de aglutinación se leen como positivas. Los cultivos que tienen reacciones típicas de TSI/KIA de *Salmonella typhi*

y que reaccionan serológicamente tanto con Vi o con el antisuero D pueden ser identificados como presuntas cepas *Salmonella typhi*.⁵

2.1.4 CUADRO CLÍNICO

Gastroenteritis

Es la manifestación más frecuente, que varía desde una diarrea leve hasta una fulminante, acompañada por fiebre leve y grados variados de náusea y vómitos.

El período de incubación de esta infección es de 8 a 48 horas después de la exposición, y suele ser de corta duración, entre 3-6 días.

Bacteriemia

Etapa que no posee síntomas gastrointestinales mayores, caracterizada por fiebre alta en picos y hemocultivos positivos, debido al paso de las bacterias desde el tracto digestivo hacia la sangre. El riesgo de esta situación consiste en la posibilidad de que el germen infecte otras estructuras, sobre todo en pacientes con cierta predisposición, como neonatos, ancianos, pacientes con prótesis, alteraciones de la inmunidad (SIDA, trasplantes) patología reumática, valvular o vascular.

Fiebre tifoidea

La especie responsable es la *Salmonella typhi*. La fiebre tifoidea se caracteriza por un cuadro clínico que aparece tras un período de incubación variable entre 3 y 60 días, donde predominan una fiebre elevada con disminución del nivel de conciencia, dolor abdominal y aparición de lesiones cutáneas en tronco en forma de manchas circulares de color rosa, que desaparecen con la presión y se mantiene durante pocos días. En este período temprano de una a dos semanas de duración con fiebre y constipación, durante el cual los cultivos de sangre son positivos y los cultivos de materia fecal son negativos; seguido por una segunda fase (diarreica) durante la cual, los cultivos de sangre que se toman son negativos y los de materia fecal son positivos. Otros datos de importancia para el diagnóstico son la esplenomegalia (crecimiento del bazo) y la leucopenia con importante desviación a la izquierda. Dada a su evolución natural, la enfermedad dura entre 4 y 8 semanas, pero este tiempo se ha acortado notablemente en la era antibiótica

Estado portador

Etapa en la cual las personas con infecciones previas, especialmente con *Salmonella typhi* pueden continuar excretando el microorganismo en sus heces hasta un año después de la remisión de los síntomas.⁶

⁵ Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Editorial Organización mundial para la Salud 2005 pag. 150.

⁶ Libro: Jawetz, décima edición

2.1.5 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El médico examinará al paciente en búsqueda de signos y síntomas de intoxicación alimentaria y también hará preguntas acerca de los alimentos que la persona ha ingerido recientemente. Los exámenes del vómito, la sangre, las heces y cualquier alimento sobrante pueden identificar la causa de la infección. Los exámenes son:

- Cultivo de heces (coprocultivo) para *Salmonella*
- Cultivos de sangre (hemocultivo) si se sospecha bacteriemia.
- Aglutininas frías/febriles (examen para anticuerpos específicos)

2.1.6 TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento es reponer los líquidos y electrolitos (sal y minerales) que se pierden a causa de la diarrea. Por lo general, no se administran medicamentos antidiarreicos ya que pueden prolongar el proceso infeccioso.

Una de las medidas de cuidados personales para evitar la deshidratación es la ingestión de soluciones electrolíticas para restituir los líquidos perdidos por la diarrea, las cuales se pueden conseguir sin prescripción. Se puede recomendar la terapia con antibióticos en personas con síntomas graves.

Las personas con diarrea (especialmente los niños) quienes no puedan tomar líquidos por vía oral debido a la náusea, pueden requerir de atención médica y de líquidos intravenosos. La fiebre y el dolor se pueden tratar con acetaminofén o con ibuprofeno. Cuando se presenta diarrea, es posible que las personas que tomen diuréticos deban suspenderlos durante el episodio agudo. Al respecto se le deben solicitar instrucciones al médico. Podría ser conveniente realizar modificaciones en la dieta durante un episodio de diarrea: restringir los productos lácteos, consumir banano, arroz, manzanas, tostada (dieta BRAT en inglés). Los bebés deben continuar con la lactancia materna y recibir soluciones de reposición electrolítica como lo sugiera el médico.

El uso de antibióticos se limita a los pacientes con fiebre tifoidea, con bacteriemia y a aquellos que tienen un mayor riesgo de producir complicaciones, como los ancianos, neonatos, portadores de prótesis e inmunodeprimidos. El tratamiento de elección es el cloranfenicol, teniendo como alternativas la ampicilina, amoxicilina, las cefalosporinas de tercera generación y las quinolonas. Para erradicar el germen en los portadores crónicos, se prefiere la amoxicilina.

2.1.7 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas. Según lo que se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.

El objetivo de la utilización del medio de cultivo es: el antibiograma, identificación, y multiplicación de los microorganismos.

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 °C. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos.

El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras (el rojo fenol se usa como indicador ya que es rojo en pH básico y amarillo en pH

ácido. La violeta de genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias grampositivas.

2.1.7.1 Clasificación de los medios de cultivo

Según su estado físico (consistencia).

- **Medios líquidos:** Se denominan caldo por su estado líquido. El medio líquido más utilizado es el llamado caldo nutritivo, compuesto principalmente de extracto de carne, peptona y agua. Se utiliza fundamentalmente cuando se pretende la obtención de una suspensión bacteriana de una determinada concentración.
- **Medios sólidos:** Se preparan a partir de los medios líquidos, agregándoles un agente gelificante. Los más utilizados son la gelatina y el agar.

Gelatina: Es una proteína animal obtenida de los huesos. Tiene el inconveniente de que es hidrolizada por muchas bacterias, y además su uso está muy limitado porque su punto de fusión es bajo (licúa a temperatura ambiente) razón por la que no puede utilizarse para cultivos a 37°C, que es la temperatura óptima de crecimiento para muchos microorganismos.

Agar-agar: Es un polímero de azúcares obtenido de algas marinas. Se trata de una molécula insoluble en agua pero soluble en agua caliente; una solución al 1.5% p/v forma un gel firme entre 32 °C y 39°C y no se funde por debajo de 85°C. Funde a 90°C y solidifica una vez fundido alrededor de los 45°C. Tiene el inconveniente de que introduce compuestos orgánicos indefinidos que pueden falsear los resultados de las necesidades nutritivas de un microorganismo.

Medios semisólidos: Se preparan a partir de los medios líquidos, agregando a éstos un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus usos es la investigación de la movilidad de las bacterias.

Según su utilización.

- **Medios comunes:** Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de bacterias que no necesiten requerimientos especiales. El medio más conocido de este grupo es el agar nutritivo o agar común, que resulta de la adición de agar al caldo nutritivo. Otros representantes de este grupo son el agar Tripticasa Soya, el agar Columbia, etc.
- **Medios de enriquecimiento:** Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes. Este enriquecimiento se hace por adición de sangre u otros productos biológicos (sangre, suero, leche, huevo, bilis, etc.) que aportan

dichos factores. En ocasiones es posible añadir suplementos artificiales a los medios para producir un enriquecimiento del mismo (por ejemplo. Polivitex, Isovitalex, etc.) El gonococo, por ejemplo, necesita cistina y cisteína para su crecimiento. Estas sustancias son aportadas por la sangre calentada adicionada al medio de cultivo (agar chocolate).

- **Medios selectivos:** Son medios utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias contenidas en una población polimicrobiana. El fundamento de estos medios consiste en facilitar nutricionalmente el crecimiento de una población microbiana específica. Un ejemplo de medio selectivo es el caldo selenito, que se utiliza para favorecer el crecimiento de *Salmonella* y frenar el del resto de Enterobacterias.
- **Medios inhibidores:** Cuando las sustancias añadidas a un medio selectivo impiden totalmente el crecimiento de una población microbiana, se denomina inhibidor. Los medios inhibidores podrían considerarse como una variante más restrictiva de los medios selectivos. Los medios inhibidores se consiguen habitualmente por adición de sustancias antimicrobianas o de cualquier otra que inhiba completamente el desarrollo de una población determinada. Un medio inhibidor es el Mac Conkey que permite el crecimiento de los gérmenes gramnegativos e impide el crecimiento de los grampositivos.
- **Medios diferenciales:** Se utilizan para poner en evidencia características bioquímicas que ayuden a diferenciar géneros o especies. La adición de un azúcar fermentable o un sustrato metabolizable se utilizan para este fin. El medio Mac Conkey es un medio diferencial porque permite distinguir los gérmenes que fermentan la lactosa de aquellos que no lo hacen. También lo son el C.L.E.D. (lactosa positiva/lactosa negativa), el agar sangre (tipo de hemólisis), el *Salmonella-Shigella* (que es doblemente diferencial), etc.
- **Medios de identificación:** Son los destinados a comprobar alguna cualidad específica que puede servirnos para reconocer la identidad de un microorganismo. Estos medios han de poseer los elementos necesarios para asegurar el crecimiento de los microorganismos, el sustrato específico que vaya a ser metabolizado y el indicador que nos muestre el resultado. El agar Kligler, el medio de Simmons y en general, cualquier medio al que se le haya añadido un elemento diferencial de un microorganismo, son medios utilizados en identificación.
- **Medios de multiplicación:** Sirven para obtener una gran cantidad de células a partir de un microorganismo ya aislado. Se emplean en la obtención de vacunas, en la investigación y en la industria. Los medios más adecuados para la multiplicación suelen ser líquidos. El caldo-infusión cerebro-corazón (BHI), es un ejemplo típico de estos medios.
- **Medios de conservación:** Se utilizan para conservar una cepa que, por diversas razones nos interese mantener. Fundamentalmente se utilizan como controles de calidad de las pruebas y reactivos utilizados en Microbiología. En el laboratorio se pueden conservar las cepas de tres formas:

- a. Haciendo pases periódicos de placa a placa,

- b. Mediante liofilización de una suspensión bacteriana.
 - c. Congelando las cepas en leche descremada estéril al 10%.
- **Medios de transporte:** Se usan para el transporte de muestras clínicas que no pueden sembrarse inmediatamente. Su utilización debe hacerse introduciendo la torunda con la que se obtuvo la muestra en el interior del medio (generalmente en un tubo). Son ejemplos típicos de este grupo los medios de Stuart-Amies, Cary-Blair.

Según su origen o composición.

Según las sustancias que entren a formar parte en su composición, los medios de cultivo pueden ser clasificados en:

- **Medios complejos:** Se preparan a partir de tejidos animales, y más raramente de vegetales. Su composición no es exactamente definida, y por consiguiente no es rigurosamente constante. Esto puede tener ciertos inconvenientes en condiciones experimentales, donde la reproductibilidad no podrá ser exacta.
- **Medios sintéticos:** Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua destilada en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida.
- **Medios semisintéticos:** En este caso se aportan los factores de crecimiento bajo la forma de un extracto orgánico complejo (extracto de levadura, extracto de tejidos, etc.). Ciertos gérmenes no crecen en ningún medio por muy enriquecido que esté éste, haciéndolo exclusivamente en células vivas con unas características determinadas. Ejemplos de este tipo son, aparte de los virus, las *Chlamydias*, *Rickettsias*, etc.

2.1.7.2 AGAR MAC CONKEY

El agar Mac Conkey es un tipo de gelatina que se produce de unas algas rojas. Se usa ampliamente en microbiología por sus propiedades al utilizarse para el aislamiento y cultivo de bacilos gramnegativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos.

Adicionalmente sirve como selector de bacterias lactosafilas en muestras clínicas, de agua y alimentos. La razón de la selección es que de bacterias grampositivas no admiten la lactosa que se encuentran en el medio. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Componentes

Los ingredientes necesarios para este medio son los siguientes: sales biliares (medio inhóspito para el crecimiento de bacterias grampositivas, excepto *Enterococcus* y algunas especies de *Staphylococcus*), cristal violeta colorante (inhóspito para cierto tipo de bacterias grampositivo), colorante rojo neutro (el cual marca microorganismos que fermenten la lactosa), lactosa y peptona. (Ver Fig.5).

Usos

Sirve como un indicador visual de pH, distinguiendo así las bacterias gramnegativas que pueden fermentar la lactosa (lactosa positiva) y las que no pueden (lactosa negativa).

Fermentadores de lactosa

Al utilizar la lactosa en el medio, bacterias Lactosa positiva como *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella* producen acidez, lo cual baja el pH bajo 6.8 lo que tiene como consecuencia la aparición de colonias de color rosadas o rojas.

No fermentadores

Bacterias que no fermentan la lactosa como *Salmonella*, *Proteus* y *Shigella* utilizan peptona en su lugar, formando amonio, lo cual incrementa el pH del agar, formando colonias incoloras.

2.1.7.3 AGAR MUELLER-HINTON

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Commite for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad, su bajo contenido de sustancias inhibitoras y el crecimiento satisfactorio que presentan la mayoría de los patógenos no fastidiosos. Con este medio se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de *Streptococcus*. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Componentes

En éste medio la infusión de carne y la peptona de caseína proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos. El almidón es agregado para absorber cualquier metabolito tóxico y el agar es adicionado como agente solidificante. (Ver Fig. 6).

Usos

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

2.1.7.4 AGAR TRIPTICASA SOYA

Es un medio nutritivo que garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológico tanto grampositivos como gramnegativo, hongos y levaduras puede ser utilizado para el monitoreo microbiológico de áreas y superficies y para el mantenimiento de cepas ATCC.

Componentes

Este medio contiene: polisorbato, histidina, peptona de soya, sodio tiosulfato, lecitina, peptona de caseína, cloruro de sodio y agar.

Usos

Este medio es de nutrición para las bacterias de crecimiento rápido.

2.1.8 HISTORIA DE LOS ANTIBIÓTICOS

A pesar de que los potentes compuestos antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas causadas por bacterias, tales como la tuberculosis, peste bubónica o la lepra, no se aislaron e identificaron hasta el siglo XX, el uso más remoto de los antibióticos tuvo lugar en China hace más de 2500 años. Se sabía entonces que la aplicación de la cuajada mohosa de la soya sobre ciertas infecciones traía beneficios terapéuticos.

Muchas otras culturas antiguas, entre ellos los antiguos egipcios y griegos usaban moho y ciertas plantas para el tratamiento de infecciones debido a que contenían antibióticos.

Este fenómeno recibe del nombre de antibiosis. El principio de antibiosis fue descrito en 1877 cuando Louis Pasteur y Robert Koch observaron que un bacilo en el aire podía inhibir el crecimiento de la bacteria *Bacillus anthracis*.

El primer antibiótico descubierto fue la penicilina, en 1897 por Ernest Duchesne, en Francia, quien trabajaba con hongos del género *Penicillium*, aunque su trabajo no recibió

la atención de la comunidad científica. La investigación en el campo de la terapéutica antibiótica moderna comenzó en Alemania, con el desarrollo del antibiótico de corto espectro Salvarsan por Paul Ehrlich en 1909. Ese descubrimiento permitió el tratamiento efectivo de la sífilis, un amplio problema de Salud Pública en la época. Ése medicamento, efectivo también para combatir otras infecciones por espiroquetas, ya no se emplea en el presente. Más adelante Alexander Fleming (1881-1955), un médico británico, estaba cultivando una bacteria (*Staphylococcus aureus*) en un plato de agar, el cual fue contaminado accidentalmente por hongos. Luego él advirtió que el medio de cultivo alrededor del moho estaba libre de bacterias, sorprendido, comenzó a investigar la causa, Fleming ya había trabajado previamente en las propiedades antibacterianas de la lisozima, y por ello pudo hacer una interpretación correcta de lo que vio, que el hongo estaba secretando algo que inhibía el crecimiento de la bacteria. Aunque no pudo purificar el material obtenido (el anillo principal de la molécula no era estable frente a los métodos de purificación que utilizó), informó del descubrimiento en la literatura científica. Debido a que el hongo era del género *Penicillium* (concretamente *Penicillium notatum*), denominó al producto penicilina.

Más de 10 años después, Ernest Chain y Howard Walter Florey se interesaron en el trabajo de Fleming y produjeron una forma purificada de la penicilina. Un antiguo alumno de Fleming, Cecil George Paine, realizó las primeras experiencias clínicas con penicilina en neonatos aquejados de oftalmía neonatal logrando el éxito en 1930. Paine no publicó estos resultados, cosa que sí hicieron Chain y Florey más adelante. Los tres investigadores, Fleming, Chain y Florey, compartieron el premio Nobel de Medicina en 1945.

En 1939, René Dubos aisló la gramicidina, uno de los primeros antibióticos usados fabricados comercialmente e indicado en el tratamiento de heridas y úlceras. Debido a la necesidad imperiosa de tratar las infecciones provocadas por heridas durante la II Guerra Mundial, se invirtieron muchos recursos en investigar y purificar la penicilina, y un equipo liderado por Howard Florey tuvo éxito en producir grandes cantidades del principio activo puro en 1940. Los antibióticos pronto se hicieron de uso generalizado desde el año 1943.

En marzo de 2000, médicos del hospital San Juan de Dios de San José (Costa Rica) publicaron manuscritos de Clodomiro Picado que explican sus experiencias entre 1915 y 1927 acerca de la acción inhibitoria de los hongos del género *Penicillium* en el crecimiento de *Staphylococcus* y *Streptococcus* infecciosos, motivo por el cual es reconocido como uno de los precursores del antibiótico, penicilina, descubierta por Fleming en 1928. El informe con los resultados de los tratamientos realizados con la penicilina por Picado fueron publicados por la Sociedad de Biología de París en 1927.

El descubrimiento de los antibióticos, así como de la anestesia y la adopción de prácticas higiénicas por el personal sanitario (por ejemplo, el lavado de manos y utilización de instrumentos estériles), revolucionó la sanidad y se convirtió en uno de los grandes avances de la historia en materia de salud. A los antibióticos se les denomina frecuentemente "*balas mágicas*", término usado por Ehrlich, por hacer blanco en los microorganismos sin perjudicar al huésped.

2.1.8.1 Generalidades de antibióticos

Un antibiótico es una sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintética de ella que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias.

Los antibióticos se utilizan en medicina humana, animal y horticultura para tratar infecciones provocadas por gérmenes. Normalmente los antibióticos presentan toxicidad selectiva, siendo muy superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan, aunque ocasionalmente puede producirse una reacción adversa medicamentosa, como afectar a la flora bacteriana normal del organismo. Los antibióticos generalmente ayudan a las defensas de un individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección. Un antibiótico es bacteriostático si impide el crecimiento de los gérmenes, y bactericida si los destruye, pudiendo generar también ambos efectos, según los casos.

En términos estrictos o históricos, un antibiótico es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros microorganismos. El término antibiótico fue utilizado por primera vez por Selman Waksman en 1942 para describir ciertas influencias antibióticas, es decir, aquellas formulaciones antagonistas al crecimiento de microorganismos y que son derivadas de otros organismos vivos. Esa definición, por ende, excluye a aquellas sustancias naturales, como el jugo gástrico y el peróxido de hidrógeno, que pueden matar a un microorganismo y que no son producidos por otros microorganismos.

En la actualidad la definición de un antibiótico está siendo usada para incluir a los antibióticos sintéticos o quimioterapéuticos antimicrobianos, como las quinolonas, sulfamidas y otros agentes antimicrobianos derivados de productos naturales y aquellos con propiedades antibióticas descubiertas empíricamente.

El objetivo del tratamiento con antibióticos es conseguir la erradicación del microorganismo patógeno. Para ello es necesario seguir una posología que consiga que en el foco de la infección se alcance una concentración del medicamento superior a la mínima concentración capaz de inhibir al microorganismo durante el tiempo suficiente. La automedicación con antibióticos supone un serio problema de salud pública, pues la inadecuada elección del antibiótico y, especialmente, una incorrecta posología, puede generar poblaciones de bacterias resistentes a dicho antibiótico. Por otro lado, los antibióticos y antimicrobianos son totalmente inefectivos en las enfermedades virales, por lo que su uso debe evitarse en estos casos.

2.1.8.2 Mecanismos de acción de los antibióticos

Debido a que los antibióticos tienen efectos sobre una diversidad de bacterias, sus mecanismos de acción difieren basados en las características vitales de cada organismo y que, por lo general, son objetivos que no existen en las células de mamíferos.

Pared celular

Algunos antibióticos ejercen su función en regiones y orgánulos intracelulares, por lo que son ineficaces en bacterias que contengan una pared celular, a menos que se logre inhibir la síntesis de esta estructura exterior, presente en muchas bacterias, pero no en animales. Muchos antibióticos van dirigidos a bloquear la síntesis, exportación, organización o formación de la pared celular, específicamente los enlaces cruzados del peptidoglicano, el principal componente de la pared celular, sin interferir con los componentes intracelulares. Esto permite alterar la composición intracelular del microorganismo por medio de la presión osmótica. Como la maquinaria intracelular permanece intacta, ello aumenta la presión interna sobre la membrana hasta el punto en que ésta cede, el contenido celular se libera al exterior, y la bacteria muere. También permiten la entrada de otros agentes antimicrobianos que no pueden atravesar la pared celular. Algunos ejemplos clásicos son:

- La bacitracina: del grupo de los péptidos, inhibe al transportador lipídico del peptidoglicano hacia el exterior de la célula.
- La penicilina: en el grupo de los betalactámicos, inhibe la transpeptidación, una reacción en la que se producen los enlaces cruzados de la pared celular y bloquea los inhibidores de las autolisinas.
- Las cefalosporinas: otro tipo de moléculas que inhiben la transpeptidación, por unión a las proteínas PBPs, implicadas en la última fase de la formación de la pared celular.

Membrana celular

Ciertos antibióticos pueden lesionar directa o indirectamente, al inhibir la síntesis de los constituyentes, la integridad de la membrana celular de las bacterias y de ciertos hongos. Las polimixina por ejemplo, son antibióticos que actúan como surfactante o detergente que reacciona con los lípidos de la membrana celular de las bacterias. Ello destruye la integridad de la permeabilidad de la membrana. Los elementos hidrosolubles y algunos que son tóxicos para el germen, pueden así entrar sin restricción al interior celular. La gramicidina A forma poros o canales en las bicapas lipídicas

Acción sobre ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas

Algunos antibióticos actúan bloqueando la síntesis del ADN, ARN, ribosomas, ácidos nucleicos o las enzimas que participan en la síntesis de las proteínas, resultando en proteínas defectuosas. La mitomicina es un compuesto con estructura asimétrica y que se fija a las hélices del ADN e inhibe o bloquea la expresión de la enzima ADN polimerasa y,

por ende, la replicación del ADN y el ensamblaje de las proteínas. La actinomicina, por su parte, ejerce su mecanismo en la misma manera que la mitomicina, solo que es una molécula simétrica.

