



**“ FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE
Pseudomonas aeruginosa EN MUESTRAS DE
HEMOCULTIVOS Y SU PATRÓN DE
SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA ”**

T E S I S

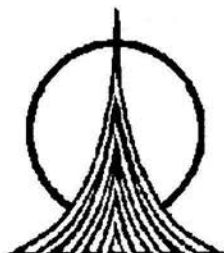
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

P R E S E N T A :

PAZ MANZUR SONIA IMELDA

DIRECTOR : DRA. LUZ ELENA ESPINOSA DE
LOS MONTEROS PÉREZ

ASESOR : M. EN C. RAQUEL CARIÑO CORTÉS



FES ZARAGOZA

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimiento

*A Jehová dios por darme la vida y su cuidado,
además de las muchas bendiciones entre las
cuales están conocerlo, contar con el apoyo
y amor de mi familia y cumplir con mis metas.*

*A mi madre Eleazar Manzur porque me ha dado la herencia
mas valiosa que un padre puede dar a un hijo, además de
brindarme su vida, amor y apoyo en todo
momento , pero sobre todo por darme el ejemplo de
seguir adelante a pesar de las adversidades,
por lo tanto mis logros también son suyos.*

*A Abiud porque aun en tiempos difíciles me
a apoyado y porque ha contribuido en gran
manera para cumplir mi meta, aunque esto
supusiera sacrificar las propias.*

*A Adami y Heli dos grandes tesoros que Jehová me
a dado y quienes mediante una sonrisa, un abrazo o
un beso me han dado fuerzas para continuar adelante,
aun cuando sacrifique parte de nuestro tiempo.*

*A mis hermanos Javier y Aleida por brindarme
siempre su apoyo y amor, además de ser
participes de mis éxitos y fracasos así como
a sus respectivos cónyuges Alexandra y John.*

*A mi tía Tere por su apoyo y a sus hijas Yess y Mari quienes
mas que mis primas han sido mis hermanas
con las que siempre puedo contar*

*A la Dra. Luz Elena por la oportunidad, paciencia,
disposición y tiempo para realizar este proyecto.*

*A la M. En C. Raquel quien me brindo su ayuda y el
tiempo para revisar este proyecto las veces que fuera
necesario además de sus valiosas sugerencias.*

*A los Químicos Maria Eugenia, Norma,
Rubén, Juan Carlos y Leticia quienes además
de compartir sus conocimientos me han
brindado lo más valioso su amistad y cariño.*

*A todo el personal del Laboratorio de Bacteriología quienes
siempre tuvieron la disposición de ayudarme.*

*A Marce por su amistad incondicional y
sobre todo porque siempre me ayudo.*

*A la Dra. Alison porque a pesar de no conocerme me
brindo la orientación y ayuda para terminar este trabajo.*

*A mis sinodales y profesores Mercedes, Víctor
y Pierre porque además de ser parte de mi
formación contribuyeron a la culminación de
este trabajo mediante su revisión y su oportunas
sugerencias.*

*A mis profesoras Reina, Lourdes y Celia quienes han
jugado un papel importante en mi desarrollo y que
además me brindaron su amista siempre.*

*A todos los profesores y personas que han contribuido
a lo largo de mi vida a alcanzar mis metas.*

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	
3.1. HEMOCULTIVO	3
3.2. BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES	3
3.2.1. Hábitat	4
3.2.2. Patogenicidad	4
3.2.3. Géneros y especies de importancia	5
3.2.4. Características	5
3.2.5. Identificación	5
3.2.5.1. Sistemas tradicionales	5
3.2.5.2. Sistemas instrumentales comerciales	9
3.2.5.2.1. Tubo Oxi/Ferm	9
3.2.5.2.2. Sistema API 20E	9
3.2.5.2.3. Sistema Flow N/F	9
3.3. EL GÉNERO <i>PSEUDOMONAS</i>	10
3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
3.4.1. Morfología	10
3.4.2. Requerimientos nutricionales	10
3.4.3. Distribución	11
3.4.4. Patogenicidad	11
3.4.4.1. Pili o Fimbrias	12
3.4.4.2. Cápsula polisacárida de alginato	12
3.4.4.3. Endotoxina	13
3.4.4.4. Exotoxina A	13
3.4.4.5. Exoenzima S	14
3.4.4.6. Elastasa	14
3.4.4.7. Proteasa alcalina	14
3.4.4.8. Fosfolipasa C	14
3.4.4.9. Citotoxina	15
3.4.4.10. Pigmentos y Sideróforos	15

3.4.5. Epidemiología	15
3.4.5.1. Proporción de infecciones nosocomiales	15
3.4.5.2. Reservorios inanimados	15
3.4.5.3. Reservorios animados	16
3.4.6. Importancia clínica	17
3.4.7. Aislamiento e identificación	19
3.4.8. Prevención y control	19
3.4.9. Tratamiento	21
3.4.10. Mecanismos de resistencia	22
3.5. ANTIBIÓTICOS	22
3.5.1. Definición	22
3.5.2. Métodos útiles para evaluar un antimicrobiano	24
3.5.2.1. Métodos de difusión	24
3.5.2.2. Métodos de dilución	24
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
5. OBJETIVOS	
5.1. OBJETIVO GENERAL	26
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	26
6. HIPÓTESIS	27
7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	
7.1. TIPO DE ESTUDIO	28
7.2. POBLACIÓN	28
7.3. VARIABLES	28
7.3.1 Variables independientes	28
7.3.2 Variables dependientes	28
7.4. MATERIAL Y EQUIPO	28
7.4.1. Cepas	28
7.4.2. Material de laboratorio	28
7.4.3. Medios de cultivo	29
7.4.4. Reactivos	29
7.4.5. Colorantes	29

7.4.6. Equipo	30
7.4.7. Pruebas bioquímicas	30
7.4.8. Antibióticos	30
7.5. MÉTODOS	30
7.5.1. Aislamiento de Bacilos gramnegativos no fermentadores.	30
7.5.2. Identificación de Bacilos gramnegativos no fermentadores.	30
7.5.3. Concentración Inhibitoria Mínima.	31
7.5.3.1. Preparación de soluciones madre para Antibióticos	31
7.5.3.1.1. Solución madre de amikacina, gentamicina, cefotaxima, ceftriaxona, cefepima, imipenem, meropenem, ciprofloxacino y levofloxacino	31
7.5.3.1.2. Solución madre de trimetoprim-sulfametoxazol	33
7.5.3.1.3. Solución madre de ticarcilina-ácido clavulánico	34
7.5.3.2. Preparación de placas	36
7.5.3.3. Preparación del inóculo	36
7.5.3.4. Inoculación de placas	36
7.5.3.5. Lectura e Interpretación	37
7.5.3.6. Manejo de resultados	38
8. RESULTADOS	
8.1. FRECUENCIA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
8.2. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA	41
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
10. CONCLUSIÓN	47
ANEXOS	48
1) Identificación de los bacilos gramnegativos no fermentadores	
2) Medios de cultivo	
3) Tinción	
4) Pruebas especiales	
5) Pruebas bioquímicas	
6) Cálculos	
BIBLIOGRAFÍA	49

1. RESUMEN

El hemocultivo como su nombre lo indica permite el cultivo de la sangre, para el desarrollo de o los agentes etiológicos causante de una bacteremia o una septicemia.

Los bacilos gramnegativos no fermentadores son causantes de una gran parte de las bacteremias y septicemias en el ámbito hospitalario. Esto se debe a la baja necesidad de nutrientes, que les permite sobrevivir en superficies inanimadas y poder ser parte de la flora transitoria de las manos de médicos y enfermeras. Aunque este grupo de microorganismo consta de diferentes géneros, el más importante es *Pseudomonas* debido la frecuencia con la que se le relaciona con enfermedades de tipo oportunista.

De este género, *Pseudomonas aeruginosa* es el bacilo gramnegativo no fermentador mas estudiado debido a: la frecuencia con la que se encuentra y la capacidad que tiene de adquirir mecanismos de resistencia.

Aunque es incapaz de causar enfermedades en personas sanas, es un patógeno oportunista que causa severas infecciones en las personas inmunocomprometidas o cuyas defensas están dañadas por diversas circunstancias tales como pacientes con cáncer, antibióticoterapias de amplio espectro, quimioterapias, etc.

Pseudomonas aeruginosa es causante de una gran variedad de infecciones; debido a que se introduce en zonas desprovistas de defensas, se fija a la mucosa o a la piel y las coloniza, las invade de manera local y produce enfermedad general. Estos procesos encuentran apoyo en los factores de virulencia.

Por lo anterior, en el presente trabajo se buscó y seleccionó a las cepas identificadas como bacilos gramnegativos no fermentadores, procedentes de hemocultivos, en el periodo de Enero de 1999 a Septiembre del 2002. El total de bacilos gramnegativos no fermentadores recuperados y aislados, ascendió a 223 a estos se les identifico por medio de pruebas bioquímicas. Al concluir la identificación de los bacilos no fermentadores, se encontró que 123 (55.15%) de estos eran *Pseudomonas aeruginosa* y las restantes pertenecían a otros géneros además de *Pseudomonas*.

A las cepas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* se les determinó la susceptibilidad antibiótica a diferentes antimicrobianos utilizando el Método de Concentración Inhibitoria Mínima por dilución en placa. Los antibióticos más eficaces *in vitro* fueron Levofloxacin, Ciprofloxacino y Gentamicina cuya sensibilidad fue mayor al 90%. Por otra parte la Ceftriaxona y la Cefotaxima mostraron sensibilidades inferiores al 13%.

2. INTRODUCCIÓN

Debido a que en las infecciones los microorganismos tienen la capacidad de invadir el torrente sanguíneo, el cultivo de sangre permite identificar al microorganismo causante de una septicemia o una bacteremia.

En la actualidad los bacilos gramnegativos han adquirido relevancia clínica debido a que son causantes de entre 6.6 a 10% de las infecciones nosocomiales de allí la importancia de identificarlos. Aunque géneros como *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, y *Burkholderia* están adquiriendo relevancia clínica, no debemos olvidarse que *Pseudomonas aeruginosa* es el microorganismo más estudiado debido a la frecuencia con que se aísla y la capacidad de resistencia a los antibióticos que comúnmente se usan.

El contacto de *Pseudomonas aeruginosa* con el ser humano es amplio, ya que se encontrar en el suelo, agua, plantas incluyendo frutas y verduras. Este microorganismo es oportunista y por su habilidad para sobrevivir en ambientes acuosos, es causa de la tercera parte de las infecciones oportunistas en humanas, sobre todo en ambientes hospitalarios ya que la podemos encontrar en una variedad de soluciones acuosas incluyendo desinfectantes, ungüentos, jabones, fluidos de irrigación, gotas oftálmicas, entre otros; además que lo encontramos como reservorio en equipos de diálisis, trampas de fregaderos, baños de hidroterapia, en equipos de terapia respiratoria y en regaderas. La colonización aumenta en pacientes hospitalizados, particularmente aquellos que están hospitalizados por periodos prolongados y/o son sometidos a terapias antimicrobianas de amplio espectro o quimioterapias.

Pseudomonas aeruginosa se puede alojar en cualquier tejido, pero es más frecuente en: oído, ojos, aparato respiratorio, digestivo, circulatorio, sistema urinario, nervioso, osteoarticular y piel. Su crecimiento en los tejidos depende ampliamente de su capacidad para resistir la ingestión por parte de los neutrófilos y a los factores de virulencia que posee este microorganismo.

La terapia antimicrobiana de las infecciones por *Pseudomonas* es frustrante, puesto que los pacientes infectados con mecanismos de defensa deprimidos, se muestran incapaces de potenciar la actividad antibiótica y *Pseudomonas* posee una resistencia a la mayoría de los antibióticos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. HEMOCULTIVO

Es importante recordar que la sangre es estéril, por lo que la identificación de bacterias contenidos en ella indica una bacteremia o una septicemia. Definimos como bacteriemia la presencia de bacterias en la sangre que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos; mientras que como septicemia se denominar el síndrome clínico con el que se manifiestan las bacteriemias, independientemente del resultado de los hemocultivos. El hemocultivo es un procedimiento que permite el cultivo de la sangre, su importancia en microbiología clínica es el de establecer con certeza el agente etiológico.

Los agentes infecciosos tienen la capacidad de invadir el torrente sanguíneo sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, que están expuestos a cateterismo, prótesis o que por su circunstancia se encuentran por periodos largos en centros hospitalarios. ^(1, 2)

El número de muestras que deben extraerse y en que período, dependen de la gravedad clínica de la enfermedad, generalmente se recogen 2-3 muestras en un período de 24 h, a menos que el paciente presente shock séptico o sea necesario iniciar inmediatamente la administración de antibióticos; las tomas de sangre se deben separar por lo menos 30-60 min. Se debe de recoger un volumen grande de sangre, puesto que más de la mitad de todos los pacientes con septicemia presentan menos de un microorganismo por mililitro de sangre. Se recogen 20 ml de sangre en los adultos, 5 a 10 ml en niños y 1 a 2 ml en recién nacidos para cada hemocultivo. La sangre se inocula en un medio enriquecido, se incuba a 37° C e inspecciona a intervalos regulares para buscar crecimiento microbiano hasta por dos semanas.

Si se desarrollan microorganismos a partir de los hemocultivos, es necesario entonces determinar su significado descartando un error técnico. Los siguientes criterios pueden ser de utilidad en la diferenciación de los positivos "verdaderos" de las muestras contaminadas.

- Desarrollo del mismo tipo de microorganismo en cultivos repetidos: Bacteremia.
- Desarrollo de un gran número de un solo tipo de microorganismo en cultivos repetidos: Bacteremia.
- Pequeño número de varios microorganismos diferentes: Probable contaminación
- La aparición en un solo de los varios cultivos de la flora común de la piel *Staphylococcus epidermidis*, *S. albus* y *Propionibacterium*: Probable contaminación. La presencia de tales microorganismos en más de un cultivo o en cultivos de médula ósea además de hemocultivo, aumentan la posibilidad de bacteremia clínicamente significativa. ⁽³⁾

3.2. BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES

Las bacterias gramnegativas son causantes de alrededor de 50% de los casos de sepsis y, al menos la mitad de los pacientes hospitalizados, tienen un hemocultivo positivo. Entre el 50 y 60% de las bacteriemias producidas por bacterias gramnegativas se complican con

shock séptico. Esto se debe a la baja necesidad de nutrientes, lo que les permite sobrevivir durante periodos prolongados en superficies inanimadas, poder ser parte de la flora transitoria de las manos de médicos y enfermeras y la elevada mortalidad atribuible comparada con otros bacilos gramnegativos. Otro de los aspectos por el cual es interesante el estudio de los bacilos no fermentadores es la susceptibilidad a los antibióticos ya que estos microorganismos con frecuencia presentan una elevada resistencia.^(4, 5, 6)

Dentro de los microorganismos denominados bacilos gramnegativos, se encuentra un amplio grupo con características especiales, a este se le llama bacilos gramnegativos no fermentadores, estos son un grupo heterogéneo de microorganismos aerobios, no formadores de esporas, que son incapaces de utilizar hidratos de carbono como fuentes de energía a través de la vía fermentativa, sin embargo algunos de ellos tienen la capacidad de utilizar algunos hidratos de carbono mediante la vía oxidativa.⁽⁵⁾

La glucosa es la principal fuente de hidratos de carbono para las bacterias y la degradación bacteriana ocurre por diferentes vías; los bacilos gramnegativos no fermentadores utilizan la vía Entner-Doudoroff también denominada vía aerobia porque requiere de oxígeno para la glucólisis. En esta vía la glucosa es oxidada a 6-fosfogluconato y 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato antes que se forme ácido pirúvico. Algunas bacterias utilizan vías de derivación a través de las cuales la glucosa es oxidada directamente a ácido glucurónico y cetoglucurónico sin la fosforilación inicial. En cualquier caso, se forma ácido pirúvico. Al carecer de la enzima deshidrogenasa necesaria para oxidar el ácido pirúvico a ácido láctico y otros ácidos mixtos, las bacterias oxidativas transfieren los iones hidrógeno disponibles del ácido pirúvico al ciclo de Krebs donde los iones finalmente se unen con oxígeno para formar agua.⁽⁷⁾

3.2.1. Hábitat

Los bacilos gramnegativos no fermentadores son organismos ambientales que pueden encontrarse en la naturaleza como habitantes del suelo, agua, plantas, incluyendo frutas y vegetales. Su capacidad para crecer en ambientes acuosos, secos o a elevadas temperaturas les permite ser microorganismos oportunistas causantes de infecciones intrahospitalarias al alojarse en soluciones, desinfectantes, jabones, fluidos para diálisis, ventiladores, tuberías, etc. Estos microorganismos aprovechan cualquier estado de alteración o debilitamiento del huésped para infectarlo (la inmunodeficiencia, el uso de medicamentos potentes, maniobras instrumentales y prolongados procedimientos quirúrgicos, entre otros).⁽⁸⁾

3.2.2. Patogenicidad

La patogenicidad de los bacilos gramnegativos no fermentadores depende de su capacidad de adherirse al epitelio y la producción de uno o varios productos que incrementan su virulencia tales como: Cápsula, Endotoxina, Exotoxina A, Exoenzima S, Elastasa, Proteasa, Fosfolipasa, Citotoxina, Pigmentos y Sideróforos.⁽⁹⁾

3.2.3. Géneros y especie de importancia

Las bacterias gramnegativas que no fermentan glucosa forman aproximadamente el 15% de los aislamientos que se encuentran en el laboratorio de microbiología clínica. El género predominante es *Pseudomonas* y de este género el más frecuente es *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo hay otras especies como *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. putida*, entre otras. A este género le siguen otros géneros pequeños como son: *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*. Estos constantemente sufren reclasificación debido a las técnicas innovadoras que permiten una mejor diferenciación. ^(1, 10, 11, 12)

3.2.4. Características morfológicas y bioquímicas.

Cuando un microorganismo cuya tinción de Gram muestra la presencia de un bacilo gramnegativo y una o más de las siguientes características se puede sospechar de la presencia de un no fermentador:

- Ausencia evidente de fermentación de la glucosa. El medio que se usa para demostrar la utilización de la glucosa es el agar-hierro de Kligler o el agar TSI, en este no se evidencia un cambio de color si el microorganismo es un no fermentador, ya que los ácidos producidos por el microorganismo son más débiles que los producidos en la fermentación.
- Reacción de oxidasa positiva.
- Sin crecimiento en agar MacConkey.

