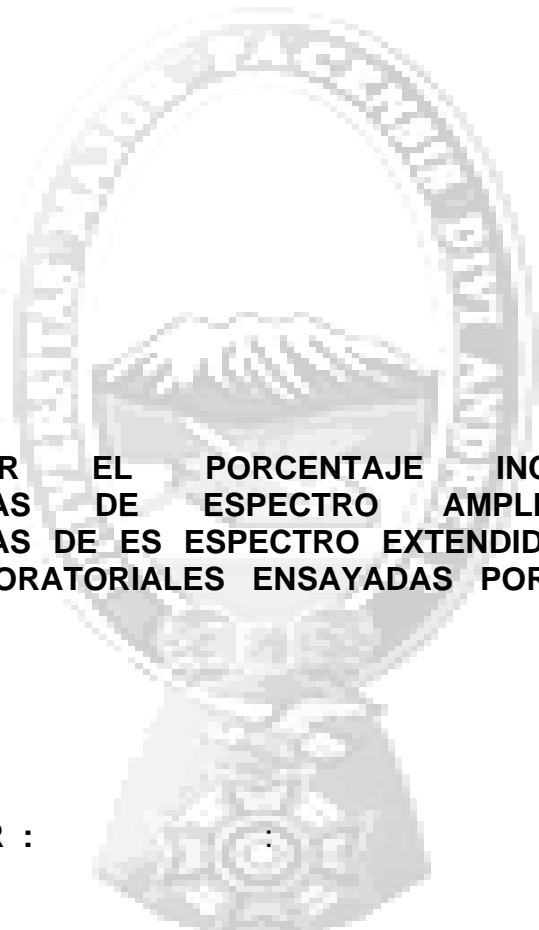


**UNIVERSIDAD MAYOR SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**“ DETERMINAR EL PORCENTAJE INCIDENTE DE
BETALACTAMASAS DE ESPECTRO AMPLIADO (BLEA)
BETALACTAMASAS DE ES ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN
MUESTRAS LABORATORIALES ENSAYADAS POR EL METODO
KIRBY BAVER “**

ELABORADO POR :

Univ. Evelyn Duran Medina

ASESOR :

Dr. Juan Callisaya H.

(Tesina de grado para optar al titulo de licenciatura en
Bioquímica , Mención Microbiología)

LA PAZ - BOLIVIA
2005

**A Dios por iluminar mi camino,
y a mi Familia por su gran amor.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios por escucharme y tenerme siempre paciencia por hacer que todas las personas que quiero estén junto a mí.

A mis papas que con su esfuerzo , sacrificio y recomendaciones hicieron que terminara mi carrera profesional , a ti Papa gracias por apoyarme siempre y enseñarme lo bueno al final de este sacrificio , gracias Mami por quererme y darme un empujoncito en la vida.

A mi hermano Hans por darme una mano cuando lo necesitaba , por cuidarme y protegerme de las personas malas , al el quiero decirle que termine lo que a empezado que al final llega la recompensa , no te rindas sigue adelante.

A mi hermanita Xiomara por ayudarme a estudiar , por sus ideas geniales , por sus reprimendas reflexivas y gracias hermanita , tu taza de café si funciona.

A mi Asesor al Dr. Juan Callisaya por sus consejos , confianza y su optimismo de ver la vida y todas las personas que trabajan en el laboratorio del Hospital Obrero , gracias por acogernos en su Institución.

Al Dr. Enrique Udaeta por brindarme su amistad y su apoyo pero sobretodo por sus grandes consejos e ideas que siempre me dio , gracias por confiar y creer en mí .

A la Dra. Clotilde Cortez que mas que una persona mas dentro de la Facultad es una gran amiga , una persona integra , sencilla y correcta que me dio mucho apoyo , cariño y amistad.

A la Dra. Yolanda Osinaga por su paciencia , cariño y optimismo que siempre me brindo desde que la conocí y por enseñarme que toda meta se consigue y que uno tiene que salir a buscarla y no esperar sentada a que llegue.

A mis amigos que nunca voy a olvidar Paolita , Ivan ,Gina,Juan Carlos ,Marina , Carlita , Delia, Pamela , Claudia , Mónica , Lizeth , Thelma ,Alex , Daniel , Roció , Efraín , Oscar ,José Luis , Javier ,...etc.gracias por ser mis amigos y que recuerden que siempre seremos amigos.

A las personas que ahora no están conmigo pero que desde lo lejos me acompañaron y siempre hicieron que el sol salga y que mi día siempre sea bendecido con paz y amor , gracias Abuelitos , Hermanitos (Daniel y LuisÁngel), tío , amigos y a mi hijiño que quiero con todo el corazón Sponky..

RESUMEN.-

El presente trabajo esta basado en identificar la incidencia de microorganismos productores de BLEA (Betalactamasa de espectro ampliado) y BLEE (Betalactamasas de espectro extendido) en diferentes muestras recabadas en el Laboratorio de microbiología del Hospital Obrero , en este trabajo se tomaron en cuenta varios parámetros edad , sexo , tipo de muestra , servicio y multiresistencia.

Para la identificación de estos microorganismos se realizaron pruebas de sensibilidad y resistencia mediante la utilización de discos de antibiograma donde la formación de un halo en forma de huevo o de pera en presencia de una Cefalosporina ya sea de 1ra generación para BLEA y de 3ra generación para BLEE frente a Amoxicilina + ácido clavulánico , fueron útiles para su identificación solo se detectaron microorganismos productores de BLEA en muestras de orina , sobre todo en el sexo femenino con mayor porcentaje comprendidos entre la tercera edad y provenientes del servicio de consultas externas , para BLEE se encontraron también ,pero no con porcentajes incidentes elevados como el anterior.

En cada lectura del antibiograma ensayado se fue realizando un perfil de sensibilidad para tener una referencia de que antibiótico se puede utilizar o seleccionar para un buen tratamiento frente a una determinada infección.

Palabras clave :Microorganismos , BLEE ,BLEA ,TEM-1 , SVH-1 (inhibidores resistentes clase 1) ,OMPF(Proteína de la membrana externa F), enzimas betalactamasas , resistencia , plasmidos , Cefalosporinas , penicilinas , técnica de doble disco , halo sobrepuesto (forma de huevo o pera).

TABLA DE CONTENIDO

I.	Introducción.....	1
II.	Justificación.....	3
III.	Objetivos.....	4
	A. Objetivo General.....	4
	B. Objetivos Específicos.....	4
IV.	Diseño teórico.....	4
	A. Marco Referencial.....	4
	1. Antecedentes generales de B-lactamasa.....	4
	2. Resistencia bacteriana.....	6
	3. Mecanismo de resistencia.....	6
	a) Transporte de agentes antimicrobianos a través de la pared celular y la membrana celular.....	8
	b) Las proteínas porinas y la fusión través de la membrana externa.....	9
	4. Antibióticos que interfieren en la formación de la pared celular bacteriana.....	12
	a) Antibióticos betalactámicos y glucopeptidos.....	12
	b) Penicilina y las proteínas fijadoras de Vancomicina.....	12
	c) Modificación de las enzimas blanco, proteínas fijadoras y resistencia a antibióticos.....	14
	5. Enzimas modificadoras de antibióticos B-Lactamasa.....	15
	6. Inhibidores de las B-lactamasas.....	18
	B. Antibióticos que no ejercen su efecto sobre la pared celular.....	21
	1. Producción de enzimas modificadoras.....	21
	2. Alteración de los sitios blancos.....	21
	C. Betalactamasa de amplio espectro.....	22
	D. Detección de cepas productoras de BLEE, BLEA.....	25
	E. Opciones terapéuticas.....	26
V.	Diseño Metodológico.....	27
	A. Población en estudio.....	27

B. Tipo de investigación.....	27
C. Materiales y métodos.....	27
1. Métodos, técnicas y procedimientos generales.....	27
2. Materiales, equipos y reactivos de bioanálisis.....	28
a. Materiales y equipos.....	28
b. Medios de cultivo.....	29
c. Reactivo.....	29
3. Procedimientos del bioanálisis.....	30
a. Examen directo.....	30
b. Aislamiento.....	30
c. Identificación.....	31
d. Antibiograma.....	31
VI. Resultados.....	33
A. Resultado General.....	33
B. Resultado Específico.....	35
VII. Discusión.....	53
VIII. Conclusión.....	57
A. Conclusión general.....	57
B. Conclusiones específicas.....	57
IX. Bibliografía.....	57

TABLA DE CONTENIDO CUADROS

Cuadro N ° 1. Resultado general del total de muestras analizadas para la detección de BLEA.....	33
Cuadro N ° 2. Resultado general del total de muestras analizadas para la detección de BLEE.....	34
Cuadro N ° 3. Microorganismos aislados y su relación con BLEA.....	35
Cuadro N ° 4. Microorganismos aislados y su relación con BLEE.....	37
Cuadro N ° 5. Tipos de muestras analizadas y su relación con la producción de BLEA.....	39
Cuadro N ° 6. Tipos de muestras analizadas y su relación con la producción de BLEE.....	41
Cuadro N ° 7. Microorganismos aislados provenientes de muestras recabadas de cada especialidad medica.....	43
Cuadro N ° 8. Microorganismos aislados provenientes de diferentes tipos de muestras recabadas en el Laboratorio.....	45
Cuadro N ° 9. Tipos de muestras recabadas en el laboratorio y microorganismos aislados ambos relacionados con el sexo.....	47
Cuadro N ° 10. Pacientes registrados en el laboratorio de bacteriología según edad.....	49
Cuadro N ° 11. Perfil de sensibilidad en forma general de las muestras analizadas.....	51

TABLA DE CONTENIDO GRAFICOS

Grafico N ° 1. Porcentaje general del total de muestras analizadas para la detección de BLEA.....	33
Grafico N ° 2. Porcentaje general del total de muestras analizadas para la detección de BLEE.....	34
Grafico N ° 3. Porcentaje de microorganismos aislados productores de BLEA.....	36
Grafico N ° 4. Porcentaje de microorganismos aislados productores de BLEE.....	38
Grafico N ° 5. Porcentaje de muestras positivas productoras de BLEA.....	40
Grafico N ° 6. Porcentaje de muestras positivas productoras de BLEE.....	42
Cuadro N ° 7. Porcentaje total del numero de muestras recabadas de cada especialidad medica.....	44
Grafico N ° 8. Porcentaje total del tipo de muestras recabadas y porcentaje total de microorganismos aislados.....	46
Grafico N ° 9. Porcentaje de tipos de muestras recabadas y microorganismos aislados en relación al sexo.....	48
Grafico N ° 10. Porcentaje de la edad en base al numero de pacientes registrados.....	50
Grafico N ° 11. Porcentajes acumulados de resistencia y sensibilidad para cada antibiótico empleado en el antibiograma.....	52

I. INTRODUCCION .-A finales de la década de 1980 se describen los primeros brotes de cepas productoras de BLEA (B-lactamasa de espectro ampliado) como BLEE(B-lactamasas de espectro extendido) desde entonces se han ido incrementando el numero casi por todo el mundo ,sobre todo es causado por especies de enterobacterias , un estudio realizado recientemente en toda Europa demostró que un 22,8 % de los aislamientos de Klebsiella sp. eran productores de BLEA siendo la mas importante K. pneumoniae.

La producción de estas enzimas confiere resistencia a penicilinas , cefalosporinas y monobactams , los carbapenems y las cefamicinas , no son hidrolizados por este grupo de betalactamasas pero pueden ser activadas , aunque se han descrito casos de resistencia por hiperproducción de BLEA y por producción conjunta de BLEE (B- betalactamasa de espectro extendido)¹⁶(Martínez J.L).

La determinación de cepas productoras de BLEA y BLEE puede ser muy importante para conocer si existe brotes o epidemias que suelen afectar a los pacientes aunque también pueden ser de mayor extensión y originar una situación endémica ,

Los brotes nosocomiales causados por enterobacterias productoras de BLEA y BLEE pueden deberse a la diseminación horizontal de un plasmido por conjugación entre diferentes especies de bacterianas , o bien a la diseminación de un clon bacteriano multiresistente , estas epidemias se asocian a un consumo elevado de cefalosporinas de tercera generación .La colonización fecal es importante porque actúa de reservorio de estos microorganismos y facilita la transmisión de esta resistencia a otras enterobacterias.

La transmisión horizontal de paciente a paciente mediante la

manipulación por el personal sanitario es la forma mas frecuente de diseminación de una cepa epidémica, los factores de riesgo asociados a infección y/o colonización por estos microorganismos son: estancia prolongada en UCI (Unidad de cuidados intensivos), cateterización arterial o urinaria y consumo de antibióticos.

En el control de estos brotes ha resultado eficaz la restricción del uso de cefalosporinas de tercera generación, la educación del personal sanitario y la aplicación de medidas de barrera (aislamiento cutáneo) la descontaminación intestinal, aunque es una medida cuestionada, ya que puede seleccionar otros microorganismos multiresistentes.

Motivada por la capacidad de las bacterias de adquirir una resistencia a los betalactámicos y los distintos estudios realizados en diferentes países en donde esta alcanzando una verdadera importancia para el control de antibióticos es por lo que se eligió el tema intitulado.

“Determinar el porcentaje incidente de betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras laboratoriales ensayadas por el método Kirby Bauer.

La muestra constituyo 149 muestras para cultivos provenientes de diferentes áreas de servicio.

II. JUSTIFICACION.- El trabajo de investigación esta basado en poder obtener una información sobre la determinación de B-lactamasas de espectro ampliado y extendido que pueda presentarse en nuestro medio , sobre todo en el Hospital Obrero porque como es una institución que presta servicios a muchas personas aseguradas proveniente de muchos centros de trabajo , sobre todo presta atención a las personas de la tercera edad que están expuestas a muchos tipos de infecciones o problemas biológicos , esta incidencia puede dar por muchos factores de riesgo dentro del hospital como fuera de el .

Además esto servirá para mejorar la calidad de atención tanto de limpieza de equipos quirúrgicos como de antibióticos a recetar incluso en el momento de realizar un antibiograma y vigilancia constante del paciente para que no adquiera una infección nosocomial que implique una incidencia de betalactamasas. O talvez se produzca un brote epidémico o endémico dentro de nuestra población.

También será útil en la práctica médica en las asociaciones de betalactamicos e inhibidores de betalactamasas porque esta puede ser la causa de la aparición en la clínica de cepas productoras de betalactamasas resistentes a los inhibidores ya que el uso de estas asociaciones es mas frecuente en atención primaria que en los hospitales.

III. OBJETIVOS.-

A. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el porcentaje incidente de betalactamasas de espectro ampliado(BLEA) y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras laboratoriales ensayadas por el método Kirby Bauer .

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.-

- Determinar la relación entre multirresistencia y producción de BLEA y BLEE.
- Determinar que microorganismos presentan mayor porcentaje de incidencia si BLEA o BLEE.
- Conocer que tipo de muestra presenta Betalactamasas.
- Identificar la presencia de Betalactamasas según el servicio.
- Determinar la producción de betalactamasas en relación al sexo y edad del paciente.
- Conocer el perfil de sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas.

IV. DISEÑO TEORICO.-

A. MARCO REFERENCIAL.-

1. ANTECEDENTES GENERALES DE B- LACTAMASAS.-Hasta los años 1960 los betalactamicos constituían el tratamiento de elección para infecciones, ya que todas las cepas se mostraban uniformemente sensibles. A partir de la siguiente década comenzaron a describirse cepas resistentes a este antimicrobiano debido a la producción de betalactamasa incrementándose paulatinamente el numero de cepas que presentan este mecanismo de resistencia en casi todas las regiones y países alcanzando en muchos casos entre el 25-35 % de todos los aislamientos.

En algunos microorganismos , se han descrito alteraciones en las estructuras de sus proteínas fijadoras de betalactamicos que afectaría

tanto a cepas productoras del mismo y cuyo papel en la resistencia de compuestos betalactámicos es objeto de reciente discusión.