Las sulfamidas son análogos estructurales de moléculas biológicas y tienen parecido a las moléculas normalmente usadas por la célula diana. Al hacer uso de estas moléculas farmacológicas, las vías metabólicas del microorganismo son bloqueadas, provocando una inhibición en la producción de bases nitrogenadas y, eventualmente, la muerte celular

Las quinolonas y fluoroquinolonas actúan sobre enzimas del tipo girasas y topoisomerasas de ADN, responsables de la topología de los cromosomas, alterando el control celular sobre la replicación bacteriana y produciendo una alteración en la lectura del mensaje genético.

Acción sobre los ribosomas

Aproximadamente la mitad de los antibióticos actúan por inhibición de los ribosomas bacterianos, los orgánulos responsables de la síntesis de proteínas y que son distintos en composición de los ribosomas en mamíferos. Algunos ejemplos incluyen los aminoglucósidos (se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma), las tetraciclinas (bloquean la unión del ARNt aminoacil al complejo ARNm-ribosoma), eritromicina (se fijan de manera específica a la porción 50S de los ribosomas bacterianos) y la doxiciclina.

2.1.8.3 Generalidades de las quinolonas: ciprofloxacina.

La primera quinolona: Es el ácido nalidíxico, específico contra bacterias gramnegativas, fue presentado en 1962. Desde entonces las modificaciones estructurales han dado como resultado fluoroquinolonas de segunda, tercera y cuarta generación, que han ampliado la cobertura a organismos grampositivos.

Mecanismo de acción de las quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano. Actúan en el ADN cromosómico bacteriano, uniéndose a algunas de las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, por desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico.

En gramnegativos, las topoisomerasas que inhiben principalmente es la ADN-girasa, que tiene una subunidad A y una subunidad B. La función más importante de la ADN-girasa es mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. También libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP. En la girasa las quinolonas interaccionan con aminoácidos de las alfa-hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del ADN. En grampositivos la principal diana es la

topoisomerasa IV, que tiene dos subunidades, ParC y ParE. La topoisomerasa IV separa las hebras de ADN tras cada replicación. También tiene una actividad relajante sobre la cadena de ADN.

Un paso importante en el mecanismo de acción de las quinolonas es la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN que contiene ADN roto. La unión de una quinolona a la ADN-girasa provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN responsable de la inhibición de la enzima. La topoisomerasa IV formaría complejos similares a los que se forman con la girasa. Su acción sobre las topoisomerasas, aunque necesaria, no explica por sí sola su acción bactericida. Deben tener lugar acontecimientos posteriores, pero su mecanismo íntimo se desconoce.

Espectro antimicrobiano

Las quinolonas se han dividido en cuatro generaciones sobre la base de actividad antimicrobiana, agentes de primera generación, que son usados muy poco actualmente, tienen moderada actividad gramnegativa y una distribución sistémica mínima.

Las quinolonas de segunda generación han ampliado la actividad contra gramnegativo y contra agentes patógenos atípicos, pero tiene limitada acción grampositivo. Estos agentes son más activos contra los bacilos gramnegativo aeróbicos. La ciprofloxacina es la quinolona más activa contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Las quinolonas de tercera generación conservan la actividad gramnegativa y amplían su actividad contra bacterias intracelulares atípicas, además de mejorar la actividad contra grampositivos.

Los agentes de cuarta generación mejoran la acción contra grampositivos, mantienen la cobertura de gramnegativos, y adquieren acción contra bacterias anaeróbicas. La menor susceptibilidad y la resistencia adquirida a las quinolonas de segunda generación limitan su uso en el tratamiento de infecciones estafilocócicas y estreptocócicas. Las fluorquinolonas actualmente disponibles con actividad in vitro contra *Streptococcus pneumoniae* (incluyendo las variedades penicilina -resistentes) son levofloxacina, sparfloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, y trovafloxacina. levofloxacina y sparfloxacina presentan actividad estreptocócica in vitro inferior comparado con gatifloxacina, moxifloxacina y trovafloxacina. gatifloxacina es dos a cuatro veces más activo que la levofloxacina contra *Streptococcus pneumoniae* in vitro, y moxifloxacina es cuatro a ocho veces más activo. Comparado con ciprofloxacina y levofloxacina, las fluorquinolonas gatifloxacina, moxifloxacina, y trovafloxacina tienen actividad in vitro mayor contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*.

GENERACIÓN DE QUINOLONAS	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
PRIMERA GENERACIÓN	
Ácido nalidixico Cinoxacina Ácido pipemidico	Enterobacterias
SEGUNDA GENERACIÓN	
Clase I : Lomefloxacina Norfloxacina Enoxacina	Enterobacterias
Clase II : Ofloxacina Ciprofloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (solo ciprofloxacina)
TERCERA GENERACIÓN	
Levofloxacina Sparfloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, <i>Streptococcus</i>
CUARTA GENERACIÓN	
Trovafloxacina	Enterobacterias patógenos atípicos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , anaerobios

Resistencia a las quinolonas

La resistencia a quinolonas tiene mecanismos múltiples y un impacto clínico importante. Las mutaciones pueden ocurrir rápidamente durante la terapia con fluoroquinolonas y convertirse en el factor más importante que limite uso de estos antimicrobianos.

Los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas se pueden resumir en tres principales:

- Mutación de la enzima. Se produce por producción de mutaciones cromosómicas que alteran la topoisomerasa del ADN bacteriano.

- Alteración de la permeabilidad. Se presenta como una disminución de la permeabilidad bacteriana por alteración de las porinas (poros).
- Bomba de eflujo. Por un mecanismo de eflujo, mediante el cual se excreta de manera activa a las quinolonas hacia el exterior bacteriano como una bomba de agua que saca el líquido desde una inundación hacia fuera.

2.1.9 EL ANTIBIOGRAMA

El primer objetivo del antibiograma es el de medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales.

El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país, es como puede adaptarse la antibioterapia empírica, revisarse regularmente los espectros clínicos de los antibióticos y adoptarse ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales.

Sensibilidad bacteriana a los antibióticos

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas.

Hay diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de rutina, y de manera semicuantitativa, las concentraciones inhibitorias mínimas (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Estos diferentes métodos de rutina permiten categorizar una cierta cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. Esta cepa se denomina Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico.

Para un determinado antibiótico, una cepa bacteriana es, según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

- **Sensible:** si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.

- **Resistente:** si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- **Intermedia:** cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

Ciertas moléculas son representativas de un grupo de antibióticos. Los resultados (Sensible, Intermedio y Resistente) obtenidos con estas moléculas pueden ser ampliados a los antibióticos del grupo, que en ese caso no es necesario ensayar (Ejemplo: Equivalencia entre La cefalotina que se ensaya y las restantes cefalosporinas de 1ª generación que no es necesario probar, ya que el resultado puede deducirse del obtenido en la cefalotina).

Este hecho permite ensayar un número reducido de antibióticos, sin limitar por ello las posibilidades terapéuticas. Para considerar a una bacteria susceptible o resistente a cualquier antimicrobiano se debe poner atención, a su estructura química, por lo que se clasifican de la siguiente manera:

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS AGRUPADOS POR ESTRUCTURA			
Nombre genérico	Usos frecuentes	Posibles efectos adversos	Mecanismo de acción
Aminoglucósidos			
Amikacina Gentamicina Neomicina Netilmicina Estreptomycinina Tobramicina	Infecciones severas causadas por bacterias gramnegativas como <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> .	-Sordera (especialmente en combinación con diuréticos de asa) -Vértigo -Daño renal (especialmente con Cefalosporina).	Se une a la unidad 30S del ribosoma provocando una alineación y reconocimiento anormal por el ARN, por lo que inhibe la síntesis de proteínas.
Carbacefen			
Loracarbef	Infecciones respiratorias altas e infecciones urinarias	-Ocasionalmente trombocitopenia	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.
Carbapenem			
Ertapenem	Bactericidas para las grampositivas y	-Malestar estomacal y diarrea.	Mecanismo betalactámico:

Doripenem Imipenem/Cistatina Meropenem	gramnegativas por lo que se usa para cobertura de amplio espectro de manera empírica.	-Nauseas. -Dolor de cabeza. -Rash y alergias.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular, aunque son menos sensibles a las betalactamasas.
Cefalosporinas de primera generación.			
Cefadroxilo Cefazolina Cefalotina Cefaloxina Cefradina	Al igual que las penicilinas, todas las cefalosporinas tienen un anillo betalactámico, por lo que son también antibióticos bactericidas. Cocos grampositivos, <i>Proteus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> .	-Malestar estomacal y diarrea. -Nauseas. -Reacción alérgicas.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular, aunque son menos sensibles a las betalactamasas.
Cefalosporinas de segunda generación			
Cefaclor Cefamandol Cefoxitina Ceprozil Cefuroxina	Son más eficaces que la penicilina frente a los bacilos gramnegativos, e igual frente a los cocos grampositivos, <i>Enterobacter</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella</i> .	-Malestar estomacal. -Náuseas y diarreas. -Reacciones alérgicas.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular.
Cefalosporinas de tercera generación.			
Cefixima Cefdinir Cefditoren Cefoperazona Cefotaxima Ceftazidima	Las cefalosporinas se emplean en el tratamiento de serias infecciones por organismos resistentes a otros betalactámicos,	-Malestar estomacal. -Náuseas y diarrea. -Reacción alérgica.	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano, una capa de pared celular.

Cefibuten Cefizoxima Ceftriaxona	como ciertas presentaciones de meningitis.		
Cefalosporina de cuarta generación.			
Cefepime Cefaclidina	Mayor cobertura en contra de <i>Pseudomonas</i> y organismos grampositivos.	-Igual que las otras Cefalosporinas.	Impiden la síntesis de peptidoglicano.
Cefalosporinas de quinta generación.			
Ceftobiprol	Actividad adicional contra el <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina.	-Igual que otras cefalosporinas.	Impiden la síntesis de peptidoglicanos.
Glicopéptidos			
Teicoplanina Vancomicina	Pacientes críticamente enfermos y con sensibilidad demostrada a los betalactámicos.	Reversibles: -Alergias y dolor. -Nefrotoxicidad. -Neutropenia. -Sordera	Actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglucano en un paso metabólico, inhibe la síntesis de ARN
Macrólidos			
Azitromicina Claritromicina Diritromicina Eritromicina Telitromicina Espectinomina	Infecciones por <i>Streptococcus</i> , sífilis, infecciones respiratorias, infección por <i>Mycoplasma</i> . neumonía, y activo contra gonococos	-Náuseas y diarreas (especialmente en altas dosis). -Ictericia. -Trastornos visuales.	Se une al ribosoma, unidad 50s por lo que inhibe la síntesis de proteínas.

Monobactámicos			
Aztreonam	Activo frente a bacterias gramnegativas aeróbicas, como las Enterobacterias y las especies <i>Yersinia</i> , <i>Plesiomonas</i> y <i>Neisseria</i> inactivo frente a cocos grampositivos anaerobios y <i>Acinetobacter</i> .	-Rash cutáneo -Alteración de ciertas funciones hepáticas.	Igual que los otros Betalactámicos: interrumpen la síntesis de peptidoglicano.
Penicilinas			
Amoxicilina Ampicilina Azlocilina Carbenicilina Dicloxacilina Meticilina Oxacilina Penicilina Piperacilina Ticarcilina	Amplia gama de infecciones, penicilina aún se indica en infecciones estreptococcicas, Sífilis y enfermedad de Lyme.	-Malestar gastrointestinal y diarrea. -Alergias con serias reacciones anafilácticas. -Raramente daño renal o cerebral.	Igual que los otros betalactámicos: interrumpen la síntesis de peptidoglicano.
Polipéptidos			
Bacitracina Colistin Polimixina B	Infecciones del ojo, oído y vejiga.	Daño renal y ciertos nervios (cuando sea inyectado)	Inhibe la síntesis de componentes del peptidoglicano en la pared celular bacteriana, interactúa con la membrana plasmática bacteriana.
Quinolonas			
Ciprofloxacina Gatifloxacina Levofloxacina Lomefloxacina Nofloxacina Ofloxacina	Infecciones del tracto urinario, prostatitis bacteriana, neumonía adquirida en la comunidad, diarrea bacteriana, infecciones	-Nauseas -Tendinosis.	Inhibe la Topoisomerasa, ADN girasa y otras enzimas bacterianas inhibiendo la replicación y transcripción de ADN.

Trovafloxacina Moxifloxacina Enoxacina	por <i>Mycoplasma</i> , Gonorrea.		
Sulfonamidas			
Prontosol Sulfocetamida Sulfametizol Sulfanilimida Trimetropin Trimetropin- sulfametoxazol	Infecciones urinarias (con la excepción de sulfametacida)	-Náuseas y diarreas. -Alergias. -Cristales en orina -Insuficiencia renal. -Disminución del número de glóbulos blancos.	Inhibición de la síntesis de ácido fólico, entre otras funciones inhibitorias de la síntesis de ADN y ARN.
Tetraciclinas			
Democlociclina Doxiciclina Oxitetraciclina Tetraciclina	Sífilis, infecciones por <i>Chlamydia</i> , <i>Mycoplasma</i> y <i>Rickettsia</i> .	-Malestar gastrointestinal -Manchas en los dientes. -Toxico para la madre y el feto durante el embarazo.	Se une a la unidad 30s del ribosoma por lo que inhibe la síntesis de proteínas.

Cualquier agente aprobado para uso clínico tuvo que haber demostrado in vitro su capacidad para inhibir el crecimiento de algunos blancos de bacterias en concentraciones que pueden alcanzarse con riesgo de toxicidad aceptables, lo que significa que la concentración inhibitoria mínima (CIM) puede rebasarse cómodamente con dosis que siguen siendo tolerables para los pacientes.

Una vez que se establecen estos factores, la selección rutinaria del tratamiento puede basarse en las características conocidas o esperadas de los microorganismos y las características farmacológicas de los antimicrobianos. Con respecto a los microorganismos el uso del término susceptible (sensible) implica que su CIM está en un nivel alcanzable en la sangre y otros líquidos corporales apropiados con la dosis recomendada. Lo contrario de susceptible, resistente significa que la CIM no se basa con los niveles alcanzables en condiciones normales. Como en todos los sistemas biológicos, la CIM de algunos microorganismos se encuentra entre los niveles susceptibles y resistentes. Las cepas limítrofes se llaman intermedias, moderadamente sensibles o moderadamente resistentes, según los valores exactos y las convenciones de sistema en que se informa. Para el tratamiento de enfermedades por estos microorganismo pueden usarse agentes antimicrobianos, pero en dosis mayores, para llegar a compartimientos corporales en los

que se concentran los patógenos. Por ejemplo la administración masiva de antimicrobianos no tóxicos, como penicilinas y Cefalosporinas, inhibe a algunos patógenos que en condiciones normales se considerarían resistentes in vitro

Las características farmacológicas importantes de los antimicrobianos incluyen la dosis, vías y frecuencias de administración.

La naturaleza aparentemente perfecta de los antimicrobianos, al principio considerado como “fármacos maravillosos”, se ha erosionado de manera constante por la aparición de cepas resistentes a su actividad. Esta resistencia puede ser inherente al microorganismo o aparecer por mutación o adquisición de nuevos genes. Los mecanismos por los cuales las bacterias desarrollan resistencia y la manera en que estas se disemina son de gran interés para el uso continuo de los agentes actuales y para el desarrollo de antimicrobianos nuevos.

2.1.10 FORMAS PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA

Existen dos formas para determinar la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos:

2.1.10.1 Método base de dilución en caldo

En los métodos de dilución en caldo, base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad, se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones 1:2, en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Mueller-Hinton suplementado con los cationes magnesio y calcio. (Ver Fig. 7).

El antibiótico se preparan en "soluciones madre" concentradas y luego se diluyen en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.

Un tubo de caldo se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. Luego de la incubación adecuada (usualmente de un día para el otro) se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. El microorganismo crecerá en el tubo control y en todos los otros que no contengan suficiente agente antimicrobiano como para inhibir su desarrollo. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un microorganismo (CMB) se debe realizar la prueba de actividad bactericida, que emplea el mismo sistema de dilución en caldo que para medir la sensibilidad.

Al mismo tiempo que la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento, inmediatamente después de ser sembrado, y se inoculara también en una placa de agar para determinar el

número real de unidades formadoras de colonias (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la incubación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación por el factor de dilución. Por ejemplo, usando un asa calibrada de 0,01 ml para sembrar la placa y contando unas 250 colonias, en 1 ml del tubo original habrá 250/0,01 UFC/ml.

Una vez determinada la CIM, se siembra una cantidad conocida de inóculo de cada uno de los tubos de caldo que no presentaban turbidez en placas de agar (la pequeña cantidad del agente antimicrobiano que es llevada junto con el inóculo se elimina por dilución en el agar), y el número de colonias que crece en estos subcultivos, después de incubar durante la noche, se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. Dado que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0,1 % del inóculo original se denomina concentración bactericida mínima (CBM) o Concentración Letal Mínima (CLM).

Las CIM y las CMB de un agente antimicrobiano pueden ser determinadas, con este método o con alguna variante, para cualquier bacteria que crezca en un medio líquido.

2.1.10.2 Método de difusión en agar (Kirby- Bauer)

Una vez demostradas las grandes ventajas de las técnicas de dilución en caldo, el paso siguiente, pensando sobre todo en poder realizar fácilmente pruebas de sensibilidad de un microorganismo frente a múltiples antibióticos a la vez, consistió en buscar la manera de aplicar la idea directamente a las placas de agar. (Ver Fig. 8)

Las primeras pruebas se realizaron inoculando la superficie de una placa de agar con el microorganismo en estudio, colocando pequeñas cubetas (de metal o vidrio) sobre el agar y agregando las soluciones de los diferentes antimicrobianos dentro de dichas cubetas. Los agentes antimicrobianos difundían en el medio en forma radial alrededor de la cubeta e inhibían el desarrollo del microorganismo en la zona donde su concentración era suficientemente alta. Las áreas de inhibición grandes indicaban una actividad antimicrobiana más efectiva.

Este método fue modificado en 1947 por Bondi y cols. incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel de filtro. Fue un paso adelante gigantesco ya que el uso de los discos de papel permitía preparar un gran número de pruebas idénticas y almacenarlas para uso futuro.

En 1966, después de los estudios realizados por Bauer, Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad fue estandarizado y correlacionado definitivamente con las CMI correspondientes.

Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido, y aun es, uno de los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo.

La técnica de Kirby-Bauer siempre debe de efectuarse con el agar Mueller-Hinton, el grosor de la placa, concentración del inóculo, humedad, temperatura, y otros factores deben estar estandarizados. Esta técnica solo sirve para efectuar el antibiograma de las siguientes bacterias aerobias o facultativas de crecimiento rápido:

- *Staphylococcus aureus*
- Enterobacterias
- *Pseudomonas*

El antibiograma para *Haemophilus* spp y *Neisseria* spp debe de hacerse en Mueller-Hinton con 5% de sangre “achocolatado”.

Para *Streptococcus pneumoniae* Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero.

Estandarización del método de Kirby –Bauer

La principal mejoría en la guía de laboratorio de las pruebas de sensibilidad en las últimas décadas ha provenido del desarrollo de procedimientos estandarizados que han sido adoptados ampliamente. Es muy importante cumplir con los protocolos recomendados por la CLSI para lograr resultados reproducibles.

Los siguientes parámetros son algunas de las importantes facetas de las pruebas de sensibilidad que han sido estandarizadas:

- **Medio de cultivo:**

Se ha seleccionado caldo y agar de Mueller-Hinton para evaluar las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Estas fórmulas se aproximan más estrechamente a los criterios de un medio reproducible. Contienen infusión de carne de vaca deshidratada, digerido, ácido de caseína y almidón de maíz. La mayoría de los patógenos crecen satisfactoriamente y los medios tienen un efecto inhibitor mínimo sobre sulfamidas, trimetoprim y tetraciclinas. Se presentan grandes cantidades de timina en algunos lotes de medios. Algunos microorganismos pueden utilizar la timina para evitar el mecanismo de acción de trimetoprim, y crecer aun cuando sean innatamente resistentes al antibiótico.

- **pH:**

El pH del medio debe estar entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.

- **Concentración de cationes.**

La concentración de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} afecta los resultados de la sensibilidad cuando se evalúan ciertas combinaciones de especies bacterianas y antibióticos.

- **Atmósfera.** Se incuba el agar en una estufa de incubación con aire ambiental. No se debe utilizar una estufa con CO_2 para pruebas de rutina. El ácido carbónico formado sobre la superficie del agar puede producir una disminución en el pH, que puede afectar la actividad antibacteriana de ciertos antibióticos.

- **Temperatura.**

Las placas deben ser incubadas a $35\text{ }^\circ\text{C}$.

- **Inóculo.**

En general, el inóculo se prepara a partir de un cultivo en caldo que ha sido incubado de 4 a 6 horas, cuando se considera que el crecimiento está en fase logarítmico. Se deben tomar muestras de varias colonias de aspecto similar para reducir la variación en la población bacteriana. La densidad de la suspensión se ajusta hasta aproximadamente 10^8 Unidades formadoras de colonias (UFC) por milímetro, comparando la turbidez con un estándar de BaSO_4 de Mc Farland de 0.5.

- **Escala de Mac Farland.**

Este se utiliza para la preparación del inóculo, se compara el grado de turbidez del inóculo con la escala de Mac Farland con concentración 0.5.

Preparación de la turbidez estándar de Mac Farland

La turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland preparada comercialmente está disponible de varios fabricantes. Además, la turbidez estándar de 0,5 de Mac Farland se prepara añadiendo 0,5 ml de cloruro de una solución de bario deshidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1,175% (p/vol) a 99,5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (vol/vol). La turbidez estándar se divide en alícuotas, se coloca en tubos de prueba idénticos a aquellos utilizados para preparar la suspensión del inóculo.

Se sella los tubos de turbidez estándar de Mac Farland con cera, Parafilm u otros medios para prevenir la evaporación. La turbidez estándar de Mac Farland se guarda hasta 6 meses en la oscuridad a temperatura ambiente (22°C – 25°C); descártela después de 6 meses o antes si pierde algún volumen. (Se marca el tubo para indicar el nivel del líquido y verificar antes de utilizarlo para estar seguro que no ha ocurrido evaporación, si esto ocurre, debe prepararse una turbidez estándar fresca.) Antes de utilizarlos, se debe agitar bien el tubo que contiene la turbidez estándar, de manera que el precipitado blanco fino de sulfato de bario se mezcle en el tubo.