Sin embargo ninguna de estas pruebas sería definitiva para determinar que el microorganismo en estudio es un no fermentador, por ello se realizarán otras pruebas que den evidencias concretas para identificar a un no fermentador en un género y especie determinados. ⁽⁷⁾

3.2.5. Identificación

Aunque los bacilos gramnegativos no fermentadores constituyen un pequeño porcentaje de los aislamientos totales, en general requieren un mayor esfuerzo para su identificación debido a que los microbiólogos están menos familiarizados con estos, muchas especies se hallan infrecuentemente y con frecuencia requieren pruebas especiales. ^(7, 8, 10)

3.2.5.1. Sistemas tradicionales

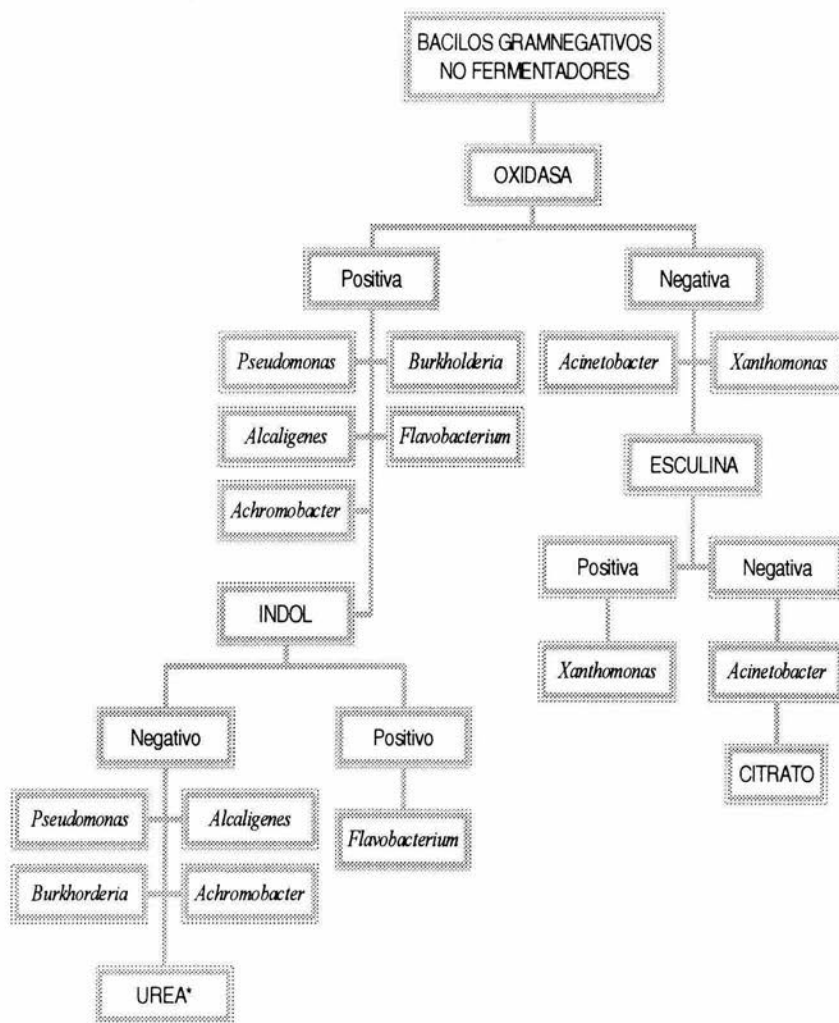
Para la identificación de los bacilos gramnegativos se han diseñado diferentes esquemas los cuales se basan en diferentes criterios según el punto de vista del autor. De los esquemas que se han realizado con el fin de identificar a los no fermentadores los que poseen datos más amplios son los diseñados por Pickett, Gilardi y Weaver-Hollis. Los esquemas difieren entre sí en algunas pruebas, pero concuerdan en la mayoría lo que indica que cada autor utiliza su propio criterio para decidir que pruebas son más esenciales y de mayor peso para la identificación.

En los laboratorios actualmente se emplean varios esquemas, entre los que se encuentran los ya mencionados, sin embargo en muchos laboratorios se emplean híbridos de los procedimientos de prueba utilizados en esquemas publicados. La elección del enfoque es en gran medida una cuestión de preferencia personal, experiencia previa y disponibilidad de los medios de cultivo necesarios para efectuar las diversas pruebas, siempre y cuando se cumplan con los siguientes criterios:

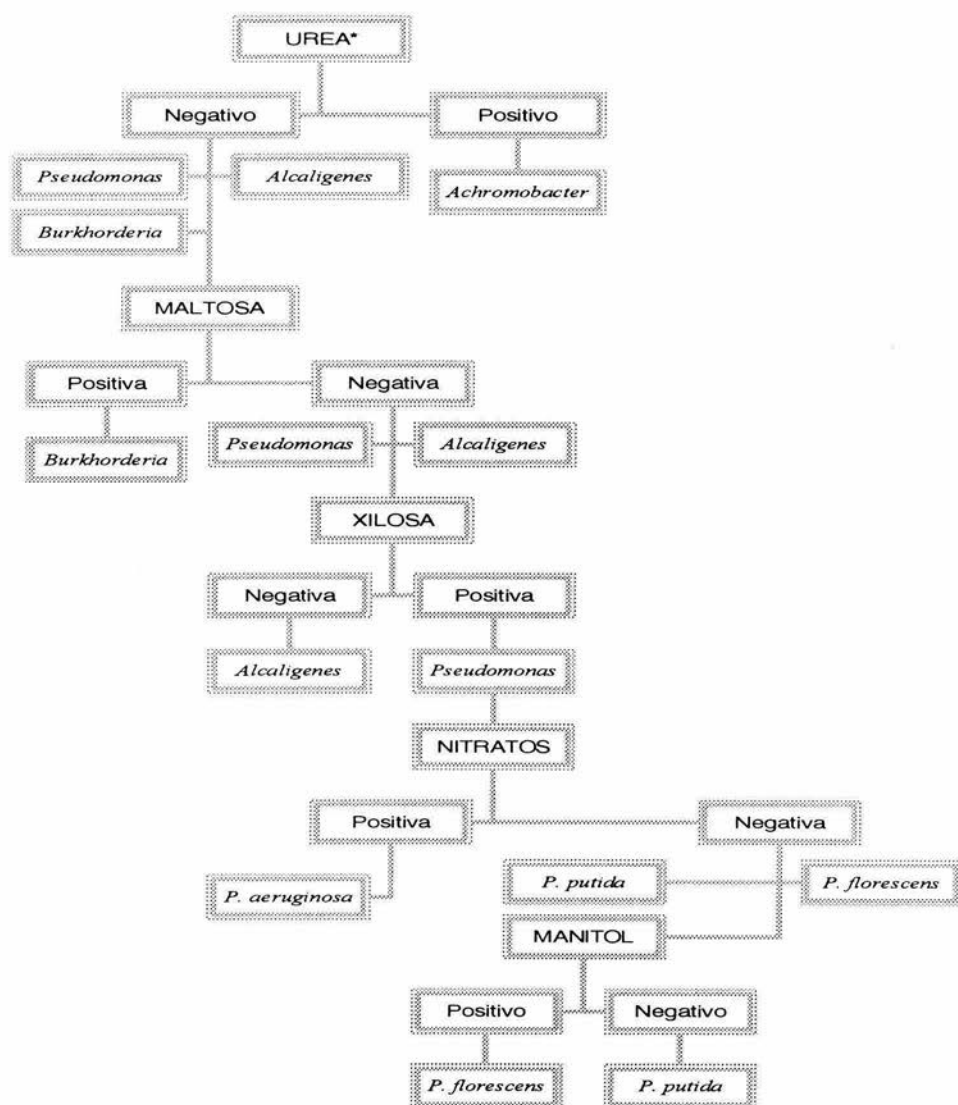
- Los resultados positivos y negativos especificados en el cuadro de identificación deben basarse en los procedimientos y fórmulas listadas en el manual de procedimientos del laboratorio
- Todas las reacciones listadas en el cuadro de identificación deben tener un nivel de confianza del 90% o más.
- Todas las pruebas deben efectuarse bajo control de calidad estándar para asegurar que los reactivos, reacciones y puntos finales se acercan lo más posible a aquellos en los cuales se basó originalmente el cuadro. ⁽⁷⁾

Una de las tareas en este trabajo, fue seleccionar las pruebas que se utilizarían para identificar a los bacilos gramnegativos no fermentadores tomando en cuenta: los criterios anteriores, los microorganismos más frecuentemente encontrados en el hospital y los medios de los que se disponía. De esta manera se logró seleccionar las pruebas necesarias para diferenciar a los no fermentadores, elaborando un diagrama que fuera separando a los géneros y posteriormente las especies; por otra parte también se realizó un cuadro de lecturas, que permitió agilizar la identificación de los bacilos gramnegativos no fermentadores.

El diagrama que se realizó es el siguiente.



* Continuación siguiente pagina



La tabla de lecturas para la identificación de los géneros y especies se encuentra en el Anexo 1. (7, 8, 10, 11, 12, 13, 14)

3.2.5.2. Sistemas instrumentales comerciales

Los sistemas instrumentales comerciales se han diseñado para la identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores. Estos sistemas son convenientes ya que tienen una vida útil prolongada y eliminan la necesidad de suministrar frascos de medios y reactivos, también proporcionan técnicas estandarizadas que son exactas y dan resultados reproducibles.

Los problemas inherentes de estos sistemas comerciales son: 1) la tendencia de los microorganismos con una actividad bioquímica débil o retardada dan reacciones falsas negativas, 2) el diseño no óptimo de muchos sistemas comerciales para el cultivo de ciertos no fermentadores y 3) la inclusión de algunas pruebas diferenciales que pueden no ser aplicables a la identificación de un no fermentador.

A continuación se presentan algunos de estos sistemas comerciales de identificación disponibles en el mercado. ⁽⁷⁾

3.2.5.2.1. Tubo Oxi/Ferm.

Es un tubo de plástico con forma de lápiz cuyo contenido es estéril y está dividido en 8 compartimentos separados, cada uno con un pico de flauta de agar hidratado. Una aguja inoculadora corre por toda la longitud del tubo y está ubicada para pasar a través del centro de cada pico de flauta de agar. La punta de la aguja inoculadora se usa para muestrear la parte superior de varias colonias del microorganismo, la inoculación se logra tironeando de la aguja a través del centro del tubo. El tubo se incuba a 35° C durante 48 h y las reacciones se interpretan visualmente observando los cambios de color y las reacciones positivas y negativas se comparan con una matriz en tablero o datos de base computarizados para la identificación final. ⁽⁷⁾

3.2.5.2.2. Sistema API 20E

El sistema consiste en una tira de plástico de 20 cúpulas en miniatura que contienen sustratos deshidratados y una cámara plástica de incubación. Cada cúpula tiene un pequeño agujero en la parte superior a través de la cual puede inocularse una suspensión bacteriana con una pipeta. Se prepara una suspensión bacteriana en 5 ml de solución salina estéril al 0.85%, la turbidez del inóculo se compara con un estándar de 0.5 de Mac Farland. Se inoculan las cúpulas y se incuban por 24 a 48 h. Las reacciones positivas y negativas se convierten en un número de biotipo de 7 dígitos y la identificación se logra a partir de datos de base computarizados o de una lista de perfiles proporcionados por el fabricante. ⁽⁷⁾

3.2.5.2.3. Sistema Flow N/F

Este sistema consta de dos tubos de medio en forma de flauta y una rueda con 11 componentes periféricos y 1 compartimiento central con una variedad de sustratos. El tubo con constricción detecta la fermentación de la glucosa y producción de fluoresceína en el pico de flauta. El tubo sin constricción llamado 42P se usa para evaluar crecimiento a 42° C y producción de piocianina ambos se incuban a 42° C.

Inicialmente se inoculan los dos tubos por punción y se incuban, si la reacción en los tubos no es compatible para *P. aeruginosa* se prepara una suspensión bacteriana con 2 ml de agua estéril y el crecimiento del tubo con constricción y se agrega una gota a cada uno de los pocillos periféricos y el agar del pocillo central se inocula por punción profunda. Se tapa la rueda y se incuba a 35° C por 18 a 24 h. Las reacciones se interpretan visualmente y la identificación se hace usando un esquema lógico o un programa computarizado.⁽⁷⁾

3.3. EL GÉNERO *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* son ubicuas y se encuentran en agua, suelo, plantas incluyendo frutas y verduras. Este género contiene más de 140 especies la mayoría saprofitos, sin embargo a unas 25 especies se les asocia con el humano, sobre todo en casos de infecciones oportunistas.

El género *Pseudomonas* comprende bacterias gramnegativas, de metabolismo oxidativo, que producen citocromooxidasa y catalasa, son móviles por uno o más flagelos polares y no forman esporas. Por años se ha reclasificado a los microorganismos que pertenecen a este género, esto se debe a las técnicas innovadoras como la hibridación de ácidos nucleicos que permite relacionar y clasificar a las distintas especies. La proporción de guanina más citocina del DNA de *Pseudomonas* es de 58 a 70 mol %.^(10, 14, 15)

Dentro de el género *Pseudomonas* la especie que a recibido mayor atención es *Pseudomonas aeruginosa* debido a dos causas, primera la frecuencia con la que está envuelta en enfermedades humanas y segunda las infecciones producidas por este microorganismo normalmente son severas y difíciles de tratar debido a la resistencia de este a muchos antibióticos que son favorecidos por la condición inmunocomprometida del huésped.⁽¹³⁾

3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

3.4.1 .Morfología

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo recto o ligeramente curvo, no esporulado, que mide 1.5 a 5 µm de largo y 0.5 a 1 µm de ancho. Se puede encontrar de manera aislada, en pares y ocasionalmente, en cadenas cortas. Es móvil por ello poseen un singular flagelo polar, pero ocasionalmente tiene 2 o 3 flagelos.^(13, 15)

3.4.2.Requerimientos nutricionales

Aunque estos microorganismos se definen como aerobios obligados, es decir que el oxígeno actúa como aceptor terminal de electrones, es posible su crecimiento en condiciones de anaerobiosis usando nitrato o arginina como aceptores terminales de electrones. Sus requerimientos nutricionales son mínimos y usan de manera impresionante compuestos naturales y artificiales como fuente de carbono.

Pseudomonas aeruginosa no fermenta los carbohidratos y si utiliza alguno de ellos lo hace de manera oxidativa, además es extremadamente adaptable ya que puede metabolizar más de 80 compuestos orgánicos para su crecimiento. ^(1, 15, 16, 17)

3.4.3. Distribución

Pseudomonas aeruginosa no se encuentra como parte de la flora microbiana de individuos sanos, sin embargo es capaz de colonizar de manera transitoria la piel y el tracto intestinal de humanos y animales. También lo podemos encontrar en otros sitios húmedos del cuerpo que incluyen garganta, la mucosa nasal y otras zonas como axilas y peritoneo. Aunque es incapaz de causar enfermedades en personas sanas, es un patógeno oportunista que causa severas infecciones en las personas inmunocomprometidas o cuyas defensas están dañadas por diversas circunstancias tales como pacientes con cáncer, antibióticoterapias de amplio espectro, quimioterapias, etc. Por su habilidad de sobrevivir en ambientes acuosos, estos organismos causan problemas principalmente en el ambiente hospitalario. *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra en una variedad de soluciones acuosas incluyendo desinfectantes, ungüentos, jabones, fluidos de irrigación, gotas de ojos, sueros salinos, agua destilada, etc. Los fregaderos, los baños de hidroterapia, las regaderas, los equipos de terapia respiratoria y los humidificadores son importantes reservorios. *Pseudomonas aeruginosa* se puede encontrar también en piscinas, tinas calientes, soluciones de lentes de contacto, cosméticos, drogas inyectables ilícitas y todas éstas son fuentes de infección. ^(10, 13, 15, 17, 18, 19)

3.4.4. Patogenicidad

Pseudomonas aeruginosa no produce enfermedades en personas sanas, sin embargo es patógena para las personas inmunocomprometidas (debido a procedimientos quirúrgicos invasivos, la cateterización prolongada, traumatismos graves como quemaduras y heridas, etc). Por otra parte el tracto respiratorio de los niños y los adultos jóvenes que padecen fibrosis quística (FQ) terminan invariablemente por ser colonizados por variantes altamente mucosas.

Cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas, la bacteria se fija a la mucosa o a la piel y las coloniza, las invade de manera local y produce enfermedad general. Estos procesos encuentran apoyo en los factores de virulencia producidas por *Pseudomonas aeruginosa* los cuales se muestran en la figura 1. ^(3, 10)

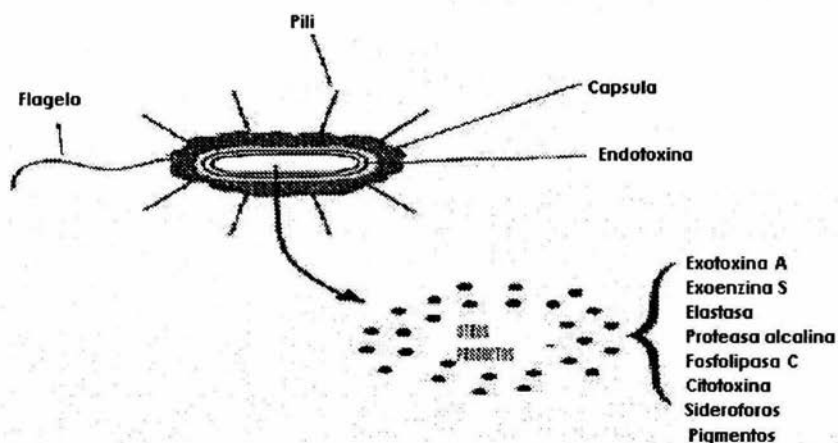


FIGURA 1. *Pseudomonas aeruginosa* y sus factores de patogenicidad.

3.4.4.1. Pili o fimbrias

Los pili son estructuras cortas, parecidas al pelo, que intervienen en la adherencia a las células huésped o facilitan el intercambio de DNA durante la conjugación bacteriana. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* estas estructuras median la adherencia de la bacteria al epitelio respiratorio. La *Pseudomonas aeruginosa* no se adhiere al epitelio intacto normal. *In vitro*, los pili actúan como adhesinas en las células epiteliales bucales y traqueales, pero no se han identificado las moléculas receptoras en las células epiteliales. Las cepas con pili se adhieren mejor al epitelio traqueal lesionado que las cepas sin pili. ^(7, 20)

3.4.4.2. Cápsula

Muchas bacterias están rodeadas por una capa de polisacárido que a veces se denomina cápsula, capa de moco (slime) o glicocalix, dependiendo de su afinidad relativa por la célula bacteriana. Estos polisacáridos se parecen a los producidos por ciertas algas marinas, de ahí su nombre "alginato". Están formados por un polímero de ácido D-manurónico y L-gulurónico que se unen por medio de un enlace β (1,4). La producción de alginato es frecuentemente llamada mucóide porque la colonia que lo produce tiene un aspecto mucóide. Esta capa mucosa es particularmente evidente en aislamientos de personas con FQ, donde la relación volumen / peso de la capa puede exceder el de la célula bacteriana entera. Los polisacáridos permiten que las bacterias se adhieran entre sí, formando microcolonias en los pulmones de los enfermos con neumonía por *Pseudomonas aeruginosa* y la matriz aniónica circundante también protege a la gran masa bacteriana de los fagocitos y de la acción de los anticuerpos y del complemento. Se cree que el alginato es necesario para la persistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en los pacientes con FQ. Aunque sólo 0.8 al 2% de todas las infecciones por *Pseudomonas* se deben a las cepas mucoides, 80 a 90% de los pacientes con FQ presentan infecciones

pulmonares por cepas de *Pseudomonas* productoras de alginato. Las cepas de *Pseudomonas* que inician la infección en el árbol traqueobronqueal no son mucoides, pero el crecimiento en los pulmones con FQ inicia un cambio fenotípico que hace que los microorganismos dejen de expresar pili y antígeno O y empiecen a sintetizar alginato. Los pulmones con FQ son un sitio ideal para la activación de la síntesis de alginato porque contienen concentraciones altas de iones sodio, potasio, cloro y calcio que permiten que los microorganismos crezcan como microcolonias gelatinosas rodeadas de alginato. Se atribuyen diversas propiedades al alginato pero quizás la más importante es su capacidad para evitar que las *Pseudomonas* sean fagocitadas y mueran a causa de los polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos alveolares. ^(10, 14, 16)

3.4.4.3. Endotoxina

Al igual que sucede con otros bacilos gramnegativos, *Pseudomonas* poseen una endotoxina lipolisacárida que constituye un antígeno fundamental de la pared celular. La mayor parte de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* tienen este lipopolisacárido, aunque las cepas mucoides son ásperas. Expresan más de un tipo antigénico "O" y las condiciones de desarrollo afectan la expresión del antígeno. Las *Pseudomonas* con lipolisacárido liso son resistentes a la actividad bactericida del suero, pero los que tienen lipolisacárido rugoso son sensibles. La producción de alginato y la expresión del antígeno "O" son inversas, de modo que las cepas que producen alginato, dejan de expresar antígeno "O". ^(1, 10, 16)

3.4.4.4. Exotoxina A

Uno de los factores de virulencia más importante producido por las cepas patogénicas de *Pseudomonas aeruginosa*, es la exotoxina A. Esta toxina compuesta por dos fragmentos A y B, bloquea la síntesis de proteínas en las células eucarióticas lo cual lleva a la necrosis; inicialmente se une a receptores específicos en la membrana celular, una vez que el fragmento B se une a receptores de la célula, el fragmento A penetra en ella; y dentro el fragmento A catalizará la unión del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) al factor de elongación 2 (necesario para la translocación de las cadenas polipeptídicas nacientes en el ribosoma) y la reacción conduce a la formación irreversible de un difosfato de adenosina ribosa que forma un complejo con el factor de elongación y se libera dicotinamida e hidrógeno. Más del 90% de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* producen esta proteína y su síntesis está regulada por el hierro, con máxima expresión cuando los niveles de hierro son bajos. A pesar de su baja toxicidad para las células humanas, la exotoxina A parece que representa un importante papel en la enfermedad humana, ya que la muerte se correlaciona con una respuesta pobre de anticuerpos frente a la toxina. Además las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que no sintetizan esta exotoxina son avirulentas en el modelo animal. ^(1, 10, 17)

3.4.4.5. Exoenzima S

Esta toxina extracelular es producida aproximadamente por el 90% de los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* y puede inhibir la síntesis de proteínas distintas del factor de elongación 2. Entre sus blancos se encuentran la vimentina y diversas proteínas que se enlazan con el triptofano de guanosina (GTP). Como esta proteína de enlace GTP participa en el desplazamiento de los lisosomas, es probable que proteja a la *Pseudomonas aeruginosa* de los polimorfonucleares y macrófagos. Las exotoxinas A y S son ADP-ribosil transferasas, pero se diferencian por el carácter termoestable de la exoenzima S. ^(1, 10, 16)

3.4.4.6. Elastasa

La elastina es una proteína que forma cerca del 30% de las proteínas en el tejido pulmonar. Su nombre se debe al hecho de que permite al tejido tener las propiedades elásticas necesarias, y dado que el pulmón tiene la función de succionar y expulsar aire éste requiere de expansión y reducción de los alvéolos. La elastina es además un importante componente de la pared celular de vasos sanguíneos, la elastasa es una enzima capaz de catalizar la destrucción de las fibras elásticas en las paredes de los vasos sanguíneos, lo que conduce a las lesiones hemorrágicas (ectima gangrenoso) que se encuentra en las infecciones diseminadas. ^(1, 17)

3.4.4.7. Proteasa alcalina

Se sabe menos acerca de ésta, pero se cree que esta contribuye a la inmunosupresión y necrosis porque rompe gran diversidad de proteínas del huésped, incluso interleucina 2 y diversas moléculas de adhesión leucocitaria. ⁽¹⁶⁾

3.4.4.8 Fosfolipasa C

La fosfolipasa C descompone los lípidos y la lecitina con la que se facilita la destrucción tisular. *Pseudomonas aeruginosa* produce dos tipos la hemolítica y la no hemolítica, ambas degradan la fosforilcolina, que es el constituyente principal de la sustancia tensoactiva pulmonar. La degradación de la fosforilcolina libera diacilglicerol y colina, produce atelectacia, estimula más síntesis de fosfolipasa C hemolítica y conduce a la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Estos productos del metabolismo de araquidonato tal vez contribuyen a los cambios patológicos que ocurren en los pulmones de sujetos con FQ e infecciones pulmonares crónicas. Los principales productos de la actividad de la fosfolipasa C también son osmoprotectores y es probable que protejan la bacteria de la presión osmótica elevada que está presente en los pulmones de estos pacientes. ^(1, 16)

3.4.4.9. Citotoxina

La citotoxina originalmente se llamaba leucocidina por su capacidad para matar polimorfonucleares. Ésta se enlaza con la membrana de las células huésped, forma huecos de 1 nm en la membrana y desestabiliza la integridad de la misma. ⁽¹⁶⁾

3.4.4.10. Pigmentos y Sideróforos

Pseudomonas aeruginosa pueden producir varios pigmentos, entre los cuales podemos mencionar la piocianina, la pioverdina y la piorrubina. La producción de piocianina se ha usado por mucho tiempo como un rasgo de diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa*, pero también puede funcionar como un factor de la virulencia. La piocianina se ha encontrado en el daño de tejido endotelial *in vitro*, y una explicación de cómo la piocianina pudiera mediar el daño del tejido, es la siguiente: la piocianina que es un derivado de la fenazina este puede catalizar la conversión de NADH-dependiente de oxígeno a superóxido y peróxido de hidrógeno. Estos dos reactivos formados del oxígeno son más tóxicos que el oxígeno, pero son mucho menos tóxicos que otros reactivos formados del oxígeno o radicales hidroxilo.

Las bacterias requieren hierro para invadir el tejido del huésped. Hay muy poco hierro libre en los líquidos corporales. En lugar de ello el hierro extracelular forma complejos con transferrina y lactoferrina. *Pseudomonas aeruginosa* utiliza algunos de sus sideróforos para obtener hierro de la transferrina estos son la pioverdina y la pioquelina.

En sus formas libre y ligada, el hierro puede catalizar la conversión del radical superóxido y peróxido dentro del radical hidroxilo, capaz de causar daño tisular.

Así, la combinación de la piocianina y pioquelina, ambos son producidos por la bacteria que crece en el huésped, podría hacer una contribución significativa al daño tisular, especialmente en áreas ricas en oxígeno como el pulmón. ^(16, 17)

3.4.5. EPIDEMIOLOGÍA

3.4.5.1. Proporción de infecciones nosocomiales.

Durante 1987-1997, *Pseudomonas aeruginosa* se consideraba el quinto patógeno nosocomial más común y fue relacionado como el agente causal del 10% de infecciones nosocomiales reportadas. En el tracto urinario, *Pseudomonas aeruginosa* fue el segundo patógeno más común, mientras en casos de pulmonía era el patógeno principal. ⁽⁹⁾

3.4.5.2. Reservorios inanimados.

Los mayores vehículos para *Pseudomonas aeruginosa* se transmiten dentro de los hospitales y son comida y agua de grifo. Los vegetales son los alimentos mas comúnmente contaminados, y las proporciones de cultivos positivos de ensaladas han ido de 11% a 44%. La concentración de *Pseudomonas aeruginosa* en vegetales individuales o en ensaladas ha sido de 10^3 UFC/g. En sistemas de agua de grifo calientes y fríos en

hospitales parecen ser sumamente bajo, como evidenciado por los frecuentes cultivos negativos en la mayoría de las escenas.

Estudios para determinar si los aislamientos medioambientales de *Pseudomonas aeruginosa* causan colonización o infección de pacientes han implicado las fuentes potenciales como, suministro de agua de grifo, sifón del grifo, fregadero o lava cubeta, desagüe del fregadero, fuente de agua o la máquina de hielo, vórtice o tanque de hidroterapia, agua para humidificación, agua destilada, agua estéril, agua no estéril. Los microorganismos son sensibles a la sequedad, de modo que no se diseminan con facilidad sobre fomites. En vez de ello, a menudo se diseminan a través del agua que se emplea para limpieza de respiradores, nebulizadores, así como las flores que traen los visitantes o ensaladas verdes de consumo. La simple recuperación de *Pseudomonas* en una fuente ambiental significa muy poco sin evidencia epidemiológica de que la zona contaminada actúa como reservorio de infecciones. ^(1, 9, 17, 18)

3.4.5.3. Reservorios animados.

La colonización de pacientes por *Pseudomonas aeruginosa* constituye un importante reservorio, particularmente en unidades de cuidado especial donde se exponen pacientes a antibióticos de amplio espectro, dispositivos médicos, y las manos de personal de salud. Los estudios de cultivos han mostrado que la tasa de colonización es de 4% a 58% en pacientes onco-hematológicos, 13 a 39% en pacientes Unidad de cuidados Intensivos (UCI), 19 a 43% en pacientes de cirugía y 2% a 51% en unidades de cuidado especial de bebés. Los pacientes con alto riesgo son quienes tienen menor número y funcionalidad de polimorfonucleares, o alguna afección que hace que la superficie del cuerpo sea adecuada para que las *Pseudomonas* se adhieran y crezcan. Así mismo se encuentran personas que han recibido antibióticos intravenosos de amplio espectro y quienes padecen diabetes mellitus, leucemia, neutropenia, FQ, quemaduras, úlceras oculares, lesiones traumáticas o tienen un catéter fijo. Factores que se han asociado en estudios individuales con un incremento en el riesgo de colonización incluyen ileostomía o colestomía, intubación traqueal, traqueotomía, ventilación mecánica, terapias antimicrobianas de amplio espectro, anterior hospitalización, edad mayor de 65 años, anterior cirugía gastrointestinal y anemia. *Pseudomonas* frecuentemente es adquirida después de entrar a hospitalización y la proporción de pacientes con cultivos positivos normalmente aumenta por lo menos 50%. El sitio más común del que se recupera *Pseudomonas aeruginosa* es el recto y en la mayoría de los estudios, por lo menos 80% de pacientes colonizados puede ser descubierto por cultivos de ese sitio. La faringe normalmente es el segundo sitio más común de cultivos positivos, aunque la proporción del transporte más alta se ha informado de vez en cuando para el perineo y la orina. ^(9, 18)

3.4.6. Importancia clínica

Pseudomonas aeruginosa es el más importante patógeno humano del género *Pseudomonas* con respecto al número y tipo de infecciones causadas y asociadas a la morbilidad y mortandad.

Este patógeno puede infectar cualquier tejido como se muestra en la figura 2.

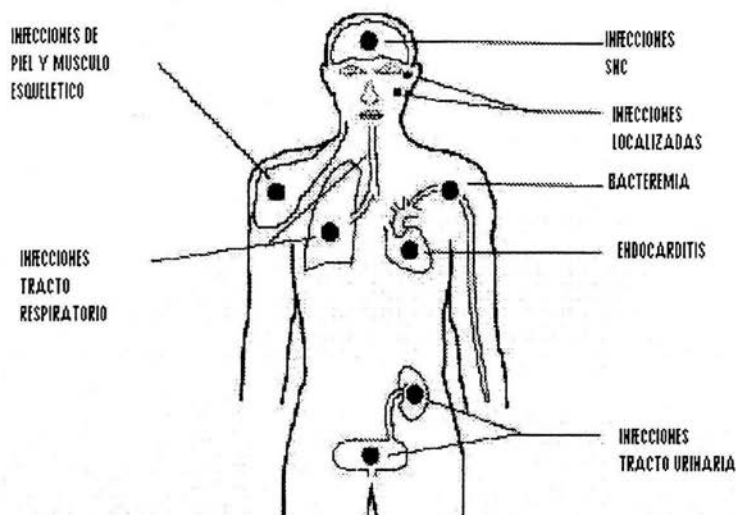


FIGURA 2. Infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

El espectro de enfermedades causadas por este agente va desde las infecciones superficiales de la piel a sepsis.

La comunidad que adquiere infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* son individuos inmunocomprometidos, estas tienden a ser localizadas y frecuentemente se asocian a contaminación del agua o soluciones. La disminución de las defensas del huésped pueden deberse a la rotura de la integridad de la piel (quemaduras), el uso de dispositivos médicos como, catéter intravenoso, sondas urinarias, tubos endotraqueales o la presencia de una enfermedad subyacente (cáncer, FQ). ^(1, 10, 14, 15, 16)

La tabla 1 muestra que individuos son más predisponentes a cada tipo de infección y la fuente donde se adquiere.

Tipo de infección	Fuente de Infección	Sujetos de riesgo
Foliculitis	Piscinas, tinas calientes y esponjas contaminadas.	Lesiones cutáneas
Bacteremia	Infecciones del tracto respiratorio, tracto urinario, la piel y los tejidos blandos (quemaduras infectadas)	Pacientes con neutropenia, diabetes mellitus, quemaduras, neoplasias malignas hematológicas.
Auditivas.	Piscinas	Nadadores o personas involucradas con deportes acuáticos.
Sistema nervioso central (meningitis y abscesos cerebrales).	Traumatismos, diseminación hematógica por extensión directa o a partir de infecciones auriculares crónicas o sinusitis	Personas con cáncer
Oculares	Soluciones de lentes de contacto y el uso de agua de grifo durante el cuidado de los lentes.	Personas que utilizan lentes de contacto.
Osteomielitis de calcáneo	Almohadilla del zapato de lona.	Niños
Endocarditis	Drogas inyectables contaminadas (mas que la droga en si el material y el agua que se utilizan para su preparación)	Personas que se administran drogas inyectables.
Huesos y articulaciones.	Diseminación hematógica a partir del sitio de infección o por extensión directa de la infección a partir del sitio contiguo.	Personas que usan drogas vía hematógica, infecciones urinarias o pélvicas.
Tracto respiratorio.	Equipo de ventilación o nebulizadores contaminados.	pacientes con enfermedades pulmonares crónicas o insuficiencias cardíacas congénitas, cáncer y neutropenias.
Vías urinarias	Sonda	Pacientes con sondas urinarias, prostatitis crónica o cálculos renales.

TABLA 1. Infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, fuentes de infección y sujetos en riesgo.