Como en otros microorganismos, el porcentaje de resistencia a los diferentes antimicrobianos varía de forma apreciable según el área geográfica y el periodo de tiempo analizado, por lo que la realización de estudios de vigilancia epidemiológica que combinen datos globales o nacionales, junto con otros más específicos o locales ofrece una visión del problema más ajustada a la realidad de cada ámbito analizado.

En *E. coli* resistente a la ampicilina la CMI (en mg/l) para amoxicilina-ácido clavulánico suele agruparse en los valores 8/4, 16/8 y 32/16, que se categorizan como sensible, intermedio y resistente, respectivamente. La variabilidad inherente al método puede ser una de las causas de que se observen distintas cifras de resistencia entre países e incluso en el mismo país, aunque otra causa puede ser la diferencia temporal en la realización de los trabajos .

En un estudio realizado en Londres con cepas aisladas entre 1990 y 1994 se encontró que aproximadamente el 5% (del 10% al 15% de las resistentes a la ampicilina) eran resistentes o con resistencia intermedia a amoxicilina-ácido clavulánico, y que había habido pocos cambios en esos cinco años. El principal mecanismo, observado en el 61% de las cepas, era la hiperproducción de TEM-1, seguido de la producción de OXA-1 (15%) y de la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas (13%), siendo raras las betalactamasas resistentes a inhibidores. Hay que tener en cuenta que la mayoría de las cepas estudiadas presentaban una CMI de amoxicilina-ácido clavulánico de 16/8 mg/l (resistencia intermedia) y sólo 21 tenían CMI >32/16 mg/l. En este último grupo es donde se encontraron tres cepas con betalactamasas resistentes a los inhibidores derivadas de TEM (*Inhibitor Resistant-TEM* o IRT)^{19 : 20}.

La presencia de los genes que codifican betalactamasas resistentes a inhibidores en plásmidos o transposones, elementos genéticos fácilmente transferibles, hace que el peligro de intercambio entre cepas de la misma especie, e incluso de distinta especie, sea un hecho a tener en cuenta en el futuro. Por otra parte, existe la posibilidad de la aparición de nuevas betalactamasas resistentes a inhibidores derivadas de otras betalactamasas. Bonono y cols. consiguieron un mutante de laboratorio en el cual el cambio Met69Leu en la betalactamasa OHIO-1 confería resistencia a los inhibidores de betalactamasas.

La introducción en la práctica médica de las asociaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas ha sido probablemente la causa de la aparición en clínica de cepas productoras de betalactamasas resistentes a los inhibidores. El uso de estas asociaciones es más frecuente en atención primaria que en los hospitales, lo cual explicaría la mayor prevalencia de cepas portadoras de IRT entre los aislamientos de la comunidad que entre los hospitalarios. El peligro de la aparición de nuevas mutantes con este fenotipo de resistencia, o el de la diseminación de las ya existentes, es un hecho probable que debe ser considerado y a ser posible evitado con una mejora en el uso de estas asociaciones antibióticas durante el tratamiento y durante la realización del antibiograma si se encuentran cepas betalactamasas se debe utilizar otros antibióticos de elección en donde la cepa muestre sensibilidad.

2. RESISTENCIA BACTERIANA.- Para comprender los mecanismos de la resistencia bacteriana es necesario entender la fisiología bacteriana, la farmacología de las drogas antimicrobianas y la biología molecular de los agentes infecciosos. Los genes para el mecanismo de la resistencia pueden ubicarse tanto en el cromosoma como en un elemento extracromosómico denominado plásmido. Los plásmidos son piezas circularizadas de DNA que actúan independientemente del cromosoma. La

significación práctica de la diferencia es que el DNA del plasmido se moviliza con facilidad de una cepa a otra , de un especie a otra , o incluso , de un genero a otro .Además , la vinculación de los genes de resistencia para múltiples antibióticos en un plasmido permite la transferencia en masa de la resistencia que caracteriza a muchos de los microorganismos resistentes mas nuevos.

El mecanismo mas común por el cual se transfieren los genes de la resistencia es la conjugación.Es necesario un factor de transferencia genética adicional antes de que un plasmido que transporta un gen de resistencia pueda transmitirse de un microorganismo a otro .El mecanismo de transferencia detectado mas recientemente es el transposon (elemento genético transponible) .Los transposones pueden transportar porciones de plasmidos .De manera mas importante , ellos también pueden llevar una pieza del cromosoma de una bacteria a otra por transferencia conjugativa (transposones conjugantes o " gen " saltarín) .se ha documentado la transferencia de resistencia a los antibióticos a través de una barrera importante entre bacterias grampositivas y gramnegativas.

Un mecanismo de resistencia puede expresarse en forma continua mas allá de la presencia o ausencia de un estímulo desencadenante.Este estado se denomina expresión constitutiva.En contraste, algunos genes deben ser inducidos para producir sus productos por exposición a la sustancia desencadenante .La B-lactamasa estafilocócica (penicilinasa) es un ejemplo de una enzima inducible. Esta presente en un plasmido y no se produce a menos que las bacterias estén expuestas a un antibiótico betalactámico, como la penicilina, después de lo cual comienza la producción de la enzima. Muchas B -lactamasas de las bacterias Gram. negativas estén presentes en el cromosoma y son producidas en forma constitutiva, pero pueden ser inducidas para producir niveles

mayores de enzima.

Algunas enzimas son segregadas de manera activa en el medio extracelular, donde pueden ejercer su acción antibacteriana. Las B – lactamasas de los estafilococos son segregadas. En contraste, la mayor parte de las enzimas de las bacterias gramnegativas esta unida a las células de modo que solo ejerce sus efectos si el antibiótico atraviesa la pared celular de la bacteria¹¹ (MIMS Cedric, 413).

3. MECANISMOS DE RESISTENCIA.-

Los mecanismos por los que se expresa la resistencia en las bacterias están resumidos en Anexo 1 .

El transporte de antibióticos a sus sitios de acción será considerado en primer lugar, debido a que es importante para todos los compuestos y todas las bacterias. Para los antibióticos que son activos contra paredes celulares (los betalactamicos , el grupo mas importante de agentes antimicrobianos y los glucopeptidos) y para los agentes antimicrobianos que operan por otros mecanismos se consideran por separado otras formas de resistencia . Es imposible sobreestimar la importancia de los mecanismos de resistencia múltiple a menudo complementarios en las especies bacterianas¹¹ (MINS Cedric, 415).

a. TRANSPORTE DE AGENTES ANTIMICROBIANOS A TRAVES DE LA PARED CELULAR Y DE LA MEMBRANA CELULAR .-

La acumulación de antibióticos en sus sitios de acción en la célula bacteriana es la suma del transporte al interior de la célula , la inactivación durante el proceso de transporte y la eliminación del antibiótico desde la célula .Primero debe considerarse el proceso de movimiento de avance a través de la olas membranas .Para comprender el transporte de moléculas al sitio activo es necesario considerar las diferencias estructurales entre las bacterias grampositivas y las gramnegativas .Las bacterias son microorganismos procariontes y tanto las especies grampositivas como las

gramnegativas contienen una mezcla de ácidos nucleicos , ribosomas y otra maquinaria celular en su citoplasma las bacterias grampositivas presentan una única membrana celular con una capa externa de peptidoglicano .Para los antibióticos betalactamicos y glucopetidos , que quizá no tengan que atravesar la membrana plasmática para ejercer su actividad antimicrobiana , el transporte a través de las membranas de las bacterias grampositivas no es un problema.

Las bacterias gramnegativas poseen una membrana plasmática interna y una membrana celular externa , entre las cuales hay una membrana celular externa entre las cuales hay una capa delgada de peptidoglicano .la permeabilidad de las membranas a los antibióticos y el transporté de las moléculas a través de las barreras son de la mayor importancia en el caso de las bacterias gramnegativas , que tienen dos membranas que obstaculizan a los agentes antimicrobianos que tienen como blanco de acción en el interior de la célula.

La membrana celular externa que es una barrera crucial para todos los agentes antimicrobianos , se considerara en primer lugar.El método mas simple para la entrada de las drogas en el interior de las células es la difusión directa a través de la membrana lipidica , pero incluso las sustancias muy hidrófobas no atraviesan la bicapa lipidica en forma eficiente .La razón para este bloqueo a la difusión es en parte la naturaleza polarizada , asimétrica de la membrana celular externa de las bacterias , que posee lipopolisacaridos con lípido A y un oligosacarido adherido solo sobre la cara mas externa de la membrana^{1:3}.

b. LAS PROTEINAS PORINAS Y LA DIFUSIÓN A TRAVES DE LA MEMBRANA EXTERNA .- Para muchos de los antibióticos incluso los betalactamicos, el medio de transporte principal es a través de la membrana externa de las bacterias entericas es un notable grupo de

1. Basualdo ,1105p

3. Brooks , 415p

proteínas de membrana, denominadas porinas .se han identificado dos proteínas porinas principales en E. Coli, la especie mas estudiada: una porina de canal grande designada OmpF (Proteína de la membrana externa F) y una porina de canal pequeño denominada OmpC.

En mutantes que carecen tanto de OmpF como OmpC, se produce un tercer canal, denominado PhoE, pero este no parece ser importante para el movimiento antibiótico.

Factores como la carga de la molécula y la hidrofobia del compuesto son factores importantes.Las moléculas cargadas negativamente se desplazan a través de la membrana con mayor lentitud que las moléculas con carga positiva o Zwitteriones (compuestos con cargas positivas y negativas equilibradas) .Se presume que las cargas negativas hacen que el antibiótico se " cuelgue " a medida que atraviesa el canal de porina cargado negativamente.La exclusión de los compuestos hidrófobos del ambiente acuoso de la porina puede explicar la carencia de eficacia del compuesto hidrófobo ,los antibióticos betalactamicos con grandes cadenas laterales , como la mezlocilina , piperacilina y cefoperazona , también atraviesan mal la membrana.Entre los antibióticos betalactamicos el que se comporta mejor es el Imipemen , que es un compuesto hidrofílico zwitterionico con una estructura muy compacta .Se ha propuesto que la explicación de la sensibilidad del Enterobacter Cloacae al imipemen , en presencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación , en su mayor capacidad de acceso a las células blanco, medida por el transito rápido , probablemente , mediante diversos canales de porinas.

En un estudio se realizaron investigaciones con Salmonela typhimurium que contenía dos proteínas porinas OmpF y OmpC (Aislamiento 1).

Una cepa variante aislada del mismo paciente solo produjo OmpF (Aislamiento 2) .Ambas cepas produjeron una B- lactamasa similar .En medios con baja osmolalidad , la cepa 1 produjo proteínas F y C mientras que la cepa 2 solo produjo proteína F , la porina de canal . En condiciones

de alta osmolalidad, como podría ocurrir en los tejidos de los pacientes, la síntesis de la proteína OmpF, la expresión de la OmpC continuó en la de transporte (porinas) de modo que ceso el transporte del antibiótico a través de la membrana y dio por resultado la resistencia bacteriana.

Las proteínas porinas de otras bacterias gramnegativas parecen comportarse de un modo similar a las de E. Coli.

No obstante, las porinas de *Pseudomonas aeruginosa* no se comportan de la misma manera. El único antibiótico con el cual la resistencia esta explicada con claridad por medio de una alteración en el transporte de membrana en la *P. aeruginosa* es el imipenem. En algunas situaciones este antibiótico logra entrar, no mediante la proteína porina principal, sino a través de una proteína de transporte específica, designada D2. Sin embargo, parece que es necesaria la presencia de una β -Lactamasa clase C cromosomita para la resistencia además de una proteína porina alterada.

Los antibióticos distintos de los compuestos betalactámicos también dependen de los canales de porinas para ingresar en la célula. La resistencia al cloranfenicol de las bacterias entericas y de *Haemophilus influenzae* que habitualmente es producida por degradación enzimática, también puede estar mediada por proteínas porinas alteradas. De modo similar, la resistencia a los aminoglucósidos puede estar mediada por alteraciones en las proteínas porinas, a pesar de que el mecanismo principal de la resistencia es la degradación enzimática. La resistencia a las quinolonas, que esta mediada sobre todo por cambios, en la estructura de las enzimas sobre las que actúa también puede ser producida por alteraciones en las proteínas de membrana.

Para algunas bacterias que deben ganar acceso al citoplasma bacteriano, puede existir una segunda barrera en la membrana plasmática interna. El cruce de la segunda membrana se realiza por un proceso que requiere gasto de energía y un carga negativa mínima dentro del citoplasma, la

fuerza motriz protónica , para “ empujar” los antibióticos aminoglicosidos al interior del citoplasma. Este mecanismo de transporte se demostró tanto para las bacterias grampositivas como para las gramnegativas .Se han descrito mutantes de Enterobacteriae que son resistentes in vitro a los antibióticos debido a deficiencias de este mecanismo de transporte , pero su importancia clínica no esta aclarada .Estas variantes aparecen como colonias pequeñas en medios sólidos pero pueden revertir a la morfología normal de las colonias⁸ (Koneman , 771p) .

4. ANTIBIOTICOS QUE INTERFIEREN EN LA FORMACION DE LA PARED CELULAR BACTERIANA

a) ANTIBIÓTICOS BETALACTAMICOS Y GLUCOPEPTIDOS .- La superfamilia de enzimas reconocedoras y los antibióticos que actúan en el nivel de las membranas celulares antes de introducirse a los mecanismos de resistencia es importante considerar el concepto evolutivo de una superfamilia de enzimas reconocedoras y su relación con la estructura bacteriana .Estas interacciones son fundamentales para comprender el grupo mas importante de agentes antimicrobianos , la familia de antibióticos betalactamicos .

b) . LA PENICILINA Y LAS PROTEÍNAS FIJADORAS DE VANCOMICINA.-El peptidoglicano que confiere rigidez y estabilidad funcional a la célula bacteriana , posee capas de aminoazucars alternadas , la N – acetilgucosamina y acido N – acetil muramico , unidas por pépticos .Como se digiera con anterioridad , la capa de peptidoglicano de las de las bacterias grampositivas es gruesa y externa a una membrana celular única , en tanto que la capa de peptidoglicano de las bacterias gramnegativas , que es mas delgada , se encuentra entre la membrana plasmática y celular externa .La biosíntesis del peptidoglicano consta de varios pasos que comienzan en el citoplasma y finalizan por fuera de la membrana celular .El estadio final del proceso es la transpeptidacion de la molécula de peptidoglicano en formación por medio

de la cual se une un residuo glicina de una cadena lateral de pentaglicina a la d- alanina de una cadena adyacente , liberando una segunda molécula de d – alanina en el proceso .También parecen intervenir una glicosilasa y una carboxilasa , pero su papel es menos claro.La transpeptidasa que se encuentra unida a la membrana celular , es un miembro de una familia de enzimas conocidas como proteínas fijadoras de penicilina , que a su vez son parte de la superfamilia de enzimas reconocedoras de penicilina

Además de las transpeptidasas, existen otras proteínas fijadoras de penicilina que participan en la formación de la pared celular bacteriana.

Estas proteínas fijadoras se encuentran adheridas a la membrana celular en las bacterias grampositivas y a la membrana plasmática interna en las especies gramnegativas .La función específica de las diferentes proteínas fijadoras de penicilina ha sido ilustrada de manera específica en *Escherichia Coli*, en la que la interferencia con diferentes proteínas produce efectos morfológicos diversos cuando se dificulta la síntesis de la pared celular.

En microorganismos bacilares , las diferentes proteínas fijadoras parecen funcionar en la formación de paredes cruzadas en el momento de la división celular y en la elongación de las células después de la división .Las proteínas fijadoras de penicilina se numeran de acuerdo con su peso molecular , la proteína 1 es la de mayor peso.El sistema de numeración es específico para cada especie , de tal forma que la proteína fijadora de penicilina1 de *Escherichia coli* no es la misma que la 1 de *Klebsiella pneumoniae*.Los compuestos de alto peso molecular funcionan como las transpeptidasas que son esenciales para la formación del peptidoglicano.Los compuestos de bajo peso molecular parecen funcionar como la d-alanina carboxipeptidasas , y su significado biológico no está aclarado.