- **Almacenamiento de los discos de antibióticos.**

Las existencias de trabajo de discos de antimicrobianos deben guardarse en un refrigerador (a 4°C). Al sacar los discos del refrigerador, el paquete que contiene los cartuchos debe permanecer cerrado a temperatura ambiente por aproximadamente una hora, para que la temperatura se equilibre; esto reduce la condensación en los discos.

Si se usa un dispensador de discos, este debe tener una tapa bien ajustada, debe guardarse en el refrigerador y se debe dejar a temperatura ambiente antes de usarse.

Se aplica los discos de antimicrobianos a las placas lo más pronto posible, pero no pasados los 15 minutos después de la inoculación. La superficie de la placa debe estar seca, sin líquido remanente. Se debe colocar los discos uno por uno con pinzas estériles o con un aparato dispensador mecánico y se debe presionar suavemente en el agar hacia abajo. En general, no deben ponerse más de 12 discos en una placa de 150mm ni más de cuatro en una placa de 100 mm, para prevenir la superposición de las zonas de inhibición y posibles errores en las mediciones. La difusión del antibiótico en el disco comienza inmediatamente, por lo cual, una vez que el disco toque la superficie del agar, no debe moverse.

2.1.11 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella typhi*

El tratamiento con un agente antimicrobiano apropiado es fundamental para el paciente con tifoidea.

Los resultados de informes recientes han dado a conocer un aumento en el grado de resistencia de cepas de *Salmonella typhi* a uno o más agentes antimicrobianos, por lo cual es necesario someter los aislamientos a pruebas de susceptibilidad lo antes posible. Sin embargo, cualquier desviación en los métodos puede invalidar los resultados. Por esta razón, si los laboratorios no cuentan con recursos para realizar la prueba de difusión en disco exactamente como se describe, deben enviar los aislamientos a otros laboratorios donde se realice la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

2.1.11.1 Prueba de difusión en disco para *Salmonella typhi*.

El medio de agar Mueller-Hinton es el único validado por el CLSI para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

2.1.11.2 Preparación del inóculo.

Cada cultivo que se va a analizar debe ser estriado en un medio de agar no inhibitorio (por ejemplo, agar sangre, agar infusión cerebro corazón o agar Trypticase Soya) para obtener colonias aisladas. Después de incubar durante toda la noche a 35°C, se debe seleccionar con un asa de inoculación de cuatro o cinco colonias bien aisladas y se transfiere el crecimiento a un tubo de solución salina estéril o de caldo no selectivo (por ejemplo, caldo de Mueller-Hinton, caldo infusión de corazón o caldo de Trypticase Soya) y se ponen en un mezclador vórtex.

La suspensión bacteriana debe compararse con la turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland. La turbidez estándar debe agitarse en un mezclador vórtex inmediatamente antes de usarla. Si la suspensión bacteriana no parece tener la misma densidad que la turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland, reduzca la turbidez añadiéndole salina estéril o caldo; para aumentarla, añádale más crecimiento bacteriano.

2.1.11.3 Procedimiento para la inoculación

A los 15 minutos de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se debe introducir un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Se presiona firmemente contra la pared interior del tubo, justo sobre el nivel del líquido, rote el hisopo para quitar el exceso del líquido. Se estría tres veces el hisopo sobre toda la superficie del medio, rotando la placa con un giro de aproximadamente 60 grados después de cada aplicación, para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Por último, se pasa el hisopo alrededor de todo el borde de la superficie del agar.

2.1.11.4 Control de calidad

Para verificar que los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos son confiables, se debe incluir al menos un microorganismo de control con cada prueba. (ATCC 25922 es la cepa de control de *Escherichia coli* usada cuando se prueba *Salmonella typhi* y otras cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.) Los diámetros de zona obtenidos para la cepa ATCC 25922 se deben comparar con los límites publicados por el CLSI. Si las zonas producidas por la cepa control están fuera de los rangos esperados, es necesario considerar posibles fuentes de error. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se ven afectadas por variaciones en los medios, el tamaño del inóculo, el tiempo de incubación, la temperatura y otros factores. El medio puede ser una fuente de error si no cumple con las recomendaciones del CLSI. Por ejemplo, si el agar contiene timidina o timina en exceso, pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim y causar que las zonas de inhibición del crecimiento sean más pequeñas o se distingan menos. Los microorganismos pueden presentarse como resistentes a estas drogas cuando en realidad no lo son. Si la profundidad del agar en la placa no es de 3 a 4 mm, puede afectar el rango de difusión de los agentes antimicrobianos o la actividad de los medicamentos.

También afecta la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos el hecho de que el inóculo no sea un cultivo puro o no contenga una concentración de bacterias que se aproxime a una turbidez estándar de 0,5 en la escala de Mac Farland. Por ejemplo, un microorganismo resistente podría aparecer como susceptible si el inóculo es muy ligero.

También, si las colonias del medio de agar sangre se usan para preparar la suspensión por el método del inóculo directo, los antagonistas del trimetoprim o sulfonamida pueden trasladarse y producir una nube de crecimiento dentro de las zonas de inhibición que rodean los discos de trimetoprim y sulfametoxazol, al igual que cuando los aislamientos que se prueban son susceptibles. Si los discos de antimicrobianos no se almacenan correctamente o se usan después de la fecha en que caducan, su potencia puede disminuir, lo que quedará demostrado por una disminución en el tamaño de la zona de inhibición que está alrededor de la cepa control.

2.1.12 OTROS TIPOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA IN VITRO

2.1.12.1 Método Epsilométrico (E-test)

Se trata de una técnica cuantitativa en placa que permite obtener una lectura directa de CIM en $\mu\text{g/ml}$, ya que se emplean tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antibiótico indicadas en una escala graduada sobre la propia tira.

Una de sus grandes ventajas, dadas sus características, es que resulta un método ideal para estudiar cualquier tipo de microorganismo, aerobio o anaerobio, incluyendo aquellos llamados "fastidiosos" o los que tengan requerimientos especiales para crecer.

Fundamento

Consiste en una tira de plástico no poroso de 6cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.

El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en agar. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CIM será el valor obtenido en el punto que el extremo de inhibición intersecciona con la tira. (Ver Fig. 9).

Indicaciones y limitaciones

Debe tenerse en cuenta que si se coloca la tira al revés no se observa elipse de inhibición ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira. El E-test se ha utilizado para determinar la CIM de diversos antibióticos en una amplia gama de bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus* nutricionalmente deficientes, *Enterococcus* con resistencia elevada a aminoglicósidos. En algunos casos como vancomicina y *Streptococcus pneumoniae*, la CIM es más alta utilizando el E-test que la obtenida por los métodos de microdilución, produciendo resultados que se encuentran en el rango superior de aislamientos susceptibles y con resultados de control de calidad por encima de los límites aceptables.

El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM.

Método del E-test.

- De la técnica disco-placa. Se deja absorber el inóculo de 10 a 15 minutos para asegurarse que la superficie del agar está completamente seca antes de aplicar las tiras. Este punto es crítico para optimizar la realización del E-test.
- Dispensación de las tiras. Tanto si se utiliza el aplicador de las tiras como las pinzas, nos debemos asegurar que la escala de CIM está orientada hacia arriba y que la concentración máxima está cercana al extremo de la placa de petri.
- Se debe asegurar que la tira haga contacto completamente con la superficie del agar. Si es necesario, eliminar las gotas de aire que puedan encontrarse por debajo de la tira presionándola ligeramente con las pinzas.

Es importante no mover las tiras una vez que han sido colocadas en la superficie del agar ya que el antibiótico empieza a difundir rápidamente. Cuando se utiliza una placa de petri de 100 mm depositar solo una tira por placa y poner la tira en el centro de la placa, mientras que cuando se utiliza una placa de 150 mm no se deben colocar más de 6 tiras.

Incubación.

Por regla general las placas son incubadas inmediatamente durante 16 a 24 horas a una temperatura de 35 °C.

Lectura de los resultados.

La CIM se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presente crecimiento.

Control de calidad

Las cepas de control utilizadas serán las recomendadas por la CLSI para la determinación de la CIM por métodos de dilución. Los valores de CIM esperados deberán estar comprendidos entre los rangos establecidos para cada antibiótico.

Interpretación de resultados.

Después de la incubación se observa una zona de inhibición en forma de elipse, el valor de CIM es el punto de intersección de la elipse con la tira y está indicada en la escala impresa sobre la superficie de la tira.

2.1.12.2 Métodos automatizados

La mayoría de estos novedosos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en "U" e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o

fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica del técnico a través de un visor invertido de espejo.

Su manipulación suele ser fácil y rápida, generalmente automatizada o semiautomatizada, lo que los convierte en métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que sólo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales.

Este sistema no puede emplearse para las pruebas de sensibilidad de las cepas fastidiosas; sin embargo, es esperable que en pocos años se pueda desarrollar un medio de cultivo que soporte el crecimiento de este tipo de cepas.

Uno de estos es el sistema Vitek, el cual está hecho para las pruebas de sensibilidad de los microorganismos de crecimiento rápido y es aquí donde se ha sentido su impacto.

2.1.13 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA.

Los principales mecanismos de resistencia bacteriana son:

- Acumulación de barreras para un antimicrobiano por impermeabilidad o salida activa.
- Alteración de un blanco antimicrobiano que lo vuelve susceptible
- Desactivación de un antimicrobiano por efecto de una enzima que produce el microorganismo⁷.

Los cambios en las vías metabólicas se traducen en resistencia en una cuantas combinaciones antimicrobianos –microorganismos.

- **Acumulación de barreras para un antimicrobiano por impermeabilidad o salida activa.**

Un antimicrobiano efectivo debe entrar a la célula bacteriana y alcanzar concentraciones suficientes para actuar sobre objetivos. La pared celular de las bacterias gramnegativas, en particular la membrana externa representa una barrera formidable para el ingreso al interior de la célula. Los canales en una proteína (porina) de la membrana externa permiten el ingreso de moléculas según su tamaño, carga, grado de hidrofobia o configuración molecular. Esta es una de las principales razones de resistencia inherente a los antimicrobianos, pero dicha características de transporte pueden cambiar incluso en especies susceptibles típicas a causa de mutaciones en las proteínas porinas. Diversas

⁷ Libro: Sherris, MICROBIOLOGIA MÉDICA cuarta edición

especies bacterianas tienen mecanismos de salida que dependen de la energía que bombean a las tetraciclinas o flouoroquinolonas para expulsarla de la célula.

- **Alteración de un blanco antimicrobiano que lo vuelve susceptible**

Una vez dentro de la célula, los antimicrobianos actúan mediante la unión y desactivación de su blanco, que casi siempre es una enzima crucial o un sitio del ribosoma. Si el blanco se modifica de tal manera que su afinidad por el antimicrobiano disminuye, el efecto inhibitor se reduce de manera proporcional. Si la modificación de un solo sitio del blanco hace que el microorganismo no sea susceptible al fármaco, la mutación a la resistencia puede ocurrir en un solo paso, incluso durante el tratamiento. Esto ocurrió con los primeros aminoglucósidos (estreptomina), que se unía a un solo sitio de los ribosomas, y con la primera quinolona (ácido nalidíxico), que se adhería solo con una de las cuatro subunidades de la topoisomerasa. En la actualidad de los nuevos agentes de cada una de esas clases se unen en múltiples sitios del blanco, lo que hace improbable la mutación a la resistencia.

- **Desactivación de un antimicrobiano por efecto de una enzima que produce el microorganismo**

La desactivación enzimática del antimicrobiano invasor es el mecanismo de resistencia más potente y sólido. Literalmente, cientos de enzimas distintas producidas por las bacterias resistentes pueden desactivar al antimicrobiano dentro de la célula, en el espacio periplasmático o fuera de la célula.

Pueden actuar sobre la molécula de antimicrobiano por interrupción de su estructura o al catalizar una reacción que modifique su estructura química.

B -Lactamasa

Es un término general que se refiere a cualquiera de los cientos de enzimas bacterianas capaces de abrir el anillo betalactámico y desactivar a varios integrantes del grupo betalactámico. La primera de ellas se descubrió cuando surgieron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina que desactivaban a la penicilina in vitro.

La enzima se llamó penicilinas, pero con el crecimiento de la familia de los lactámicos beta y la resistencia concomitante, quedó claro que la situación es bastante compleja; cada beta lactamasa es una enzima distinta, con características físicas y perfil de sustratos propios. Por ejemplo, la penicilinas estafilocócica original también tiene actividad contra ampicilina, pero no contra meticilina ni cualquiera de las cefalosporinas.

Las bacterias que producen de manera constitutiva betalactamasa casi siempre tienen un alto nivel de resistencia, con CIM fuera del espectro terapéutico. Incluso los productores débiles de betalactamasa beta se consideran resistentes porque el resultado de las pruebas de susceptibilidad (y tal vez de los sitios infectados) depende mucho de la cantidad de bacterias que existen.

Enzimas modificadoras.

Las modificaciones ocurren en el citoplasma o en estrecha relación con la membrana citoplasmática. La resistencia que confieren estas acciones casi siempre es alta; el aminoglucósido modificado ya no se une con el ribosoma. La mayoría actúa mediante la modificación química de la molécula del antimicrobiano en forma similar a las enzimas modificadoras de aminoglucósido. Las enzimas con mayor importancia clínica confieren resistencia a la eritromicina y al cloranfenicol.

2.1.13.1 Genética de la resistencia

- **Resistencia intrínseca**

Llamada también cromosómica, en este tipo de resistencia las especies tienen rasgos que los hacen susceptibles, como barreras de permeabilidad, falta de susceptibilidad de la pared celular o blancos ribosomales.

- **Resistencia adquirida**

Cuando una especie que al principio era susceptible desarrolla resistencia, esta resistencia adquirida puede ser resultado de una mutación o provenir de otro microorganismo mediante algunos de los mecanismos de intercambio genético. De éstas la conjugación y la transposición son los más importantes y a menudo suceden.

- **Resistencia por mutación**

La resistencia adquirida puede ocurrir cuando se produce una mutación crucial en el blanco del antimicrobiano o en las proteínas relacionadas con el acceso al blanco.

- **Plásmidos conjugación**

La transferencia de plásmidos por conjugación fue el primer mecanismo descubierto para adquirir nuevos genes de resistencia y aun es el más importante.

Los genes de resistencia en los plásmidos pueden determinar la resistencia a uno o varios antimicrobianos que actúan por distintos mecanismos. Después de la conjugación, los genes de resistencia pueden permanecer en un plásmido que recupera su forma circular o, menos a menudo, se integran en el cromosoma por recombinación.

2.1.13.2 Origen de las cepas resistentes

Es posible que las cepas resistentes existan desde antes de la introducción de un antimicrobiano, pero con una frecuencia tan baja que es improbable detectarlas. Por ejemplo *Staphylococcus aureus* productor de penicilinas se encontró en colecciones de cultivos previos al desarrollo en el empleo de este antimicrobiano. Bajo la presión selectiva que ejerce el uso del antimicrobiano, es probable que las clonas resistentes aumenten y si son virulentas se diseminen.

2.1.13.3 Factores que contribuyen al aumento de la resistencia bacteriana.

Entre los factores que han contribuido a la resistencia bacteriana tenemos:

- La presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos.
- La utilización generalizada de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos.
- El uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana.
- El desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes teniendo en cuenta la flora local de cada institución o comunidad.

2.1.13.4 Resistencia de *Salmonella typhi* a la ciprofloxacina

El uso masivo de fluoroquinolonas también se asoció con la disminución en la susceptibilidad y aumento de las tasas de resistencia. Los pacientes con fiebre entérica causada por aislamientos con susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina tienen más probabilidad de tener fiebre por períodos más prolongados y altas tasas de fracaso terapéutico. También se comunicaron casos de susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina entre los aislamientos de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*.

La resistencia a quinolonas de salmonella en general se asocia con mutaciones en el sitio blanco, la ADN girasa, más frecuentemente en la región determinante de resistencia a las quinolonas de la subunidad A. En las especies de *Salmonella* no *typhi* se describieron genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, *qnr* y *aac(6')-Ib-cr*. El mecanismo exacto de resistencia no se ha dilucidado por completo, pero diversas investigaciones demostraron que las mutaciones puntuales en el gen *gyrA* de la región determinante de resistencia a las quinolonas confieren resistencia al ácido nalidíxico y susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas. La resistencia de alto grado a la

ciprofloxacina puede deberse al impacto acumulado de mutaciones en múltiples genes, a la disminución de la permeabilidad de la membrana, a las bombas activas de salida y a la presencia de genes *qnr* codificados por plásmidos.

Emergencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación

La aparición de resistencia a las fluoroquinolonas y de cepas con susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina motivó el uso de cefalosporinas de tercera generación para el tratamiento de las salmonelosis. Los plásmidos que portan el gen *qnr* o *aac(6)-Ib-cr* pueden contener un gen de resistencia a cefalosporinas de espectro ampliado. Hay informes esporádicos de resistencia de alto grado a ceftriaxona en *Salmonella typhi*, con beta lactamasas de espectro extendido CTX-M-15 y SHV-12. Recientemente, se descubrieron cepas de *Salmonella typhi* productoras de AmpC beta lactamasas ACC-1. La diseminación de beta lactamasas de espectro extendido limita las opciones terapéuticas y deja solamente como opciones de segunda línea a los carbapenémicos y a la tigeciclina.

2.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.

- **Agar:** esta gelatina es un polisacárido sin ramificación obtenidas de la pared celular de varias especies de algas géneros *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria* entre otros resultando según la especie de un color característico. La palabra agar viene del malayo agar-agar, que significa jalea
- **Aglutinación:** fenómeno en el que las bacterias o las células en suspensión en un líquido precipitan cuando se añaden anticuerpos; éstos se unen a sus antígenos y originan complejos del tipo células antígenos anticuerpos en forma de grumos visibles.
- **Aminoglucósidos:** glucósidos en los que existen varios grupos amino, especialmente una familia de antibióticos, de los cuales la estreptomicina fue el primero en ser descubierto y que son producidos por diferentes hongos del género de los *Streptomyces*.
- **Antibiótico:** es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros microorganismos.
- **Antimicrobiano:** sustancia que actúa contra microorganismos parásitos como bacterias, virus, u hongos matando o inhibiendo su crecimiento. Según el agente microbiano que ataca se habla de antibiótico, antifúngico, antiviral, etc.
- **ATCC:** American Type Culture Collection.
- **Bacteria:** organismo microscópico unicelular procariota, carente de núcleo, que se multiplica por división celular sencilla o por esporas: algunas bacterias son importantes agentes en la putrefacción o la fermentación (por ejemplo, para la

elaboración de quesos), producen antibióticos (como la estreptomina) o causan enfermedades (como el tifus, el cólera y la tuberculosis).

- **Bacteriología:** ciencia que estudia las bacterias, sus clases, formas de reproducción y métodos para controlarlas o destruirlas.
- **Blanco:** solución que contiene todos los reactivos necesarios para el análisis de una sustancia excepto la sustancia investigada.
- **CDC:** Centro de Control para la Prevención de Enfermedades.
- **Cefalosporinas:** nombre bajo el que agrupa una familia de antibióticos beta lactámicos, derivados del ácido cefalosporánico producido por un hongo, el *Cephalosporum acremonium*. Se han obtenido a partir del mismo numerosos derivados, activos por vía oral y parenteral.
- **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima.
- **CMB:** Concentración Mínima Bactericida.
- **CLM:** Concentración Letal Mínima.
- **CLSI:** Clinical Laboratory Estandar Institute.
- **Control de calidad:** método de repetición de ensayos de materiales estándar conocidos y de monitorización de los parámetros de reacción para garantizar la precisión y la exactitud.
- **Enterobacteria:** son una familia de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes y de otros del ser humano y de otras especies animales).
- **Enzima:** molécula orgánica de naturaleza proteica que interviene en todas las reacciones del metabolismo acelerando su velocidad y favoreciendo las transformaciones bioquímicas. Son sustancias muy solubles y globulares.
- **Gérmen:** microorganismo, en especial el que puede provocar alguna enfermedad en el hombre.
- **Intoxicación:** conjunto de alteraciones provocadas por la penetración de una sustancia tóxica capaz de alterar los procesos vitales en el organismo. Las sustancias que pueden ocasionar una intoxicación son de origen muy diverso.
- **Inoculación:** introducción en el organismo de forma accidental o voluntaria de los gérmenes productores de una enfermedad, a través de una herida en los tegumentos.
- **Medio de cultivo:** son una mezcla equilibrada de nutrientes que en concentraciones adecuadas y con condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Contienen una base mineral; fuente de carbono, nitrógeno y azufre; atmósfera adecuada y los factores de crecimiento necesarios.
- **Microbiota:** también conocida como *microflora* es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo humano.

- **Mutación:** alteración en el material hereditario de un DNA cromosómico, producida de forma espontánea o a causa de un agente físico, químico o incluso biológico. Si afecta a las células germinales puede ser heredada por la siguiente generación.
- **Patógeno:** es todo agente (o cualquier “ente” en otras áreas fuera de la biología) que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea este humano, animal o vegetal.
- **PBPs:** son proteína de anclaje de las Penicilinas.
- **Péptidoglicano:** el péptidoglucano o mureína es un copolímero formado por una secuencia alternante de N- acetil glucosamina y el ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces β 1,4.
- **Plásmido:** son moléculas de ADN extracromosómicos circular o lineal, que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico.
- **Quinolonas:** son unos antimicrobianos que actúan bloqueando la actividad de la ADN girasa y de la topoisomerasa bacteriana. Tienen una acción bactericida rápida, que es dosis dependiente (en relación con la concentración).
- **Resistencia bacteriana:** capacidad de ciertas cepas de bacterias para desarrollar tolerancia a antibióticos específicos.
- **Susceptibilidad:** calidad de ser más vulnerable de lo normal a una enfermedad, trastorno o una acción.⁸
- **Topoisomerasa:** son enzimas capaces de actuar sobre la topología del ADN.
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.

⁸ Diccionario Mosby de Medicina

3. SISTEMA DE HIPÓTESIS

3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hi: Existe susceptibilidad al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

3.2 HIPÓTESIS NULA

Ho: No existe susceptibilidad al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

3.3 HIPÓTESIS ALTERNA

Ha: Existe susceptibilidad intermedia al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test).