3.4.7. Aislamiento e identificación

Debido a que *Pseudomonas aeruginosa* requiere nutrientes muy simples, esta crece fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo, sus colonias alcanzan un diámetro entre 1.5 a 3 mm tras una incubación de 18 a 20 h a 37° C. Sus colonias son planas extendidas y de bordes irregulares. *Pseudomonas aeruginosa* produce un olor dulzón como de uvas maduras o como de tortilla de maíz y puede diferenciarse de otras bacterias por su crecimiento a 42° C.

En agar sangre las colonias son planas, con aspecto rugoso o de vidrio molido y beta hemolíticas. Estas colonias pueden alcanzar un diámetro de 3-5 mm de diámetro a las 48 h de incubación. Las cepas mucosas se aíslan principalmente de pacientes con FQ y pueden tener un color azul verdoso o verde amarillento y son extremadamente mucosas, el material mucoso puede ser tan abundante que llega a deslizarse sobre la placa cuando esta se inclina. ^(3, 7, 10, 14)

Más del 95% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* puede identificarse observando la presencia de tres características primarias: 1) Pigmento piocianina, 2) Pigmento fluoresceína y 3) Actividad de citocromo oxidasa.

- 1) La mayor parte de las cepas produce piocianina, un pigmento de fenacina verde e hidrosoluble que imparte un color verdoso al medio de cultivo. El Agar *Pseudomonas* P o medio King A potencia la elaboración de la piocianina. La detección del olor como de uvas también es un indicio útil cuando se examina el crecimiento en placas; las colonias son grandes, pueden ser mucoide o secas y a menudo se dispersan, algunas cepas pueden producir pigmentos de otros colores: piorrubina (rojo), piomielina (marrón o negro) y pioverdina (amarillo).
- 2) La fluoresceína puede observarse con el uso de una fuente de luz ultravioleta de onda corta (lámpara de Wood). El Medio *Pseudomonas* F o medio King B (medio que contienen proteosa peptona y cationes con magnesio) aumentan la síntesis de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina. El agar Mueller-Hinton también es adecuada para demostrar la fluoresceína. La producción de fluoresceína puede incrementarse si los cultivos se incuban de 20 a 30° C en lugar de 35 a 37° C.
- 3) *Pseudomonas aeruginosa* es oxidasa positiva.

Existen características adicionales útiles para identificar cepas no productoras de pigmento de *Pseudomonas aeruginosa*: crecimiento a 42° C, alcalinización de acetamida, presencia de nitratos y nitritos, movilidad por medio de flagelos, entre otros. ⁽⁷⁾

3.4.8. Prevención y control

Las medidas de prevención y control de las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* requieren atención, tanto en el cuidado del paciente, como del ambiente hospitalario y se describen en la tabla 2 según la fuente de contaminación.

Fuente de contaminación	Medidas de Prevención
Agua de grifo.	Supervisión constante de los sistemas de distribución (principalmente después de almacenamiento y/o tratamiento).
Agua no estéril (baños de agua y agua de floreros)	No deben de estar en áreas de cuidado de pacientes o en áreas donde se prepara equipo médico o se guarda el mismo.
Dispositivos de humidificación.	Uso de agua estéril en los dispositivos de humidificación
Antisépticos y desinfectantes	Sobre todo aquellos que deben de mezclarse se deben de usar a concentraciones adecuadas y deben de ser activos contra no fermentadores.
Equipo médico (endoscopios, hemodializadores o componentes reutilizables de dispositivos respiratorios)	Éstos deben esterilizarse o desinfectarse.
Viales multidosis	Evitar su uso en lo posible
Personal sanitario	Debe de darse mucho énfasis a las practicas asépticas de rutina y tener mucho cuidado en el manejo del paciente de tal forma que se evite el traslado del microorganismo de sitios colonizados a sitios no colonizados susceptibles a infección. Cuando los brotes son causados por transmisión paciente a paciente, la atención aumentada a las prácticas asépticas es la medida del mando primaria.
Escenarios de alto-riesgo	Vigilancia periódica para descubrir la incidencia de casos esporádicos o la ocurrencia de casos en grupo debido a no fermentadores. En los casos en grupo debe investigarse para identificar el campo de transmisión o en el medio ambiente la fuente de transmisión para prevenir potencialmente casos.
Comida	Excluir en la dieta de los pacientes inmunocomprometidos verduras crudas.

TABLA 2. Fuentes de contaminación de *Pseudomonas aeruginosa* y sus medidas de prevención.

En cuanto a las medidas de prevención y control con vacunas y antibióticos están las siguientes:

- Para infecciones establecidas, utilice terapia antibiótica apropiada, incluyendo dosis completas y combinación de regímenes, cuando es indicado. Esto es especialmente importante para sepsis y neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. Cuando emerge la resistencia probablemente, el monitoreo bacteriológico durante la terapia se justifica.
- Es absolutamente necesario evitar el uso inapropiado de antibióticos de amplio espectro, puesto que estos fármacos suprimen la flora microbiana normal y permiten por tanto la proliferación de *Pseudomonas* resistentes. El uso juicioso de los antibióticos debe ayudar a prevenir la adquisición o emergencia favorablemente de multiresistencia en *Pseudomonas aeruginosa*.
- La vacuna de tipo apropiado administrada a los pacientes de alto riesgo, brindan cierta protección contra la sepsis por *Pseudomonas*. Este tratamiento se ha empleado de manera experimental en pacientes con leucemia, quemaduras, FQ e inmunosupresión. ^(1, 3, 9)

3.4.9. Tratamiento

La comunidad de la que se aísla *Pseudomonas aeruginosa* es usualmente susceptible a las penicilinas antipseudomonas (ticarcilina y piperacilina), los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), quinolonas (ciprofloxacina), cefalosporinas (cefoperazona, ceftazidima) y carbapenems (meropenem e imipenem). La susceptibilidad es menos predecible para otras cefalosporinas de amplio espectro (ceftriaxona y cefotaxima), y el monobactámico aztreonam. El organismo es uniformemente resistente a penicilinas antiestafilocócicas, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, tetraciclinas, macrólidos, rifampina, cloranfenicol, cefalosporinas de bajo y amplio espectro, y cefalosporinas orales de amplio espectro (cefixima y cefpodoxima).

Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* adquiridos nosocomialmente tiende a ser más resistencia a agentes antimicrobianos que las que adquieren en la comunidad, frecuentemente despliega resistencia de múltiples clases a agentes antimicrobianos. El desarrollo de resistencia durante la monoterapia con cualquier agente por los activos de la pared (penicilinas antipseudomonas, cefoperazona y ceftazidima) o ciprofloxacina ocurren frecuentemente.

Las pruebas de susceptibilidad de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de secreciones respiratorias de pacientes con FQ presentan un especial desafío en microbiología clínica por dos razones. Primero, varias diferencias morfológicas son a menudo presentes en esputo de estos pacientes. Aunque frecuentemente se relacionan clonalmente, estos morfotipos individuales pueden tener diferentes antibiogramas. Pruebas individuales de morfotipos son de intensa labor y extensas. Estudios hechos al comparar pruebas de morfotipos individuales con pruebas de mezclas de estos morfotipos han demostrado que pruebas a morfotipos-mixtos no demuestran resistencia con tanta precisión como lo hacen los morfotipos individuales. Segundo, la exactitud de las pruebas comerciales de susceptibilidad disponibles para el morfotipo mucoide sólo se han evaluado en el E-test. Aunque estas técnicas mostraron buena correlación tomando

como método de referencia la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), es demasiado caro para las pruebas de la rutina. Hasta la evaluación de pruebas comerciales de susceptibilidad disponibles, la Fundación de FQ recomienda las pruebas de difusión en disco de *Pseudomonas aeruginosa* recuperada de pacientes con FQ.

En la fase final de la infección pulmonar crónica de FQ, *Pseudomonas aeruginosa* puede ser resistente a los agentes antimicrobianos disponibles. En estos pacientes, la dosis alta de tobramicina en aerosol puede ser de valor. Debe notarse que usando esta estrategia del tratamiento, la concentración utilizada del tobramicina en las vías aéreas debe estar en un rango de 100 un 200 g/ml de la secreción. Por consiguiente, los laboratorios involucrados en el cuidado de estos pacientes deben poder ofrecer pruebas de CIM o E-pruebas para determinar el CIM de tobramicina de estos organismos resistentes, especialmente en los rangos de 200 mcg/ml. ⁽¹⁵⁾

El éxito en la terapia para las infecciones de *Pseudomonas*, requiere en general empleo combinado de aminoglucósidos (tobramicina) y betalactámicos antipseudomonas (azlocilina, piperacilina o ceftazidima). ^(1, 10)

3.4.10. Mecanismos de resistencia

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo que presenta resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, lo que conlleva a una clara reducción de las posibilidades terapéuticas. Por otra parte, es un microorganismo con extraordinaria capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia por lo general mediante mutaciones.

Durante años se ha invocado a su baja permeabilidad de su membrana externa como elemento clave para explicar su resistencia natural. La permeabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* para compuestos hidrófilos es baja, esto se debe fundamentalmente, a que tanto la estructura como la capacidad funcional de la porina principal de este microorganismo limita significativamente el paso de los antimicrobianos. Aunque si bien es cierto que su escasa permeabilidad de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* interviene en el mecanismo de resistencia intrínseca, probablemente el factor más importante sean las bombas de expulsión que muestran la capacidad de esta bacteria para eliminar los antimicrobianos que penetran a la misma, empleando para ello sistemas de expulsión activa.

Así mismo los aislamientos clínicos expresan una β -lactamasas cromosómica de clase C (no inhibible por los inhibidores de las β -lactamasas habituales, como el ácido clavulánico) que contribuye a la resistencia a muchos de los β -lactámicos de uso clínico.

La presencia de betalactamasas plasmídicas es menos frecuente que en enterobacterias. Las más habitualmente conocidas son las conocidas con las siglas PSE (Enzima específica para *Pseudomonas*) estas se caracterizan por hidrolizar ticarcilina y piperacilina. Debido a esto es tan importante que se realicen los patrones de susceptibilidad. ^(21, 22)

3.5. ANTIBIÓTICOS

3.5.1. Definición.

Un antibiótico es un compuesto producido por un microorganismo que es capaz de inhibir el crecimiento de otro u otros microorganismos por lo cual se le denomina agente

antimicrobiano. Un agente antimicrobiano es una droga que actúa contra microorganismos infecciosos y cada agente antimicrobiano difiere en cuanto a su mecanismo de acción.^(1, 7)

Existen 5 diferentes mecanismos de acción de los antibióticos y son los siguientes: Inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, Inhibición de la síntesis de proteínas, Inhibición de la síntesis de ácido nucleico, Alteración de la membrana celular y Actividad antimetabólica o antagonismo competitivo.

Como se utilizaron diferentes clases de antibióticos la tabla 3 muestra el mecanismo de acción de cada uno de ellos.^(7, 23, 24)

Antibiótico	Clase	Mecanismo de acción
Ticarcilina	Penicilinas	Inhibición del paso final en la síntesis de la pared celular bacteriana.
Ácido clavulánico	Actividad antibiótica insignificante cuando se administra solo.	Inhibidor de β -lactamasas que en combinación con penicilinas y cefalosporinas potencia su actividad.
Cefotaxima	Cefalosporina de tercera generación	Inhibición del paso final en la síntesis de la pared celular bacteriana.
Ceftriaxona	Cefalosporina de tercera generación	Inhibición del paso final en la síntesis de la pared celular bacteriana.
Cefepima	Cefalosporina de cuarta generación	Inhibición del paso final en la síntesis de la pared celular bacteriana.
Imipenem	Carbapenems	Inhibición del paso final en la síntesis de la pared celular bacteriana.
Meropenem	Carbapenems	Inhibición del paso final en la síntesis de la pared celular bacteriana.
Amikacina	Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis de la proteína bacteriana mediante el bloqueo de la formación del complejo de iniciación, se fija a 30S.
Gentamicina	Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis de la proteína bacteriana mediante el bloqueo de la formación del complejo de iniciación, se fija a 30S.
Ciprofloxacino	Quinolonas	Inhibición de la DNA girasa bacteriana.
Levofloxacino	Quinolonas	Inhibición de la DNA girasa bacteriana.
Trimetoprim-Sulfametoxazol	Sulfamidas	Ambos inhiben la síntesis del ácido fólico.

TABLA 3. Mecanismo de acción de los antibióticos utilizados.

3.5.2. Métodos útiles para evaluar un antimicrobiano.

El aislamiento de un agente infeccioso a partir de un paciente con frecuencia no es suficiente para establecer la terapia adecuada. Muchas bacterias presentan resistencia a los agentes antimicrobianos y los patrones de resistencia cambian constantemente. Como no puede predecirse la susceptibilidad de las bacterias, con frecuencia es necesario estudiar la sensibilidad individualmente de cada agente a estas drogas, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado (el más activo contra el patógeno, el menos tóxico para el huésped, con las características farmacológicas apropiadas y el más económico), que proporciona mayores posibilidades de una evolución favorable.

Con este fin se desarrolló el antibiograma que trata de reproducir *in vitro* la situación en la que se encuentra el microorganismo infectante en el huésped humano, para determinar su posible sensibilidad a los antibióticos.

Para determinar la sensibilidad se enfrenta al microorganismo a estudiar con distintas concentraciones de antimicrobianos en condiciones estándar. Las diferentes técnicas emplean los antimicrobianos incorporándolos a medios de cultivo líquidos o sólidos (técnicas de dilución) o la difusión del antimicrobiano contenido en un disco de papel de filtro en un medio sólido (técnica de difusión). ^(7, 8, 14.)

3.5.2.1 Métodos de difusión

Es un método muy utilizado en la clínica; su fundamento es sencillo: se inocula un agar nutritivo y sobre su superficie se aplican discos de papel impregnados con antimicrobiano. Tras un período de incubación se obtienen alrededor del disco una zona de inhibición de crecimiento (sensible) y el diámetro de la zona determina el grado de susceptibilidad del microorganismo al antimicrobiano.

3.5.2.2. Métodos de dilución

La dilución es el método cuantitativo de referencia para la determinación de la susceptibilidad y la resistencia de los microorganismos. Su fundamento es la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio de cultivo.

Inicialmente se utilizaron medios de cultivo líquidos (caldo) y posteriormente, al describirse un sistema de inoculó múltiple para la superficie de placas de agar (inoculador de Steers), se popularizó el método en medio sólido. Los resultados obtenidos permiten clasificar a los microorganismos como sensibles, moderadamente sensibles (intermedios) y resistentes. El método de dilución más utilizado es la CIM. ⁽¹⁴⁾

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años la recuperación en hemocultivos de bacilos gramnegativos no fermentadores de las muestras clínicas ha ido en aumento, por ello la necesidad de identificarlos. El microorganismo aislado con mayor frecuencia es *Pseudomonas aeruginosa* que causa procesos patológicos en sujetos inmunocomprometidos aprovechando las condiciones críticas del paciente. También tiene la capacidad de adquirir resistencia a diversos antibióticos. La resistencia a los antimicrobianos es un problema creciente que se observa notablemente en hospitales y en la comunidad.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Conocer la frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* en cepas aisladas de hemocultivo en pacientes pediátricos en el periodo de enero de 1999 a septiembre del 2002 así como el patrón de susceptibilidad antibiótica.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar mediante pruebas bioquímicas a los bacilos gramnegativos no fermentadores aisladas de hemocultivos en pacientes pediátricos en el periodo de enero de 1999 a septiembre del 2002.
- Conocer la frecuencia con que se aísla *Pseudomonas aeruginosa* a partir de hemocultivos en pacientes pediátricos.
- Conocer el patrón de susceptibilidad antibiótica de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de hemocultivos.

6. HIPÓTESIS

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que infecta produciendo bacteremias y septicemias. Por lo tanto se identificara un gran número de *Pseudomonas aeruginosa* y la gran mayoría de éstas presentará resistencia a los antibióticos probados.

7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

7.1. TIPO DE ESTUDIO

El estudio es transversal, retrospectivo.

7.2. POBLACIÓN

Del Banco de Cepas del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", se buscarán los bacilos gramnegativos no fermentadores, procedentes de aislamientos de hemocultivos, en el periodo que abarca de enero de 1999 a septiembre de 2002 y se les identificará, posteriormente se seleccionara solo a aquellos aislamientos identificados como *Pseudomonas aeruginosa*.

7.3. VARIABLES

7.3.1. Variables independientes

- Período de enero de 1999 a septiembre del 2002
- Antibióticos

7.3.2. Variables dependientes

- Frecuencia
- Concentración Inhibitoria Mínima

7.4. MATERIAL Y EQUIPO

7.4.1. Cepas

- Cepas identificadas como bacilos gramnegativos no fermentadores que proceden de hemocultivos de pacientes pediátricos del Hospital Infantil "Federico Gómez".
- Cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*.