Los antibióticos betalactámicos ejercen su efecto por interferencia con la formación de peptidoglicano, mecanismo compartido por los agentes glucopeptidos, como la vancomicina. Hace muchos años se detectó que la similitud estructural entre la molécula de penicilina y la D – alanina – alanina terminal de la cadena de peptidoglicano era esencial para la acción antibacteriana del compuesto. Nelly y col. dilucidaron la estructura tridimensional de la proteína transpeptidasa fijadora de penicilina y observaron su interacción con las penicilinas y cefalosporinas de manera directa, para establecer la identidad del sitio fijador de penicilina con la enzima transpeptidasa en forma definitiva.

En esencia, la penicilina engaña a la proteína fijadora de penicilina, haciéndole creer que es el siguiente bloque a agregar a la cadena de peptidoglicano en formación. Una vez insertada, la molécula de penicilina impide la elongación posterior de la cadena de peptidoglicano. Los diferentes miembros del grupo de los antibióticos betalactámicos poseen afinidades distintas para las diversas proteínas fijadoras de penicilina, la eficacia de los compuestos contra las bacterias se debe a que son unidos. La actividad bactericida puede requerir la interacción de un antibiótico betalactámico con más de una proteína fijadora de penicilina. Satta y col. Demostraron que la resistencia de E. coli aumentaba a medida que se saturaban más sitios críticos de fijación a penicilina. La saturación de proteínas fijadoras no esenciales no tiene efecto sobre la sensibilidad microbiana. El efecto de las enzimas autolíticas bactericidas de los antibióticos betalactámicos⁵ (Goodman, 1120).

c).-Modificación de las enzimas blanco, proteínas fijadoras y resistencia a antibióticos.-Un mecanismo importante de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos es una alteración de las proteínas fijadoras de penicilina, de tal forma que aquellos ya no tienen acceso a la cadena peptidoglicano en elongación. Las proteínas alteradas se designan mediante el agregado de un signo de prima (') , al esquema

numérico .Por ejemplo , el mecanismo para la resistencia de alto nivel de *Staphylococcus aureus* a las penicilinas resistentes a la penicilinas es la producción de una variante de la proteína fijadora PBP2a.En forma alternativa puede haber perdida de las proteínas fijadoras que tienen mayor afinidad por el antibiótico.

La evidencia que apoya la importancia de las proteínas fijadoras alteradas proviene de dos fuentes .En primer lugar, la presencia de proteínas alteradas de estafilococos a la meticilina induce una alteración de la proteína fijadora 2(PBP2) a una variante (PBP2a)

En las Enterobacteriaceae pueden ser importantes los cambios en las proteínas fijadoras.Los cambios en la PBP3 de *Escherichia coli* se relacionaron con la resistencia a la cefalexina y a algunos otros antibióticos cefalosporinicos .En forma similar , la resistencia al imipenem puede estar mediada por cambios de las proteínas fijadoras , también entre las bacterias entericas como *Enterobacter aerogenes* o *Acinetobacter baumannii*.En el caso de la cepa *Enterobacter* la proteína fijadora se encontraba en la membrana externa y no en la citoplasmática y puede haber sido importante en el transporte del antibiótico a través de la membrana.

La segunda línea de evidencia que apoya la importancia de las proteínas fijadoras proviene de la observación de que la perdida de la proteína variante da como resultado la recuperación de la sensibilidad o incluso produce un estado de hipersuceptibilidad¹²(Prescott , 1015).

5. ENZIMAS MODIFICADORAS DE ANTIBIÓTICOS B – LACTAMASAS.-Otro grupo importante de enzimas reconocedoras de penicilina es la clase conocida como B- lactamasas .En el presente esta claro que las B- lactamasas y las proteínas fijadoras de penicilina tienen un origen evolutivo común aunque lejano.

Para ejercer su función ambas clases de compuesto deben interactuar con los antibióticos betalactámicos. Se han demostrado secuencias de aminoácidos similares en las proteínas fijadoras de penicilina de alto y bajo peso molecular y en ciertos tipos de β -lactamasa, además se comprobaron similitudes en la conformación y la estructura tridimensional. Es interesante que algunas proteínas fijadoras de penicilina pueden funcionar como β -lactamasas, aunque no con tanta eficacia o con una importancia clínica tan grande como las B-lactamasas "profesionales".

Además, el mecanismo de acción tanto de las B-lactamasas como de las transpeptidasas fijadoras de penicilina, es la ruptura de un puente amida por un mecanismo de acilación enzimático.

Las B-Lactamasas son una familia de enzimas cuya importancia varía desde ser el mecanismo prácticamente exclusivo en un extremo, hasta ser constituyentes insignificantes de la pared celular de algunas bacterias entericas. Cualquier antibiótico o grupo de antibióticos betalactámico puede ser inactivado por estas enzimas. La cantidad de enzimas diferentes es superior a 170 y el ritmo de crecimiento no muestra señales de disminuir como la especificidad de las proteínas fijadoras de penicilina para los antibióticos betalactámicos es un factor que determina la sensibilidad de la bacteria al fármaco, la especificidad de la β -lactamasa para un antibiótico betalactámico es un determinante importante de la eficiencia con la cual la enzima hidroliza el fármaco. Si ocurre en una área estructuralmente en uno o más aminoácidos puede alterar la especificidad de la molécula.

Existen evidencias de que las fuentes microbianas de antibióticos (como las especies de *Streptomyces*) producen tanto el antibiótico como enzimas modificadoras que protegen al productor del antibiótico contra la auto-destrucción. Es interesante conocer que algunos científicos que desarrollaron la penicilina publicaron la presencia de penicilinasas en una cepa *Bacillus* (*Escherichia*) *coli* antes de la introducción del antibiótico.

para uso clínico .esta claro que la naturaleza no invento las B-lactamasas solo para atormentar a los médicos especialistas en enfermedades infecciosas y a las compañías farmaceuticas.Dos grupos de investigadores han presentado evidencias que apoyan el concepto acerca de que el papel fisiológico de las B –lactamasas es reestructurar el peptidoglicano en el curso del desarrollo de la célula bacteriana, estos investigadores encontraron que la síntesis de B-lactamasas es inducida tanto por la presencia de antibióticos betalactamicos como por la de precursores de la pared celular en el medio extracelular , esto remarca la similitud estructural de penicilina con el dipéptido d-alanina-d-alanina terminal de las cadenas de peptidoglicano.

Se ha creado una variedad de esquemas de clasificación , el grupo mas importante es la clase A, que son proteasas que tienen preferencia por la penicilina o una actividad de amplio espectro .Se encuentran en los cromosomas o en plasmidos y por tanto son transferibles de una célula a otra con facilidad .Pueden ser constitutivas o inducibles, en este grupo se encuentran las enzimas estafilococicas y muchas de las B- lactamasas mas importantes de las bacterias gramnegativas .Las enzimas de clase C son sobre todo las cefalosporinas , constitutivas o inducibles , que se encuentran en el cromosoma de las bacterias gramnegativas .las enzimas clase B (metaloenzimas) y clase D (oxacilinasas) tienen menor importancia clinica.En época reciente se desarrollo una nueva clasificación de las B-lactamasas que integran características funcionales y moleculares.Algunas B-lactamasas , como las producidas por el *Staphylococcus aureus* , han sido estables durante varias décadas .esta enzimas poseen un espectro de actividad bastante estrecho , dirigido a las moléculas de penicilina .

Las de espectro mas amplio, las B-lactamasas transmitidas por plasmidos de las bacterias gramnegativas, como la TEM-1 y la SHV-1, también fueron estables durante muchos años.

Sin embargo , desde principios de la década de 1980 comenzó a parecer una serie de variantes enzimáticas que tienen un espectro de actividad mas amplio contra muchos de los antibióticos betalactamicos mas modernos. Estas B-lactamasas de amplio espectro se encontraron por primera vez en Europa , con mayor frecuencia en aislamientos de especies de Klebsiella , y con menor asiduidad en Escherichia coli . La cantidad de enzimas continua en aumento. Las enzimas nuevas y sus precursores como la TEM-1 y la SHV-1 , se encuentran en plasmidos , pero pueden haberse originado en una enzima en plasmidos , pero pueden haberse originado en una enzima cromosomita. Muchas de las B-lactamasas nuevas difieren entre si solo por un aminoácido , pero los cambios tienen implicaciones profundas para el manejo de muchas enfermedades infecciosas(ver anexo 2)¹⁰(Madigan , 135).

6. INHIBIDORES DE LAS B-LACTAMASAS .-Estos compuestos se asemejan lo suficiente a los antibióticos betalactamicos como para unirse a las B-lactamasas ya sea en forma reversible o irreversible , para proteger de la destrucción a los antibióticos . Son mas eficaces cuando actúan como “ bomberos suicidas “ , absorbiendo toda la enzima disponible . No es sorprendente que estos compuestos , que pueden imitar a los betalactamicos en lo que respecta a funcionamiento , también posean una actividad antibacteriana limitada por si mismos. En efecto , en el caso del aztreonam , que fue creado como antibiótico betalactamico , luego se descubrió que tenia actividad adicional como inhibidor de B-lactamasas . Los tres inhibidores de actividad adicional como inhibidor de B-Lactamasaa. Los tres inhibidores de la actividad de las B-lactamasas que han tenido aplicación en medicina clínica son el ácido clavulanico , el sulbactam y el tazobactam . Los tres inhibidores son eficaces contra la

penicilinasa del estafilococo y tienen eficacia variable contra enzimas cromosómicas de las bacterias gramnegativas¹(MIMS ,Cedric , 417).

El clavulanato y el tazobactam son superiores al sulbactam en actividad contra las B-lactamasas transmitidas por plasmidos de los microorganismos gramnegativos incluidas las B-lactamasas de amplio espectro .No existen diferencias importantes entre el clavulanato y el tazobactam , aunque el espectro de actividad es diferente.Algunas enzimas de amplio espectro son producidas en grandes cantidades.en el laboratorio es posible matar las bacterias con grandes cantidades de antibióticos antes que ocurra la inducción de la enzima , lo que da una falsa impresión de sensibilidad.Teóricamente , antes de la inducción de la B- lactamasa pequeñas cantidades de estafilococos deben haber muerto in vivo , pero este hecho no ha sido demostrado.Segundo la producción extracelular de B-lactamasa puede proteger a las bacterias coinfectantes que no producen la enzima .se ha adelantado la hipótesis de que las recaídas de la faringitis estreptocócica del tratamiento con penicilina pueden deberse a este mecanismo pero otros investigadores no han podido demostrar una relación entre la presencia de bacterias que producen B-lactamasas y el resultado final del tratamiento.

Las B-lactamasas de las bacterias gramnegativas son mas complicadas .La mayoría de las enterobacterias contiene enzimas cromosómicas constitutivas que se producen a bajo nivel y que varían según la especie.La inducción de altos niveles de estas enzimas cromosómicas Clase C , sobre todo cefalosporinas , aumenta el nivel de resistencia y expande la cobertura eficaz de las enzimas a otras resistentes a la acción de los betalactámicos , como las cefalosporinas de tercera generación y los carbapenémicos .La aparición de B- lactamasas inducibles de clase A que funcionan como penicilinasas y / o cefalosporinasas ha ampliado el arsenal de armas bacterianas .la localización de enzimas , como la TEM -1 y la SHV- 1 en los plasmidos

facilita la diseminación entre diferentes especies. Varios progresos incrementaron aun mas la capacidad de las bacterias para inactivar antibióticos nuevos , como las cefalosporinas de tercera generación (resistentes a B-lactamasa) y los carbapenemicos.

En primer lugar , la superproducción de enzimas inducibles cromosomicas o de plasmidos puede inactivar antibióticos como el imipemen o las cefalosporinas de tercera generación que eran resistentes a la degradación por cantidades normales de enzima. Segundo las B-lactamasas de amplio espectro inactivan muchas de las cefalosporinas de tercera generación , aunque los carbapenemicos son relativamente resistentes a esta enzimas versatiles. Por ultimo , las bacterias gramnegativas han estado lo suficientemente llenas de recursos como para producir B-Lactamasas que inactivan antibióticos en forma especifica , como el imipemen , que son resistentes a la acción de la mayor parte de las otras enzimas .En efecto , las bacterias elaboraron enzimas que son activas contra virtualmente cualquier antibiótico que pudieran producir los químicos.

Varios factores determinan la eficacia de combinaciones de inhibidores , antibióticos , enzimas y cepas bacterianas especificas. Estos factores incluyen la magnitud con la que los antibióticos o los inhibidores inducen la actividad B –lactamasa , la cantidad de enzima producida , y la eficacia del inhibidor contra el tipo especifico de B –lactamasa producida .Los antibióticos que son inductores eficaces de B – lactamasas con frecuencia siembran la semilla de su destrucción , además de la de sus amigos y parientes .Entre las B-lactamasas de amplio espectro algunas son bloqueadas por diferentes inhibidores , en tanto que otras no son afectadas por su presencia⁸ (Koneman , 777p).

B) ANTIBIÓTICOS QUE NO EJERCEN SU EFECTO SOBRE LA PARED CELULAR.-

1. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS MODIFICADORAS .- Las enzimas modificadoras también son importantes para algunos antibióticos que ejercen su acción dentro del citoplasma de la célula bacteriana .El mecanismo primordial de resistencia a los aminoglicosidos son las enzimas modificadoras : Existen tres tipos generales de proceso :

- Fosforilación
- Acetilacion
- Adenilacion

Todos los antibióticos aminoglicosidos tienen riesgo de ser inactivados por alguna de estas enzimas .Las bacterias gramnegativas que inactivan la estreptomina y la kanamicina han adquirido una distribución tan amplia que estos antibióticos dejaron de ser de uso habitual en la clínica.

La amikacina es el menos vulnerable a estas enzimas inactivadoras, pero puede ser anulada por otros mecanismos, en particular en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*.La resistencia a los aminoglicosidos se desarrollo en proporciones epidémicas en los hospitales de todo el mundo. La eritromicina y el cloranfenicol también pueden ser inactivados enzimáticamente .En el caso del cloranfenicol, la enzima acetiltransferasa es responsable de la mayor parte de las resistencias clínicas .Para las tetraciclinas, la inactivacion enzimatica es un mecanismo secundario de resistencia.

2 . ALTERACIÓN DE LOS SITIOS BLANCOS.- Los cambios de afinidad de los blancos ribosómicos son importantes en la resistencia a algunos agentes antimicrobianos , en particular la tetraciclina , eritromicina , quinolonas , aminoglicosidos , trimetropima y sulfametoxazol.Si bien el mecanismo primario de resistencia a las tetraciclinas es el flujo ya expuesto también se describió , como mecanismo secundario importante , una proteína soluble que protege a

los ribosomas .las alteraciones en el sitio de acción ribosómico de los macrolidos y lincosamidas , como la eritromicina y la clindamicina , son mecanismos importantes de resistencia para este grupo de antibioticos tipo quinolona , es el mecanismo de resistencia mas importante a este nuevo grupo de fármacos , tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas , aunque la resistencia también puede estar producida por barreras de difusión a través de la pared celular . La resistencia a aminoglicosidos puede estar mediada por alteraciones de los blancos ribosómicos, así como por inactivacion enzimatica.

La resistencia a aminoglicosidos puede estar mediada por alteraciones de los blancos ribosómicos , así como por inactivacion enzimatica.Cuando actúa este mecanismo , en realidad puede haber una acumulación de antibiótico (ineficaz) dentro de la célula bacteriana .Un mecanismo importante de resistencia tanto a la trimetropima como al sulfametoxazol es la alteración de las enzimas blanco secuéciales de la vía bioquímica de formación de ácidos nucleicos , la dihidropteroato sintetasa para las sulfonamidas y la dihidrofolato reductasa para la trimetroprima¹³(Walter, 352).

C) BETALACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO.-A comienzos de la década de 1988 se detectaron en Europa cepas de especies de Klebsiella con sensibilidad reducida a las cefalosporinas de tercera generacion.La resistencia estaba producida por nuevas B-lactamasas presentes en plasmados que rápidamente fueron transferidos a Colí. Las nuevas enzimas derivan de las B-lactamasas de los plasmados clase A existentes en bacterias gramnegativas, como el TEM-1 y el SVH-1.En la actualidad hay tal variedad de enzimas con diferentes especificidades, que es imposible emitir juicios absolutos acerca de que antibioticos son afectados y cuales no.

Las enzimas mas frecuentes en los aislamientos clínicos de Klebsiella pneumoniae , Klebsiella oxytoca y Escherichia coli proporcionan un alto

grado de resistencia a la ampicilina , piperacilina , ticarcilina y cefalotina y sensibilidad reducida para aztreonam y las cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima , ceftriaxona y ceftazidima .Por esta razón han sido denominados b-Lactamasas de amplio espectro ,las cefamicinas , como la cefoxitina , el cefotetan y moxalactam y los carbapenemicos , como el imipenem no son afectados .

La sinergia de los antibioticos b-lactamicos con el clavulanato o el sulbactam varia según la enzima especifica, pero no se puede confiar terapéuticamente en ella para todas las cepas, las enzimas de amplio espectro derivan de cromosomas y plasmidos.

Estas cepas resistentes se han establecido permanentemente en muchos hospitales en los cuales producen enfermedad epidémica en especial en unidades de terapia intensiva.Los factores de riesgo de contaminación con estas cepas en un hospital francés fueron la frecuencia de los procedimientos invasivos y la duración de la internacion en el hospital .La colonización fue un requisito previo para la infección invasora , en otras situaciones , el amplio uso de las cefalosporinas de tercera generación , a veces utilizadas en forma apropiada para el tratamiento de infecciones graves producidas por bacterias resistentes a otros antibioticos , ha dado lugar a la aparición de cepas que producen enzimas de amplio espectro.La diseminación de la infección se puede reducir con medidas de control estándar para las infecciones y con restricción del uso de las cefalosporinas de tercera generación pero las cepas pueden reaparecer después.

Los productores de B- lactamasas de amplio espectro muestran mayor resistencia a las cefalosporinas de tercera generación a medida que aumenta el inculo bacteriano (efecto inculo) lo que probablemente sea causado por la incapacidad de los antibioticos para matar o inhibir a las bacterias .las cefamicinas que con frecuencia parecen eficaces in vitro tampoco ejercen actividad bactericida , por lo que su importancia para el

tratamiento no está aclarada. El imipenem, que posee actividad bacteriostática y bactericida es eficaz *in vitro* y terapéuticamente activo contra cepas que no poseen otros mecanismos de resistencia, en un estudio donde se infectaron ratas en forma experimental con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* que producía B-lactamasa TEM-26, las combinaciones ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam fueron eficaces para reducir los recuentos de colonias en abscesos intraabdominales, pero el imipenem fue más eficaz.

Además su amplio espectro de actividad contra agentes antimicrobianos, los productores de B-lactamasas de amplio espectro plantean un desafío adicional, debido a que las pruebas actuales para sensibilidad a antimicrobianos no detectan la resistencia a ciertos antibióticos, la ceftazidima es el mejor antibiótico centinela que permite sospechar resistencia siendo el único con el cual una disminución de la resistencia alcanza realmente el punto de corte para la interpretación de resistencia en cualquiera de los sistemas de prueba utilizados habitualmente.

El reconocimiento de una epidemia de infecciones producidas por productores de B-lactamasas de amplio espectro demora porque las pruebas de difusión con discos arrojaron resultados de sensibilidad falsos. La presencia de B-lactamasas de amplio espectro puede sospechar si en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* o de *Escherichia coli* se demuestra resistencia a la ceftazidima, pero sensibilidad a otras cefalosporinas de tercera generación.

Lamentablemente, algunas cepas parecen sensibles incluso a la ceftazidima. Las enzimas son transportadas por plásmidos que con frecuencia median la resistencia a otros antibióticos-aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfonamidas, de tal forma que la aparición de patrones no habituales de resistencia también puede ser un indicio de la presencia de enzimas de amplio espectro. Se han sugerido varios métodos para mejorar la detección de este mecanismo de resistencia.

Una prueba de sinergia con dos discos de cefotaxima y amoxicilina – clavulanico colocados con una separación de 30 mm entre centros , es eficaz para detectar la resistencia mediada por enzimas de tipo BLEA .Thompson y Sanders evaluaron dos métodos para detectar resistencia, se realizo una prueba con dos discos , con discos de ampicilina – clavulanato rodeados por discos de aztreoman y de cefalosporinas de tercera generación (separados por 30 mm entre centros) .La distorsión de los halos de inhibición en forma sinérgica indicaba la producción de enzima .Este método detecto resistencia verdadera en 22 de 28 cepas (79 %) .El segundo fue un método tridimensional en el cual se corta un orificio circular en el agar exactamente en medio de la futura ubicación de los discos con antimicrobianos , el orificio se llena con el inóculo bacteriano , por lo demás se sigue con el método de difusión de discos , la distorsión de la forma de halos de inhibición en el punto del corte en el agar indicaba la producción de enzima.La prueba tridimensional que usaron detecto resistencia en 26 de 28 aislamientos (93 %) , pero la técnica y la interpretación son muy dificultosas¹⁵(Schaechter , 425).

D. DETECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BLEE Y BLEA .-

Para la detección por el laboratorio de las cepas productoras de BLEE , se recomienda probar la susceptibilidad frente a varias Cefalosporinas de tercera generación (Tenover et al , 1999) .En un intento para garantizar la detección por el laboratorio de esta enzima , el Comité Nacional para Estandares de Laboratorio Clínico (NCCLS por sus siglas en ingles) , plantea que en *Escherichia Coli* , *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae* , deberá observarse una CMI mayor o igual a 2 mg / ml frente a alguno de los siguientes antibióticos : Cefpodoxima , Cefotaxima , Ceftriazona o Aztreonam (NCCLS , 2000) .Una vez detectada una cepa con una CMI elevada , , se deben analizar pruebas confirmatorias , que

consisten en utilizar Cefotaxima y Ceftazidima con y sin ácido Clavulanico .Una disminución de tres veces o mas en la CMI del antibiótico / ácido clavulanico frente al antibiótico solo , confirma una cepa productora de BLEA (NCCLS , 2000) .También existen métodos comerciales como las cartas Virek ESBL y las tiras Etest EBLS (Wong Bering , 2001) , así como el método de aproximación de doble disco en placa de Mueller –Hinton.

E. OPCIONES TERAPEUTICAS .-Existen pocos datos clínicos que establezcan la relación entre el tipo de BLEE y el resultado del tratamiento (Wong –Beringer , 2001) , .El tratamiento para los pacientes con infecciones causadas por cepas productoras de BLEE es todo un reto ,puesto que estas cepas tienen varios niveles de resistencia a las Cefalosporinas de espectro extendido , además presentan al mismo tiempo resistencia a otros antibióticos tales como : Aminoglucocidos , Sulfas y Fluoroquinolonas .

El tratamiento de primera elección es el uso de los Carbapenems , como el Imipen y el tratamiento de segunda elección es el uso de Ciprofloxacina , el cual puede variar en dependencia del tipo de infección , como por ejemplo o en infecciones del tracto urinario se recomienda Amoxicilina / Clavulanico y en meningitis neuro.quirúrgicas (ventriculitis) se puede adicionar Polimixin B sin embargo , existe el riesgo de la aparición de cepas resistentes a los Carbapenems , principalmente en *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.En estudios realizados se ha observado , que la brusca disminución de la utilización de cefalosporinas de tercera generación y el uso incrementado del Imipenem .Otras opciones de tratamiento son , Cefotetan o Piperacilina / Tazobactam⁹ (Honrar , 185).

V. DISEÑO METODOLOGICO.-

A. POBLACION EN ESTUDIO .-La población tomada en estudio fueron todas las muestras recabadas en el laboratorio provenientes de aquellos pacientes que presentaron infecciones de cualquier índole donde se obtuvo un total de 149 muestras de cultivos se tomaron en cuenta la edad , el sexo , el tipo de muestra y los diferentes servicios de donde provenían las muestras como también se tomaron en cuenta pacientes externos pertenecientes al centro hospitalario del Hospital Obrero N ° 1 . ,

B. TIPO DE INVESTIGACION .El trabajo de investigación es descriptivo porque se describe la capacidad de algunas bacterias para producir Beta –lactamasas ya sea de espectro extendido o ampliado.

Es longitudinal porque la investigación se realizo a lo largo de un tiempo determinado que en este caso es el mes de julio y agosto del 2004.

Es prospectivo por que la investigación se orienta a la resistencia bacteriana causadas por microorganismos productores de Beta-lactamasas que están por acontecer es decir fue una investigación de incidencia porcentual.

C. MATERIALES Y METODOS.-

1. METODOS , TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

El método que se utilizo fue mediante una hoja de registro (ANEXO 3) de cada paciente .

La técnica utilizada consto primero de un aislamiento directo del microorganismo utilizando para las distintas muestras medios como agar sangre para urocultivos, secreciones agar Chocolate y en algunos casos se utilizo agar nutritivo para otras muestras simultáneamente, se realizo un frotis directo para observar al microscopio.

Pasadas las 24 horas según el aspecto y característica de las colonias se procedió a la tipificación de los microorganismos mediante una batería Bioquímica (TSI, SIM; Lisina –Ornitina y Citrato) .

Luego de las 24 horas transcurridas se verifico el tipo de microorganismo y se procedió a realizar el antibiograma correspondiente para cada microorganismo para esto se aisló con una asa bacteriológica 5 colonias aproximadamente las cuales fueron suspendidas en suero fisiológico para realizar la escala de Mc Farland, luego se procedió a realizar la siembra , una vez transcurrida las 24 horas se procedió a hacer la lectura del correspondiente antibiograma , todas las colonias que presentaban una multirresistencia a mas de tres tipos de antibióticos nuevamente fueron sembradas en medios de Mueller Hinton para determinar su producción de betalactamasas de espectro ampliado y extendido.

2. MATERIALES , EQUIPOS Y REACTIVOS DEL BIOANALISIS

a. MATERIALES Y EQUIPOS

- Balanza analítica
- Microscopio
- Estufa (27 ° C – 37 ° C)
- Autoclave (120 ° C , 1,5 atm)
- Refrigerador (4 ° C)
- Laminas portaobjetos
- Laminas cubreobjetos
- Cajas petri
- Mechero
- Asa bacteriológica
- Lupa

- Tubos de ensayo
- Tubos de hemólisis
- Gradilla
- Pipetas de vidrio (5 , 10 , 20 mL)
- Probetas (50 , 100 , 500 mL)
- Matraz erlenmeyer (500 mL)
- Varillas
- Cubeta de tinción Gram.
- Pinzas estériles
- Tijeras estériles
- Hisopos estériles
- Regla graduada para antibiograma
- Cámara de Neubauer

b. MEDIOS DE CULTIVO

- Medio Agar Sangre (Anexo 4)
- Medio Agar Chocolate
- Medio Agar nutritivo (Anexo 5)
- Medio Mueller Hinton (Anexo 6)
- Medio TSI (Anexo 7)
- Medio Citrato (Anexo 8)
- Medio SIM (Anexo 9)
- Medio Lisina – Ornitina
- Medio Ureasa (anexo 10)

c. REACTIVOS

- Agua destilada
- Solución fisiológica 0,9 %
- Colorantes de tinción Gram.
- Aceite de inmersión

- Escala de Mac Farland
- Discos de antibiograma
- Reactivo de Kovac
- Reactivo lugol
- Alcohol

3. PROCEDIMIENTO DEL BIOANALISIS

a. EXAMEN DIRECTO

Todas las muestras recibidas en el laboratorio se proceden como primer paso con un examen directo , el cual consiste en un examen macroscopico de la muestra en el cual se observa el aspecto de la muestra ,luego se realiza un examen microscópico para observa la presencia de leucocitos células epiteliales , cilindros , bacterias y levaduras en el caso de la muestra de orina , en cuanto a las demás muestras liquidas se observa la presencia de leucocitos y bacterias .

Se realiza también un frotis directo en un portaobjetos que posteriormente se le realiza la tinción Gram. para observar la flora microbiana y la presencia de leucocitos polimorfo-nucleares.

b. AISLAMIENTO

- Teniendo las diferentes muestras se procede al sembrado en los diferentes medios (Agar sangre, Agar Chocolate, Agar nutritivo) dependiendo de la muestra.
- Pasadas las 24 horas se observa el desarrollo de colonias, se procede a realizar la biotipificaion de las colonias mediante las

baterías bioquímicas, las cuales son leídas pasadas las 24 horas.

c. IDENTIFICACION

- Pasadas las 24 horas correspondientes, según la tipificación bioquímica se reporta el microorganismos aislado y / o enterobacteria aislada.
- Identificada la bacteria se procede a tomar con una asa bacteriológica 5 colonias las cuales fueron suspendidas en un tubo de ensayo que contenga 5 ml de solución fisiológica , este se incuba por el lapso de una hora de manera de observar la turbidez para compara la suspensión con un tubo que posea una substancia patrón de 0,5 que equivale a 10^8 enterobacterias por mL.Luego la siembra se realiza con un hisopo estéril y sobre una caja petri que contenga Agar Mueller Hinton .

d. ANTIBIOGRAMA

- Una vez sembrada las colonias de microorganismos se procede a colocar los discos de antibiograma utilizando una pinza estéril , colocando los discos siempre a una distancia de 2 cm. entre disco y disco y a una distancia de 2 cm. de las paredes de la caja petri .
- Luego de las 24 horas se procede a leer el antibiograma todos los microorganismos que presenten multirresistencia a tres tipos de antibióticos , son aislados nuevamente en otro

medio de Mueller Hinton Repitiendo el paso anterior , estos fueron sometidos a disco específicos para la búsqueda de beta-lactamasas de la siguiente manera :

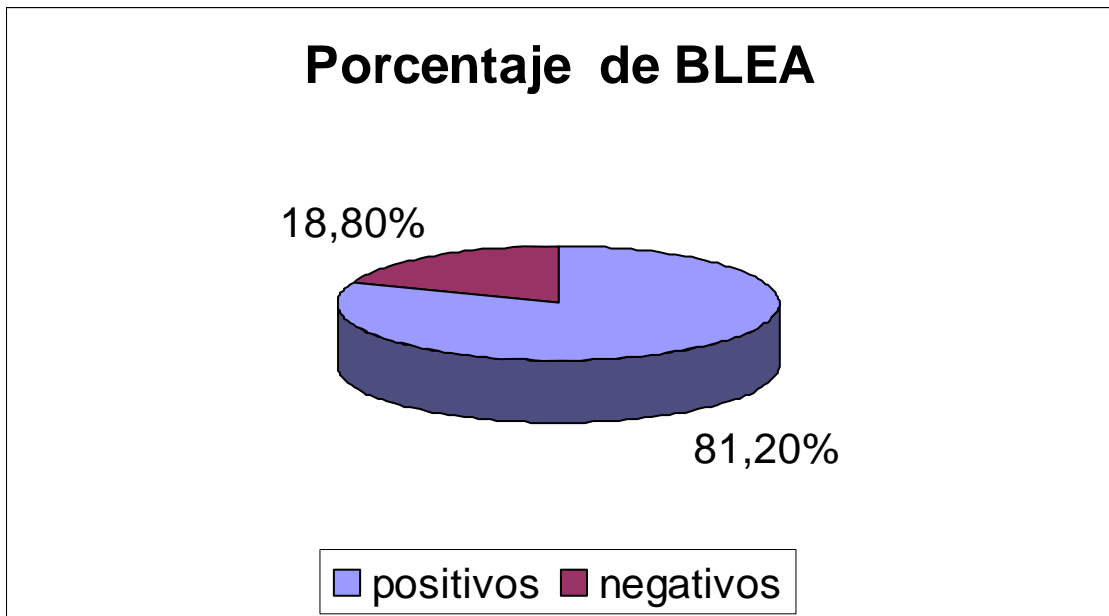
ANTIBIOTICOS	
BLEA (Betalactamasa de espectro ampliado)	Cefalotina Amoxicilina + ácido clavulanico
BLEE (Betalactamasa de espectro extendido)	Cefotaxima Amoxicilina + ácido clavulanico

VI. RESULTADOS.-**A. RESULTADO GENERAL.-**

CUADRO N ° 1. Resultado general del total de muestras analizadas para la detección de BLEA.