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

HIPÓTESIS	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES
<p>Hi: Existe susceptibilidad al antibiótico ciprofloxacina en cepas de <i>Salmonella typhi</i> en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia.</p>	<p>Susceptibilidad a ciprofloxacina a cepas de <i>Salmonella typhi</i>, por el Método Epsilométrico (E-test).</p>	<p>-Susceptibilidad bacteriana: Es la capacidad de un antibiótico para combatir la infección desarrollada por microorganismos patógenos.</p> <p>-</p>	<p>-E-test: Es una expansión de técnica de difusión en disco que incluye una tira plástica no porosa, con un gradiente predefinido de antimicrobiano que equivale a quince diluciones.</p>	<p>-Prueba bacteriológica elipsoidales para detectar en forma directa la Concentracion Inhibitoria Mínima</p> <p>-Preparación de la suspensión bacteriana.</p>	<p>-Lectura de las elipses utilizando las tablas de identificación por medio de las cuales se dará a conocer si la bacteria es sensible, intermedia o resistente.</p>

HIPÓTESIS	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES
			<p>- <i>Salmonella typhi</i> Es una bacteria gram negativa, no esporulada, móvil, flagelada en forma de bacilo que pertenece a la familia <i>Enterobacteriaceae</i> que causa la enfermedad llamada fiebre tifoidea.</p>	<p>-Comparación del inculo con el estándar de la escala de Mac Farland 0.5.</p>	

HIPÓTESIS	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES
			<p>-Antibiótico: sustancia química producida por un ser vivo o derivado, sintético que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacteria.</p>	<p>- Siembra del inóculo por estrías en tres direcciones opuestas en el agar Mueller-Hinton.</p>	

4. DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

CUANTITATIVO: porque se cuantificó la información registrada de cada una de las cepas en estudio.

De acuerdo al desarrollo de los acontecimientos y recolección de los datos; la investigación fue:

- **RETROSPECTIVA:** debido a que por medio de esta investigación, se permitió conocer el mecanismo de susceptibilidad que presentó *Salmonella typhi* frente a la ciprofloxacina.

De acuerdo al período y a la secuencia del estudio fue:

- **TRANSVERSAL:** debido a que se ejecutó el procedimiento en un solo período comprendido de julio a septiembre de 2013.

De acuerdo al análisis y alcance de los resultados:

- **DESCRIPTIVO:** Ya que la mayoría de las cepas presentaron mecanismos de sensibilidad disminuida a la ciprofloxacina, las cuales se pudieron evidenciar a través de los diferentes métodos de susceptibilidad antimicrobiana entre ellos el E-test, además se realizó resiembra en agar Tripticasa Soya y agar Mac Conkey para su posterior inoculación en Agar Mueller-Hinton y se interpretaron los resultados, de acuerdo a tablas ya establecidas por la CLSI, debido a que cada uno de los resultados obtenidos se interpretó con valores estándares del método.
- **EXPERIMENTAL:** Fue experimental ya que para su ejecución se necesitó la manipulación intencional del antibiótico (ciprofloxacina) para determinar la sensibilidad bacteriana.

4.2 POBLACIÓN

Para realizar ésta investigación la población estaba conformada por las cepas estudiadas en el Laboratorio Nacional de Referencia, que en su totalidad son 250 cepas de *Salmonella typhi*, durante el año 2013.

4.3 MUESTRA

La conformaron las cepas que presentaron sensibilidad disminuida a ciprofloxacina empleando el método de Kirby-Bauer en el Laboratorio Nacional de Referencia siendo en su totalidad una muestra de 40 cepas de *Salmonella typhi*.

4.4 CRITERIOS PARA ESTABLECER LA MUESTRA

4.4.1 Criterios de inclusión

- Que pertenezca a la especie *typhi*.
- Que la cepa sea aislada del año 2013.
- Que la cepa en estudio no presente ninguna contaminación.
- Que no interese el tipo de muestra de donde fue aislado.
- Todas aquellas cepas a las cuales no se les ha realizado la susceptibilidad por el método Epsilométrico (E-test).

4.4.2 Criterios de exclusión

- Todas aquellas cepas que hayan sido aisladas en años anteriores.
- Aquellas cepas que no pertenezcan a la especie *typhi*.
- Cepas con signos visibles de contaminación.

4.5 TIPO DE MUESTREO.

No probabilístico por conveniencia: ya que no se basa en la teoría de las probabilidades, y por conveniencia ya que se incluyeron cepas aisladas recientemente del año 2013, y la cantidad de muestras seleccionadas se debió a que cada una de las tiras para realizar las pruebas de susceptibilidad, tiene un alto costo económico, por lo que se redujo la cantidad de cepas tomadas en cuenta.

4.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Técnicas.

- **Documental bibliográfica:**
Mediante el cual se recopiló la información necesaria para la base teórica de la investigación. Ejemplo libros, diccionarios especializados y tesis.
- **Documental de información electrónica:**
Por medio de la cual se obtuvo información actualizada. Ejemplo páginas web.

4.7 INSTRUMENTOS.

- Boleta de registro de las cepas en estudio (VER ANEXO 4).
- Tablas de referencia para susceptibilidad antimicrobiana según la CLSI. (VER ANEXO 5).

4.8 TÉCNICAS DE LABORATORIO

- Siembra de las cepas en estudio en el medio selectivo y diferencial agar Mac Conkey para constatar morfología.
- Siembra en agar Trypticase Soya para la preparación del inóculo.
- Estandarización del inóculo por medio de la escala de Mac Farland 0.5.
- Siembra del inóculo en el medio de Mueller-Hinton por el método de estría en tres direcciones opuestas.
- Colocación de las tiras del antibiótico e incubación de las placas.
- Lectura e interpretación de resultados.

4.8.1 Técnica de aislamiento primario

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales, preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo, y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo

- Se mezcla suavemente el vial que contenía la cepa bacteriana en estudio, cerca del mechero, se flamea la boca de éste y con un hisopo estéril se introduce verticalmente, tomando la cantidad de muestra necesaria.
- Se coloca el inóculo en ATS.

- Inmediatamente se estria con un asa en argolla estéril, por agotamiento de estrías.
- Después, se incuban las siembras a una temperatura de $\pm 36^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se realiza la lectura de las placas, evaluando morfología y descartando aquellas con signos de contaminación.

4.8.2 Técnicas de identificación

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas consisten, en distintos test químicos, aplicados a medios biológicos, los cuales conocida su reacción, nos permiten identificar microorganismos presentes.

Agar TSI (Tres Azúcares y Hierro)

- Se inocula el medio de TSI con un asa en punta estéril, partiendo de ATS.
- Se toma una colonia aislada con el asa, y se punciona en el tubo, de 3-5 mm.
- Tras puncionar con el asa se estrió el bisel del medio, con movimiento de un lado hacia otro.
- Se incuban el medio con el tapón flojo, a 36°C por 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación se realizan las lecturas de los tubos.

Agar movilidad

- Se inocula el medio movilidad con un asa en punta.
- Se toma una de las colonias más aisladas partiendo de ATS.
- Luego se introduce el asa en el medio sin tocar el fondo.
- Después se saca el asa con sumo cuidado.
- Se incuban los tubos con el tapón flojo, a 36°C por 24 horas.
- Después de la incubación se realizan las lecturas del medio movilidad.

4.9 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS.

Material.

- Pinzas estéril.
- Hisopos estériles.
- Placas de Petri 99X100mm.
- Gabacha.

- Guantes de látex.
- Medios de cultivo.
- Papel toalla.
- Jabón antiséptico.
- Tubos.
- Espátula.
- Asa bacteriológica.
- Erlenmeyer
- Probeta
- Tubos con tapón de rosca
- Jeringa
- Chispero

Equipo.

- Balanza granataría.
- pHmetro.
- Autoclave.
- Cocina de gas.
- Mechero de Bunsen.
- Refrigerador.
- Incubadora
- Rotador Vortex
- Tabla Cebra para la escala de Mac Farland.
- Vernier

Reactivos.

- Solución salina estéril.
- Soluciones buffer para calibrar pHmetro.
- Tiras de E-test.
- Escala de Mac Farland 0.5.

4.10 PROCEDIMIENTOS

4.10.1 Planeación.

El proceso de graduación inició con una reunión general con estudiantes egresados de la carrera de tecnología médica con la coordinadora metodológica, con el objeto de informar acerca del proceso de grado, además se definieron las fases que se llevarían a cabo

en el trabajo de investigación, así también se dieron a conocer los grupos de tesis con su respectivo asesor.

Luego se procedió a una reunión con el respectivo docente director para dar a conocer el tema seleccionado a desarrollar.

Seguidamente se solicitaron los permisos necesarios a la Señora Ministra de Salud Dra. María Isabel Rodríguez para tener acceso e ingreso al área de bacteriología , para realizar la ejecución; así como también solicitar la asesoría y aporte de material al personal del Laboratorio Nacional de Referencia.(VER ANEXO6).

Posteriormente se realizó la cotización de precios unitarios y mayorista de las tiras E-test con diferentes casas comerciales y demás materiales a utilizar. (VERANEXO 7).

4.10.2 Ejecución.

Para iniciar se hizo una visita al Laboratorio Nacional de Referencia, con el objetivo de obtener información de la sensibilidad bacteriana disminuida de cepas de *Salmonella typhi*, que se encuentran identificadas en ésta institución, al mismo tiempo se solicitó la colaboración del personal que labora en el área de bacteriología en dicho establecimiento.

Luego se procedió a la preparación de los medios de cultivo tales como, agar Tripticasa Soya, agar Mac Conkey, agar Mueller Hinton, agar TSI y agar Movilidad, dos días antes de iniciar la selección de las muestras, en el Laboratorio Nacional de Referencia con la supervisión de un profesional del área de bacteriología. A los medios de cultivo se les realizó control de calidad. Todos estos procedimientos se detallan a continuación:

4.10.3 Preparación de medios de cultivo según instrucciones del fabricante:

Preparación de agar Tripticasa Soya (ATS):

Preparar 1500 ml de ATS

40mg-----1000ml

x-----1500ml = 60mg/ml

- Una vez calibrada la balanza, se procedió a pesar 60 mg de ATS.
- Luego se midió el agua destilada en una probeta.
- Se colocó una pequeña cantidad de agua destilada en un erlenmeyer estéril.
- Posteriormente se agregó el ATS pesado a un Erlenmeyer.
- Después se agregó el agua destilada restante, para disolverlo por completo, agitándolo suavemente.
- Luego se llevó a ebullición. (Ver Fig. 10).
- A continuación se le colocó la cinta testigo y se llevó a autoclave a 121⁰C con 100 libras de presión por 15 minutos.

- Transcurrido éste tiempo, se dejó enfriar el medio a 51⁰C, en baño de maría.
- Finalmente se vertió el medio en las placas de petri estériles, cerca del mechero, se dejaron solidificar, y se rotularon con fecha de preparación y nombre del medio, después se almacenan en refrigeración, en forma invertida, (Ver Fig.11).
- El medio agar Mac Conkey y agar Mueller Hinton se prepararon de igual forma, a excepción del agar Mueller Hinton que se deben medir los ml del medio, según el tamaño de la placa, que para éste caso fueron 25 ml para una placa de 99x100mm.(Ver Fig. 12).

CONTROL DE CALIDAD DEL AUTOCLAVE.

Antes de llevar los medios a su esterilización en el autoclave, se debe realizar el control de calidad de la manera siguiente:

Se realizó utilizando una ampolla que contiene caldo nutritivo, azúcar, un indicador de pH, así como esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (de esporulación optimada) como organismo de ensayo apatógeno. La termorresistencia está ajustada de tal manera que las esporas mediante calentamiento en vapor a presión tras 15 minutos a no menos de 121 °C± 0.5°C, experimentan una destrucción total. A temperatura más baja o tiempo de acción más breve las esporas sobreviven al menos parcialmente.

Las ampollas se agregan al material de carga. Después de haber tenido lugar el autoclavaje se controla el éxito de la esterilización mediante incubación de las ampollas: si no existe crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* queda demostrado una esterilización suficiente, mientras que la existencia de crecimiento, indica una esterilización insuficiente (VER ANEXO 8).

4.10.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

El control de calidad de los medios se realiza para garantizar la esterilidad, funcionalidad y actividad del medio.

Control de calidad de agar Mac Conkey.

Se inició el control de calidad comprobando la esterilidad, incubando una placa por 24 y 48 horas en la incubadora a 36 ± 1⁰C; obteniendo una esterilidad optima a las 24 y 48 horas de incubación.

Posteriormente se realizó el control de calidad de crecimiento/inhibición, utilizando las siguientes cepas control:

- *Escherichia coli* ATCC 25922.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Salmonella typhi* muestra confirmada.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Escherichia coli ATCC 25922: crecimiento satisfactorio (colonias lactosa positiva)

Staphylococcus aureus ATCC 25923: crecimiento satisfactorio (no hubo crecimiento bacteriano)

Salmonella typhi muestra confirmada: crecimiento satisfactorio (colonias lactosa negativa) (Ver Fig. 13).

Así mismo se realizó la medición de pH. (Ver Fig. 14).

De igual manera se realizó el control de calidad a los demás medios (TSA, TSI y Movilidad).

Control de calidad de agar Mueller-Hinton.

- Primeramente se realizó el control de calidad de esterilización, colocando una placa en la incubadora por 24 y 48 horas a 36 ± 1 °C. Obteniendo una esterilidad óptima a las 24 y 48 horas de incubación.
- Después se procedió a controlar el pH del medio con el pHmetro, el cual es de 7.2-7.4; obteniendo un pH de 7.2. (Ver Fig.15)
- Luego se midió el grosor del medio con la ayuda del vernier, partiendo el medio en cinco cuadrantes y medir cada una de ellos para ver la uniformidad del medio y que debe oscilar en los rangos normales (4 mm) aceptándose un margen de error de ± 0.2 mm.(Ver Fig.16).

Control de timina- timidina.

Éste se realiza cada vez que se adquiera un nuevo lote de medio de cultivo.

- El contenido de timina-timidina debe ser escaso o nulo en el medio de cultivo.
- Concentraciones elevadas dan falsa resistencia, de las sulfonamidas.
- Se utilizó una cepa control de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, frente al disco se SXT (Trimetoprim/sulfametoxazol) 25 ug, el halo debe ser ≥ 20 mm.
- El exceso de timina-timidina debe corregirse con plasma de caballo al 3%, que contiene timidina fosforilasa.

Control de calidad de los cationes.

Éste se realiza cada vez que se cambia de lote.

- La concentración de cationes en el medio de cultivo debe de ser la siguiente: Ca de 20-25mg/L, Mg de 10-12.5mg/L; concentraciones mayores de éstos cationes afectará a colistin, tetraciclinas, aumentando su actividad, y en los aminoglucósidos disminuyéndola.
- Concentraciones menores, producen efecto contrario con los mismos antibióticos.
- Para evaluar las concentraciones se utilizó ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*, frente a gentamicina, el halo debe medir entre 16- 21mm.

Teniendo listo el material a utilizar, se procedió a realizar la siembra de las cepas de *Salmonella typhi* identificadas para obtener cultivos puros, se sembró la bacteria en medio nutritivo (TSA). (Ver Fig. 17).

4.10.5 Procesamiento de cepas

Procedimiento de siembra

Las cepas en estudio se encontraban almacenadas en viales de 1ml de leche descremada al 10%, a -70⁰C. (Ver Fig.18)

- Se mezcló suavemente el vial que contenía la cepa bacteriana en estudio, cerca del mechero, se flameó la boca de éste y con un hisopo estéril se introdujo verticalmente, tomando la cantidad de muestra necesaria,
- Se colocó el inoculó en ATS,
- Inmediatamente se estrió con un asa en argolla estéril, por agotamiento de estrías.
- Después, se incubaron las placas a una temperatura de $\pm 36^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de las placas, evaluando morfología y descartando aquellas con signos de contaminación.
- Se realizó un segundo pase inoculando primero en ATS y luego agar Mac Conkey, para mejorar el metabolismo de las bacterias en estudio, realizando el mismo procedimiento antes descrito,(se sembró en agar Mac Conkey para observar la morfología de las bacterias en éste medio) ése mismo día se realizó la técnica de identificación procediendo de la siguiente forma: (Ver Fig. 19)

Agar TSI (Tres Azúcares y Hierro)

- Se inocularon los tubos de TSI con una asa en punta estéril, partiendo de ATS,
- Se tomó una colonia aislada con el asa, y se introdujo en el tubo, de 3-5 mm sin tocar el fondo.

- Tras retirar el asa se estrió el bisel del tubo, con movimiento de un lado hacia otro,
- Se incubaron los tubos con el tapón flojo, a 36⁰C por 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación se realizó las lecturas de los tubos. (Ver Fig. 20).

Agar Movilidad

- Se inoculó el medio con un asa en punta.
- Se tomó una de las colonias más aisladas partiendo de ATS.
- Luego se introdujo el asa en el medio sin tocar el fondo.
- Después se sacó el asa con sumo cuidado.
- Se incubaron los tubos con el tapón flojo, a 36⁰C por 24 horas.
- El día después de la incubación se realizó las lecturas de los tubos (Ver Fig.21).

Procedimiento de preparación del inóculo.

- Consistió en que se tomaron de 3 a 4 colonias aisladas de igual morfología, partiendo de ATS
- Se suspendió el inóculo en un tubo que contenía 8ml de solución salina estéril al 0.85%.
- Se mezcló la suspensión en el rotador vórtex. (Ver Fig. 22)
- Después se estandarizó con la escala de Mac Farland 0.5, comparando la turbidez con la escala de Mac Farland, mediante la ayuda de la tabla cebra, (Ver Fig. 23).

Método Epsilométrico (e-test)

- Una vez estandarizado el inóculo con un hisopo estéril se introdujo en el tubo que contenía la suspensión bacteriana, exprimiendo el hisopo por las paredes del tubo para eliminar el exceso de humedad.
- Seguidamente se estrió en 3 direcciones opuestas en el medio agar Mueller Hinton, finalmente se rotó el hisopo alrededor de los bordes de la placa.
- Se esperó un tiempo de 10 a 15 minutos para colocar las tiras impregnadas con el antibiótico de ciprofloxacina, presionando suavemente para evitar la formación de burbujas, (Ver Fig. 24).

Además se aplicó el control para las cepas en estudio utilizando la cepa de *Salmonella* ATCC 14024,

A continuación se incubaron las siembras en placas de Mueller Hinton a 36⁰C de 18-24 horas. (Ver Fig. 25)

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de la zona de inhibición, que nos indicó la CIM. (Ver Fig. 26)

PLAN DE ANALISIS

Interpretación de resultados según la CLSI

Puntos de corte de CLSI 2013. (Tabla 2 A Enterobacterias M02 and M07)

Las cepas con una CIM de $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ se reportan como **sensibles**.

Las cepas con una CIM de **0.12 a 0.5 $\mu\text{g/ml}$** se reportan como **intermedios**.

Las cepas con una CIM de $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, se reportan como **resistentes**

4.11 RIESGOS Y BENEFICIOS

Riesgos

- No hay riesgos directamente relacionados a la participación en ésta investigación.
- El grupo investigador tomó las medidas necesarias para el manejo y manipulación de las muestras, así como también para la preparación de los medios de cultivo, su inoculación y las pruebas bioquímicas.

Beneficios

- Los resultados que se generaron con ésta investigación fueron de gran importancia tanto para el Ministerio de Salud como para el personal que labora en el Laboratorio Nacional de Referencia en el área de bacteriología, ya que por medio del método Epsilométrico, se conoció directamente la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la bacteria a la cual ésta es sensible y se realizó una comparación con el método de Kirby Bauer.
- Así para el Ministerio de Salud los resultados fueron de gran utilidad, ya que al conocer la Concentración Inhibitoria Mínima del antibiótico a la cual la bacteria en estudio es susceptible, se reducirán los costos hospitalarios, proporcionando la dosis correcta al paciente.

5 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Éste capítulo contiene los datos obtenidos en la investigación que se realizó sobre la determinación de la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* del cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método epsilométrico (E-test).

Dichos resultados fueron recopilados del procesamiento de 40 cepas de *Salmonella typhi*, a las cuales se les realizó la siembra en los medios: agar Trypticase Soya, agar MacConkey, agar TSI y agar Movilidad, para observar las características morfológicas de la bacteria y así mismo evidenciar que las bacterias trabajadas pertenecían a la especie *typhi*.

Se realizó la susceptibilidad en el medio Mueller-Hinton por el método epsilométrico para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a la cual la bacteria muestra susceptibilidad frente al antibiótico de ciprofloxacina.

Además se tabularon los datos recolectados en la hoja de registro de las cepas, en la cual se registró la lectura de la elipse formada por la tira del antibiótico, y para su análisis e interpretación se utilizó el programa estadístico “SPSS Statistics v19”, donde se elaboró el cuadro de porcentaje.

Los resultados obtenidos se presentan en una serie de cuadros y gráficos; en los cuales se demuestra si la hipótesis era una afirmación razonable o no sobre el estudio realizado.