7.4.2. Material de laboratorio

- Asa bacteriológica
- Asa bacteriológica recta
- Cajas de Petri
- Mechero
- Porta objetos

- Tubos de ensaye
- Gradillas
- Matraces erlenmeyer
- Aplicadores
- Tripie
- Malla de asbesto.
- Jeringa dispensadora o dispensador
- Papel filtro.
- Pipetas graduadas
- Replicador de Steers

7.4.3. Medios de cultivo

- Caldo BHI DIBICO
- Caldo Mueller Hinton BIOXON
- Agar Sangre BBL
- Agar Mueller Hinton BIOXON
- Agar Soya Trypticase BIOXON
- Mac Conkey BIOXON
- Agar Hierro Kligler BBL
- Medio O/F BBL
- Agar Citrato de Simmons BBL
- Medio de Nitratos
- Agar Urea de Christensen BBL
- Agar Esculina
- Gelatina MERK
- Medio SIM BIOXON

7.4.4. Reactivos

- Solución salina
- Agua
- Dimetil-p-fenilendiamina-a-naftol
- Peróxido de hidrógeno
- Alcohol cetona
- Glucosa
- Manosa
- Manitol
- Maltosa
- Xilosa
- Arginina

7.4.4. Colorantes

- Lugol
- Cristal violeta
- Safranina

7.4.5. Equipo

- Incubadora de 37° C
- Incubadora de 42° C
- Refrigerador
- Microscopio
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Campana de flujo laminar

7.4.7. Antibióticos

- Ticarcilina-clavulanato
- Cefotaxima
- Ceftriaxona
- Cefepima
- Imipenem
- Meropenem
- Amikacina
- Gentamicina
- Ciprofloxacino
- Levofloxacino
- Trimetoprim-sulfametoxazol

7.6.5. MÉTODOS

7.5.1. Aislamiento de Bacilos gramnegativos no fermentadores.

Se recopilaron datos sobre todos los bacilos gramnegativos no fermentadores recuperados de hemocultivos en el periodo de Enero de 1999 a Septiembre del 2002 en el Hospital Infantil de México y se realizó una depuración de datos debido a que algunas muestras eran del mismo paciente y de fechas cercanas; entonces se procedió a:

- Buscar en el banco de cepas a los bacilos identificados como no fermentadores y sepáralos.
- Sembrar en Agar Sangre e incubar a 35° C por 18 a 24 h.
- De las cajas que tengan crecimiento seleccionar una colonia y sembrar en Agar Soya Trypticase por estría cruzada para obtener un crecimiento masivo y puro que permita realizar las pruebas complementarias a la identificación y la susceptibilidad antibiótica.

7.5.2. Identificación de Bacilos gramnegativos no fermentadores.

Ya que se tenían las cepas puras se procedió a:

- Realizar tinción de gram (ver Anexo 3) y observar al microscopio.

- Realizar prueba de oxidasa. (ver Anexo 4)
- Realizar prueba de catalasa. (ver Anexo 4)
- Tomar una colonia aislada e inocular el Agar Hierro Kligler. (ver Anexo 5)
- Inocular la batería de pruebas bioquímicas. (ver Anexo 5)
- Sembrar en Agar Mueller-Hinton e incubar a 35° C y a 42° C por 18-24 h y observar que cepas producen pigmento.
- Identificar con tablas.
- Guardar en medio especial para su conservación.
- Seleccionar las cepas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* que presentaron las siguientes características:

Oxidasa	+
Citrato	+
Nitratos	+
Esculina	-
Indol	-
Arginina	+
Oxidación de la glucosa	+
Oxidación de la maltosa	-
Crecimiento a 42° C	+

7.5.3. Concentración Inhibitoria Mínima.

Definimos CIM como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el desarrollo de una bacteria.

A continuación se describe la forma en la que se realiza el procedimiento para los antibióticos solos.

Por separado se describe el procedimiento de los antibióticos combinados ya que las proporciones para los antibióticos combinados es diferentes cada uno tiene un procedimiento diferente.

7.5.3.1 Preparación de las soluciones Madre de los Antibióticos.

7.5.3.1.1. Solución madre de Amikacina, Gentamicina, Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefepima, Imipenem, Meropenem, Ciprofloxacino y Levofloxacino.

- Pesar la cantidad de antibiótico puro necesario, basándose en la siguiente formula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg)}}$$

Donde:

Volumen: 20 ml.

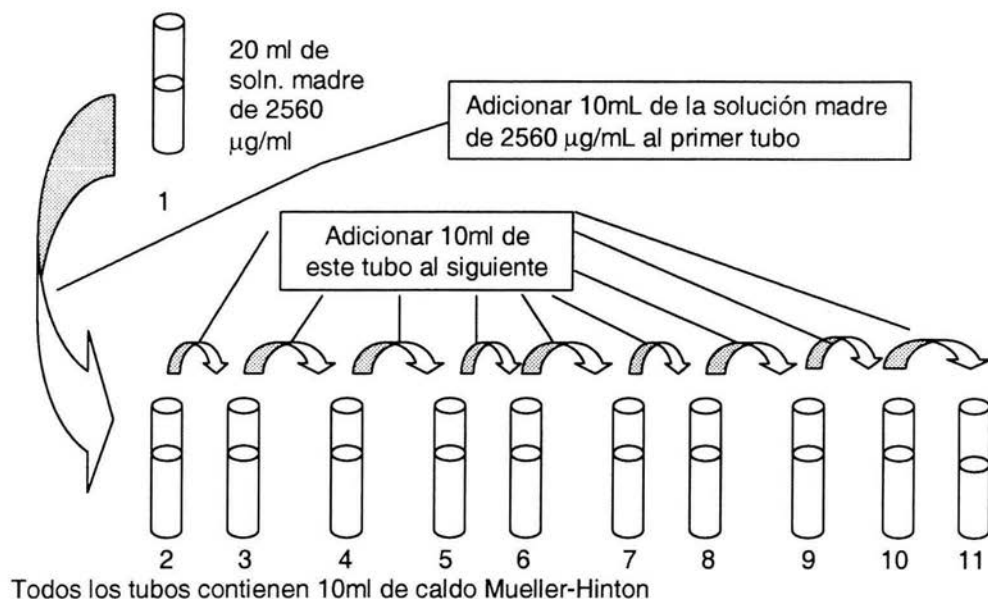
Concentración: 2560 µg/ml.

Potencia: varía según el antibiótico

- Disolver el antibiótico pesado en una cantidad mínima de solvente apropiado (algunos antibióticos requieren solventes diferentes al agua, estos se muestran en la tabla 4).
- Agregar agua o solución reguladora hasta aforar a 20 ml de acuerdo a lo que muestra la tabla 4.
- Preparar 10 tubos y hacer diluciones seriadas 1:2 para obtener soluciones de antibiótico a las siguientes concentraciones 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 y 2.5 µg/ml (Figura 3).

Antibiótico	Potencia µg/mg	Solvente	Diluyente
Cefepima	515.3	Solución reguladora de fosfatos pH=6, 0.1 M	Solución reguladora de fosfatos pH=6, 0.1 M
Cefotaxima	925.44	Agua	Agua
Ceftriaxona	1000	Agua	Agua
Amikacina	931	Agua	Agua
Gentamicina	714.8	Agua	Agua
Levofloxacin	933	½ volumen de agua y 0.1 M NaOH hasta disolver	Agua
Ciprofloxacino	1003	Agua	Agua
Imipenem	990	Solución reguladora de fosfatos pH=7, 0.01 M	Solución reguladora de fosfatos pH=7, 0.01 M
Meropenem	997	Agua	Agua

TABLA 4. Solventes y diluyentes empleado para cada antibiótico así como la potencia de cada antibiótico.



Las concentraciones finales para cada tubo son las siguientes:

Numero de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Conc. en µg/ml	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10	5	2.5

FIGURA 3. Forma en la que se realizan las diluciones para un antibiótico partiendo de la solución madre.

7.5.3.1.2. Solución Madre de trimetoprim-sulfametoxazol

Como en este caso es una combinación de antibiótico con una proporción 1:20 se realizan 2 soluciones Madres.

- Pesar la cantidad de antibiótico puro necesario de cada uno de los antibióticos usando la siguiente formula para saber cuanto usar de cada antibiótico.

$$\text{Peso del Trimetoprim (mg)} = \frac{20 \text{ ml} \times 2560 \text{ µg/ml}}{1004 \text{ µg/mg}}$$

$$\text{Peso del Sulfametoxazol (mg)} = \frac{20 \text{ ml} \times 48640 \text{ µg/ml}}{988 \text{ µg/mg}}$$

- Disolver el trimetoprim pesado en una cantidad mínima de ácido clorhídrico y adicionar lo que reste para 10ml.
- Disolver el sulfametoxazol pesado con ½ volumen de agua caliente y la menor cantidad de NaOH al 2.5 M para disolver, lo que falte para 10ml adicionar agua.
- Mezclar ambas soluciones para tener la solución madre final.
- Preparar 10 tubos y hacer diluciones seriadas 1:2 para obtener soluciones de antibiótico a las siguientes concentraciones 1280/24320, 640/12160, 320/6080, 160/3040, 80/1520, 40/760, 20/380, 10/190, 5/95 y 2.5/47.5 µg/ml. ⁽²⁵⁾

7.5.3.1.3. Solución Madre de Ticarcilina-Ácido clavulánico.

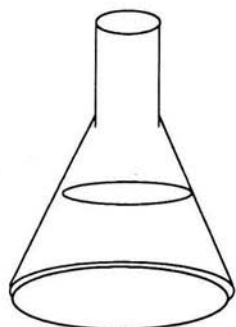
En el caso de este antibiótico combinado, la ticarcilina requieren a las mismas concentraciones de un antibiótico solo y el ácido clavulánico se mantiene constante por lo tanto también se preparan dos soluciones madres.

- Pesar la cantidad de antibiótico puro necesario de cada uno de los antibióticos utilizando la siguientes formulas:

$$\text{Peso de Ticarcilina (mg)} = \frac{25 \text{ ml} \times 5120 \text{ µg/ml}}{880 \text{ µg/mg}}$$

$$\text{Peso del Ácido clavulánico (mg)} = \frac{120 \text{ ml} \times 40 \text{ µg/ml}}{953 \text{ µg/mg}}$$

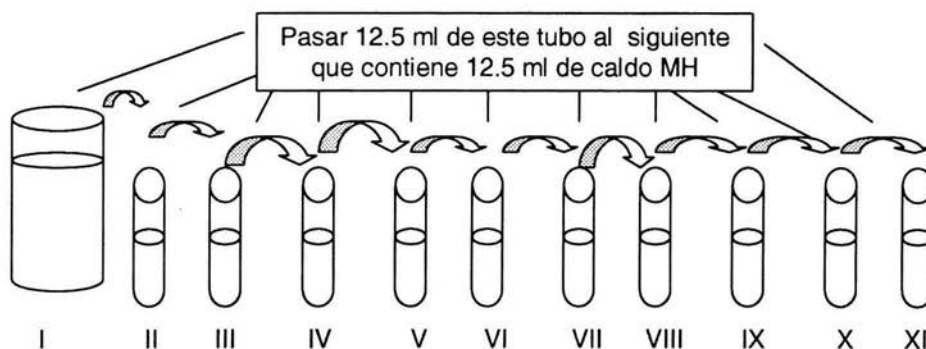
- Disolver la ticarcilina pesada con solución reguladora de fosfatos pH=6, 0.1 M hasta disolver y adicionar lo que reste para 25 ml de agua.
- Disolver el ácido clavulánico pesada con solución reguladora de fosfatos pH=6, 0.1 M hasta disolver y adicionar lo que reste para 120 ml de agua.
- Preparar 10 tubos y hacer diluciones seriadas 1:2 de la solución madre de ticarcilina para obtener soluciones de antibiótico a las siguientes concentraciones 2560,1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 y 2.5 µg/ml.
- Preparar 11 tubos y adicionar 10 ml de las soluciones obtenidas a cada uno de los tubos según corresponda.
- De la solución madre de ácido clavulánico adicionar 10 ml a cada uno de los tubos anteriores para obtener soluciones de antibiótico a las siguientes concentraciones 2560/20,1280/20, 640/20, 320/20, 160/20, 80/20, 40/20, 20/20, 10/20, 5/20 y 2.5/20 µg/ml (Figura 4).



120 ml. de solución
madre de Ac. Clavulánico
40 μ g/ml



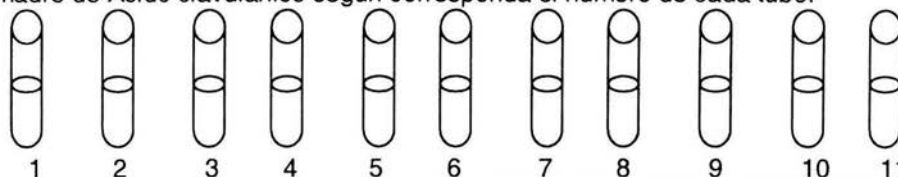
1
25 ml de solución
madre de ticarcilina
5120 μ g/ml



La concentración de los tubos anteriores es la siguiente:

Numero de Tubo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Conc. en μ g/ml	5120	2560	1280	640	320	160	80	40	20	10	5

De los tubos anteriores pasar 10 ml al tubo de abajo que contiene 10 ml de la solución madre de Ácido clavulánico según corresponda el numero de cada tubo.



No. de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración en μ g/ml	2560 /20	1280 /20	640/ 20	320/ 20	160/ 20	80/ 20	40/ 20	20/ 20	10/ 20	5/ 20	2.5/ 20

FIGURA 4. Forma en la que se realizan las diluciones para ticarcilina-clavulanato.

7.5.3.2. Preparación de placas

- Pesar e hidratar el agar Mueller-Hinton hasta disolver, esterilizar y dejar enfriar a 48 –50° C, de ser posible mantener a esta temperatura a baño María.
- Se toma una dilución antimicrobiana y se deposita 1.5 ml en cada caja de petri, el numero de cajas dependerá de la cantidad de cepas a analizar. Esto se hace con cada una de las diluciones del antimicrobiano.
- Adicionar a cada caja de petri 13.5 ml de agar y mezclar perfectamente. En general se agrega 1 parte de solución antimicrobiana a 9 partes de agar líquido (dilución 1:10).
- Colocar las placas sobre una superficie horizontal.
- Preparar placas libres de antimicrobianos para ser usadas como control de crecimiento.
- Dejar solidificar a temperatura ambiente, guardar en bolsas y almacenar en refrigeración (4-8° C).

7.5.3.3. Preparación de inóculo.

- Preparar cultivos de 18 h que estén en agar soya tripticasa, BHI o Mueller-Hinton.
- Seleccionar de 3 a 5 colonias de cada cultivo puro crecido en placa y transferir a tubos que contengan 4.5 ml de caldo BHI o caldo soya tripticasa. Incluir una o dos cepas de referencia.
- Incubar a 35° C hasta que la turbidez sea visible (2 a 6 h) ajustar la turbidez con el patrón 0.5 de Mac Farland, en caso de exceder la turbidez ajustar con solución salina o caldo.
- Diluir la suspensión bacteriana 1:10 para obtener una concentración 10⁷ Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/ml.

7.5.3.4 Inoculación de placas

- En una gradilla colocar ordenadamente las suspensiones bacterianas.
- Adicionar una alícuota de cada suspensión bien mezclada en cada uno de los pozos del replicador de Steers.
- Depositar una alícuota de 1 a 2 microlitos de cada inóculo en la superficie de agar con ayuda del replicador. Inocular primero una placa de control de crecimiento (sin antibiótico) y posteriormente las que contienen antibiótico, comenzando con las de menor concentración. Una segunda placa de control de crecimiento es inoculada al finalizar cada serie de antibiótico.
- Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos inoculados se ha absorbido en el agar.
- Invertir las placas e incubar a 35° C durante 16-20 h.

7.5.3.5. Lectura e interpretación

- Colocar las placas en una superficie no refractante.
- Revisar las placas de control de crecimiento para cada una de las series y en todas debe haber crecimiento.
- Después tomar la lectura de las cepas bacterianas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC) de Estados Unidos 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* de cada serie según el Comité Nacional para la Normalización de los Laboratorios Clínicos (NCCLS). Donde la CIM es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento. Los puntos de corte para cada antibiótico son los de la tabla 5.

ANTIBIÓTICO	PUNTO DE CORTE (µg/ml)
Ticarcilina-clavulanato	8/2 – 32/2
Cefotaxima	8 – 32
Ceftriaxona	8 – 64
Cefepima	1 – 8
Imipenem	1 – 4
Meropenem	0.25 - 1
Amikacina	1 – 4
Gentamicina	0.5 – 2
Ciprofloxacino	0.25 – 1
Levofloxacino	0.5 – 4
Trimetoprim-Sulfametoxazol	8/152 – 32/608

TABLA 5. Puntos de corte para la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* según la NCCLS para cada antibiótico.

- Si las lecturas de los ATCC entran en los rangos, entonces se procede a tomar la lectura de cada una de las cepas probadas.
- Ya que se tienen las lecturas se procede a determinar si las cepas son sensibles, intermedias o resistentes de acuerdo con los valores de la tabla 6.

ANTIBIÓTICO	CIM (µg/ml)		
	S	I	R
Ticarcilina-clavulanato	≤ 64/2	-	≥ 128/2
Cefotaxima	≤ 8	16 – 32	≥ 64
Ceftriaxona	≤ 8	16 – 32	≥ 64
Cefepima	≤ 8	16	≥ 32
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Amikacina	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacino	≤ 2	4	≥ 8
Trimetoprim-sulfametoxazol	≤ 2/38	-	≥ 4/76

TABLA 6. Puntos de corte para *Pseudomonas aeruginosa* en la interpretación de CIM según la NCCLS.

Considerando entonces que las cepas serán consideradas como:

Sensibles (S)

La categoría de sensible indica que la infección puede ser apropiadamente tratada con la dosis recomendada del agente antimicrobiano útil para este tipo de infección, a menos que halla una contraindicación.

Intermedio (I)

La categoría de intermedio indicara que el microorganismo será susceptible si se emplean dosis elevadas o si la infección está limitada a tejidos y líquidos en los cuales se alcanzan niveles antibióticos altos

Resistente (R)

Los organismos resistentes no son inhibidos por las concentraciones sistémicas normalmente logrables del agente con dosificación normal fija y/o se desploma el rango donde los mecanismos de la resistencia microbiana específicos son que la eficacia probable y clínica no ha sido fiable en estudios del tratamiento. ⁽²⁶⁾

7.5.3.6. Manejo de resultados

Se determinara el porcentaje de resistencia y sensibilidad de las cepas probadas mediante un análisis de frecuencia.