BLEA	Numero de muestras	Porcentaje
Positivas	121	81,20%
Negativas	28	18,80%
Total	149	100,00%

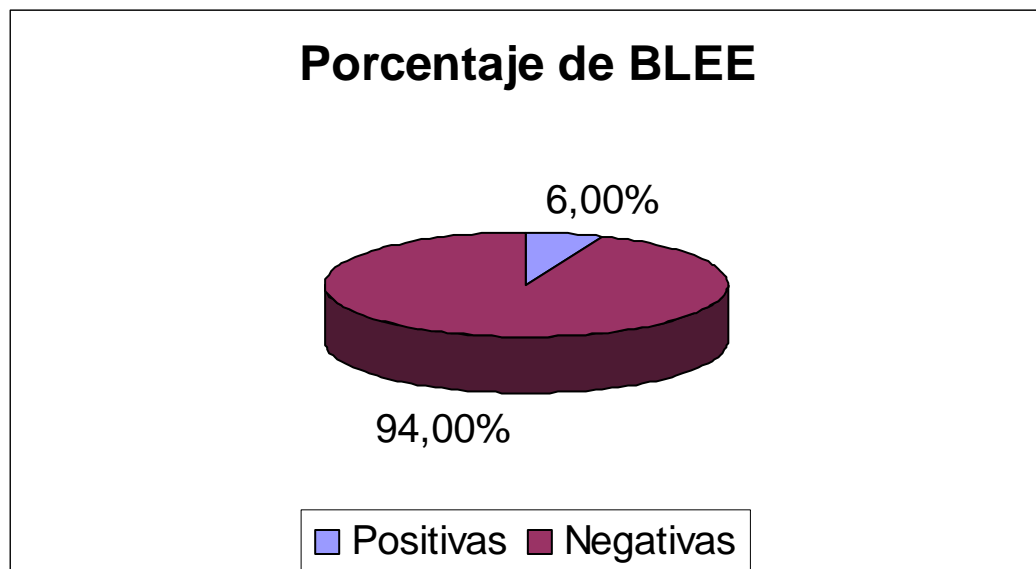
GRAFICO N° 1. Porcentaje general de muestras analizadas para la detección de BLEA.



CUADRO N ° 2. Resultado general del total de muestras analizadas para la detección de BLEE.

BLEE	Numero de muestras	Porcentaje
Positivas	9	6,00%
Negativas	140	94,00%
Total	149	100,00%

GRAFICO N° 2. Porcentaje general del total de muestras analizadas para la detección de BLEE.



CUADRO N ° 3. Microorganismos aislados y su relación con BLEA

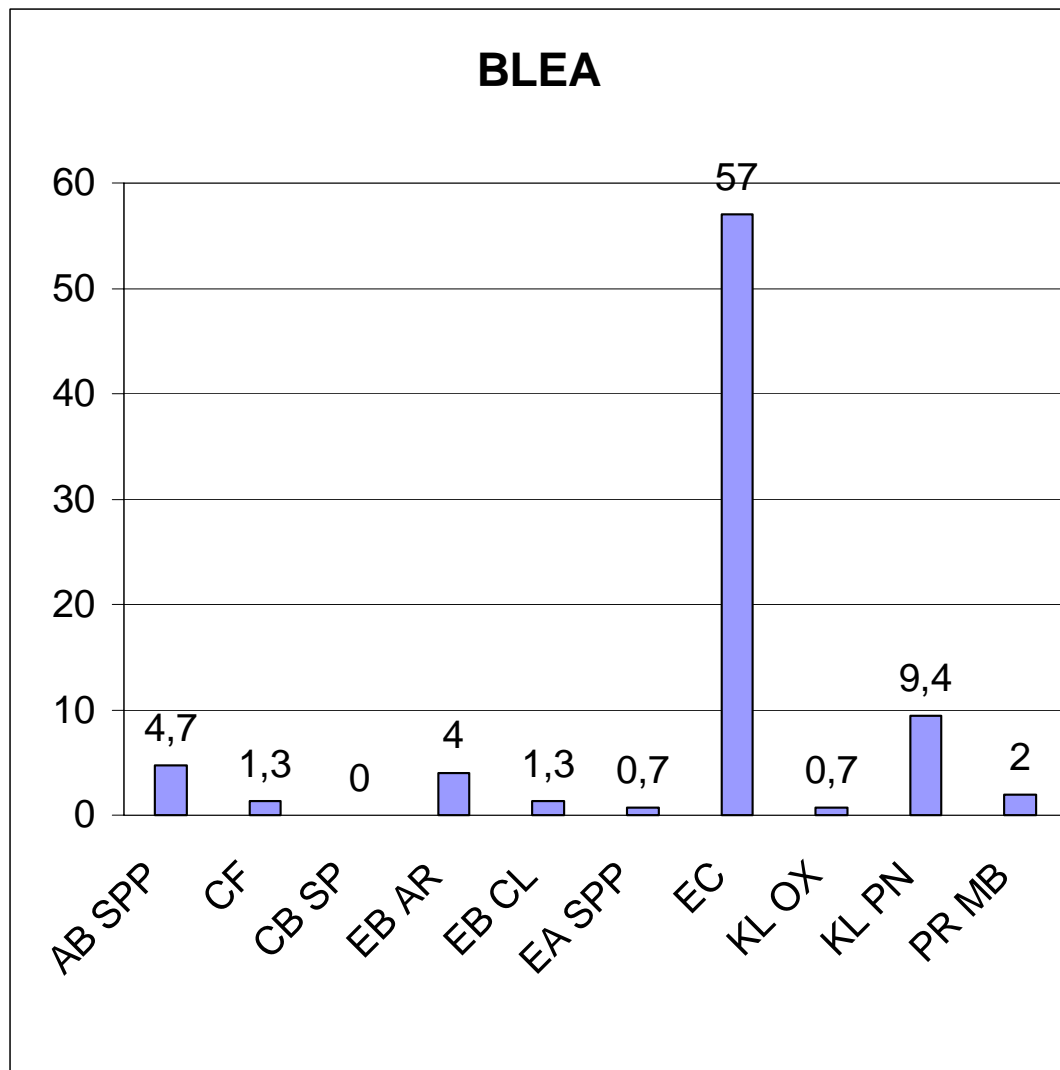
BLEA	MP	MNP	PORCENTAJE MP	
AB SPP	7	0	4,7	Acinetobacter SPP
CF	2	0	1,3	Citrobacter Freundii
CB SP	0	1	0	Corynebacterium SP
EB AR	6	1	4	Enterobacter Aerogenes
EB CL	2	0	1,3	Enterobacter Cloacae
EA SPP	1	0	0,7	Enterobacter SPP
EC	85	21	57	Escherichia Coli
KL OX	1	0	0,7	Klebsiella Oxytoca
KL PN	14	2	9,4	Klebsiella Pneumoniae
PR MB	3	3	2	Proteus Mirabilis
TOTAL	121	28	149	

MP = Microorganismos productores.

MNP = Microorganismos no productores.

GRAFICO N ° 3. Porcentaje de microorganismos aislados productores de BLEA.

AB SPP = Acinetobacter SPP, **CF** = Citrobacter Freundii,
CB SP = Corynebacterium SP, **EBAR** = Enterobacter Aerogenes ,
EB CL =Enterobacter Cloacae , **EA SPP** = Enterobacter SPP,
EC=Escherichia Coli , **KL OX** = Klebsiella Oxytoca , **KL PN**= Klebsiella
Pneumoniae , **PR MB** = Proteus Mirabilis .



CUADRO N ° 4. Microorganismos aislados y su relación con BLEE.

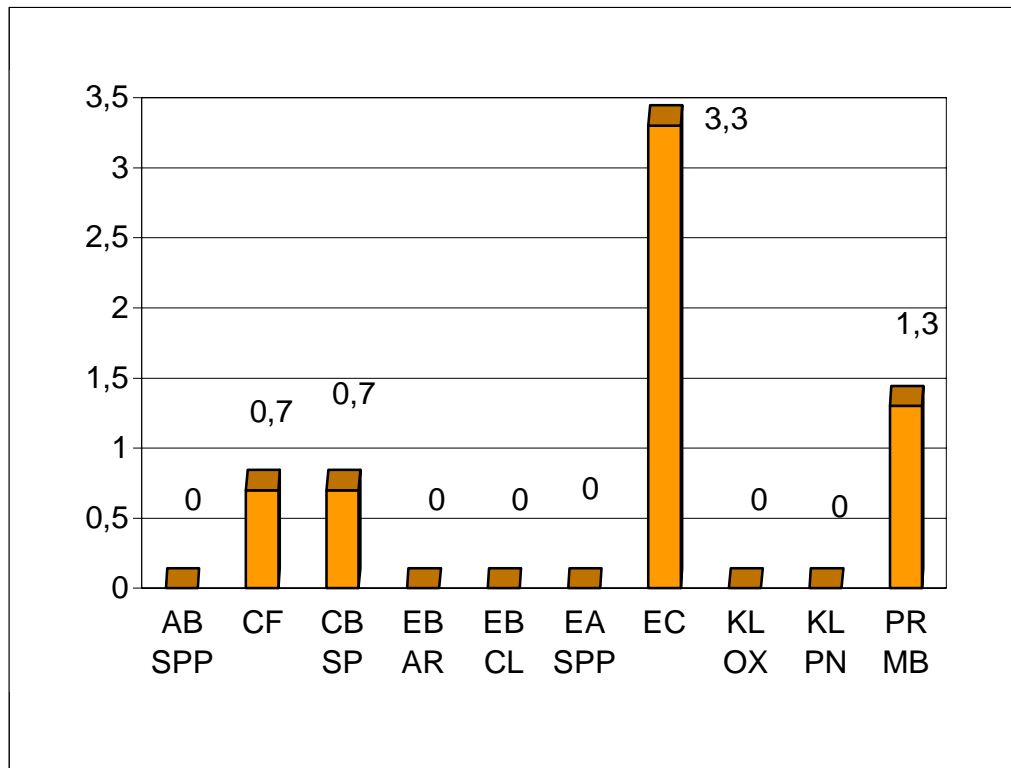
BLEE	MP	MNP	PORCENTAJE MP	
AB SPP	0	7	0	Acinetobacter SPP
CF	1	1	0,7	Citrobacter Freundii
CB SP	1	0	0,7	Corynebacterium SP
EB AR	0	7	0	Enterobacter Aerogenes
EB CL	0	2	0	Enterobacter Cloacae
EA SPP	0	1	0	Enterobacter SPP
EC	5	101	3,3	Escherichia Coli
KL OX	0	1	0	Klebsiella Oxytoca
KL PN	0	16	0	Klebsiella Pneumoniae
PR MB	2	4	1,3	Proteus Mirabilis
TOTAL	9	140	149	

BLEE = Betalactamasas de espectro extendido

MP = Microorganismos productores.

MNP= Microorganismos no productores.

GRAFICO N ° 4. Porcentaje de microorganismos aislados productores de BLEE.



AB SPP = Acinetobacter SPP, **CF** = Citrobacter Freundii,
CB SP = Corynebacterium SP **EBAR** = Enterobacter Aerogenes,
EB CL =Enterobacter Cloacae , **EA SPP** = Enterobacter SPP ,
EC = Escherichia Coli , **KL OX** = Klebsiella Oxytoca , **KL PN** = Klebsiella
Pneumoniae , **PR MB** = Proteus Mirabilis .

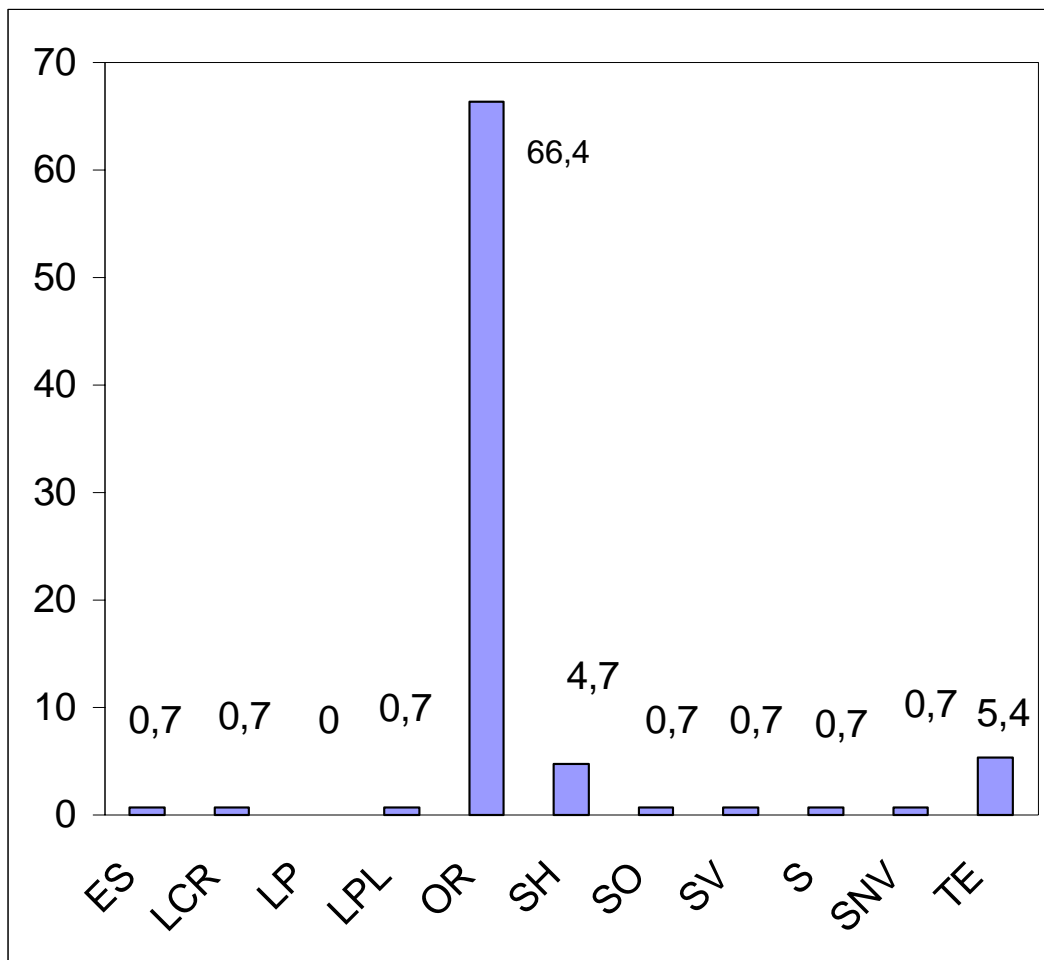
CUADRO N ° 5. Tipos de muestras analizadas y su relación con la producción de BLEA.