5.1 TABULACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

CUADRO N° 1

Características morfológicas de *Salmonella typhi* en los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Características		Frecuencia	%
Agar Mac Conkey	Fermentador de Lactosa	Positiva	0	0.0
		Negativa	40	100.0
		Total	40	100.0
Agar Trypticasa Soya	bordes lisos, amarillentas y cremosas	Si	40	100.0
		No	0	0.0
		Total	40	100.0
Tres Azucres y Hierro (TSI)	K/A	Positivo	40	100.0
		Negativo	0	0.0
		Total	40	100.0
	Producción de ácido Sulfídrico	Positivo	40	100.0
		Negativo	0	0.0
		Total	40	100.0
	Producción de Gas	Positivo	0	0.0
		Negativo	40	100.0
		Total	40	100.0
Medio Movilidad	Movilidad	Positivo	40	100.0
		Negativo	0	0.0
		Total	40	100.0

Fuente: Hoja de registro de cepas

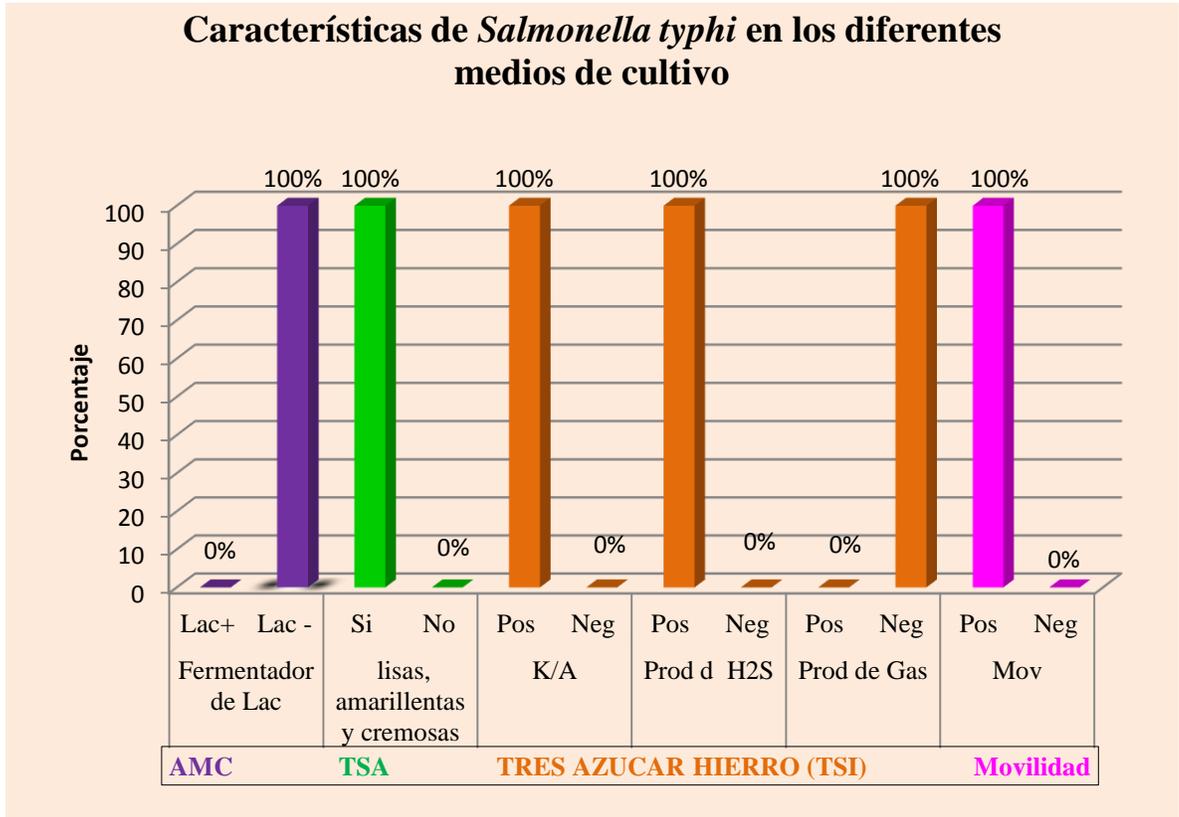
Análisis:

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar que la totalidad de las cepas estudiadas, mostraron una morfología compatible con *Salmonella typhi*: en agar Mac Conkey el 100% de las cepas eran lactosa negativa, agar Trypticasa Soya el 100% de las cepas mostró colonias con la siguiente morfología: bordes lisos, amarillentas y cremosas, en el medio TSI el 100% mostraron la siguiente reacción: K/A, producción de ácido sulfhídrico y sin producción de gas, mientras en el medio de movilidad el 100% mostro una movilidad negativa.

Interpretación:

De acuerdo con los datos obtenidos a través del estudio realizado en los diferentes medios de cultivo se muestra que todas las cepas, tenían una morfología compatible con la bacteria *Salmonella typhi*.

GRÁFICA N° 1



Fuente: Hoja de registro de cepas

TABLA N° 2
Lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico (E-test)

Concentración $\mu\text{g/ml}$ de ciprofloxacina (CIM)	Frecuencia	%
0.008 $\mu\text{g/ml}$	6	15%
0.12 $\mu\text{g/ml}$	31	77.5%
0.15 $\mu\text{g/ml}$	1	2.5%
0.25 $\mu\text{g/ml}$	2	5%
Total	40	100%

Fuente: método Epsilométrico

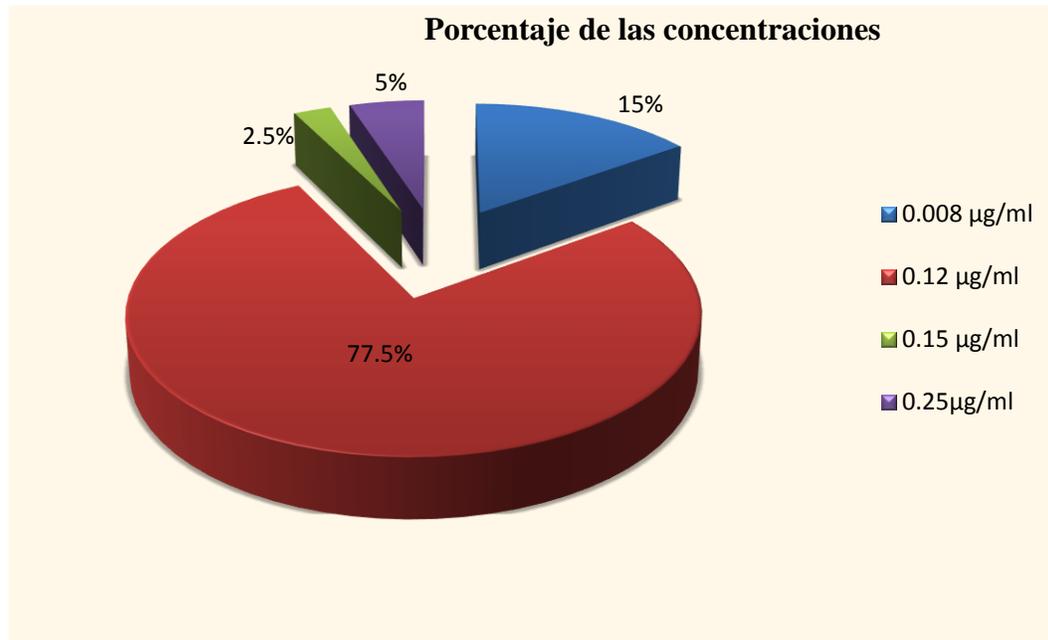
Análisis:

En el siguiente cuadro muestra las diferentes lecturas de las concentraciones que dieron las elipses con el antibiótico ciprofloxacina, un 15% de las cepas mostraron una concentración de 0.008 $\mu\text{g/ml}$, mientras que un 77.5% una concentración de 0.12 $\mu\text{g/ml}$, un 2.5% una concentración de 0.15 $\mu\text{g/ml}$ y un 5% una concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$, sumando un total de 100%.

Interpretación:

De los datos anteriores se interpreta que el 15% de las cepas en estudio mostraron una concentración 0.008 $\mu\text{g/ml}$ siendo esta una CIM baja con la cual la bacteria puede ser sensible, mientras que el 2.5%, 5% y el 77.5% tiene una (CIM) alta en la cual la bacteria puede ser intermedia según la CLSI, siendo predominante en el 77.5% lo cual nos confirma que la mayoría de bacterias en estudio tienen una susceptibilidad intermedia con una Concentración Inhibitoria Mínima de 0.12 $\mu\text{g/ml}$.

CUADRO N°2
Lectura de la concentración de la elipse por el método Epsilométrico (E-test)



Fuente: método Epsilométrico.

CUADRO N° 3
Clasificación de la susceptibilidad según la CLSI

CLSI	Método Epsilométrico (E-test)	
	Frecuencia	%
Sensible $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$	6	15.0
Intermedio 0.12-0.05 $\mu\text{g/ml}$	34	85.0
Resistente $\geq 1 \mu\text{g/ml}$	0	0.0
Total	40	100.0

Fuente: Tabla de interpretación de la CLSI

Análisis:

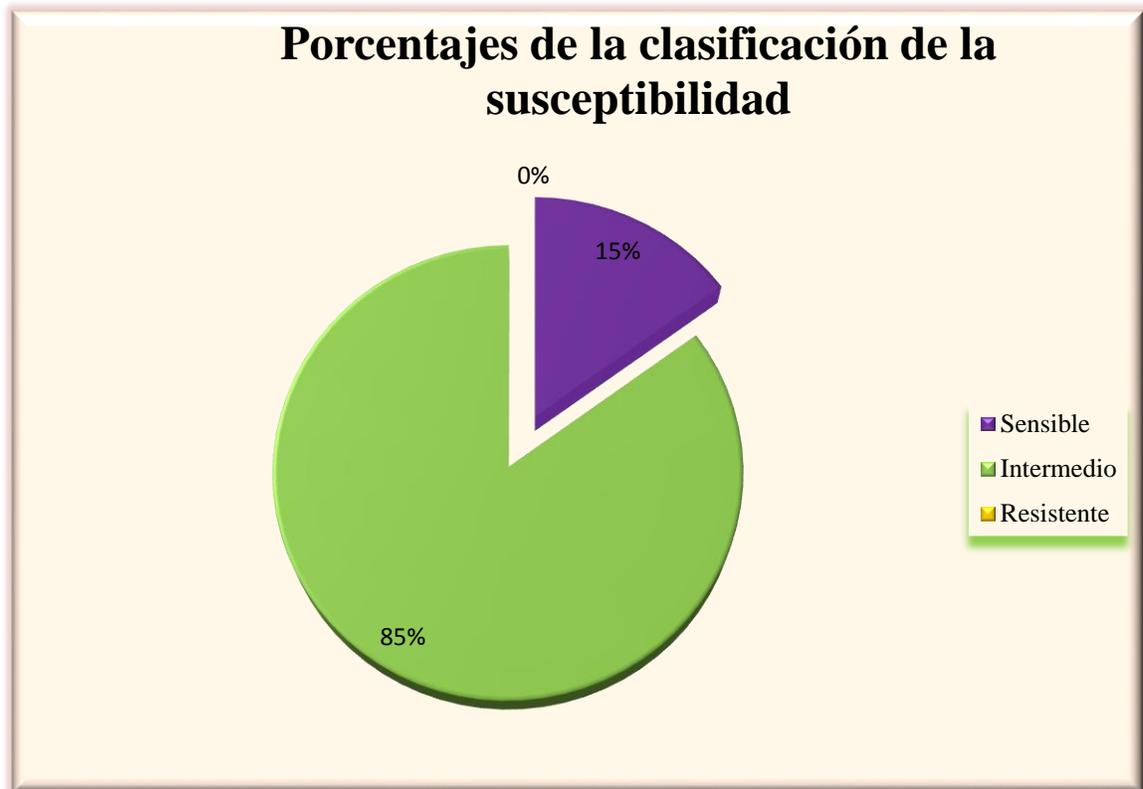
Según los datos obtenidos en el cuadro anterior se obtuvo un total de 15% de las cepas con sensibilidad, mientras que un 85% muestra susceptibilidad intermedia, sumando un total 100%.

Interpretación:

De los datos obtenidos anteriormente se interpreta que el 15% de las cepas de *Salmonella typhi* estudiadas son sensible al antibiótico de ciprofloxacina, mientras que el 85% muestra sensibilidad intermedia, esto puede deberse a factores externos que promueven la sensibilidad disminuida a ciertos antibióticos, en éste caso a la ciprofloxacina.

GRÁFICO N° 3

Clasificación de la susceptibilidad por el método Epsilométrico según CLSI



Fuente: Tabla de interpretación de la CLSI

CUADRO N° 4
COMPARACIÓN E-TEST vs. KIRBY-BAUER.

CLSI	Método					
	E-test		Kirby-Bauer		Total	
	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
S	6	15.0	6	15.0	12	15.0
I	34	85.0	34	85.0	68	85.0
R	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Total	40	100.0	40	100.0	80	100.0

Fuente: hoja de registro de bacterias y datos de Laboratorio Nacional de Referencia

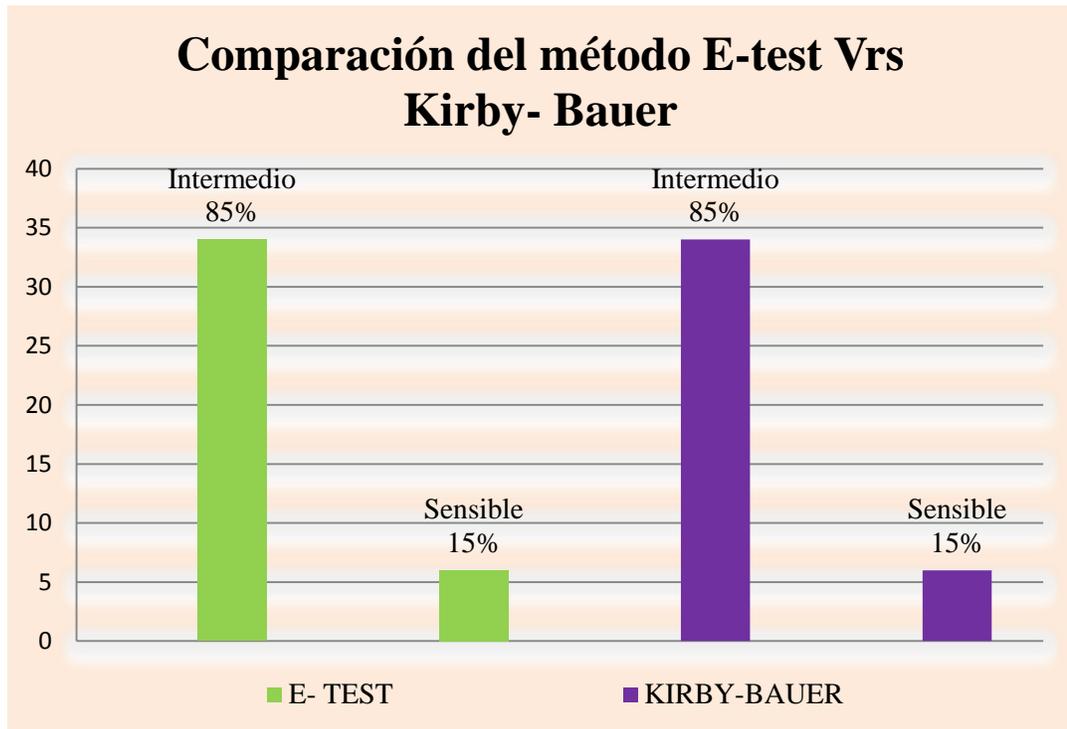
Análisis:

En cuadro N°4 se presenta la frecuencia del método Epsilométrico con relación al método de Kirby-Bauer, en el cual el en método Epsilométrico un 15% de las cepas muestran sensibilidad, mientras un 85% muestran sensibilidad intermedia, y en el método de Kirby-Bauer un 15% de las cepas en estudio presentaron sensibilidad, y un 85% tiene sensibilidad intermedia.

Interpretación:

De los datos anteriores del cuadro anterior muestra que las cepas en estudio un 15% tiene sensibilidad al antibiótico ciprofloxacina, mientras que un 85% son intermedias; correlacionando los métodos Kirby- Bauer con el Epsilométrico, se dice que los datos obtenido coinciden en su totalidad, con una ventaja que el método Epsilométrico se conoce la (CIM), mientras que en el método de Kirby-Bauer se debe de interpretar la medición de halo del disco utilizado.

GRÁFICA N°4



Fuente: hoja de registro de bacterias y datos de Laboratorio Nacional de Referencia

5.2 PRUEBA DE HIPÓTESIS

Dado que se realizó la determinación de la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia, por el método Epsilométrico (E-test). Entonces en este caso hablamos de una proporción y además como $n > 30$, entonces se utiliza el estadístico de proporciones para una distribución normal, para ello se realizan los siguientes pasos:

Comprobación de la hipótesis alterna

1. Establecimiento de la hipótesis alterna de trabajo

En donde:

$H_1 = P \neq 0.33$. \hat{p} = Proporción obtenida con los datos de la muestra.
 $H_0 = P = 0.33$. P = Proporción establecida según los registros del Laboratorio Nacional de Referencia.
 $\sigma_{\hat{p}}$ = Error cometido al calcular la proporción muestral
 Z_t = Valor crítico generado por la tabla al 95% de confianza. Éste es 1.65.
 Z_c = Valor de Z obtenido con los datos de la muestra
 n = Tamaño de muestra.

2. Calculando el valor de Z_t para una confianza del 95% esto es $Z_t = 1.96$
3. Obteniendo Z para los datos de la muestra (Z_c)

$$Z_c = \frac{\hat{p} - P}{\sigma_{\hat{p}}} \quad \text{Donde } \sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{0.33(1 - 0.33)}{40}}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{0.33(0.67)}{40}}$$

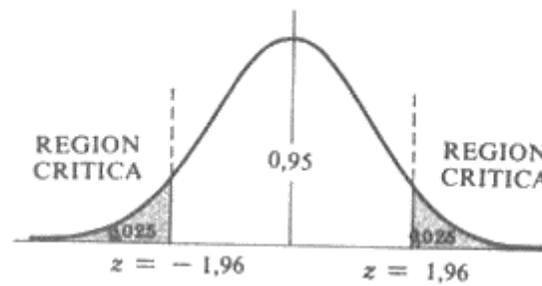
$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{0.2211}{40}}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = \sqrt{0.00552}$$

$$\sigma_{\hat{p}} = 0.074.$$

Entonces:

$$Z_c = \frac{\frac{34}{40} - 0.33}{0.074} = \frac{0.85 - 0.33}{0.074} = \frac{0.52}{0.074} \quad Z_c = 7.03.$$



4. Regla de decisión:

Si $Z_c > Z_t$ o $Z_c < Z_t$, entonces se acepta la H_1

Si $Z_c = Z_t$ entonces se acepta H_0 .

6 Decisión estadística:

Hemos observado que el valor $Z_c = 7.03$ y es mayor a $Z_t = 1.96$, entonces se acepta H_1 , es decir que la sensibilidad intermedia supera el 33% proporcionados por los datos del Laboratorio Nacional de Referencia para toda la población de cepas.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el estudio sobre la Determinación de la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi*, en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-Test), durante el período de julio a septiembre de 2013, se obtuvieron las conclusiones siguientes:

- En ésta investigación se muestrearon 40 cepas, a las cuales se les realizó la susceptibilidad por el método Epsilométrico (E-Test) del cual se obtuvieron resultados de 34 cepas con susceptibilidad intermedia, que equivale al 85% y 6 cepas sensibles, que equivale al 15% de las cepas estudiadas.
- Las cepas con susceptibilidad intermedia predominante tienen una concentración de 0.12 µg/ml que equivale a un 77.5%, esto se debe a factores externos como la automedicación que generan sensibilidad disminuida.
- Al comparar los resultados obtenidos por el método Epsilométrico (E-Test), con los datos registrados en el Laboratorio Nacional de Referencia por el método de Kirby-Bauer, se verifica que coinciden en su totalidad, en cuanto a la clasificación de la susceptibilidad de las cepas en estudio.
- Al obtener los resultados de las pruebas bioquímicas (agar TSI, agar Movilidad) se confirmó que todas las cepas en estudio pertenecían a *Salmonella typhi*.
- La determinación de la susceptibilidad a cepas bacterianas a través del método Epsilométrico (E-Test) es el más indicado para la realización del antibiograma, ya que por medio de éste se conoce directamente la Concentración Inhibitoria Mínima a la cual la bacteria es sensible, ayudando así al diagnóstico oportuno del paciente, como a reducir costos hospitalarios.

- Al final de ésta investigación se concluye que se acepta la hipótesis alterna que dice, “Existe susceptibilidad intermedia al antibiótico ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi* en el cepario del Laboratorio Nacional de Referencia por el método Epsilométrico (E-test), ya que en los resultados obtenidos la frecuencia total de cepas con susceptibilidad intermedia fue de 34, con un porcentaje del 85%, confirmando así la hipótesis alterna.

6.2 RECOMENDACIONES

Al Ministerio de Salud:

- Que con la nueva ley de los medicamentos, tomen estricta vigilancia en cuanto a la automedicación y al uso correcto de los medicamentos, ya que con el mal manejo de éstos lo que estamos promoviendo es el aumento de la resistencia bacteriana.
- Monitorear los antibióticos que se les proveen a los centros hospitalarios, como a las unidades de salud, para que así se cuenten con los medicamentos correctos al momento de dar una receta a los pacientes.
- Evaluar si el personal de salud tiene óptimo conocimiento de los antibióticos a utilizar frente a las diferentes enfermedades, incluyendo a las causadas por bacterias.

Al Laboratorio Nacional de Referencia

- Que sigan trabajando con la calidad que están realizando todos los procedimientos microbiológicos, y así brinden datos estadísticos como país, para formar parte de las estadísticas de la OMS.
- Evaluar al personal de los diferentes centros hospitalarios, en cuanto a conocimientos que tienen acerca de la resistencia bacteriana y cuáles son los mecanismos que la generan.

- Continuar capacitando al personal de los diferentes laboratorios clínicos, pertenecientes a la red de salud, en cuanto al manejo de los diferentes métodos utilizados para determinar la susceptibilidad bacteriana.

A las nuevas generaciones de Profesionales de Laboratorio Clínico.

- Continuar investigando sobre los mecanismos de resistencia que están presentando las bacterias actualmente en nuestro país, y así ayudar a los médicos en el tratamiento eficaz de los pacientes.
- Investigar el mecanismo de resistencia que presenta *Salmonella typhi* frente a otros medicamentos utilizados en el cuadro básico de la red hospitalaria, como las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona).

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Editorial Organización mundial para la Salud 2005 pag. 150.
- 2- Sherris MICROBIOLOGÍA MÉDICA cuarta edición Editorial McGraw-Hill 2004.
- 3- Koneman DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO sexta edición Editorial Medica Panamericana 2008.
- 4- Patrones de Resistencia Antimicrobiana de Salmonella typhi autores: Harish B, Menezes G. Comité de Redacción Científica de SIIC CITA : Indian Journal of Medical Microbiology 29(3):223-229, Jul 2011 [HTTP://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm](http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb620.htm) (consultada 12 de marzo de 2013).
- 5- Generalidades de bacterias, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.htm> (consultada 16 de marzo de 2013)
- 6- Familia *Enterobacteriaceae* – Microbióloga Ciencia y Biología
<http://www.cienciaybiología.com/microbiología/familia-Enterobacteriaceae.php>

ANEXOS

ANEXO N°2

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES ESPECÍFICAS A DESARROLLAR EN EL PROCESO DE GRADUACIÓN.