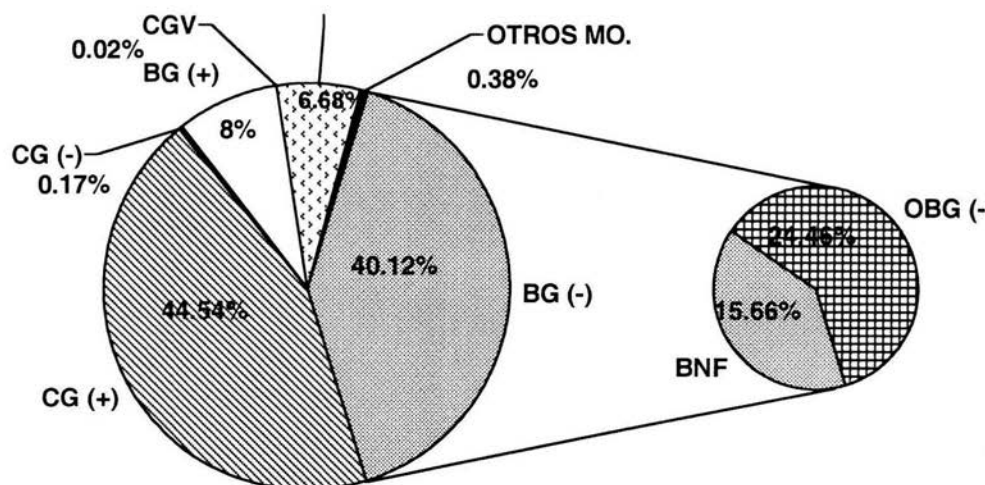
8. RESULTADOS

8.1 Frecuencia en el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*

El total de hemocultivos recibidos en el periodo de Enero de 1999 a Septiembre del 2002 ascendió a 22,784. Los hemocultivos positivos fueron 3489 de estos se aislaron y recuperaron 3886 microorganismos ya que de algunas muestras se recupero más de un microorganismo. A los microorganismos aislados se les clasifico como cocos gramnegativos, grampositivos y gramvariable, bacilos gramnegativos y grampositivos, levaduras y otros, obteniendo así:

MICROORGANISMO	NO. DE AISLAMIENTOS
COCOS GRAM(+)	1731
COCOS GRAM (-)	7
COCOS GRAM VARIABLE	1
BACILOS GRAM (-)	1560
BACILOS GRAM (+)	311
HONGOS	261
OTROS	15

La gráfica 1 da una visión más clara del porcentaje de cada uno de los microorganismos.



Grafica 1. Porcentaje de microorganismos encontrados en hemocultivo en el periodo de Enero de 1999 a Septiembre del 2002 en pacientes del HIM.

La grafica 1 muestra que 40.14% (1560) de los microorganismos aislados fueron bacilos gramnegativos y de estos solo el 15.66% (609) fueron bacilos gramnegativos no fermentadores

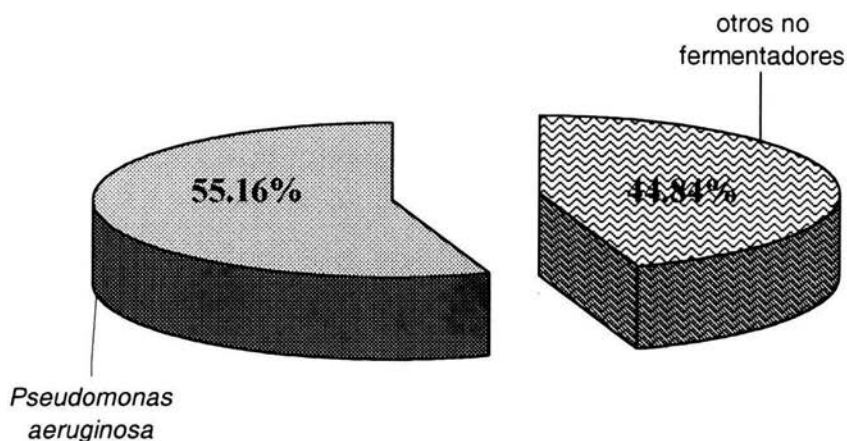
Del total de bacilos gramnegativos no fermentadores se hizo una depuración de datos debido a que algunas pertenecían a un mismo paciente y las fechas de los aislamientos eran muy cercanas obteniendo finalmente 309.

De los 309 seleccionados se descartaron 86 ya que no hubo desarrollo bacteriano, por lo tanto el numero de no fermentadores recuperados y aislados fue 223.

A los 223 se les caracterizo obteniendo así:

Total de aislamientos	Otros No Fermentadores	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
223	100	123

La grafica 2 muestra que el porcentaje de *Pseudomonas aeruginosa* es mayor que el de los otros bacilos gramnegativos no fermentadores.



Grafica 2. Porcentaje de *Pseudomonas aeruginosa* y otros no fermentadores.

Las cepas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* se clasificaron por edades obteniendo así:

EDAD	No. DE NIÑOS
Menores de 1 mes	12
Menores de 1 año	18
1 año	12
2 años	4
3 años	8
4 años	8
5 años	6
6 años	6
7 años	6
8 años	6
9 años	4
10 años	6
11 años	4
12 años	4
13 años	3
14 años	4
15 años	6
16 años	2
17 años	2
18 años	1
Sin edad	1

Posteriormente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se les realizó la Susceptibilidad antibiótica por medio del método de CIM.

8.2. Concentración Inhibitoria Mínima

Los resultados obtenidos de las cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* de cada serie se verificaron con los rangos mencionados y como todas entraron dentro de los rangos establecidos se procedió a tomar las lecturas de las cepas problemas, cuando se tuvieron los resultados se procedió a obtener el CIM50 (concentración inhibitoria mínima necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de las cepas estudiadas) y el CIM90 (concentración inhibitoria mínima necesaria para inhibir el crecimiento del 90% de las cepas estudiadas). Estos se obtienen mediante los cálculos siguientes:

$$\text{CIM 50} = \frac{123 \text{ cepas} \times 50}{100} = 61.5 \text{ cepas}$$

Por lo tanto el CIM50 para cada antibiótico será la concentración que este entre la cepa 61 y la 62.

$$\text{CIM 90} = \frac{123 \text{ cepas} \times 90}{100} = 110.7 \text{ cepas}$$

Por lo tanto el CIM90 para cada antibiótico será la concentración que este entre la cepa 110 y 111.

Para determinar los números de cepa:

- Se ordenan los valores de la menor concentración a la mayor.
- Después se obtiene la frecuencia de cada uno de los valores
- Posteriormente se obtiene la frecuencia acumulada (Ver Anexo 6) y así los CIM50 y CIM90 que se muestran en la tabla 7 junto con los rangos obtenidos para cada antibiótico.

Antibiótico	CIM50 (µg/ml)	CIM90 (µg/ml)	Rangos (µg/ml)
Ticarcilina-clavulanato	32/2	128/2	≤ 0.25/2 a >256/2
Cefotaxima	32	256	4 a >256
Ceftriaxona	32	128	4 a >256
Cefepima	8	16	1 a 64
Imipenem	2	16	0.5 a 64
Meropenem	1	8	≤ 0.25 a 32
Amikacina	4	64	1 a >256
Gentamicina	0.5	2	≤ 0.25 a 64
Ciprofloxacina	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25 a 64
Levofloxacino	≤ 0.25	1	≤ 0.25 a 64
Trimetoprim-Sulfametoxazol	2/38	16/304	≤ 0.25/4.75 a 64/1216

TABLA 7. Valores de CIM50, CIM90 y rangos de concentración para los antibióticos probados en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para poder interpretar el CIM es necesario obtener cuantas cepas son resistentes, cuantas intermedias y cuantas sensibles a los antibióticos probados, la tabla 8 muestra los puntos de corte según la NCCLS.

ANTIBIOTICO	CIM (µg/ml)		
	S	I	R
Ticarcilina-clavulanato	≤ 64/2	-	≥128/2
Cefotaxima	≤ 8	16 - 32	≥64
Ceftriaxona	≤ 8	16 - 32	≥64
Cefepima	≤ 8	16	≥32
Imipenem	≤ 4	8	≥16
Meropenem	≤ 4	8	≥16
Amikacina	≤ 16	32	≥64
Gentamicina	≤ 4	8	≥16
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥4
Levofloxacino	≤ 2	4	≥8
Trimetoprim-Sulfametoxazol	≤ 2/38	-	≥4/76

Tabla 8. Puntos de corte de Sensibilidad, Resistencia e Intermedios según la NCCLS.

Los valores obtenidos en el CIM para las cepas problema se sustituyeron por los símbolos S, I y R según correspondía y se procedió a obtener el porcentaje de susceptibilidad, intermedia y resistencia para cada antibiótico por medio de la siguiente fórmula.

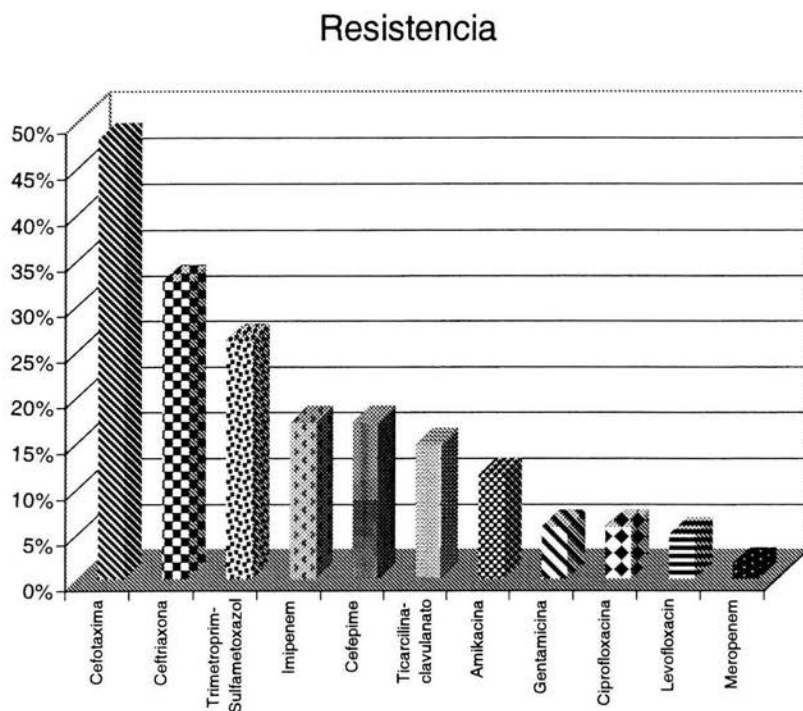
$$\% \text{ de Susceptibilidad, Resistencia o Intermedio} = \frac{\text{Número de cepas X 100}}{123 \text{ (cepas totales)}}$$

Obteniendo así los valores de la tabla 9 (ver Apéndice 6):

Antibiótico	Sensibilidad	Intermedia	Resistencia
Levofloxacino	95.12%	0	4.87%
Ciprofloxacino	94.30%	0	5.69%
Gentamicina	91.86%	2.43%	5.69%
Meropenem	87.80%	10.56%	1.62%
Ticarcilina-clavulanato	85.36%	-	14.63%
Amikacina	83.73%	4.87%	11.38%
Cefepima	78.04%	17.07%	4.87%
Trimetoprim-Sulfametoxazol	73.98%	-	26.01%
Imipenem	73.98%	8.94%	17.07%
Ceftriaxona	12.19%	55.28%	32.52%
Cefotaxima	4.06%	47.96%	47.96%

Tabla 9. Porcentajes de resistencia, Intermedios y sensibilidad de las cepas probadas.

La grafica 3 muestra los porcentajes de resistencia para cada uno de los antibióticos probados.



Grafica3. Porcentaje de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* para cada antibiótico.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el estudio realizado se determinó que 15.67% de los microorganismos aislados de hemocultivos en el periodo de Enero de 1999 a Septiembre del 2002 eran bacilos gramnegativos no fermentadores observando un incremento con respecto a un estudio que se realizó en el mismo Hospital Infantil de México en el año de 1996 en hemocultivos donde el porcentaje de bacilos gramnegativos no fermentadores ascendió a 14.8% ⁽²⁷⁾ lo que indica un incremento de 0.8% lo que muestra que estos microorganismos se van abriendo paso en el ámbito hospitalario, lo cual se ve favorecido por los mínimos requerimientos nutricionales que necesita para sobrevivir y factores como la inmunosupresión, la edad y la hospitalización prolongada, estos factores están presentes en esta institución.

Aunque los géneros que pertenecen al grupo de los bacilos gramnegativos no fermentadores es amplio y algunos de ellos se encuentran raramente, otros recientemente han adquirido importancia clínica, por ser causa de infecciones nosocomiales: a pesar de ello, *Pseudomonas aeruginosa* es el bacilo gramnegativo no fermentador más frecuentemente encontrado dentro del ambiente hospitalario y el que causa mayor problemas, el caso de los bebés muertos en el hospital 1 de Octubre a fines del año pasado lo muestra claramente.

De los bacilos gramnegativos no fermentadores que se identificaron 55.16% pertenecían a *Pseudomonas aeruginosa*. De estas el 50.40% se recuperaron de niños menores de 5 años y de estos el 34.14% se recuperó de niños menores a 2 años.

Los resultados muestran que de los antibióticos más efectivos *in vitro* son; Levofloxacino y Ciprofloxacino ambos del grupo de las quinolonas, ya que 95.12% de las cepas fueron sensibles a el Levofloxacino y 94.30% fueron sensibles a el Ciprofloxacino. Dicho resultado concuerda con reportes en la literatura donde se menciona a las quinolonas como los antibióticos más efectivos contra *Pseudomonas aeruginosa* reportando incluso un 0% de resistencia para Ciprofloxacino en el año 2001 ⁽¹⁸⁾, dato muy parecido al obtenido en un estudio realizado en este hospital en este mismo año obteniendo una sensibilidad del 98% ⁽²⁸⁾, por otra parte otras publicaciones reportan sensibilidades de 80% en el año de 1997 ⁽²⁹⁾, 72% en 1996 ⁽³⁰⁾, 71% en el 2003 ⁽³¹⁾ y 47.5% para Ciprofloxacino, mientras que reportan un 72% para Levofloxacino en el año 2001 ⁽³²⁾. La gran diversidad de resultados incluso en los mismos años destacan la importancia de determinar susceptibilidad antibiótica en cada hospital.

Seguido de las quinolonas estaría la gentamicina un amino glucósido ya que el 91.86% de las cepas fueron sensibles a este, sin embargo este resultado no se parece en nada a los reportados en la literatura donde se mencionan sensibilidades de 57% en el año de 1997 ⁽²⁹⁾, 34.4% en el año 2001 ⁽³²⁾. Por otra parte la resistencia obtenida en este estudio fue de 5.69% y dicho valor no se relaciona a el registrado en la literatura donde se describen resistencias de un 80% ⁽¹⁸⁾ y 65.5% ambas en el año 2001 ⁽³³⁾ a este mismo

antibiótico. Estos valores recalcan la importancia de susceptibilidades como en el caso anterior.

Por otra parte el otro aminoglucósido probado la amikacina mostró un 83.73% de sensibilidad y un 11.38% de resistencia, mientras que la bibliografía indica diferentes resistencias que va desde 40% en el 2001 ⁽¹⁸⁾, 18.7% ⁽³⁴⁾ y hasta 8% ambas en el 2003 ⁽³⁵⁾ para este antibiótico.

Por otra parte el Meropenem e Imipenem ambos pertenecientes al grupo de los carbapenems muestran ser menos efectivos ya que: en el caso del Meropenem 87.80% de las cepas fueron sensibles, la literatura encontrada muestra resultados parecidos ya que se reportan sensibilidades desde 86.6% ⁽³²⁾ y 73% ambos en el 2001 ⁽²⁸⁾. En el caso del Imipenem solo el 73.98% de las cepas fueron sensibles y los valores reportados en la literatura de sensibilidad fueron desde 95% en el año de 1996 ⁽³⁰⁾, 82% en el año de 1997 ⁽²⁹⁾ hasta 78.6% en el año de 2001 ⁽³²⁾; estos resultados muestran que las cepas se van haciendo resistentes a este antibiótico a medida que pasa el tiempo quizás por el uso indiscriminado del mismo.

En cuanto a los antibióticos combinados probados se obtuvo: en el caso de ticarcilina-ácido clavulánico un 85.36% de sensibilidad y una resistencia de 11.38%, mientras que los valores reportados fueron de 59% de sensibilidad en el año de 1997 ⁽²⁹⁾ y un 40% de resistencia en el 2001 ⁽¹⁸⁾; en el caso de trimetoprim-sulfametoxazol mostró una sensibilidad de 73.98% mientras que la bibliografía muestra un 54.9% de sensibilidad en el año 2001 ⁽³³⁾ y 0% en el año de 1996 ⁽³⁰⁾.

La Cefepima una cefalosporina de cuarta generación solo fueron sensibles el 78.04% de las cepas y mostraron una resistencia de 4.87%, sin embargo la literatura muestra sensibilidades de 93.1% ⁽²⁹⁾, 39.66% ambas en el año 2001 ⁽³²⁾ y resistencias de 60% ⁽¹⁸⁾, 49.5% en el 2003 ⁽³⁴⁾ y 10% en este mismo año ⁽³⁵⁾.

Es importante mencionar que de los 11 antibióticos probados solo dos la Cefotaxima y la Ceftriaxona ambas cefalosporinas de tercera generación no son efectivas contra las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* probadas ya que la sensibilidad fue inferior al 15% y aunque ambas mostraron resistencias menores al 40% se observa que en ambos casos hay una gran cantidad de cepas intermedias (cerca al 50%) y para fines clínicos estas también se consideran como resistentes por ello estos antibióticos no son recomendables y los estudios realizados confirman esto ya que se muestra una sensibilidad de 20.7% para el año 1997 ⁽²⁹⁾, 7.15 % para ceftriaxona y 8.5 % para cefotaxima ambas en el 2001 ⁽³²⁾.