BLEA	NMP	NMN	PORCENTAJE MP	
ES	1	0	0,7	ES = Esputo
LCR	1	0	0,7	LCR = liquido cefalorraquídeo
LP	0	1	0	LP = Liquido peritoneal
LPL	1	0	0,7	LPL = liquido pleural
OR	99	27	66,4	OR = Orina
SH	7	0	4,7	SH = Secreción de herida
SO	1	0	0,7	SO = Secrecion osea
SV	1	0	0,7	SV = Secrecion vaginal
S	1	0	0,7	S = Semen
SNV	1	0	0,7	SNV = Sonda vesical
TE	8	0	5,4	TE = Tubo endotraqueal
TOTAL	121	28	149	

BLEA = Betalactamasas de espectro amplio NMP = Numero de muestras positivas

NMN = Numero de muestras negativas

GRAFICO N ° 5. Porcentaje de muestras positivas productoras de BLEA.



ES =Espuito , **LCR** = Liquido Cefalorraquídeo , **LP**=Liquido peritoneal , **LPL**=Liquido pleural , **OR** = Orina , **SH** = Secreción Herida , **SO**=Secrecion ósea , **SV** =Secreción vaginal ,**S** = Semen , **SNV** = Sonda vesical , **TE** =Tubo endotraqueal .

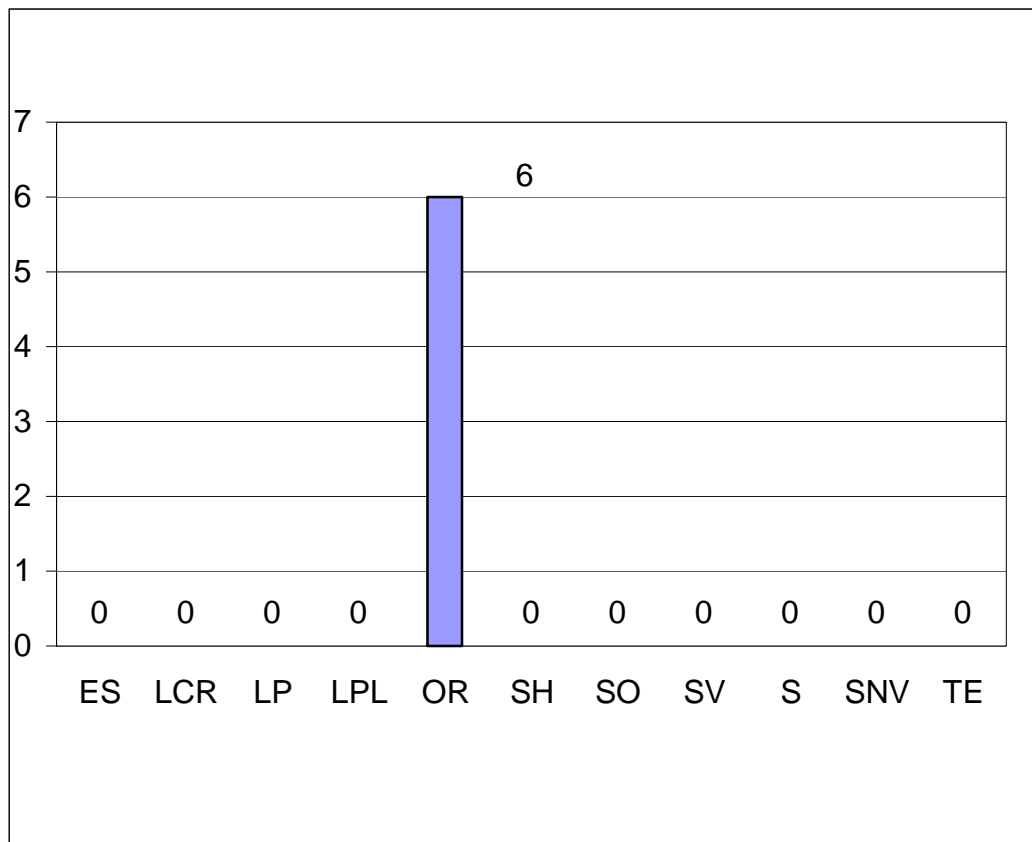
CUADRO N ° 6. Tipos de muestras analizadas y su relación con la producción de BLEE.

BLEE	NMP	NMN	PORCENTAJE MP	
ES	0	1	0	ES= Esputo
LCR	0	1	0	LCR = Liquido cefalorraquídeo
LP	0	1	0	LP= liquido peritoneal
LPL	0	1	0	LPL = Liquido pleural
OR	9	117	6	OR= orina
SH	0	7	0	SH = Secreción de herida
SO	0	1	0	SO = Secrecion osea
SV	0	1	0	SV=Secrecion vaginal
S	0	1	0	S= Semen
SNV	0	1	0	SNV= Sonda vesical
TE	0	8	0	TE= Tubo endotraqueal
Total	9	140	149	

NMP = Numero de muestras positivas.

NMN=Numero de muestras negativas.

GRAFICO N ° 6. Porcentaje de muestras positivas productoras de BLEE .



ES =Espuito , **LCR** = Liquido Cefalorraquídeo , **LP**=Liquido peritoneal ,
LPL=Liquido pleural , **OR** = Orina , **SH** = Secreción Herida , **SO**=Secrecion
ósea , **SV** =Secreción vaginal , **S** = Semen , **SNV** = Sonda
vesical , **TE** =Tubo endotraqueal

CUADRO N °7 Microorganismos aislados provenientes de muestras recabadas de cada especialidad medica.

SERV.	CD	CV	CE	OC	UTI	TM	URG	URO	UTINN
AB SPP	0	0	1	0	4	2	0	0	0
CF	0	0	2	0	0	0	0	0	0
CB SP	0	1	0	0	0	0	0	0	0
EB AR	0	1	3	0	1	1	0	1	0
EB CL	0	0	0	1	0	0	0	1	0
EA SPP	0	0	0	0	0	0	0	1	0
EC	8	8	53	0	2	8	13	7	7
KL OX	0	0	1	0	0	0	0	0	0
KL PN	0	4	4	0	3	4	0	1	0
PR MB	0	1	4	0	0	0	0	1	0
TOTAL	8	15	68	1	10	15	13	12	7
%	5,4	10,1	45,6	0,7	6,7	10,1	8,7	8,1	4,7

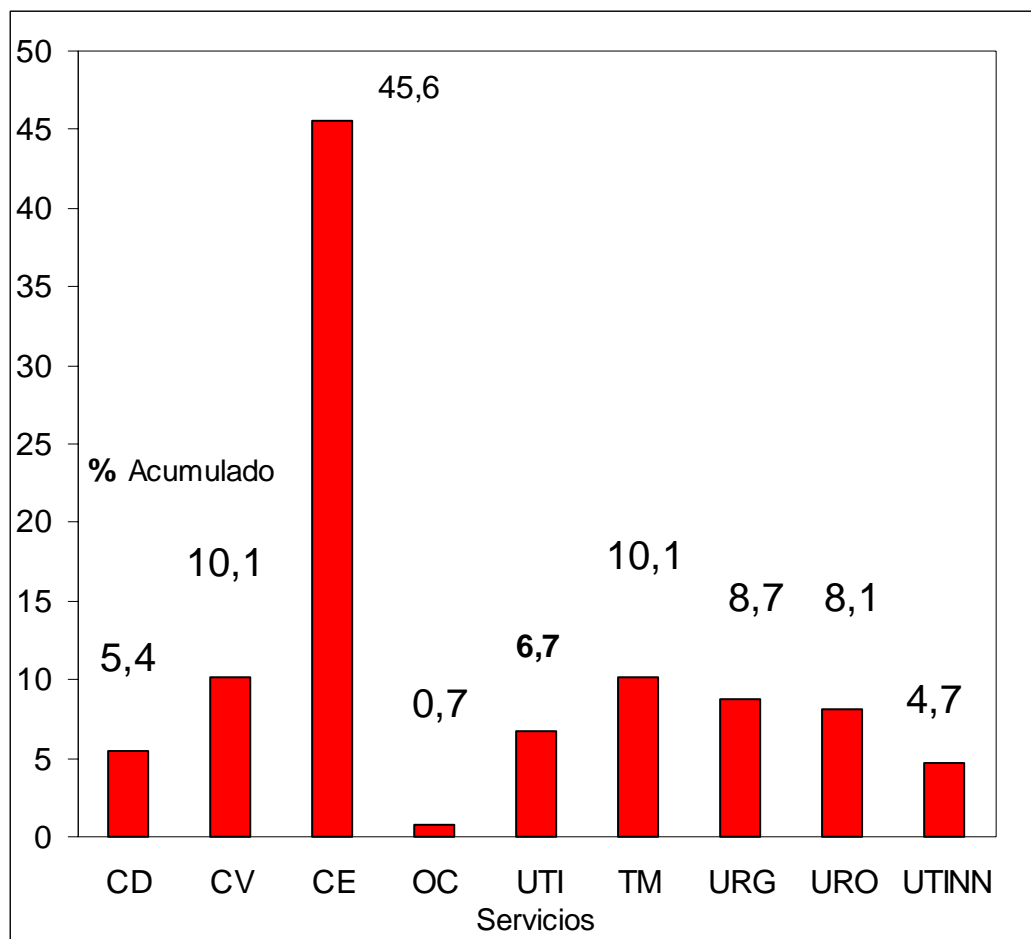
Servicio

CD =Cardiología, **CV** = Cirugía vascular, **CE**=Consultorio externo, **OC**=Oncologia , **UTI**= Unidad de terapia intensiva , **TM** = Traumatología , **URG**=Urgencias , **URO** =Urología ,**UTINN** = Unidad de terapia intensiva media .

Microorganismo

AB SPP = Acinetobacter SPP, **CF** = Citrobacter Freundii, **CB SP** = Corynebacterium SP, **EBAR**= Enterobacter Aerogenes, **EB CL** =Enterobacter Cloacae, **EA SPP** = Enterobacter SPP , **EC** = Escherichia Coli , **KL OX** = Klebsiella Oxytoca , **KL PN** = Klebsiella Pneumoniae , **PR MB** = Proteus Mirabilis .

GRAFICO N ° 7. Porcentaje total del número de muestras recabadas de cada especialidad medica.



CD =Cardiología , **CV** = Cirugía vascular , **CE**=Consultorio externo ,
OC=Oncología , **UTI**= Unidad de terapia intensiva , **TM** = Traumatología ,
URG=Urgencias , **URO** =Urología ,**UTINN** = Unidad de terapia intensiva media

CUADRO N ° 8 Microorganismos aislados provenientes de diferentes tipos de muestras recabadas en el laboratorio.

TIPO DE M.	OR	SH	SO	SV	S	SNV	TE	ES	LCR	LP	LPL	T
AB SPP	1	1	1	0	0	0	4	0	0	0	0	7
CF	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
CB SP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
EB AR	5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	7
EB CL	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
EA SPP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
EC	95	4	0	1	1	1	0	1	1	1	1	106
KL OX	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
KL PN	12	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	16
PR MB	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
T	126	7	1	1	1	1	8	1	1	1	1	149
%	84,6	4,7	0,7	0,7	0,7	0,7	5,4	0,7	0,7	0,7	0,7	100

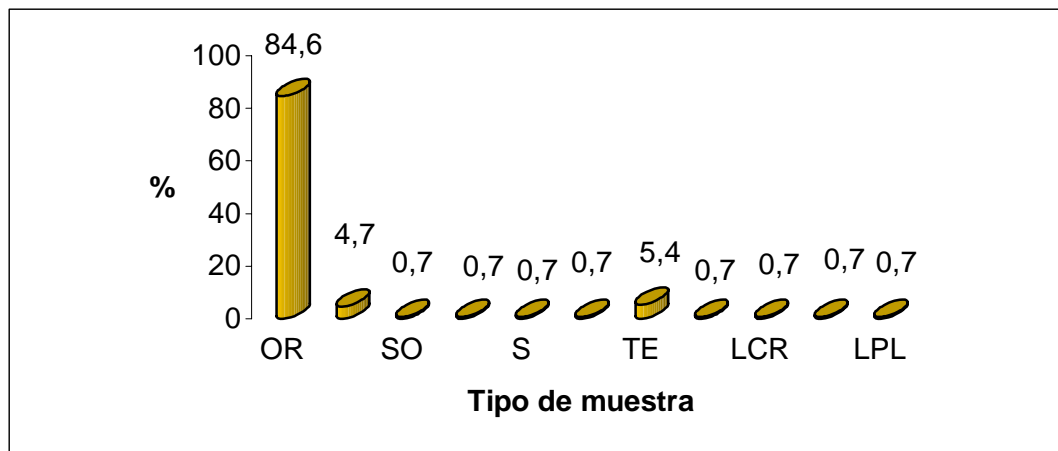
Tipo de muestra

ES =Espuito , **LCR** = Liquido Cefalorraquídeo , **LP**=Liquido peritoneal , **LPL**=Liquido pleural , **OR** = Orina , **SH** = Secreción Herida , **SO**=Secrecion ósea , **SV** =Secreción vaginal , **S** = Semen , **SNV** = Sonda vesical , **TE** =Tubo endotraqueal

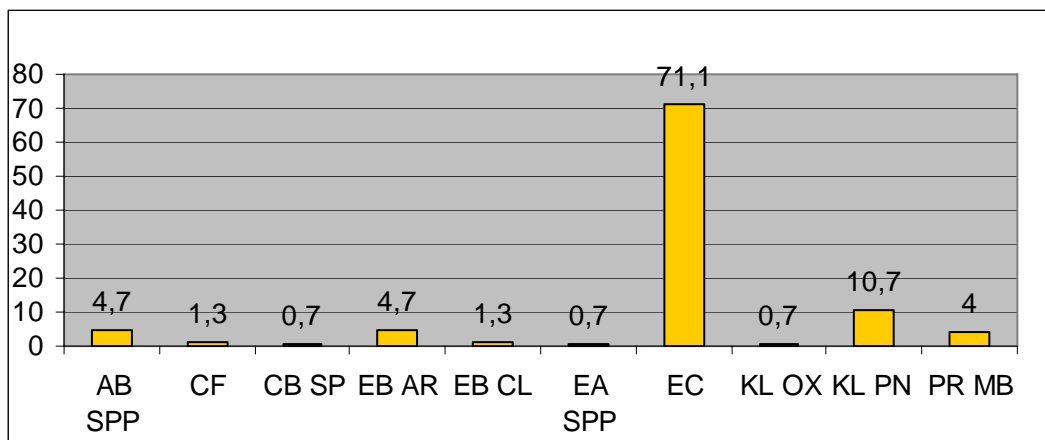
Microorganismo

AB SPP = Acinetobacter SPP, **CF** = Citrobacter Freundii, **CB SP** = Corynebacterium SP, **EBAR** = Enterobacter Aerogenes, **EB CL** =Enterobacter Cloacae, **EA SPP** = Enterobacter SPP, **EC** = Escherichia Coli, **KL OX** = Klebsiella Oxytoca, **KL PN** = Klebsiella Pneumoniae , **PR MB** = Proteus Mirabilis .

GRAFICO Nº 8 Porcentaje total del tipo de muestras recabadas y porcentaje total de microorganismos aislados.