N°	MESES ACTIVIDADES	MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPT				OCT			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
		1	Solicitud de permiso de acceso a cepas																														
2	solicitud de permiso para realizar ejecución en el LNR																																
3	Cotización de materiales																																
4	Cotización de Tiras E-test de ciprofloxacina																																
5	Presentación con autoridades de LNR																																
6	Preparación de materiales																																
7	Siembra de cepas																																
8	Procesamiento de cepas																																

ANEXO N° 3

PRESUPUESTO Y FINANCIAMIENTO

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1500	Págs. De papel bond	\$ 0.02 ctvs.	\$ 30.00
60	Tiras E-test	\$ 7.67	\$ 780.70
200	Placas de Petri	\$ 0.43	\$ 86
3	Frascos de medio de cultivo (agar Tripticasa Soya, agar Mac Conkey y agar Mueller-Hinton)	\$58.50	\$ 175.50
3	Plumones permanentes	\$ 1.05	\$3.15
1	Caja de guantes de látex	\$ 0.07 ctvs.	\$ 7.00
1	Caja de mascarillas	\$ 0.10 ctvs	\$ 5.00
3	Gorros	\$ 0.60	\$ 1.80
6	Horas de Telefonía celular	\$ 0.20	\$ 72
22	Viajes a San Salvador	\$ 20	\$ 1320
3	Pinzas estériles	\$ 5	\$ 15
2	Litro de solución salina	\$ 3.73	\$ 7.46
3	Agua destilada	\$ 6	\$ 18
1	Libro de texto	\$ 24	\$ 24
3	Lentes de protección	\$ 2.75	\$ 8.25
3	Lápices de carbón	\$ 0.15 ctvs.	\$ 0.45 ctvs.
3	Sacapuntas de metal	\$ 0.40 ctvs.	\$ 1.20
3	Borradores	\$ 0.25 ctvs.	\$ 0.75 ctvs.
3	Reglas milimetradas	\$ 0.65 ctvs.	\$ 1.95
100	Horas de internet	\$ 0.75 ctvs.	\$ 75
1	Tinta negra	\$7	\$7
1	Tinta de color	\$15	\$15
	Fotocopias y anillados	\$40	\$40
TOTAL			\$2695.21

ANEXO 4

HOJA DE REGISTRO DE LAS CEPAS ESTUDIADAS (MÉTODO DE E-TEST Y MÉTODO DE KIRBY- BAUER), AÑO 2013.

No. De cepa	Registro	CIM (E-test)	Interpretación (CLSI)	Lectura del halo (Kirby-Bauer)	Interpretación (CLSI)
1	06-13	0.12µg/ml	Intermedio	24mm	Intermedio
2	10-13	0.12µg/ml	Intermedio	28.5mm	Intermedio
3	55-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
4	60-13	0.25µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
5	73-13	0.12µg/ml	Intermedio	28mm	Intermedio
6	74-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
7	75-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.7mm	Intermedio
8	77-13	0.008µg/ml	Sensible	37.2mm	Sensible
9	78-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30mm	Intermedio
10	79-13	0.008µg/ml	Sensible	36.4mm	Sensible
11	80-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.4mm	Intermedio
12	81-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28.6mm	Intermedio
13	82-13	0.25µg/ml	Intermedio	29.6mm	Intermedio
14	84-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
15	86-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.5mm	Intermedio
16	100-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.5mm	Intermedio
17	102-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29mm	Intermedio
18	107-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30mm	Intermedio
19	109-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28.5mm	Intermedio
20	110-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.7mm	Intermedio
21	112-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0 mm	Intermedio
22	113-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
23	115-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.0mm	Intermedio
24	117-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
25	118-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
26	119-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
27	120-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.0mm	Intermedio
28	121-13	0.008 µg/ml	Sensible	28.0mm	Sensible
29	156-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.4mm	Intermedio
30	157-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.7mm	Intermedio
31	158-13	0.008µg/ml	Sensible	39mm	Sensible
32	159-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28.8mm	Intermedio
33	160-14	0.12 µg/ml	Intermedio	29.6mm	Intermedio
34	164-13	0.12 µg/ml	Intermedio	29.0mm	Intermedio
35	167-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
36	169-13	0.12 µg/ml	Intermedio	30.0mm	Intermedio
37	170-13	0.15 µg/ml	Intermedio	30.3mm	Intermedio
38	230-13	0.008µg/ml	Sensible	36.2mm	Sensible
39	238-13	0.12 µg/ml	Intermedio	28mm	Intermedio
40	244-13	0.008 µg/ml	Sensible	37.0mm	Sensible

Table 2A
Enterobacteriaceae
M02 and M07

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Criteria nearest whole mm			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
FLUOROQUINOLONES									
(31) NOTE: Reevaluation of fluoroquinolones is ongoing.									
See comment (2).									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4	(32) For testing and reporting against Enterobacteriaceae other than <i>S. typhi</i> and extraintestinal <i>Salmonella</i> spp.
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8	
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥31	21-30	≤20	≤0.06	0.12-0.5	≥1	(33) For reporting against <i>S. typhi</i> and extraintestinal <i>Salmonella</i> spp. only.
U	Lomefloxacin or ofloxacin	10 µg	≥22	19-21	≤18	≤2	4	≥8	(34) Because of limited clinical experience in the treatment of infections caused by <i>S. typhi</i> and extraintestinal <i>Salmonella</i> spp. with ciprofloxacin MICs or zone diameters in the intermediate range, clinicians may wish to use maximal oral or parenteral dosage regimens. See comment (36).
U	Ofloxacin	5 µg	≥16	13-15	≤12	≤2	4	≥8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥17	13-16	≤12	≤4	8	≥16	
O	Enoxacin	10 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8	
O	Gemifloxacin	5 µg	≥20	16-19	≤15	≤0.25	0.5	≥1	
O	Grepafoxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤1	2	≥4	
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8	(35) FDA-approved for <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
QUINOLONES									
O	Cinoxacin	100 µg	≥19	15-18	≤14	≤16	32	≥64	See comment (21).
O	Nalidixic acid	30 µg	≥19	14-18	≤13	≤16	-	≥32	(36) In addition to testing urine isolates, nalidixic acid may be used to test for reduced fluoroquinolone susceptibility in isolates from patients with extraintestinal <i>Salmonella</i> infections. Strains of <i>Salmonella</i> that test resistant to nalidixic acid may be associated with clinical failure or delayed response in fluoroquinolone-treated patients with extraintestinal salmonellosis. However, nalidixic acid may not detect all mechanisms of fluoroquinolone resistance. Therefore, <i>Salmonella</i> strains may also be tested with ciprofloxacin and reported using the <i>Salmonella</i> spp. interpretive criteria above. See comments (32) and (33). See comments (21) and (31).
FOLATE PATHWAY INHIBITORS									
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	≤2/58	-	≥4/76	See comment (2).
U	Sulfonamides	250 or 300 µg	≥17	13-16	≤12	≤256	-	≥512	(37) Sulfisoxazole can be used to represent any of the currently available sulfonamide preparations.
U	Trimethoprim	5 µg	≥16	11-15	≤10	≤8	-	≥16	

ANEXO N°6

CARTA DE SOLICITUD DE PERMISO A LA MINISTRA DE SALUD, PARA TENER ACCESO A CEPAS Y REALIZAR LA EJECUCIÓN EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCION DE LABORATORIO CLINICO



Ciudad Universitaria de Oriente, 4 de Marzo de 2013

Dra. María Isabel Rodríguez
Ministra de Salud
Presente

Respetable Dra. Rodríguez:

Reciba un afectuoso saludo de nuestra parte y deseándole muchos éxitos en sus labores cotidianas.
Por medio de la presente nosotras las estudiantes egresadas de la Carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico de la Facultad Multidisciplinaria Oriental:

- Celia Mabel Argueta Argueta Carné AA02084
- Brenda Azucena Avalos Granados Carné AG08035
- Rudis Carolina Alemán Cruz Carné AC08032

Solicitamos su autorización para tener acceso a cepas de *Salmonella typhi* del Laboratorio Nacional de Referencia, para realizar nuestro trabajo de graduación para optar al Título de Licenciada en Laboratorio Clínico con el tema denominado "Determinación de la sensibilidad a cepas de *Salmonella typhi* del cepario del Laboratorio Nacional de Referencia durante el período de Julio a Septiembre de 2013.

Asimismo hacer de su conocimiento que contaremos con la ayuda y colaboración de Profesionales del Área de Bacteriología del Hospital Nacional San Juan de Dios del Departamento de San Miguel, pretendemos con la ejecución de éste trabajo lograr un aporte en cuanto al manejo de agentes antimicrobianos, reducción de costos hospitalarios tanto para el Laboratorio Central, como para el Personal de Salud que labora en el Hospital San Juan de Dios de San Miguel.

Esperando una respuesta pronta y favorable a nuestra petición para iniciar con nuestro trabajo de graduación.

Nos suscribimos

Muy atentamente



"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"

2205-7165

2205-7208

Yadira Ramírez

Celia Mabel Argueta Argueta

Brenda Azucena Avalos Granados

Rudis Carolina Alemán Cruz

Vo.Bo. Lidia Lidiana Patricia Pacheco Herrera
Coordinadora Sección de Laboratorio Clínico
Facultad Multidisciplinaria Oriental



Vo.Bo. Lidia Aurora Guadalupe Gutiérrez
Asesora de Tesis
Facultad Multidisciplinaria Oriental

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCION DE LABORATORIO CLINICO



Ciudad Universitaria de Oriente, 16 de Mayo de 2013

Dra. María Isabel Rodríguez
Ministra de Salud
Presente

Respetable Dra. Rodríguez:

Reciba un afectuoso saludo de nuestra parte y deseándole muchos éxitos en sus labores cotidianas.
Por medio de la presente nosotras las estudiantes egresadas de la Carrera de Licenciatura en Laboratorio Clínico de la Facultad Multidisciplinaria Oriental:

- Celia Mabel Argueta Argueta Carné AA02084
- Brenda Azucena Avalos Granados Carné AG08035
- Rudis Carolina Alemán Cruz Carné AC08032

Solicitamos nos conceda su autorización para poder ingresar al Laboratorio Nacional de Referencia, para la ejecución práctica del trabajo de investigación de nuestro proceso de graduación para optar al Título de Licenciada en Laboratorio Clínico con el tema denominado **"Determinación de la sensibilidad a 40 cepas de *Salmonella typhi* del cepario del Laboratorio Nacional de Referencia durante el período de Julio a Septiembre de 2013.**

Asimismo hacer de su conocimiento que contamos con el apoyo del personal que labora en dicha institución,

Esperando una respuesta pronta y favorable a nuestra petición para iniciar con nuestro trabajo de graduación.

Nos suscribimos

Muy atentamente

"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"

RECIBIDO
17 MAY 2013
FECHA
NOMBRE Sandra
HORA 8:25 am
DESPACHO MINISTERIAL
MINSAL

RECIBIDO
FECHA 17 MAY 2013
NOMBRE
HORA
DESPACHO MINISTERIAL
MINISTERIO DE SALUD

001-22057165
7208

Celia Mabel Argueta Argueta

Brenda Azucena Avalos Granados

Rudis Carolina Alemán Cruz

Vo.Bo. Licha. Lohana Patrieta Pacheco Herrera
Coordinadora Sección de Laboratorio Clínico
Facultad Multidisciplinaria Oriental



Vo.Bo. Licha. Aurora Guadalupe Gutiérrez
Asesora de Tesis
Facultad Multidisciplinaria Oriental

ANEXO N° 7

COTIZACIÓN DE PRECIOS DE TIRAS E-TEST DE CIPROFLOXACINA

ESERSKI HERMANOS, S.A. DE C.V.

Antigua Calle Ferrocarril # 1522, Colonia Cucumacayan, San Salvador, El Salvador

Telefax: 2271-4349, 2271-6018, 2271-5801

NIT # 0614-180357-001-7

e-mail: eserskihermanos@yahoo.com

Cotización No. **224/2013**

San Salvador, 2 de Julio de 2013

Licenciada
Carolina Alemán
Presente

Estimada Licda. Alemán

Reciban un atento y muy cordial saludo.
A continuación sometemos a su consideración nuestra propuesta de lo siguiente:

Cantidad	Descripción el Producto	Precio Unitario	Precio Total
1	Tira para la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria Ciprofloxacina (CIP) 32-0.002 µg/mL (M.I.C.E.)	\$363.80	\$363.80
	Presentación: Caja de 50 Tiras		
	Código Fabricante: MA0104F		
	Marca: Oxoid/Remel/ Thermo Fisher Scientific		
	Origen: Inglaterra		
	Vence: De 6 a 8 Meses		
	Tiempo de Entrega: 35 Días Hábiles después de recibir la O.C.		
1	Tira para la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria Ciprofloxacina (CIP) 32-0.002 µg/mL (M.I.C.E.)	\$96.78	\$96.78
	Presentación: Caja de 10 Tiras		
	Código Fabricante: MA0104D		
	Marca: Oxoid/Remel/ Thermo Fisher Scientific		
	Origen: Inglaterra		
	Vence: De 6 a 8 Meses		
	Tiempo de Entrega: 35 Días Hábiles después de recibir la O.C.		
	Total		\$460.58

Precios Incluyen IVA
Forma de Pago: Contado

En espera de sus agradables ordenes.

Atentamente,
ESERSKI HERMANOS, S.A. DE C.V.
Federico Ruiz de Castilla
Lic. Federico Ruiz de Castilla Eserski
Vice presidente



Aprobada
Rudis Carolina Alemán Cruz
Egresada en Laboratorio Clínico
No. PROVISIONAL 3136

ANEXO N° 8

CONTROL DE CALIDAD DEL AUTOCLAVE

	FORMULARIO DE VERIFICACION DE ESTERILIZACION	
Seccion: _____		

REGISTRO DE CONTROL BIOLÓGICO DE AUTOCLAVES

1	9	2
	7	
3	10	4
	8	
5	11	6

EQUIPO	
NUMERO DE EQUIPO	
FECHA DE ESTERILIZACION	
HORA DE ESTERILIZACION	
NUMERO DE POSICIONES	
INDICADOR BIOLÓGICO	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953
FECHA DE LECTURA	
RESULTADO	
CONTROL POSITIVO RESULTADO	

RESPONSABLE: _____

OBSERVACIONES: _____

ANEXO 9

HOJA DE CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS




**BOLETA CONTROL PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVOS
SECCION BACTERIOLOGIA**

MEDIO PREPARADO: _____
 FECHA PREPARACION DIA: _____ MES: _____ AÑO: _____
 FECHA VENCIMIENTO DIA: _____ MES: _____ AÑO: _____
 CANTIDAD: _____ mL No TUBOS: _____ C/U: _____ mL No CAJAS: _____ C/U: _____ mL

BASE: _____ MARCA: _____ LOTE No: _____ F.V. / / _____
 FECHA APERTURA: / / _____

FORMULA			
MATERIA PRIMA	MARCA	GRAMOS/LITROS	CANTIDAD TOTAL

ESTERILIZACION

AUTOCLAVE: _____ LIBRAS DE PRESION/TIEMPO _____
 FILTRACION: _____ MICRAS DE MEMBRANA _____

CONTROL DE CALIDAD

FECHA DE CONTROL DIA: _____ MES: _____ AÑO: _____

pH	ASPECTO	CONSISTENCIA	VOLUMEN	HUMEDAD	ESTERILIDAD (24 HORAS)	ESTERILIDAD (48 HORAS)

CANTIDAD DE PLACAS CONTROLADAS

CANTIDAD DE PLACAS	%	OBSERVACION

CONTROL DE CRECIMIENTO/INHIBICION

CEPA CONTROL	SATISFACTORIO	INSATISFACTORIO

CONTROL DE HEMOLISIS

CEPA CONTROL	Beta	Alfa	Gamma

CONTROL DE MUELLER HINTON

ESPESOR	TIMINA-TIMIDINA	CATIONES
Centro: I: III:		
II: IV:		

LOTE ACEPTADO: _____ LOTE RECHAZADO: _____
 OBSERVACIONES: _____
 FIRMA DEL RESPONSABLE: _____

LISTA DE FIGURAS

MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS

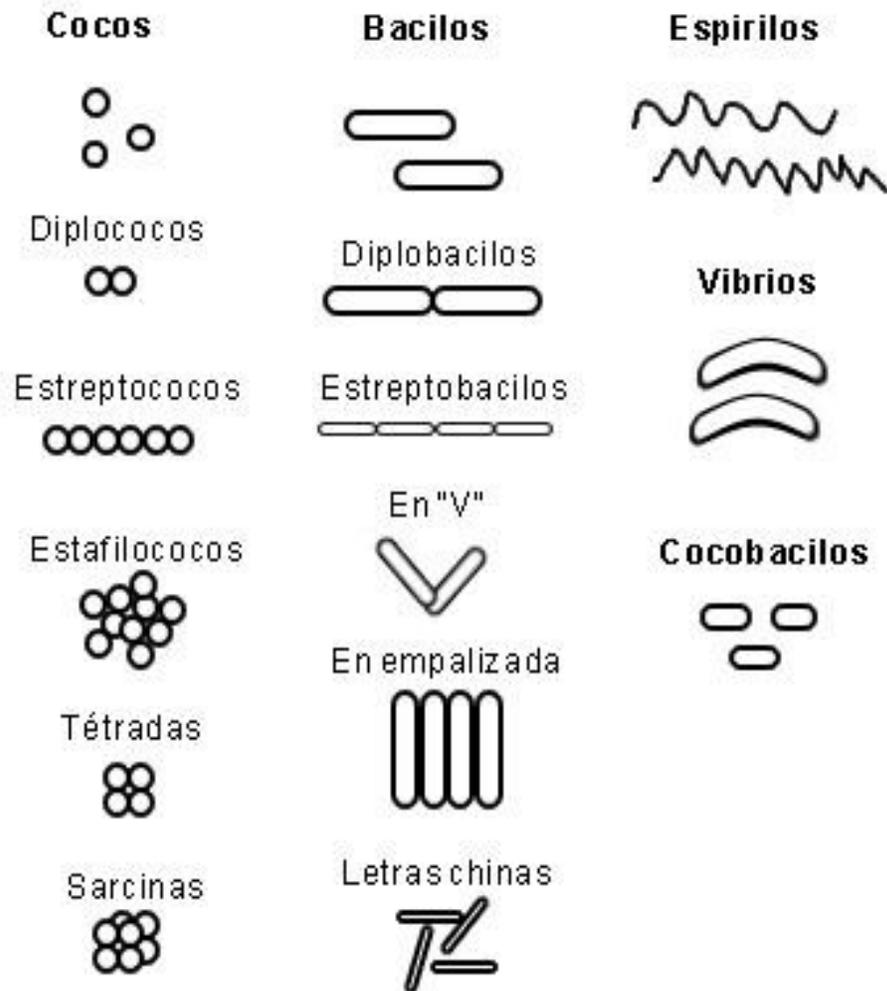


Fig.1: En la imagen obsérvese cada una de la morfología que presentan las bacterias

MORFOLOGÍA Y REACCIÓN AL GRAM DE *Salmonella typhi*

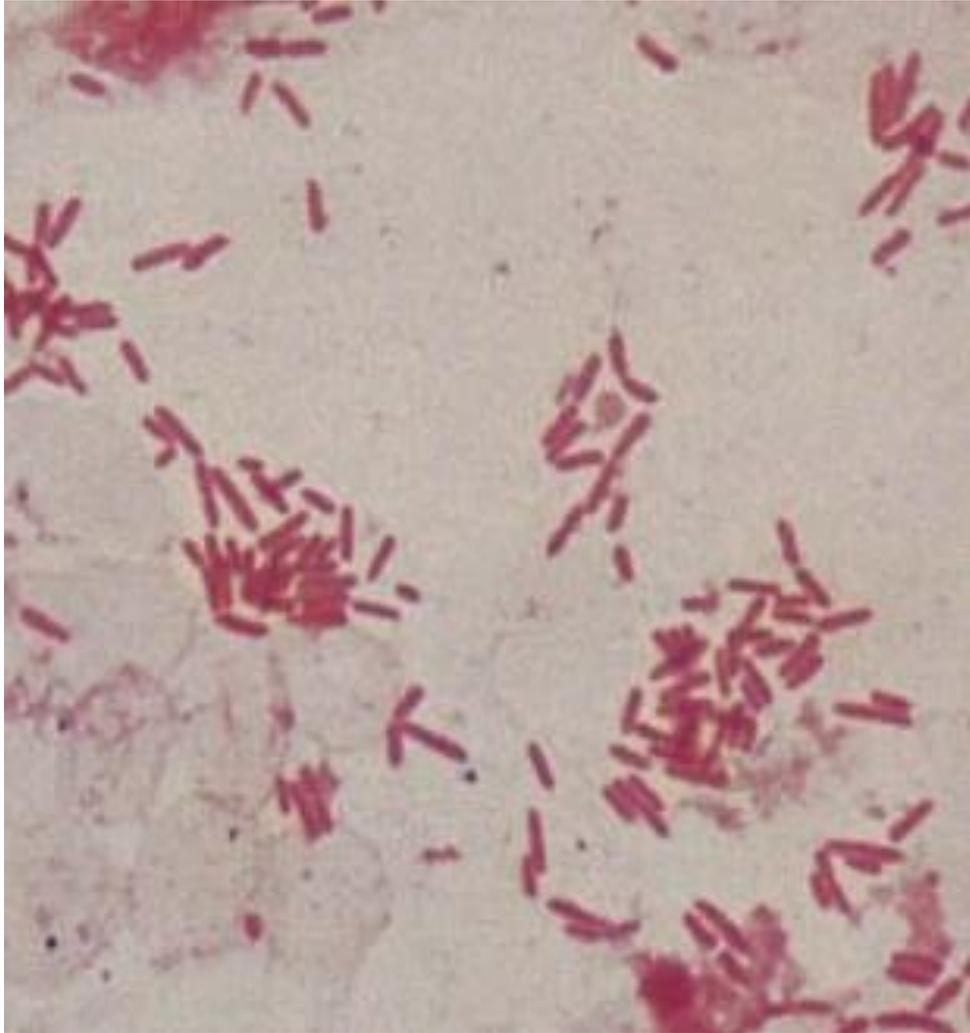


Fig. 2: En la siguiente imagen se observa la morfología y reacción al gram de *Salmonella typhi*, siendo esta un bacilo gram negativo.

MEDIO TSI



Fig. 3. Medio TSI inoculado (con *Salmonella typhi*)



Fig. 3: Medio TSI sin inocular.

MEDIO DE CITRATO NEGATIVO



Positivo

Negativo

Fig. 4: En la imagen se observa las diferentes reacciones que presentan el medio de citrato.