10. CONCLUSIONES

- *Pseudomonas aeruginosa* con 55.16% de aislamientos en hemocultivo, fue el bacilo gramnegativo no fermentador mas frecuente.
- Se esperaba que la gran mayoría de las cepas probadas fueran resistentes a los antibióticos probados, sin embargo solo 8 fueron multiresistentes.
- Por lo anterior podríamos decir que la mayor parte de las *Pseudomonas aeruginosas* aisladas provenían de la comunidad, ya que las cepas de origen nosocomial reportan resistencia a la mayoría de los antibióticos probados.

ANEXOS

1) IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES

Mo.	Prueba	Oxidasa	Citrato	Nitrato	Esculina	Indol	Urea	Gelatina	Arginina	Glucosa	Maltosa	Manitol	Xilosa	Manosa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	-	+ 66%	+ 46%	+	+	-	+ 70%	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	+ 44%	+	+	+	+ 31%	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	-	-	-	+ 43%	-	+	+	-	-	+	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+ 70%	+	+
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+	+	39%	+	-	+ 45%	+ 74%	-	+	+	+	+	89%
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	+	73%	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	+	37%	+	-	-	-	-	+	+	-	+ 35%	+
<i>Acinetobacter anitratus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	NR	+	+	+	-	NR
<i>Ochromobacter anitropi</i>	+	+	+ 47%	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+

(-) Negativo, (+) Positivo y NR= No reportado.

2) MEDIOS DE CULTIVO

Agar de Soya Tipticasa

Caseína digerida para enzimas pancreáticas	17 g
Harina de soya digerida por enzimas papaicas	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotasico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
Agar	
Agua destilada	1000 ml

Este medio de cultivo hecho de la digestión pancreática de caseína más peptona de semilla de soya facilita el crecimiento de la mayoría de las bacterias que se encuentran en microbiología médica.

Agar Sangre

Agar base	500 ml
Sangre estéril	20 ml

El agar base contiene:

Proteosa peptona No. 2	40 g
Fosfato disodico	5 g
Fosfato dihidrogeno de potasio	1 g
Cloruro de sodio	2 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Glucosa	2 g
Solución de hemina	1 ml
Agar	25 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio es útil para aislar y cultivar diversos microorganismos principalmente aquellos de difícil crecimiento. También suele usarse para describir la actividad hemolítica.

Agar Mueller Hinton

Extracto de carne bovina	2 g
Hidrolizado ácido de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17 g
Agua destilada	1000 ml

Este es un medio que se usa principalmente para realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Agar MacConkey

Peptona	17 g
Poliipeptona	3 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	4 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agua destilada	1000 ml

El Agar MacConkey es un medio diferencial para la selección y recuperación de Enterobacterias y bacilos gramnegativos. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas y algunas gramnegativas.

3) TINCIÓN DE GRAM

Fundamento

Por medio de este método es posible dividir a las bacterias en dos grandes grupos: las bacterias gramnegativas y las grampositivas.

Cuando se les tiñe con el colorante primario cristal violeta y se adiciona un mordente (soluciones débiles de yodo) con una posterior decoloración con alcohol-cetona, las bacterias grampositivas retendrán la coloración por más tiempo que las gramnegativas. Se atribuye esta diferencia al contenido lipídico mucho más elevado de la pared celular de las bacterias grampositivas. El alcohol cetona elimina casi todos los lípidos de la pared celular de las bacterias gramnegativas rápidamente, liberando así el complejo yodo-tintura que se ha formado.

De manera que se consideran bacterias grampositivas aquellas que resisten a la decoloración y por lo tanto conservan un tono azul o morado, mientras que se consideran gramnegativas las bacterias que no resisten la decoloración y por eso se observan de un tono rosado que adquieren por la safranina que es el colorante de contraste.

Método:

- Colocar una pequeña gota de agua sobre un portaobjetos.
- Tomar una colonia y homogenizar con el agua.
- Dejar secar y pasar sobre el mechero para fijar.
- Adicionar cristal violeta y se deja un minuto.
- Enjuagar con agua corriente.
- Adicionar lugol y dejar por un minuto.
- Enjuagar con agua corriente.
- Decolora con alcohol cetona.
- Enjuagar con agua corriente.
- Adicionar safranina y dejar por un minuto.
- Enjuagar con agua corriente.
- Dejar secar al aire.
- Observar al microscopio a inmersión.

Interpretación

bacterias grampositivas se observan color azul o morado.

bacterias gramnegativas se observan color rosa.

4) PRUEBAS ESPECIALES

CATALASA

Principio

Comprobar la presencia de la enzima catalasa.

Bases bioquímicas

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Por lo general, los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. La mayoría de las bacterias anaerobias poseen la enzima peroxidasa en lugar de la catalasa. El peróxido de hidrógeno se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares, si se deja acumular, es tóxico para las bacterias y provoca su muerte. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno y el pH óptimo para su actividad es 7.

Peróxido de hidrógeno -----catalasa → Agua + Oxígeno↑

Método

- Tomar con el asa de inoculación el centro de una colonia pura y colocar la sobre un porta objetos.
- Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre el organismo.
- Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas).

Interpretación

- Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de oxígeno).
- Prueba negativa no hay formación de burbujas.

Nota: está prueba no debe de hacerse en agar sangre ya que los eritrocitos poseen la enzima catalasa y puede darse un falso positivo.

OXIDASA

Principio

Determinar la presencia de las enzimas oxidasas.

Pruebas bioquímicas

La prueba de la oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo reductasa del oxígeno molecular. Todas las bacterias aeróbicas obtiene su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos. El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El sistema citocromo sólo se encuentra por lo general en los organismos aerobios, lo que los hace capaces de utilizar el oxígeno

como un aceptor de hidrógeno para reducir el oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno. Algunos aseguran que la oxidasa positiva está limitada a aquellos organismos capaces de desarrollarse en oxígeno y producir al mismo tiempo la enzima catalasa.

Método

Reactivo de Kovacs: Papel filtro impregnado con Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%

- Tomar una tira de papel.
- Con un aplicador tomar el centro de la colonia y colocarlo sobre el papel.
- Observar la presencia de color en un tiempo de 5 a 10 s.

Interpretación

- Oxidasa positiva: la parte donde se puso la colonia toma un color marrón y finalmente negro purpúreo.
- Oxidasa negativa: no se produce cambio de color o solo adquiere un color rosa pálido por el reactivo.

La citocromo oxidasa, en presencia del oxígeno atmosférico, oxida el reactivo fenilendiamina oxidasa para formar un compuesto coloreado, el indofenol.

5) PRUEBAS BIOQUÍMICAS

AGAR HIERRO KLIGLER

Principio

Determinar la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico.

Bases bioquímicas

Un organismo puede utilizar diversos sustratos incorporados en el medio; los diferentes sustratos metabolizados son utilizados para diferenciar entre varios grupos, géneros y especies. Este medio contiene dos hidratos de carbono: lactosa, con concentración del 1% y glucosa en concentración del 0.1%. Algunos organismos tienen la facultad de fermentar ambos hidratos de carbono; otros fermentan solamente la glucosa; y otros aun, no son capaces de fermentar ninguno de los dos.

La fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de flauta) y anaerobicamente (en el pico de flauta).

Medio utilizado

Agar hierro kligler, pH: 7.4

Ingredientes

Extracto de carne	3 g
Extracto de levadura	3 g
Peptona	15 g
Proteosa peptona	5 g
Lactosa	10 g
Dextrosa (glucosa)	1 g
Sulfato ferroso	0.2 g
Cloruro de sodio	5 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

Método de preparación.

- Pesar la cantidad adecuada del medio comercial.
- Rehidratar con agua destilada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Distribuir en tubos, aproximadamente 2 ml.
- Esterilizar con autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Dejar enfriar en posición inclinada.

Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular en el pico de flauta en "cola de pescado" y por picadura en la capa profunda. Incubar a 35° C por 18 a 24 h.

Interpretación

- Fermentación de la glucosa: la capa profunda cambia de color a amarillo.
- Fermentación de los dos carbohidratos: todo el tubo cambia a amarillo.
- No fermenta ni la glucosa, ni la lactosa: sin cambio de color.

ESCULINA

Principio

Determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa.

Bases bioquímicas

La esculina es un glucósido (cuando un elemento que no es un hidrato de carbono se une a una azúcar por medio de un enlace acetal, el acetal resultante se denomina aminoglucosido). Los acetales son rápidamente hidrolizados por los ácidos; la base de esta prueba es que la esculina es hidrolizada a esculetina, liberando moléculas de glucosa.

La esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un complejo castaño oscuro o negro.

Medio

Ingredientes.

- | | |
|---------------------|---------|
| - Peptona | 5 g |
| - Extracto de carne | 3 g |
| - Esculina | 1 g |
| - Citrato de hierro | 0.5 g |
| - Agar | 15 g |
| - Agua destilada | 1000 ml |

Método de preparación

- Pesar exactamente las cantidades de cada producto-
- Rehidrata con agua destilada.
- La solución se calienta suavemente.
- Colocar 2 ml. de esta en tubos de ensaye.
- Esterilizar a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Se deja enfriar el medio manteniendo el tubo inclinado.

Inoculación

De un cultivo puro de 24 h, inocular en el pico de flauta en "cola de pescado" e incubar a 35° C revisar periódicamente a las 24, 48 y hasta 72 h antes de dar un informe negativo.

Interpretación

- Prueba +: Presencia de un color negro o castaño en la mitad o más de la superficie.
- Prueba -: No se produce ennegrecimiento en el medio.

CITRATO

Principio

Determinar si un organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad.

Bases bioquímicas

Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de la fermentación o producción de ácido láctico empleando el citrato como única fuente de carbono. El metabolismo del citrato en la mayoría de las bacterias es rápido a través del ciclo del ácido tricarboxílico o el ciclo de fermentación del citrato. Las bacterias desdoblan el citrato con una enzima denominada citritasa o citrato desmolasa, la enzima requiere un catión bivalente para su actividad y es suministrada por el magnesio o el manganeso. Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio. Si el pH aumenta (alcalino) se produce acetato y formato, con disminución de la producción de lactato y CO_2 . Por encima de pH 7 no hay producción de lactato y los productos son CO_2 , ácido fórmico y ácido acético. Con un pH ácido los productos son el acetilmetilcarbinol (acetoina) y el lactato.

El medio utilizado para la fermentación del citrato también incluye sales de amonio inorgánico. Un organismo que es capaz de utilizar el citrato como una fuente de carbono utiliza también sales de amonio como única fuente nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoníaco con la consecuente alcalinidad.

Medio utilizado

Medio de Citrato de Simmons, pH 6.9

Ingredientes

Sulfato de magnesio	0.2 g
Monofosfato de amonio o	
Fosfato de amonio dihidrogenado	1 g
Fosfato dipotásico	1 g
Citrato de sodio	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 a 20 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agua destilada	100 ml

Método de preparación.

- Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial.
- Rehidratar con agua destilada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Distribuir en tubos, aproximadamente 2 ml.
- Esterilizar con autoclave a 121°C , 15 lb, 15 min.
- Dejar enfriar en posición inclinada.

Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular en el pico de flauta en "cola de pescado" e incubar a 35° C de 24 a 48 h. A veces es necesaria una incubación hasta de 4 días.

Interpretación

- Prueba +: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta.
- Prueba -: no se observa cambio de color.

ARGININA

Principio

Medir la capacidad enzimática de un organismo para decarboxilar un aminoácido (arginina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

Bases bioquímicas

La decarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas decarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en un grupo carboxilo dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico.

Las enzimas decarboxilasas son numerosas y cada una es específica para un sustrato determinado. La arginina es una decarboxilasa producida por algunos organismos en un medio ácido en presencia de un sustrato específico y los productos de la decarboxilación provocan la alcalinidad. El proceso de decarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima, el fosfato de piridoxal.

El aminoácido L-arginina es catabolizada a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultáneamente o separadamente. Estos dos sistemas son: el sistema arginina – dehidrolasa y el sistema arginina-decarboxilasa.

En el sistema decarboxilasa, la L-arginina sufre la decarboxilación para dar agmatina, la cual es desdoblada por la enzima agmatinasa a dos compuestos putresina y urea (si esta presente la ureasa en CO_2 y NH_3).

En el sistema dehidrolasa la L-arginina es desdoblada a L-citrulina, amoníaco y fosfato inorgánico, después la L-citrulina es desdoblada a ornitina y carbamilo fosfato. Si un organismo es capaz de descomponer la L-arginina en L-ornitina esta será degradada a putresina y anhídrido carbónico.

Medio

Base de decarboxilasa de Moller, pH:6

Ingredientes

- Peptona (pepsina)	5 g
- Extracto de carne	5 g
- Púrpura de bromocresol	0.1 g
- Rojo de cresol	0.005 g
- Piridoxal	5 g
- Glucosa	0.5 g
- Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Pesar la cantidad exacta de cada uno de los reactivos.
- Rehidratar con agua destilada.
- Calentar suavemente hasta la disolución.
- Agregar 10 g de L-arginina.
- Vaciar a tubos aproximadamente 2 ml.
- Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Dejar enfriar.

Inoculación

Tomar de un cultivo puro y resuspender en el medio y cubrir con una capa de aceite mineral (el oxígeno del medio va a ser consumido por el microorganismo y se controlará el pH), incubar a 35° C de 24 h a 4 días con exámenes diarios. A veces es necesaria una incubación prolongada de 6 a 10 días.

Interpretación

- Prueba +: púrpura turbio.
- Prueba -: color amarillo claro y brillante.

GELATINA

Principio

Determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasa) que licuan la gelatina.

Bases bioquímicas

Se incorpora gelatina a diversos medios para determinar la capacidad de los organismos de producir enzimas de tipo proteolítico que, a su vez, son detectadas por la digestión o licuefacción de la gelatina presente. Estas enzimas, que son capaces de gelatinólisis, se denominan gelatinazas.

Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero deben de ser catabolizadas a componentes más pequeños, en este caso el resultado final del catabolismo son aminoácidos individuales.

Medio

Medio de gelatina nutritiva para punción pH: 6.8

Ingredientes

- | | |
|---------------------|---------|
| - Extracto de carne | 3 g |
| - Peptona | 5 g |
| - Gelatina | 120 g |
| - Agua destilada | 1000 ml |

Preparación

- Se agrega la gelatina al agua y se deja reposar de 15 a 30 min.
- Calentar hasta que hierva para que se disuelva la gelatina.

- Agregar el extracto de carne y la peptona y volver a calentar hasta ebullición para disolución.
- Ajustar el pH a 6.8 o 7.
- Vaciar en tubos aproximadamente 2 ml.
- Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Dejar enfriar.

Inoculación

Se toma de un cultivo puro y se inocula por punción. Incubar a 35° C por 24 h a 14 días. Revisar diariamente, al termino de cada periodo de 24 h colocar los tubos en un refrigerador aproximadamente y leer.

Interpretación

- Prueba +: medio licuado.
- Prueba -: medio se mantiene sólido.

INDOL

Principio

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano.

Bases bioquímicas

La degradación de triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. La presencia de indol puede ser detectada por un reactivo que posea una combinación química que produce un color definido. El reactivo utilizado es el reactivo de Kovac que contiene un aldehído que se combina con el indol produciéndose un color rojo.

Medio

Medio SIM

Método de preparación

- Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial
- Rehidratar con agua destilada
- Calentar suavemente hasta su disolución
- Distribuir en tubos, aproximadamente 2 ml.
- Esterilizar con autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Dejar enfriar

Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular por picadura, incubar a 35° C por 24 a 48 h.

Reactivo

Reactivo de Kovacs

- | | |
|--------------------------------|---------|
| - Alcohol amílico o isoamilico | 150 ml. |
| - p-dimetilamino-benzaldehido | 10 g |
| - HCl concentrado | 50 ml |

Utilización del reactivo

Adicionar 5 gotas del reactivo y agitar suavemente.

Interpretación

- Prueba +: un anillo de color rojo en la superficie del medio.
- Prueba -: no se produce color.

MOTILIDAD

Principio

Determinar si un organismo es móvil o inmóvil.

Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos. Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos.

Medio

Medio SIM

Método de preparación

- Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial.
- Rehidratar con agua destilada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Distribuir en tubos, aproximadamente 2 ml.
- Esterilizar con autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Dejar enfriar

Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular por picadura, incubar a 35° C por 24 a 48 h.

Interpretación

Prueba + = los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad. Puede mostrar un crecimiento en estrías vellosas.

Prueba - = crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra; el medio circundante se mantiene claro.

REDUCCION DE NITRATO

Principio

Determinar la capacidad de un organismo de reducir los nitratos o en nitrógeno libre.

Bases bioquímicas

La reducción de nitrato en nitrito y en gas nitrógeno tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene oxígeno del nitrato. La mayoría de las bacterias aeróbicas son anaerobios facultativos y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaeróbica es un proceso por el cual las sustancias inorgánicas, especialmente nitrato y sulfato proporcionan oxígeno para suministrar energía.

Las posibilidades del producto final de reducción del nitrato son muchas: nitrito, amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso o hidroxilamina. El producto final de la reducción que se forme depende de la especie bacteriana. El más común es nitrógeno molecular (gas) por medio de la reducción del nitrito.

Medio

Medio de nitrato de potasio

Ingredientes:

- Extracto de carne	3 g
- Peptona	5 g
- Nitrato de potasio	1 g
- Agar	12 g
- Agua destilada	1000 ml

Método de preparación

- Pesar las cantidades exactas de cada uno de los reactivos.
- Rehidratar con agua destilada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Distribuir en tubos, aproximadamente 2 ml.
- Esterilizar con autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Dejar solidificar el medio en forma inclinada.

Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular en el pico de flauta en cola de pescado y por picadura en la capa profunda, incubar a 35 ° C por 12 a 24 h.

Reactivos empleados para la lectura

- Reactivo A: α -naftilamina 0.5%
- Reactivo B: ácido sulfanílico 0.8%

Agregar directamente a un cultivo de nitrato incubado 1 ml del reactivo A y 1 ml del reactivo B un resultado positivo (color rojo) dentro de los 30 s, indica una prueba completa. Si es negativa (no hay presencia de color) continuar con el siguiente paso

- Cinc en polvo

Agregar directamente al tubo una pizca de cinc en polvo, el color se produce en 30 s.

La reducción del nitrato en nitrito esta indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico p-sulfobenceno-azo- α -naftilamina, el enlace azo da como resultado un compuesto coloreado. La reducción de la sal diazoica por el agente reductor polvo de cinc, en presencia del ácido acético, produce un compuesto coloreado, la arilhidracina.

Interpretación

Reducción de nitrato a nitrito.

- Prueba +: color rosado a rojo intenso.
- Prueba -: no se desarrolla color.

Reducción de nitrito.

- Prueba +: sin desarrollo de color.
- Prueba -: color rosado o rojo intenso.

OXIDACION-FERMENTACION

Principio

Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono.

Bases bioquímicas

La utilización que una bacteria hace de los hidratos de carbono tiene lugar por alguno de dos procesos, de fermentación o de oxidación.

La fermentación es un proceso anaeróbico, por medio de este proceso un hidrato de carbono es metabolizado (o fermentado) y desdoblado en dos moléculas triosa de carbono que a su vez son convertidas en cierto número de compuestos con 1,2,3 o 4 carbonos, el intermediario clave es el ácido pirúvico. El ciclo fermentativo principal de la glucosa es el ciclo de Embden-Meyerhof.

La oxidación de la glucosa es un proceso aeróbico y los oxidadores bacterianos son por lo general aerobios obligados. En el proceso de oxidación, la glucosa u otros hidratos de carbono no son degradados ni desdoblados a dos moléculas de triosa, al contrario el grupo aldehído es oxidado directamente en grupo carbonilo formando ácido glucurónico que es oxidado a su vez en un ácido 2-cetoglucónico, este puede acumularse o degradarse nuevamente para formar 2 moléculas de ácido pirúvico. La fermentación produce una acidez más elevada que el proceso metabólico oxidativo.

Medio

Medio básico de Hugh y Leifson pH:7.1

Ingredientes

Peptona	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato de potasio	0.3 g
Agar	2-3 g
Azul de bromotimol	0.03-0.08 g
Agua destilada	1000 ml

Método de preparación

- Pesar la cantidad exacta de polvo del medio comercial.
- Rehidratar con agua destilada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Esterilizar con autoclave a 121° C, 15 lb, 15 min.
- Preparar las soluciones acuosas al 1% de cada una de los azúcares y esterilizar estos por filtración con membrana milipore.
- Dejar enfriar un poco el medio y adicionar la solución del azúcar.
- Homogenizar la solución.
- Vaciar 2 ml a cada uno de los tubos.

Inoculación

Tomar de un cultivo puro e inocular por picadura por cada azúcar un par de tubos, a uno de ellos adicionar aceite mineral, incubar ambos tubos a 35° C de 48 h a 7 días.

Interpretación

	Tubo abierto	Tubo cerrado
OXIDACIÓN	Amarillo	Verde
FERMENTACIÓN	Amarillo	Amarillo
NI F, NI O	Azul o verde	Verde

UREASA

Principio

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

Bases bioquímicas

El sustrato urea es una diamida del ácido carbónico, a la que frecuentemente se le conoce como carbamida. Todas las amidas son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución, la urea se hidroliza dando carbonato de amonio como producto final.

La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos.

Medio

Agar urea de Christensen, pH: 6.8

Ingredientes

Peptona	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato monopotásico	2 g
Glucosa	1 g
Urea	20 g
Rojo de fenol	0.012 g
Agar	15-20 g
Agua destilada	1000 ml

Método de preparación

Urea básica deshidratada.

- Pesar exactamente 29 g de la base deshidratada.
- Disolver en 100 ml de agua desmineralizada.
- Esterilizar por filtración.

Agar

- Disolver 15 g de agar en 900 ml. de agua destilada.
- Esterilizar en la autoclave 121° C, 15 lb, 15 min.
- Enfriar hasta 50° C
- Agregar los 100 ml de base de urea y mezclar
- Distribuir en tubos aproximadamente 3 ml.

Inoculación

De un cultivo puro inocular en el pico de flauta en cola de pescado e incubar a 35° C de 6 a 24 h y todos los días siguientes durante 6 días.

Interpretación

- Reacción +: color rojo rosado intenso.
- Reacción -: no se produce cambio de color.

6) CÁLCULOS

♦ CÁLCULOS PARA OBTENER EL PESO DE CADA ANTIMICROBIANO PARA LA SOLUCIÓN STOK

FORMULA:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Peso de Amikacina} = \frac{(20) (2560)}{931} = 54.99 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Gentamicina} = \frac{(20) (2560)}{714.8} = 71.62 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Cefotaxima} = \frac{(20) (2560)}{925.44} = 55.32 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Ceftriaxona} = \frac{(20) (2560)}{1000} = 51.2 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Cefepima} = \frac{(20) (2560)}{515.3} = 99.35 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Imipenem} = \frac{(20) (2560)}{990} = 51.71 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Meropenem} = \frac{(20) (2560)}{997} = 51.35 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Ciprofloxacino} = \frac{(20) (2560)}{1003} = 51.04 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Levofloxacino} = \frac{(20) (2560)}{933} = 54.87 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Ticarcilina} = \frac{(25) (5120)}{880} = 145.45 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Ácido clavulánico} = \frac{(120) (40)}{953} = 5.03 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Trimetoprim} = \frac{(20) (2560)}{1004} = 50.9 \text{ mg}$$

$$\text{Peso de Ciprofloxacino} = \frac{(20) (48640)}{988} = 984 \text{ mg}$$

♦ CALCULOS DE FRECUENCIA Y FRECUENCIA ACUMULADA PARA OBTENER EL CIM50 Y EL CIM90 PARA CADA ANTIBIOTICO.

Para obtener la frecuencia solo se cuenta el numero de veces que aparece cada valor.
Para obtener la frecuencia acumulada se suma el valor con el siguiente.

TICARCILINA-CLAVULANATO

T/C	FREC.	FREC. ACU
≤ 0.25/2	1	1
0.5/2	1	2
2/2	1	3
4/2	1	4
8/2	2	6
16/2	36	42
32/2	37	79
64/2	26	105
128/2	9	114
256/2	5	119
> 256 /2	4	123
	123	

TRIMETROPRIM-SULFAMETOXAZOL

TS	FRECUENCIA	FREC. ACU
≤ 0.25 /4.75	2	2
0.25/4.75	4	6
0.5 /9.5	20	26
1/19	27	53
2 /38	38	91
4/76	9	100
8/152	5	105
16/304	6	111
32 /608	7	118
64 /1216	5	123
	123	

CEFOTAXIMA

CTX	FRECUENCIA	FREC. ACU
4	1	1
8	4	5
16	16	21
32	43	64
64	20	84
128	10	94
256	19	113
> 256	10	123
	123	

MEROPENEM

MEP	FRECUENCIA	FREC. ACU
≤ 0.25	33	33
0.5	20	53
1	22	75
2	16	91
4	17	108
8	13	121
16	1	122
32	1	123
	123	

AMIKACINA

AN	FRECUENCIA	FREC. ACU
1	1	1
2	15	16
4	56	72
8	25	97
16	5	102
32	7	109
64	5	114
128	4	118
256	2	120
> 256	3	123
	123	

GENTAMICINA

GM	FRECUENCIA	FREC. ACU
< 0.25	1	1
0.25	1	2
0.5	84	86
1	20	106
2	7	113
8	3	116
16	3	119
32	1	120
64	3	121
	123	

IMIPENEM

IPM	FRECUENCIA	FREC. ACU
0.5	5	5
1	47	52
2	26	78
4	13	91
8	11	102
16	15	117
32	5	122
64	1	123
	123	

CEFTRIAXONA

CRO	FRECUENCIA	FREC. ACU
4	1	1
8	14	15
16	39	54
32	29	83
64	20	103
128	12	115
256	5	120
> 256	3	123
	123	

CIPROFLOXACINO

CIP	FRECUENCIA	FREC. ACU
< 0.25	114	114
0.5	2	116
4	2	118
8	1	119
16	1	120
32	1	121
64	2	123
	123	

CEFEPIMA

FEP	FRECUENCIA	FREC. ACU
1	1	1
2	20	21
4	36	57
8	39	96
16	21	117
32	3	120
64	3	123
	123	

LEVOFLOXACINO

LVX	FRECUENCIA	FREC. ACU
≤ 0.25	102	102
0.5	4	106
1	9	115
2	2	117
8	3	120
64	3	123
	123	

♦ CÁLCULOS PARA OBTENER EL % DE SUSCEPTIBILIDAD, RESISTENCIA O INTERMEDIO.

FORMULA:

$$\% \text{ de Susceptibilidad, Resistencia o Intermedio} = \frac{\text{Número de cepas X 100}}{123 \text{ (cepas totales)}}$$

$$\% \text{ de S} = \frac{117 \times 100}{123} = 95.12$$

$$\% \text{ de S} = \frac{116 \times 100}{123} = 94.30$$

$$\% \text{ de S} = \frac{113 \times 100}{123} = 91.86$$

$$\% \text{ de S} = \frac{108 \times 100}{123} = 87.80$$

$$\% \text{ de S} = \frac{105 \times 100}{123} = 85.36$$

$$\% \text{ de S} = \frac{96 \times 100}{123} = 78.04$$

$$\% \text{ de S} = \frac{15 \times 100}{123} = 12.19$$

$$\% \text{ de I} = \frac{3 \times 100}{123} = 2.43$$

$$\% \text{ de I} = \frac{11 \times 100}{123} = 8.94$$

$$\% \text{ de I} = \frac{21 \times 100}{123} = 17.07$$

$$\% \text{ de I} = \frac{69 \times 100}{123} = 56.09$$

$$\% \text{ de R} = \frac{6 \times 100}{123} = 4.87$$

$$\% \text{ de R} = \frac{14 \times 100}{123} = 11.38$$

$$\% \text{ de R} = \frac{21 \times 100}{123} = 17.07$$

$$\% \text{ de R} = \frac{40 \times 100}{123} = 32.52$$

$$\% \text{ de S} = \frac{103 \times 100}{123} = 83.73$$

$$\% \text{ de S} = \frac{91 \times 100}{123} = 73.98$$

$$\% \text{ de S} = \frac{5 \times 100}{123} = 4.06$$

$$\% \text{ de I} = \frac{6 \times 100}{123} = 47.96$$

$$\% \text{ de I} = \frac{13 \times 100}{123} = 4.87$$

$$\% \text{ de I} = \frac{59 \times 100}{123} = 47.96$$

$$\% \text{ de R} = \frac{2 \times 100}{123} = 1.62$$

$$\% \text{ de R} = \frac{7 \times 100}{123} = 5.69$$

$$\% \text{ de R} = \frac{18 \times 100}{123} = 14.63$$

$$\% \text{ de R} = \frac{32 \times 100}{123} = 26.01$$

$$\% \text{ de R} = \frac{59 \times 100}{123} = 47.96$$

BIBLIOGRAFIA

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Murray PR. Kabayashi GS. Pfaller MA. Microbiología Medica. 2ª ed. Madrid: Harcourt Brace, 1997: 253 – 259.
- 2) Ávila-Figueroa C. Bacteremia nosocomial en niños. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1988; 18 (3): 95 y 96.
- 3) Jawetz E. Melnick JL. Adelberg EA. Microbiología Medica. 13ª ed. México: Ed. El Manual Moderno, 1990: 215 – 217, 329, 330.
- 4) Rangel FS. Epidemiología de la sepsis bacteriana. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1999; 19 (4): 173 – 180.
- 5) Núñez-Tinoco F, Cashat-Cruz M, Ávila C, Pérez-Miravete A, Santos JI. Infecciones nosocomiales por bacilos gramnegativos no fermentadores en el Hospital Infantil de México. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1997; 17(1): 16 - 19.
- 6) Rangel-Fausto S. Comentario sobre infecciones nosocomiales. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1997; 17 (1): 10, 11.
- 7) Koneman E, Janota WM. Diagnostico Microbiológico. 3ª ed. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana, 1992: 268 - 317.
- 8) Finegold SM, Barum EJ, Bailey Scott. Diagnostico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana, 1989: 394 – 409.
- 9) Lippincott W. Wilkins. Hospital Epidemiology and Infection Control. 2ª ed. Filadelfia: Ed. Glen Mayhall, 1999: 431- 451.
- 10) Davis BD. Delbecco R. Eisen HN. Tratado de Microbiología. 4ª ed. Barcelona: Ed. Masson, 1996: 571 - 575.
- 11) Lennett EH. Balow SA, Hausler WJ. Manual de Microbiología clínica. 4ª ed. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana, 1987: 419 – 441.
- 12) Lennett EH. Spulding EH, Truant JP. Manual de Microbiología clínica. Buenos Aires: Ed. Salvat, 1981: 272 - 297.
- 13) Joklink WK, Willet HP, Amos DB, Wilfer CM. Microbiology. 20ª ed. Norwalk: Ed. Appleton y Lange, 1992: 576 – 583.
- 14) Perea PE. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España. Ed. Dogma, 1992: 55, 200 – 205 y 664 – 670.

- 15) Murray PR. Baron EJ. Pfaller MA. Tenover FC. Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 7ª ed. Washington, D:C:, USA: American Society for Microbiology Press 1999: 517 – 525.
- 16) Stuart WT. Microbiología. México: Ed. Mac Graw Hill Interamericana, 2000: 181 - 189.
- 17) Salyers AA. Whitt DD. Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach. Washington: Library of Congress Cataloging in Publication Data, 1994: 260 –269.
- 18) Corona-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leños-Miranda B, Portillo-Gómez L, Hernández-Chávez A, Antón-Rendón J y Aguilar- Benavides S. Epidemiologic Study of *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Patients and Reservoirs. Archives of Medical Research 2001;32: 238 – 242.
- 19) Grisaru SG, Lerner GL, Keller N y col. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in childrens: analysis of trends in prevalence, antibiotic resistance and prognostic factors. The Pediatric Infectious Disease Journal 2000; 19 (10): 959 – 963.
- 20) Schaechter, Mederoff, Eisenstein, Guerra. Microbiología Mecanismos de las enfermedades infecciosas. 2ª ed. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana, 1994: 302 – 309.
- 21) Vilaa J. Marcoa F. Interpretación del Antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2002; 20 (6): 304 – 312.
- 22) Baquero F, Blázquez J, Martínez JL. Mutación y resistencia a los antibióticos. México: Ed. Investigación y Ciencia, 2002: 72 – 78.
- 23) Flores J, Armijo JA. Farmacología humana. 3ª ed. Barcelona. Ed. Masson, 2000: 1085 - 1116, 1145 - 1155.
- 24) Katzung BG, Trevor AJ. Farmacología: Autoevaluación y repaso. 2ª ed. México. Ed. El manual moderno, 1995: 481 - 499, 511 - 519, 531 - 538.
- 25) Díaz R, Gamazo C, López GI. Manual Practico de Microbiología. 2ª ed. Ed. Barcelona. Ed. Masson, 1999: 141 –147.
- 26) NCCLS. Performance Standars for Antrimicrobial Suseptibility Testing. informational supplement. Nccls document Wayne. PA. USA: National Committee for Clinical Laboratory Standars 2002: 48, 49, 77 – 85, 94, 95, 118 – 123 y 127 – 133.
- 27) León-Ramírez A, Casta-Cruz M, Ávila-Figueroa C, Aranda-Patrón E, Martínez Graciela y Santos Preciado JI. Infecciones nosocomiales en el Hospital Infantil de México. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1996; 16 (4): 219 –223.

- 28) Coria LJ. El uso del meropenem en el Hospital infantil de México. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2001; 15 (59): 110 – 112.
- 29) Barriga AG, Castillo TN, Alarcón ON, Rojas ML, Peredo LV. Patrones de susceptibilidad in vitro de organismos aislados en pacientes hospitalizados. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 1997; 17 (3): 79 –82.
- 30) Fass RJ, Barnizan Jean, Salomón MC y Ayers LW. In vitro Activities of Quinolones, β -Lactams, Tobramycin, and Trimetoprim-Sulfamethoxazole against Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40 (6): 1412 – 1418.
- 31) Bhavnani SM, Callen WA, Forrest A, Gilliland KK, Collins DA, Paladino JA, Schentag JJ. Effect of fluoroquinolone expenditures on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin in U.S. hospitals. *Am J Health Syst Pharm*. 2003; 60(19): 1962 - 1970.
- 32) Celaya RM, Moreno NJ. Estudio bacteriológico y determinación de la sensibilidad a 21 antibióticos, en una población de pacientes atendidos en el Hospital General de México durante el año 1999. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2001; 21 (4): 129 – 144.
- 33) Igumbor E, Gwanzura L, Chirara M, Obi C, Muza D, Chihara M. Antibiotic sensitivity and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa*. *Cent Afr J Med*. 2000; 46(11): 296 - 300.
- 34) Goossens H. Susceptibility of multi-drugs-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European Mystic study group. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9 (9): 980 –983.
- 35) Jones RN, Sader HS, Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22(6): 551 - 556.