ES =Espuito , **LCR** = Liquido Cefalorraquídeo , **LP**=Liquido peritoneal , **LPL**=Liquido pleural , **OR** = Orina , **SH** = Secreción Herida , **SO**=Secrecion ósea , **SV** =Secreción vaginal , **S** = Semen , **SNV** = Sonda vesical , **TE** =Tubo endotraqueal

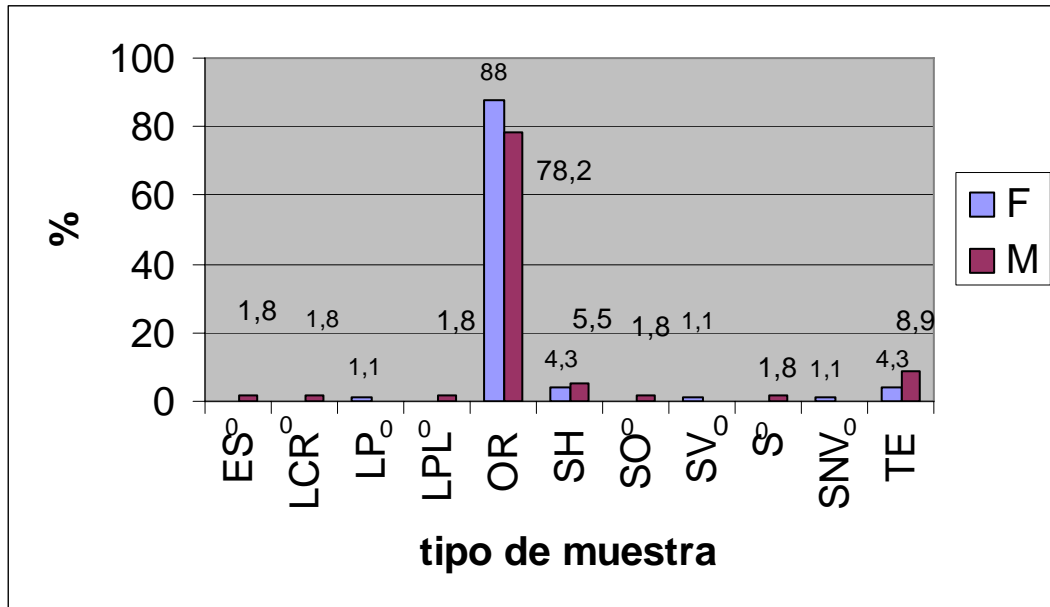


AB SPP = Acinetobacter SPP , **CF** = Citrobacter Freundii , **CB SP** = Corynebacterium SP, **EBAR** = Enterobacter Aerogenes , **EB CL** =Enterobacter Cloacae , **EA SPP** = Enterobacter SPP , **EC** = Escherichia Coli , **KL OX** = Klebsiella Oxytoca , **KL PN** = Klebsiella Pneumoniae , **PR MB** = Proteus Mirabilis .

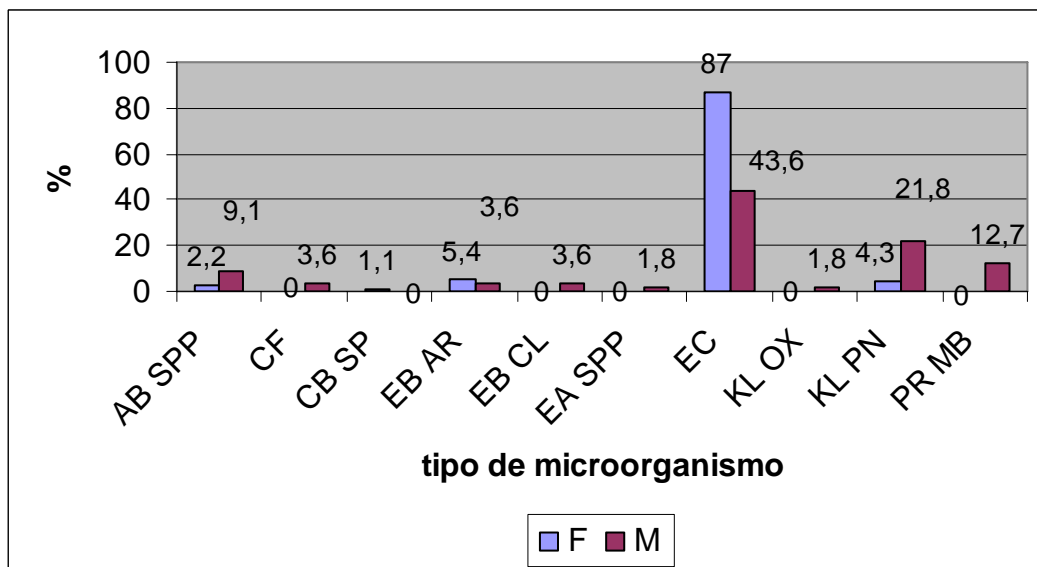
CUADRO N ° 9. Tipos de muestras recabadas en el laboratorio y microorganismos aislados ambos relacionados con el sexo.

TM	F	M		DB	F	M
ES	0	1		AB SPP	2	5
%	0	1,8		%	2,2	9,1
LCR	0	1		CF	0	2
%	0	1,8		%	0	3,6
LP	1	0		CB SP	1	0
%	1,1	0		%	1,1	0
LPL	0	1		EB AR	5	2
%	0	1,8		%	5,4	3,6
OR	82	43		EB CL	0	2
%	88	78,2		%	0	3,6
SH	4	3		EA SPP	0	1
%	4,3	5,5		%	0	1,8
SO	0	1		EC	81	24
%	0	1,8		%	87	43,6
SV	1	0		KL OX	0	1
%	1,1	0		%	0	1,8
S	0	1		KL PN	4	12
%	0	1,8		%	4,3	21,8
SNV	1	0		PR MB	0	7
%	1,1	0		%	0	12,7
TE	4	5		TOTAL	93	56
%	4,3	8,9				
TOTAL	93	56				

GRAFICO N ° 9. Porcentaje de tipos de muestras recabadas y microorganismos aislados en relación al sexo.



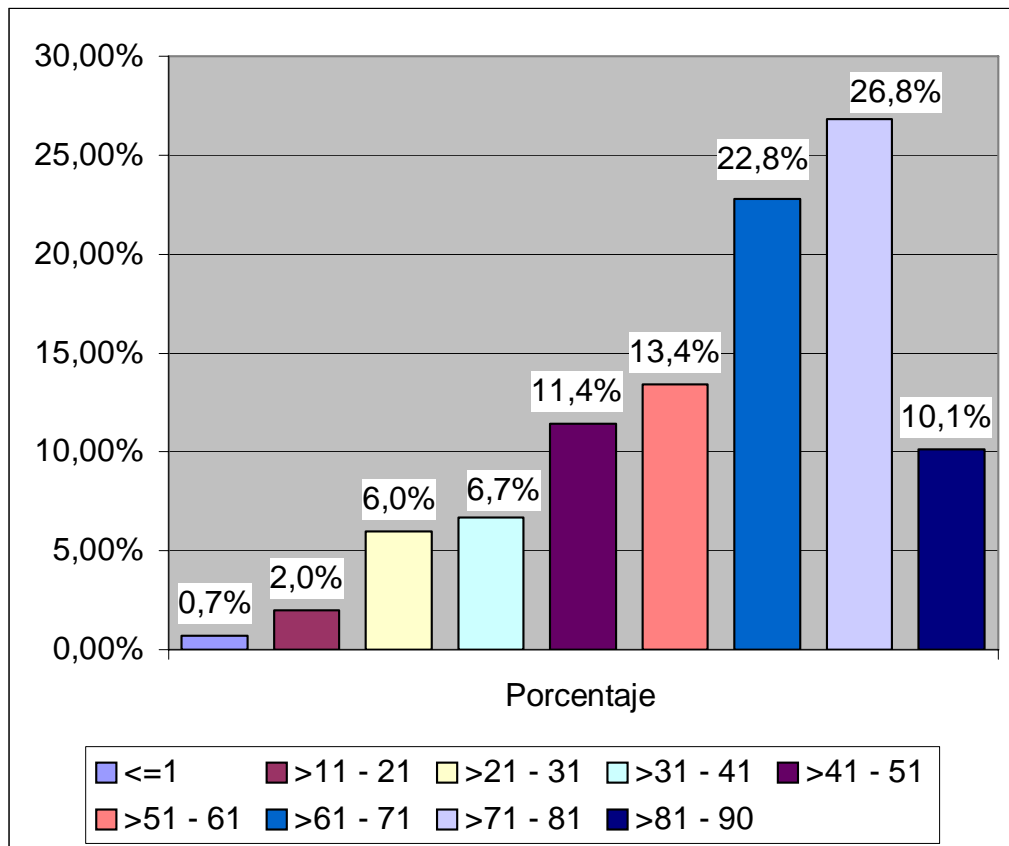
ES =Espuito , LCR = Liquido Cefalorraquídeo , LP=Liquido peritoneal , LPL=Liquido pleural , OR = Orina , SH = Secreción Herida , SO=Secrecion ósea , SV =Secreción vaginal , S = Semen , SNV = Sonda vesical , TE =Tubo endotraqueal



CUADRO N ° 10. Pacientes registrados en el laboratorio de bacteriología, según edad.

EDAD	Numero de pacientes	Porcentaje
1	1	0,70%
11 - 21	3	2,00%
21 - 31	9	6,00%
31 - 41	10	6,70%
41 - 51	17	11,40%
51 - 61	20	13,40%
61 - 71	34	22,80%
71 - 81	40	26,80%
81 - 90	15	10,10%
Total	149	100,00%

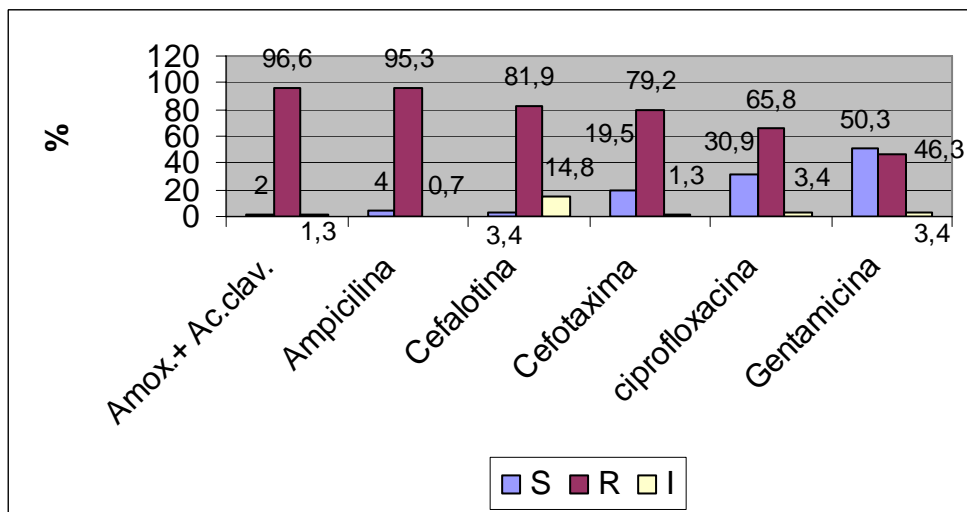
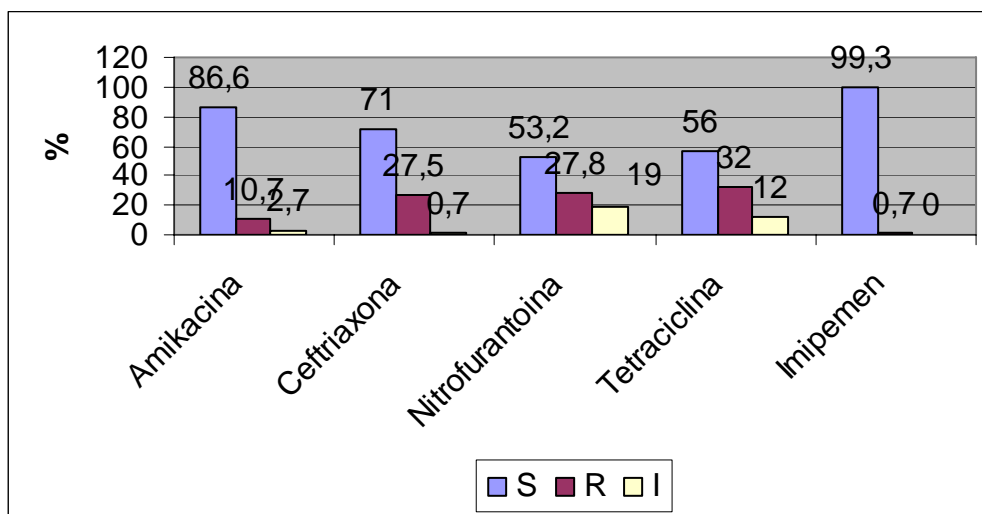
GRAFICO N ° 10. Porcentaje de la edad en base al número de pacientes registrados.



CUADRO N º 11. Perfil de sensibilidad en forma general de las muestras analizadas.

Perfil de sensibilidad							
Amikacina	S	R	I	Amox.+ Ac.clav.	S	R	I
149	129	16	4	149	3	144	2
%	86,6	10,7	2,7	%	2	96,6	1,3
Ceftriaxona				Ampicilina			
149	107	41	1	149	6	142	1
%	71	27,5	0,7	%	4	95,3	0,7
Nitrofurantoina				Cefalotina			
126	67	35	24	149	5	122	22
%	53,2	27,8	19	%	3,4	81,9	14,8
Tetraciclina				Cefotaxima			
23	12	8	3	149	29	118	2
%	56	32	12	%	19,5	79,2	1,3
Imipemen				Ciprofloxacina			
149	148	1	0	149	46	98	5
%	99,3	0,7	0	%	30,9	65,8	3,4
S = sensible				Gentamicina			
R = resistente				149	75	69	5
I = Intermedio				%	50,3	46,3	3,4

GRAFICO N ° 11. Porcentajes acumulados de resistencia y sensibilidad para cada antibiótico empleado en el antibiograma.



VII.DISCUSION. -

Entre los mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos que las bacterias pueden presentar es sin duda la síntesis de beta-lactamasas, es por lo que se realizó esta investigación que se basa en la determinación de beta-lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y extendido (BLEE) , esta investigación es útil para dar a conocer si en nuestro medio existe ya cepas productoras de beta-lactamasas ya que no existe algún dato significativo.

En los meses de Julio y Agosto del año 2004 en el laboratorio de microbiología del Hospital Obrero se recabaron todas las muestras posibles provenientes de diferentes áreas de servicio dentro del hospital todas estas fueron sometidas a la detección de beta-Lactamasa , previo aislamiento de cada cepa que presentara multirresistencia por lo menos a 3 tipos de antibióticos distintos , las cepas fueron ensayadas cada uno en medios de Mueller Hinton mediante el método Kirby Bauer con los correspondientes discos de antibiograma que se utilizaron para la detección de BLEA (Amoxicilina + ácido Clavulánico + Cefalotina) y BLEE (Amoxicilina ácido Clavulánico + cefotaxima) , en la placa de agar donde se realizó el antibiograma se colocaron los discos de antibióticos a una distancia de 20 mm midiendo de centro a centro cabe recordar que es muy importante la distancia para observar la forma característica de pera o doble halo (Anexo11) , el resultado obtenido fue para BLEA un 81,2 % de cepas productoras y un 18,8 % para no productoras , en cambio para BLEE los resultados obtenidos fueron un 6 % para productoras y un 94 % para no productoras comparando ambos resultados se ve que hay mayor predominación de cepas productoras de Beta – Lactamasa de espectro ampliado.

Según las cepas productoras de BLEA se encontró que un 57 % pertenece a *Escherichia Coli* como porcentaje más alto obtenido en un porcentaje medio obtuvimos un 0,4 % en *Klebsiella Pneumoniae* , en las

cepas productoras de BLEE el porcentaje hallado mas alto fue de un 3,3 % que se encontró en la misma Enterobacteria , en cuanto a las muestras recolectadas provenientes de cada servicio el porcentaje mas representativo fue de un 66,4 % en muestras de orina que presentaron BLEA , para las otras muestras existen porcentajes hallados pero ninguna de ellas llega a ser tan representativa por no llegar por lo menos al 20 % , en cuanto a BLEE el porcentaje obtenido es de un 6% para muestras también de orina. Al parecer las personas que presentan mas infecciones urinarias , son las que presentan mas resistencia a los betalactamicos ya que las cepas mas predominantes son las BLEA sin dejar de lado las BLEE porque a pesar de su porcentaje bajo si son representativas por ser detectadas esto se debe a que existen varios factores que pueden predisponer a la aparición o mutación de estas cepas , como ser el uso de antibióticos , sin uso de antibiogramas , fallas en las dosis o incumplimiento de la misma persona en cuanto a los días de tratamiento que debe seguir , es muy común este factor ya que la población por el escaso recurso de dinero se ve limitada a cumplir un tratamiento prolongado por lo que recurre a su propio criterio de automedicación y bienestar de momento cuando se inicia el tratamiento e incluso cuando pasan desapercibidos un problema de infección urinaria la que con el tiempo se vuelve crónica.