AGAR MAC CONKEY SIN INOCULAR

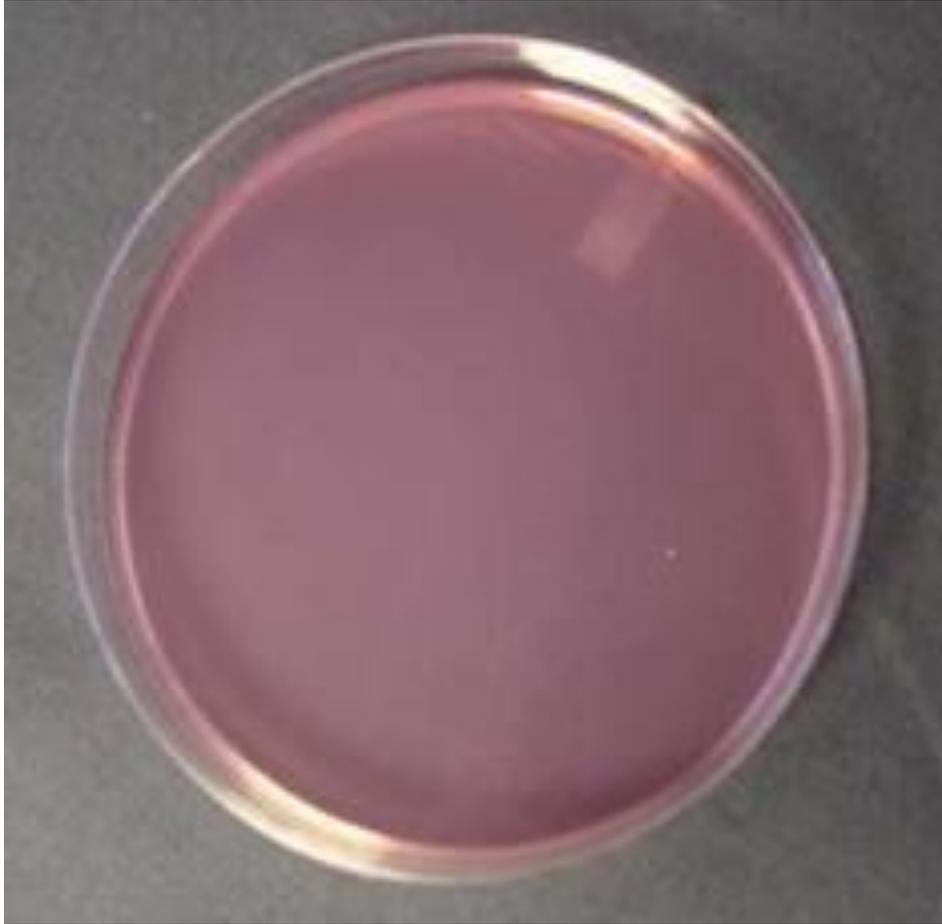


Fig. 5: Medio de Mac Conkey sin inocular.

AGAR MUELLER-HINTON SIN INOCULAR

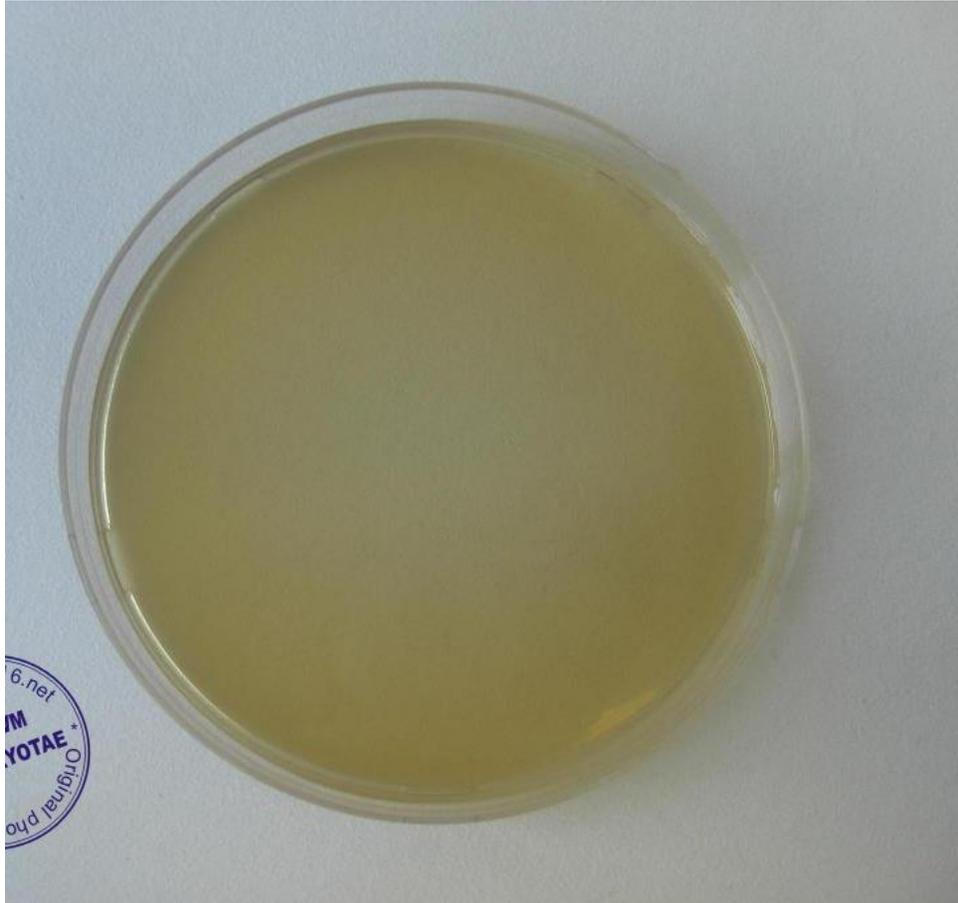


Fig. 6: Medio de agar Mueller-Hinton sin inocular.

METODO DE DILUCIÓN EN DISCO

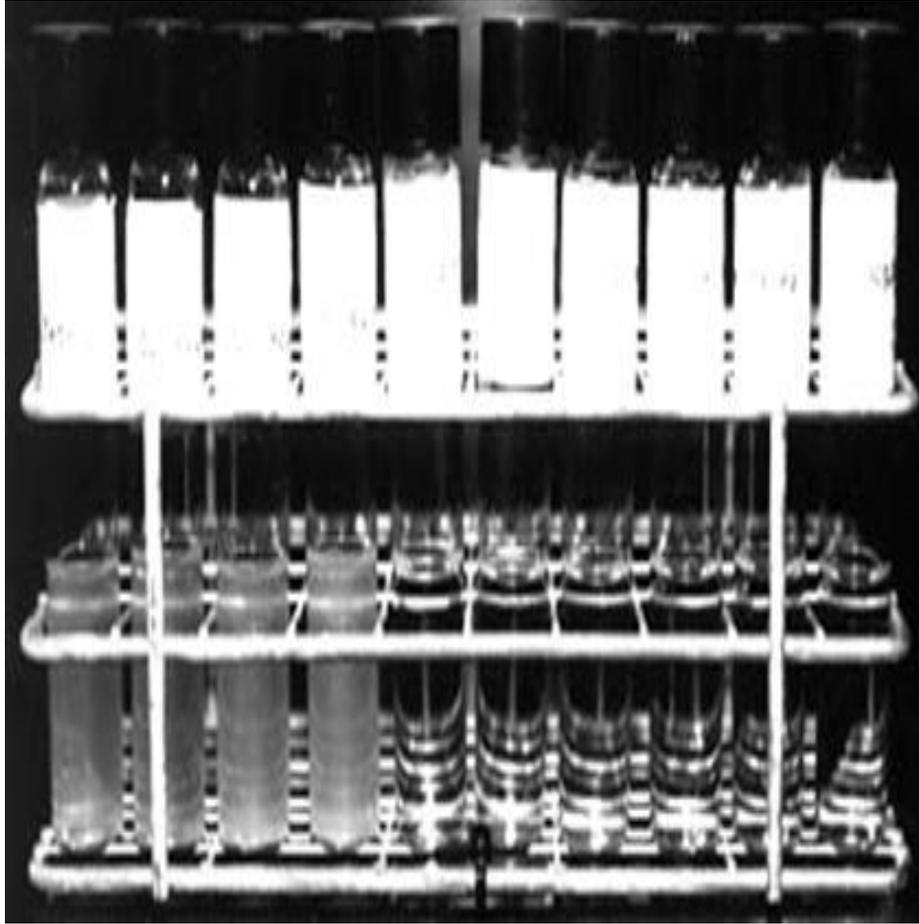


Fig.7: En la siguiente imagen se muestra el método de dilución en caldo con diferentes concentraciones.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

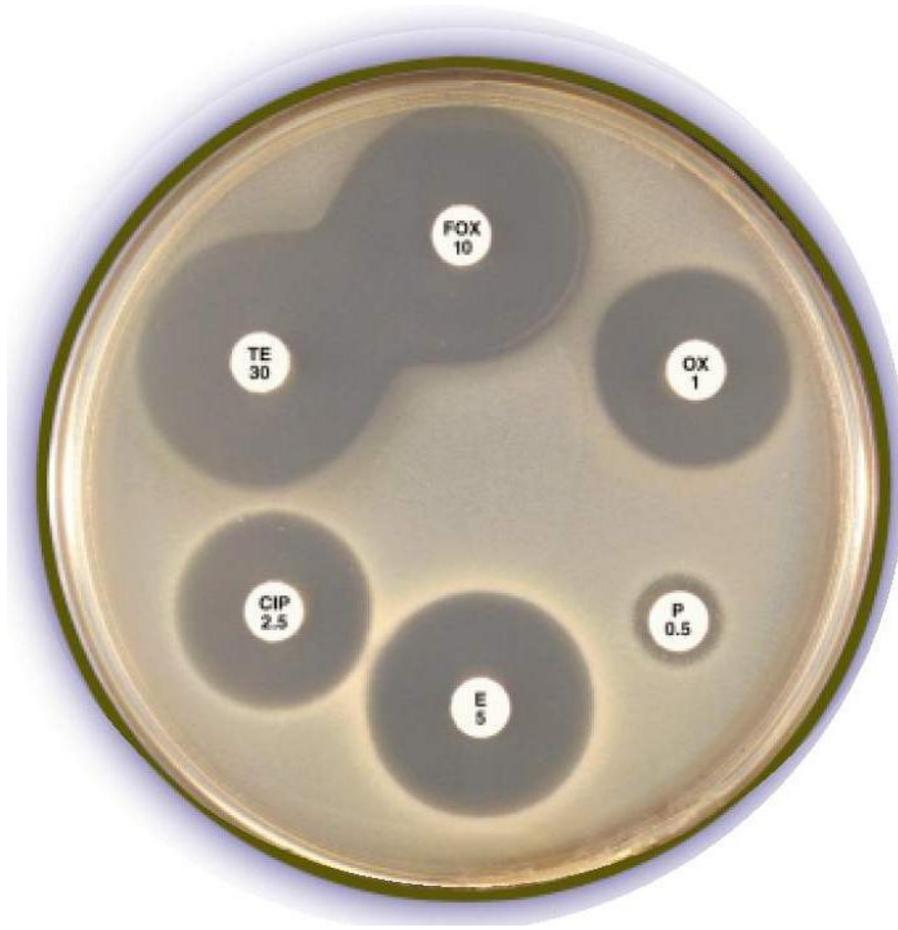


Fig. 8: En la siguiente imagen se observa la disposición de los discos de los antibióticos en el medio de agar Mueller-Hinton.

MÉTODO EPSILÓMETRICO

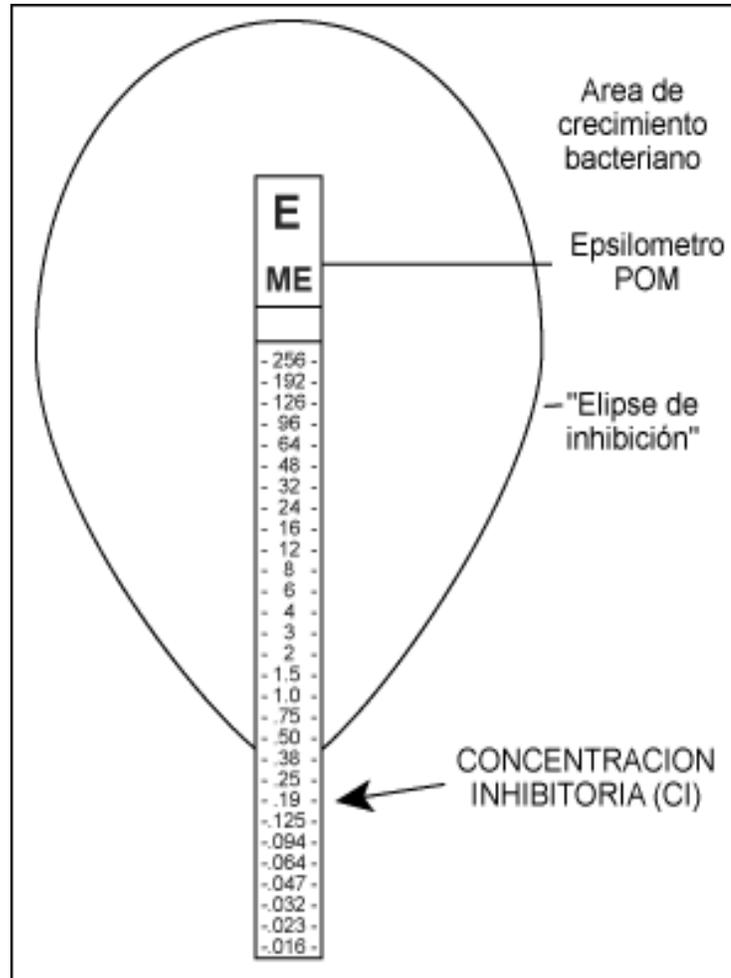


Fig. 9: En la siguiente imagen se muestra la formación de la elipse con diferentes CIM.

PREPARACIÓN DE AGAR TRIPTICASA SOYA



Fig. 10: En ésta imagen se muestra el procedimiento para la preparación de agar Tripticasa Soya antes de llevar a ebullición.

VERTIDA DE AGAR MAC CONKEY Y AGAR TRIPTICASA SOYA



Fig.11: Los medios de cultivo se deben almacenar en refrigeración a una temperatura de 4°C.

VERTIDA DE AGAR MUELLER-HINTON



Fig. 12: Para la vertida del agar Mueller-Hinton se debe tomar en cuenta la medida de la placa en la cual se vertirá el medio, que para este caso se utilizó una placa de 99x100 mm agregando 25ml del medio.

CONTROL DE CRECIMIENTO/INHIBICIÓN DE AGAR MAC CONKEY

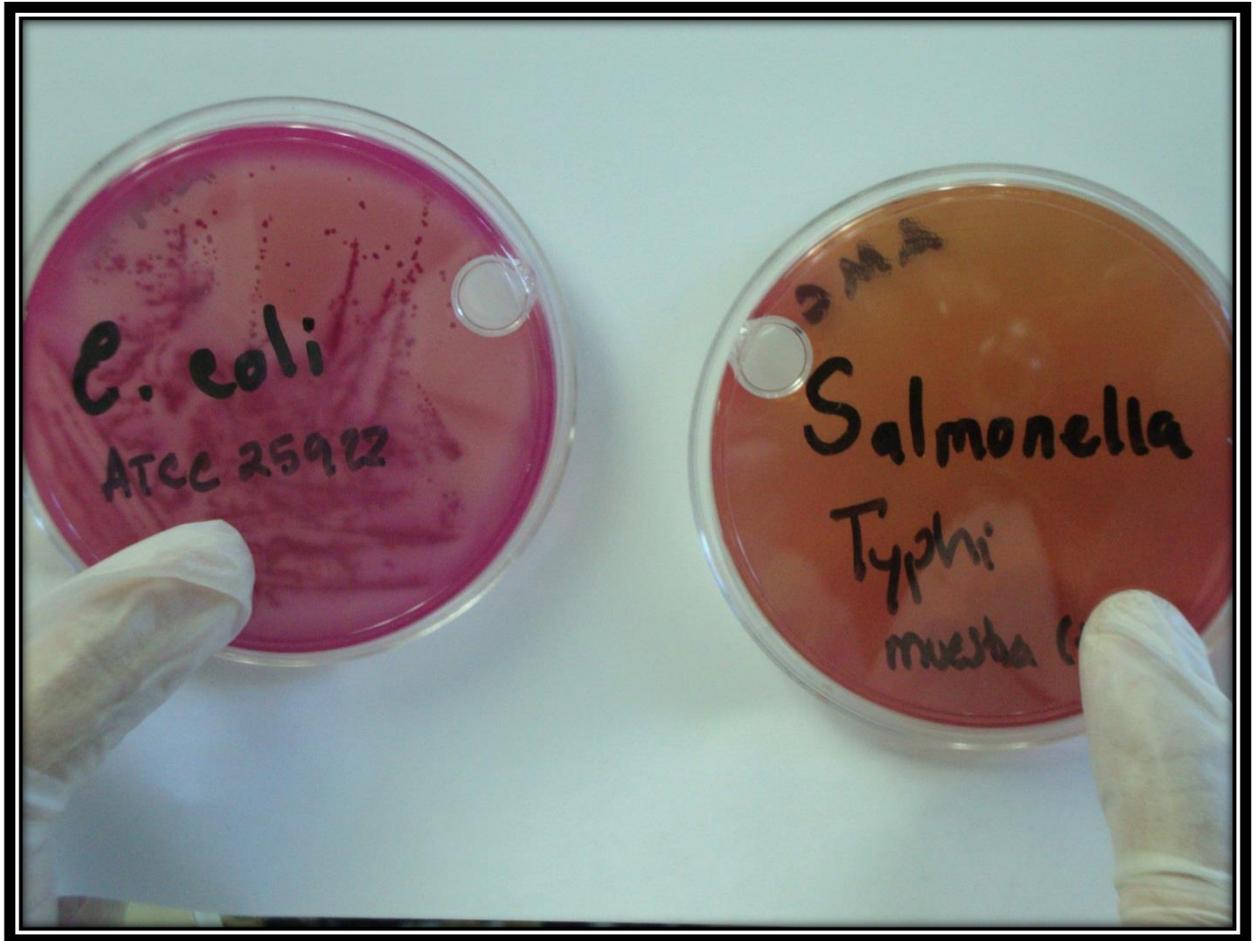


Fig. 13: Obsérvese las colonias lactosa positiva (*Escherichia coli* ATCC 25922), y lactosa negativa *Salmonella typhi*.

MEDICIÓN DE pH DE AGAR MAC CONKEY

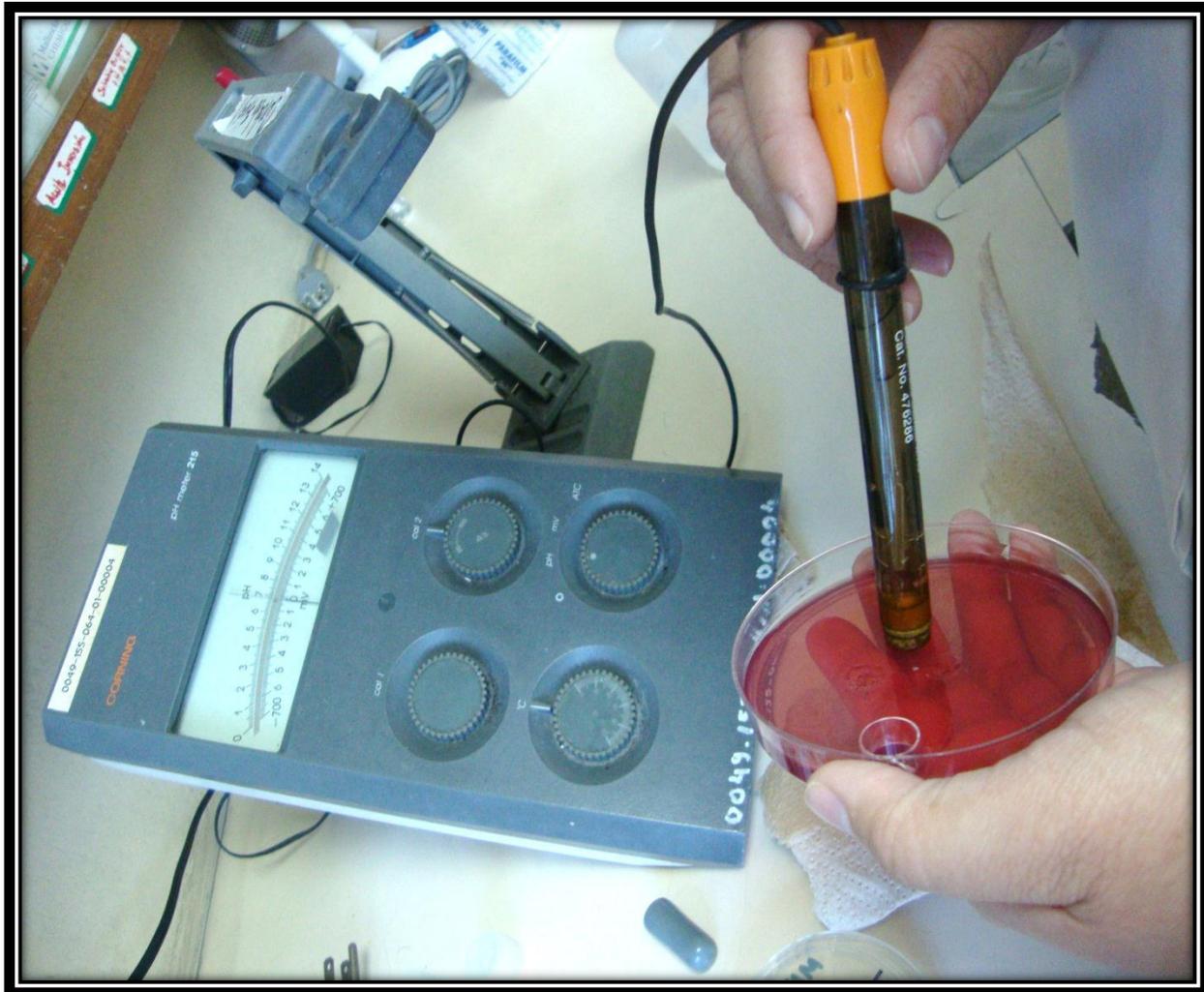


Fig. 14: En la siguiente imagen se muestra la forma de medir los pH de los medios.

MEDICIÓN DE pH DE AGAR MUELLER HINTON



Fig. 15: En la siguiente imagen se muestra la forma de medir los pH del medio Mueller-Hinton

MEDICIÓN DEL GROSOR DE MUELLER-HINTON

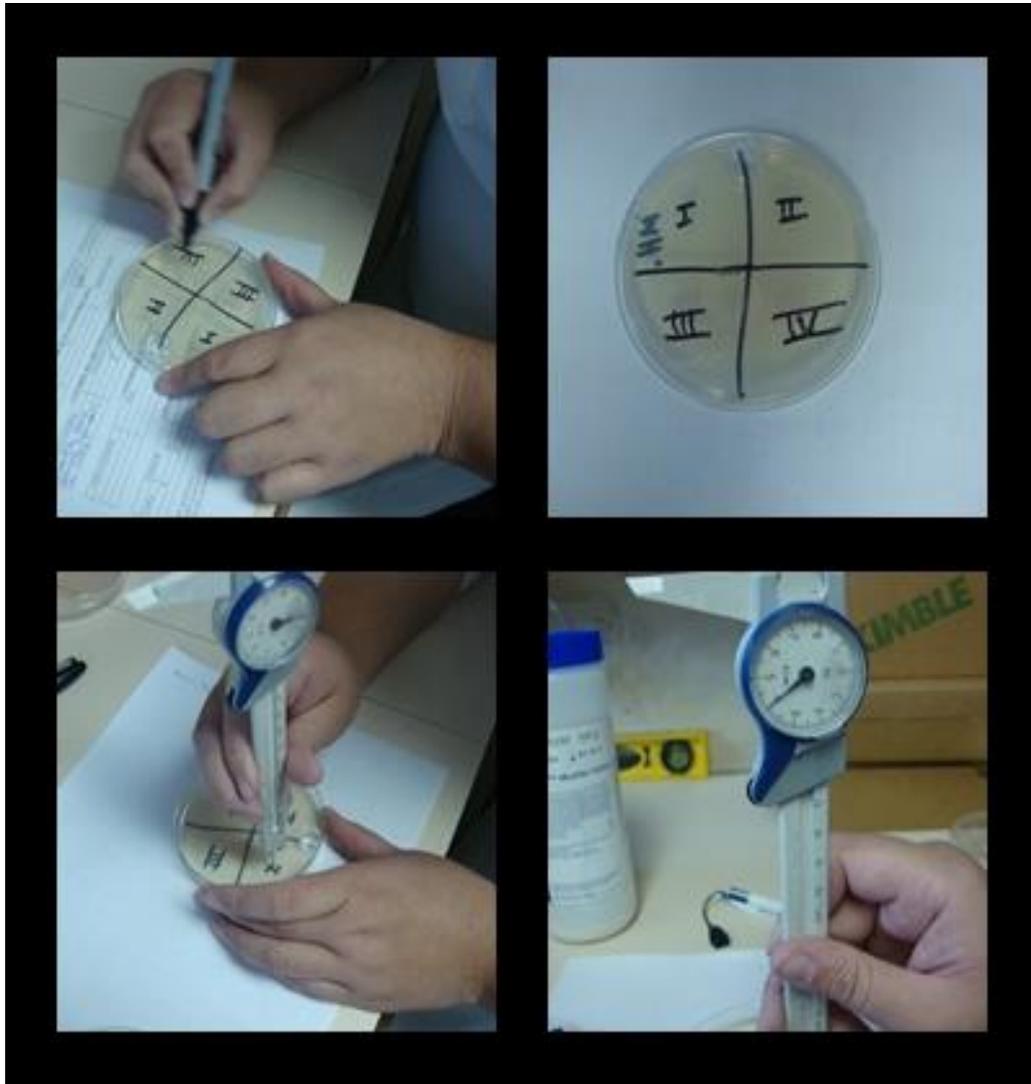


Fig. 16: En éste procedimiento se debe dividir la placa en cinco cuadrantes y medir el grosor de cada uno de ellos, con la ayuda del vernier para sacar la media.

PREPARACIÓN DE MATERIALES



Fig. 17: Hisopos estériles, solución salina estéril 0.85% y pruebas bioquímicas

CEPAS CONSERVADAS EN LECHE DESCREMADA AL 10%

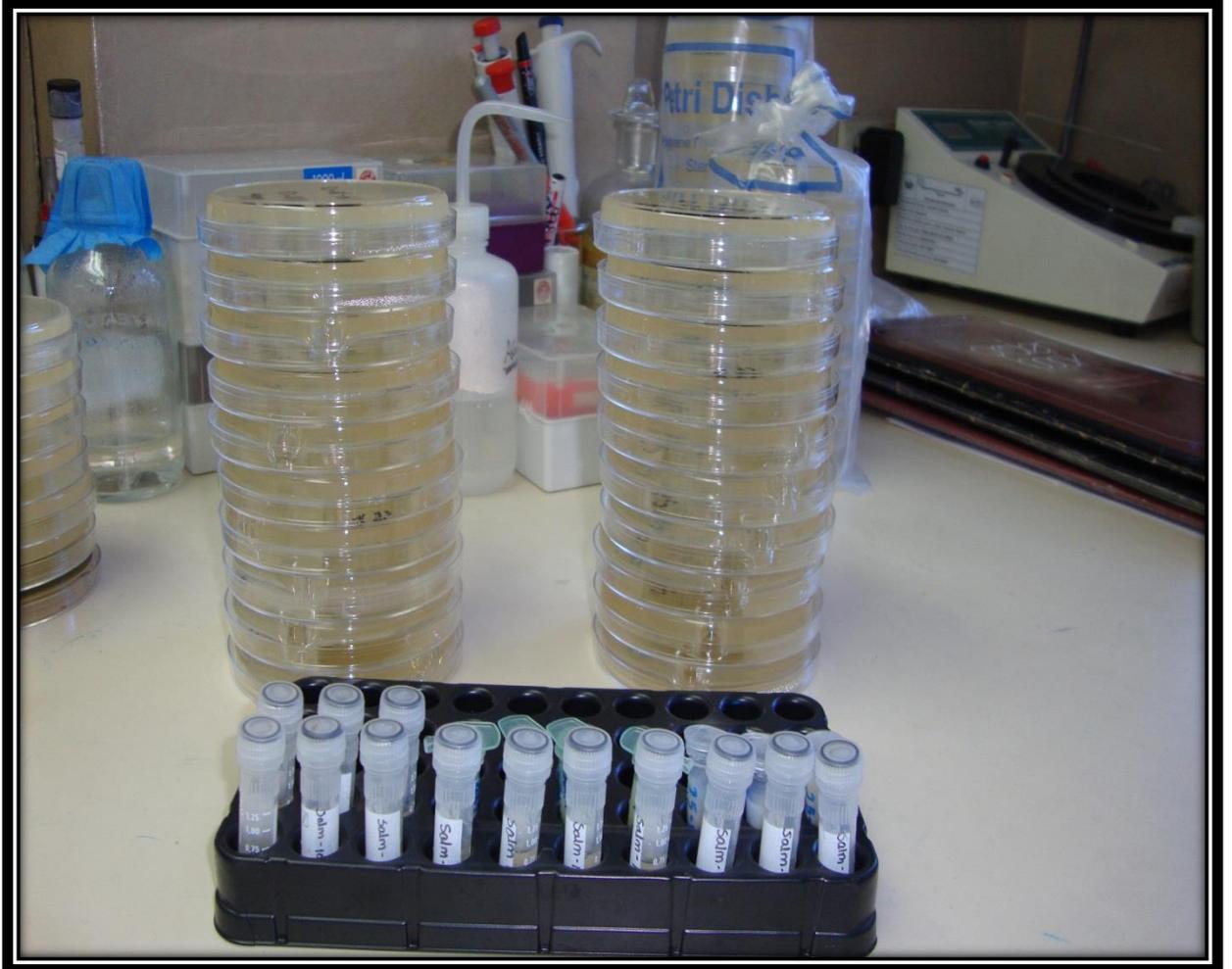


Fig. 18: Las cepas de *Salmonella typhi*, estaban almacenadas en viales de 1 ml que contenían leche descremada y conservadas a una temperatura de -70°C .

INOCULACIÓN DE AGAR TRIPTICASA SOYA Y AGAR MAC CONKEY

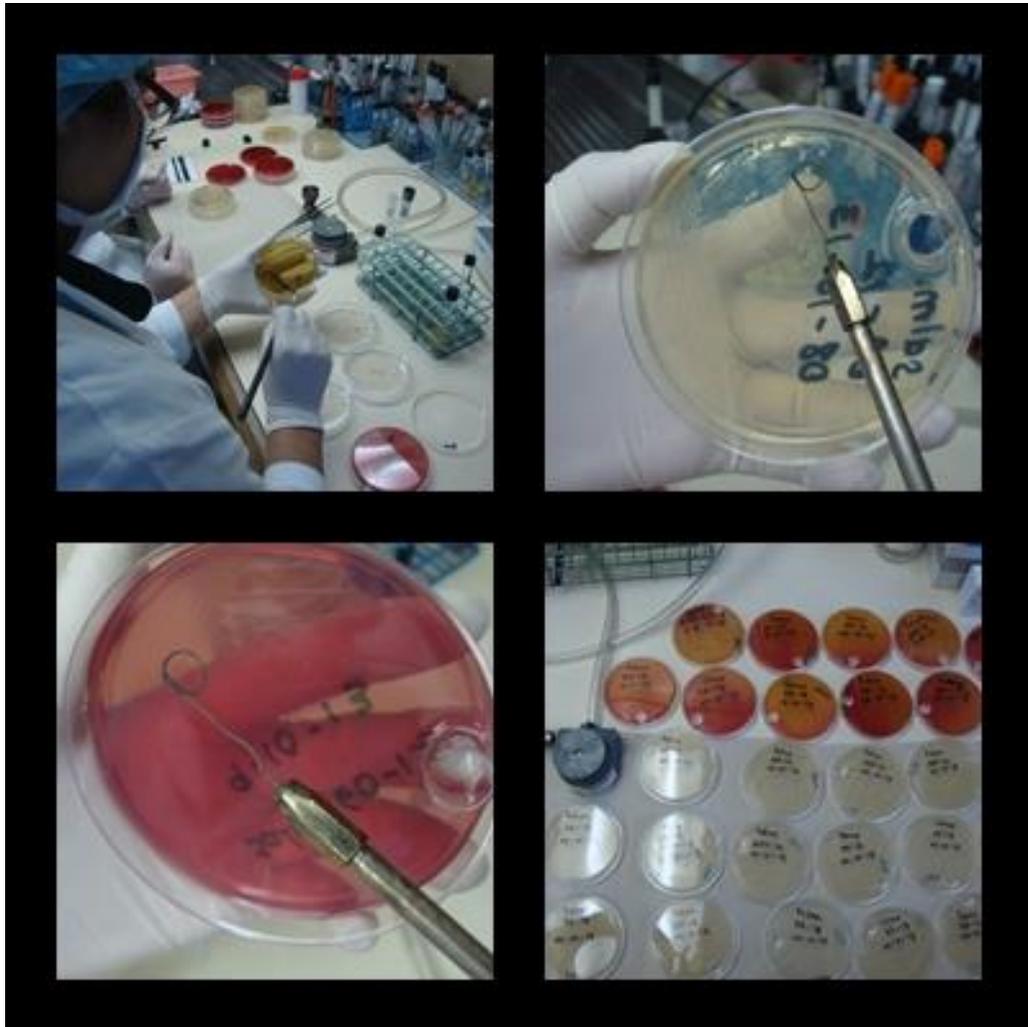


Fig. 19: En la siguiente imagen se muestra la inoculación de las cepas en el agar Mac Conkey y agar Tripticasa Soya.

INOCULACIÓN EN EL MEDIO TSI



Fig. 20: En la siguiente imagen se muestra la inoculación del TSI, el cual debe hacerse con un asa bacteriológica en punta.

INOCULACIÓN EN EL MEDIO MOVILIDAD



Fig.21: En la siguiente imagen se muestra la inoculación del medio de Movilidad, el cual se debe hacer con asa en punta.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO



Fig. 22: En siguiente imagen se muestran los pasos para la preparación del inóculo, la cual se debe preparar con colonias aisladas a partir del medio Trypticase Soya.

COMPARACIÓN DEL INOCULO CON LA ESCALA DE MAC FARLAND 0.5.

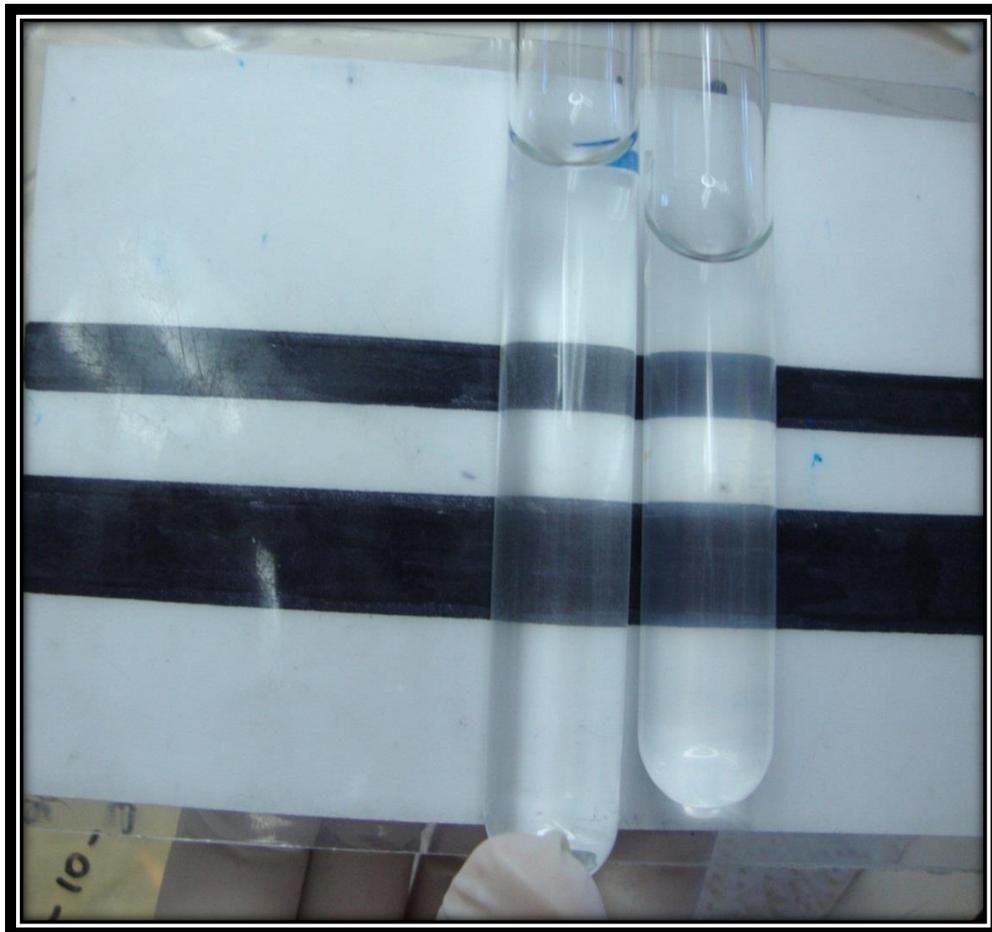


Fig. 23: Obsérvese la comparación del inóculo con la escala de Mac Farland 0.5, la cual se debe de realizar con la tabla cebra.

MÉTODO EPSILOMÉTRICO

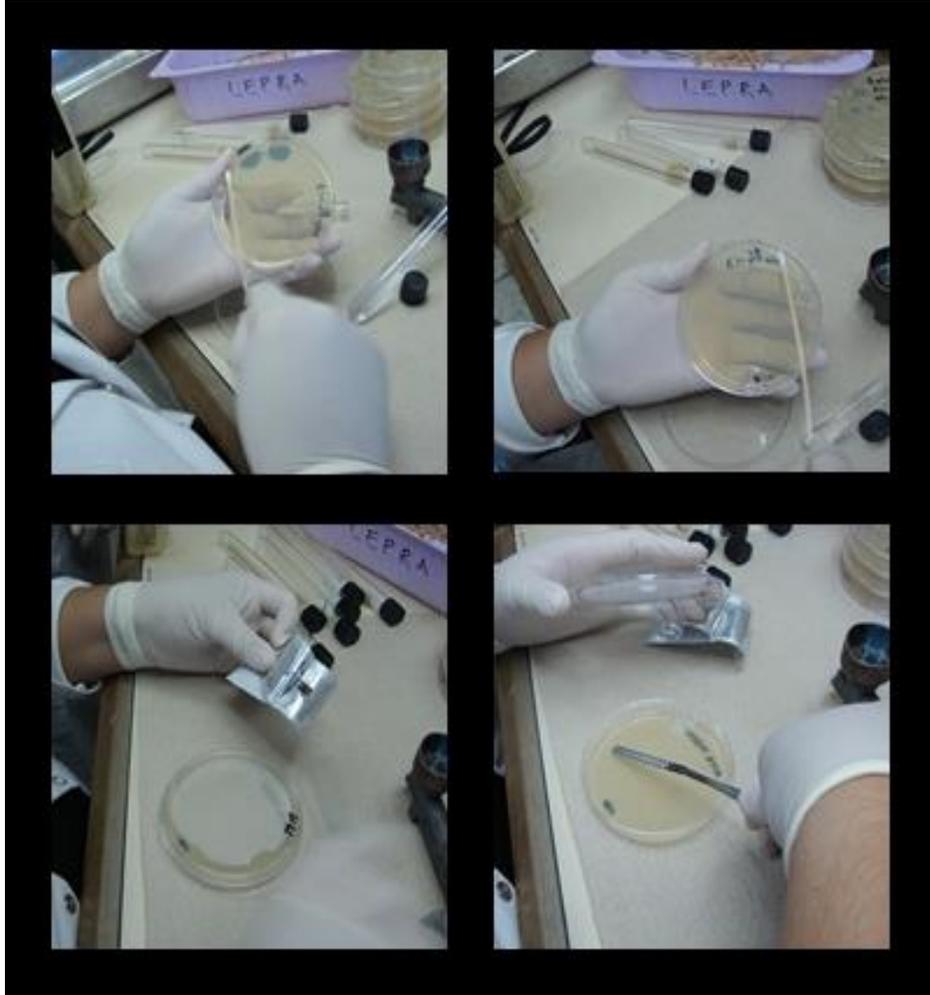


Fig. 24: Obsérvese el estriado en tres direcciones opuestas, y la colocación de la tira E-test que contiene el antibiótico de ciprofloxacina.

INCUBACIÓN DE LAS PLACAS



Fig. 25: Las placas deben ser incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

LECTURA DE PLACAS

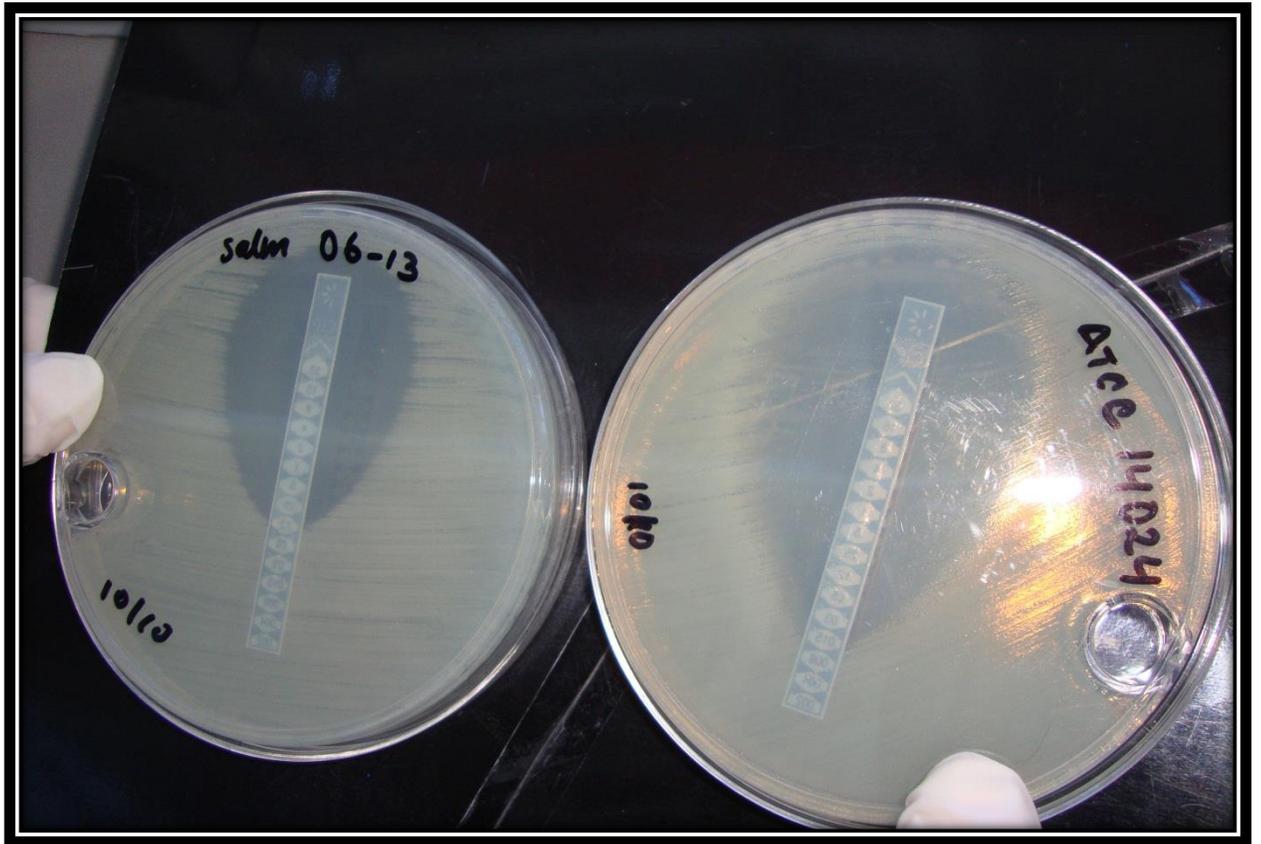


Fig. 26: Se debe leer la CIM de las placas por medio de la observación directa, detrás de un fondo oscuro y clasificar según las tablas de la CLSI.



Fig. 27: Personal del área de bacteriología, de izquierda a derecha: Jefe Licda. Zandra de Fuentes, Lic. Roberto Cardoza, Licda. Esmeralda Villatoro y Licda. Maria José Luna Boza y grupo investigador.