En cuanto a la detección de bacterias productoras de beta-lactamasa según el servicio se encontró que un 71,1 % de Escherichia Coli dio un porcentaje de 45,6 % para CE (consultorios Externos) además se vio que 95 de ellas eran muestras de orina , esto indica que las infecciones mas frecuentes con microorganismos multirresistentes productores de beta-lactamasas no son provenientes dentro del recinto hospitalario por lo tanto no son infecciones intrahospitalarias este valor esta relacionado con el porcentaje de cepas productoras de BLEA en infecciones urinarias

en cuanto a los demás servicios y tipos de muestra no hay datos representativos .

En cuanto al sexo de la población tomada en estudio la mas representativa es el sexo femenino con un 88 % y un 78,2 el sexo masculino , en cuanto a las muestras recolectadas de orina y el microorganismo con mayor porcentaje de frecuencia es de nuevo Escherichia Coli con 87 % para el sexo femenino y un 43,6 % para el sexo masculino , en cuanto a la edad el porcentaje mas alto es para la población comprendida entre los 71 y 81 años , luego viene con un 11,4 % entro los 41 – 51 años y finalmente le sigue con un porcentaje bajo de 0,7 % a os menos de 1 año.

Toda esta relación nos lleva a determinar que las personas comprendidas entre los 71 años (personas de la tercera edad) son mas predisponentes a presentar una infección urinaria y que la población mas afectada es el sexo femenino mas que el masculino y que microorganismo mas predispuesto a producir este tipo de situación es Escherichia Coli con este estudio en nuestro medio dando una alta incidencia de BLEA , por otro lado es bueno saber que en nuestro medio aun no existen índices altos de BLEE pero eso no significa que los datos obtenidos no sean importantes porque a menudo es mas difícil establecer un tratamiento , ya que la mayoría de las cepas de espectro extendido presentan resistencia a los Aminoglucosidos Sulfas y Fluoroquinolonas ya que el tratamiento de preferencia para asegurar un buen tratamiento para el paciente sin ningún rastro de infecciones recidivas es el uso de los Carpapenems como el Imipemen si estuviéramos frente a una cepa productora de BLEE.

En cuanto al perfil de sensibilidad el porcentaje de sensibilidad mas alto es de un 86 % para la Amikacina , luego esta la Ceftriaxona con un 71 % y la nitrofurantoina con un 53,2 % y la tetraciclina con un 56 % pero la que mayor sensibilidad presenta es el Imipenem con el 99,3 % , las demás están catalogadas ya dentro del grupo de antibióticos no recomendados

incluso la ciprofloxacina que es el antibiótico más utilizado y de primera elección cuando se receta un tratamiento, la resistencia a la amoxicilina ácido clavulánico es de un 96,6 % casi un 100 % luego de cerca esta la ampicilina con 95,3 %, la cefalotina con 81,9 %, la cefotaxima con un 79,2 % y la ciprofloxacina con un 65,8 %, la única que falta dentro de este grupo es la gentamicina que si bien esta catalogada dentro del grupo de las bacterias que presentan más resistencia a este antibiótico ya que no existe mucha diferencia entre el porcentaje de sensibilidad que es un 50,3 % y el porcentaje de resistencia que es 46,3 %.

Tomando en cuenta este estudio realizado y los resultados encontrados tenemos que seguir siempre la norma de realizar un cultivo y un antibiograma frente a una infección urinaria y no solo en estos casos si en las demás infecciones que se presenten para establecer un tratamiento adecuado y no dar un tratamiento prescrito sin tener un antibiograma de respaldo, porque es muy fácil que una bacteria sea BLEA incluso puede ser BLEE, hay que tener en cuenta sobre todo el sexo y la edad porque las personas de la 3ra edad están más afectadas por su bajo nivel inmunológico sobre todo el sexo femenino, para ampliar más este trabajo de investigación sería bueno aplicar otro método más específico para la detección de BLEA, incluso utilizar otras técnicas más específicas para determinar BLEE, este estudio se debe realizar en cada centro hospitalario o laboratorio para establecer si la población asistente o interna en el área de salud presenta este tipo de problemas, otro punto importante es realizar un perfil de sensibilidad para bacterias que presenten multiresistencia con el fin de orientar al médico sobre el avance de las infecciones y la aparición de bacterias con más capacidad de resistencia a los antibióticos tradicionales utilizados.

VIII . CONCLUSION.-

A. CONCLUSION GENERAL

- * El porcentaje de incidencia en la producción de beta-lactamasas de espectro ampliado (BLEA) fue la mas alta registrada con un 81,2 % y para BLEE un 6 % .

B. CONCLUSIONES ESPECIFICAS

- * Mientras es mayor la multirresistencia de por lo menos a tres tipos de distintos de antibióticos crece mas la posibilidad que sea una cepa Productora de BLEA incluso puede llegar a ser BLEE.
- * El microorganismo con mayor porcentaje de incidencia es para Escherichia Coli con u 57 % productor de beta-lactamasa de espectro ampliado (BLEA).
- * La producción de beta-lactamasas es mas predominante en muestras de orina.
- * La presencia de beta-lactamasas es mas alta en muestras provenientes de consultorios externos .
- * La producción de BLEA es mas predominante en el sexo femenino comprendida entre los 71 y 81 años .
- * Las cepas aisladas son sensibles al Imipenem lo que lo cataloga como el antibiótico de eleccion.

IX. BIBLIOGRAFIA.-

1. BASUALDO , Juan Angel y otros.**Microbiologia Biomedica**.Buenos Aires : atlante .1996.1198p.
2. BOHINSKI , Robert.**Bioquimica** .2 ed,Mexico:Addison-Wesley.620p.ilus.grafs.
3. BROOKS,Geo y otros .**Microbiologia de Jawets,Melnick y Adelberg**.17.Ed.Mexico D.F.Manual Moderno .2002.844p.
4. DAVIS , R y otros.**Tratado de Microbiologia**.3 ed.Barcelona.Salvat, 1984.1097p.

5. GOODMAN , GILMAN y otros.**Las bases farmacológicas de la terapéutica**.9 ed.Mexico DF .Mc Graw-Hill.vol II.1996.1996p.
6. GUERRA,Juan .**Diagnostico Bacteriológico e interpretación clínica**,La Paz.UMSA.1989.277p.ilus.Grafs.
7. INLASA.**Manual único de técnicas básicas de laboratorio clínico**.226p.ilus.
8. KONEMAN.Elmer.**Diagnosticomicrobiológico**.3ed.Buenos Aires,Panamericana .1992.909p.ilus.
9. KONRAD,Bachean.**Biología para médicos : conceptos básicos para facultades de medicina , farmacia y biología**.Barcelona .Rverte.1978.374.p.ilus.grafs.
- 10.MADIGAN , Michael .Brock **Biology of microorganisms**.9 ed.New Jersey.Prantice may.2000 .256p.
- 11.MIMS , PLAYFAIR y otros .**Microbiología medica**.2 ed. Madrid .Harcourt Brace.1999.584p.
- 12.PRESCOT y otros .**Microbiología** .4 ed. Madrid : Mc Graw –Hill , 1999.1120 p.
- 13.WALKER ,Stuart.**Microbiología** .Mexico DF.Mc Graw-Hill.2000 .532p.
- 14.RESTREPO,Angela **Fundamentos de Medicina : enfermedades infecciosas**.5 ed. Medellín : CIB , 1998 .713p.
- 15.SCHAECHTER,Medoff y otros .**Microbiología : Mecanismos de las enfermedades infecciosas**.2ed.Buenos Aires : Panamericana , 1993 ,1000p.
- 16.MARTINEZ J.L.Cercenado , E.Rodriguez –Creixems.**Resistance to betalactam / clavulanate** .Lancet 1987 ,2:1473
- 17.PAGE J.W.J,Farmer , T.H.,Elson ,S.W.**Hyperproduction of TEM-1 b-lactam antibiotics in Escherichia coli**.1992 , 30 : 868-9871.
- 18.**Http : //www.b-lactamasa** and susceptibility to b-lactam antibiotics in Escherichia coli.1992;30:868-871.

19. [Http://www.Functional](http://www.Functional) classification scheme of betalactamasas and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemoter* 1995 ,39:1211-1233.
20. [Http://www.Betalactamases](http://www.Betalactamases) in laboratory and clinical resistance .*Clin Microbial Rev* 1995, 8 :557-584.
21. [Http://www.Imipenem](http://www.Imipenem) resistance in gram –negative bacilli .*Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994, 13 : 203 -204.
22. [Http://www.Metallo](http://www.Metallo) –betalactamases-A new therapeutic challenge .*J Med Microbiol* 1995, 39: 93-99.

ANEXOS

Anexo 1 . Mecanismo de resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos.

Mecanismo	Grupo antibiótico	Ejemplos
Inactivacion enzimatico	Betalactamico Aminoglucosidos	B-Betalactamasas , penicilinasas cefalosporinasa , carbapenemasas Enzimas modificadoras de aminoglucosidos de bacterias Gramnegativas y grampositivas
Receptores alterados	Betalactamicos Alteraciones ribosómicas Alteraciones de la DNA girasa Enzimas bacterianas alteradas	Proteínas fijadoras de penicilina alteradas en bacterias gramnegativas y grampositivas. Tetraciclinas , eritromicina Aminoglucosidos Quinolonas Sulfametoxazol , trimetropina
Transporte alterado del antibiótico	Alteraciones en las proteínas de la membrana externa (porinas) . Fuerza motora protónica disminuida Transporte activo desde la célula bacteriana	Bacterias gramnegativas , flujo hacia el interior disminuido. Aminoglucosidos y bacterias gramnegativas ; flujo hacia el interior disminuido. Tetraciclinas , eritromicina flujo hacia el exterior activo.

ANEXO 2 . Características de las B-lactamasa de espectro ampliado y extendido mas frecuentes mediadas por plasmidos.

Cefalosporinas	Clase A	Transportadas por plasmidos	Especies Klebsiella mas frecuente Escherichia Coli
----------------	---------	-----------------------------	--

Descritas por primera vez en Alemania y Francia , todas las enzimas son activas contra Imipemen , cefalotina , cefoxitina no son hidrolizados.

La actividad comparada contra cefotaxima y ceftazidima varia con la enzima.

Algunas enzimas son activas contra Aztreonam.

La resistencia no puede detectarse por las pruebas de sensibilidad estándares.

Demostración de la inhibición de la actividad de inhibidores de B – Lactamasa.

ANEXO 3. Hoja de Registro

Fecha :			
Nombre del Paciente		Edad	Sexo
Tipo de muestra :			
Espuito	LCR	Líquido peritoneal	Líquido pleural
Secreción de herida	Secreción ósea	Secreción vaginal	Semen
Tubo endotraqueal	Orina	Sonda vesical	Otros
Microorganismo aislado :			

Acinetobacter SPP	Citrobacter freundii	Cotynebacterium SP	Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae	Enterobacter SPP	Escherichia Coli	Klebsiella Pneumoniae
Proteus Mirabilis	Otros :		
Antibiograma :	Resistente	Intermedio	Sensible
Imipemen			
Tetraciclina			
Cefotaxima			
Amikacina			
AMC+ac.clavulanico			
Ampicilina			
Ciprofloxacina			
Cefalotina			
Ceftriaxona			
Nitofurantoína			
Gentamicina			

ANEXO 4. Agar Sangre

Medio de cultivo: Agar-sangre, constituido por un medio básico (Ej.: agar nutritivo o TSA) adicionado de un 5% de sangre desfibrinada de carnero o de caballo, preferentemente la del primero, ya que las hemólisis se visualizan mejor.

* **Técnica:** inocular siguiendo la técnica de aislamiento. Incubar durante 24-48 horas a 37° C.

* **Lectura e interpretación de resultados:** podemos hablar de α , $\hat{\alpha}$, o $\tilde{\alpha}$ hemólisis.

La **α -hemólisis** es una hemólisis parcial, en la que los hematíes son parcialmente dañados.

Se observa por una estrecha zona verde alrededor de la colonia.

La **$\hat{\alpha}$ -hemólisis** se caracteriza por una zona clara e incolora que rodea a la colonia, debido a la destrucción total de los glóbulos rojos. Es una hemólisis total.

En la **$\tilde{\alpha}$ -hemólisis** no se observa ninguna variación alrededor de las colonias ni actuación sobre los glóbulos rojos.

- **Interés:** esta prueba se emplea fundamentalmente para determinar las diferentes especies de Streptococcus: por Ej. S. piógenos es $\hat{\alpha}$ -hemolítico; S.pneumoniae es α -hemolítico.

Composición por litro :

- Digestivo pancreático de caseína.....15 g
- Peptona de soya.....5 g
- Cloruro sodico.....5g
- Agar.....15g
- pH 7,3 +- 0,2 a 25 C

Agar Chocolate , es el agar sangre sometido hasta una temperatura de 80 °C de esta forma la hemoglobina se transforma en metahemoglobina dándole al agar el aspecto de una tableta de chocolate.

ANEXO 5 . Agar Nutritivo

El medio básico para el crecimiento de las bacterias es el agar nutritivo o también llamado Soya tripticasa este medio puede presentar en varias variaciones en sus formas : tubo , placa o líquida.

El Agar se puede preparar con 23 gramos del medio en 1 litro de agua desionizada , luego esta se trasvasa a tubos o placas estériles en autoclave e antes el medio debe ser autoclavado en matraces o en los tubos o botellas que van a ser utilizados , cabe recordar que no debe existir burbujas en el momento cuando se solidifique el medio ya que intervendrá en el crecimiento o desarrollo de las bacterias .

El agar nutritivo esta conformado :

- Peptona.....10-14 g
- Ext. Carne.....4 – 6 g
- NaCl.....4 – 5 g
- Agua dest.....1000 mL



ANEXO 6. Agar Mueller –Hinton.

El medio de Mueller Hinton esta preparado con infusión de carne , peptonas y almidón .El medio de Mueller Hinton es el medio recomendado por la FDA para la prueba de sensibilidad a antibacterianos por el método de dilución , debido al bajo nivel de inhibidores de sulfamidas , como timidina y PABA y por el contenido recomendado de Ca y Mg para las zonas de inhibición de P. Aeruginosa a los aminoglucoSIDOS por la NCCLS.Ademas el medio de Mueller Hinton permite el crecimiento de casi todas las bacterias , este medio puede ser suplementado con un 5 % de sangre desfibrinada de oveja , cuando la bacteria lo requiera para su desarrollo.Se puede utilizar caldo nutritivo o agua de peptona siempre y cuando no se prueben sulfonamidas.

En el momento de ejecutar la prueba , preparar medio agar Mueller Hinton , pesar y disolver en agua destilada , pH entre 7,2 -7,4 , autoclavar 121 °C , 1,5 atm por 15 minutos y dejar enfriar hasta 45 °C las cajas así preparadas se pueden almacenar en refrigeración a 4 °C , bien cubiertas en bolsa nylon ,por un periodo de una semana.

ANEXO 7. TSI (Triple azúcar Hierro)

Concepto.- Esta prueba sirve para diferenciar una bacteria básica capaz de fermentar glucosa , lactosa y sacarosa y reducir sulfuro de hidrogeno a azufre.Es de uso primordial para distinguir morfológicamente bacterias similares a las Enterobacterias de bacterias fermentadoras de glucosa productoras de ácido.

Principio.-El TSI es un agar que contiene peptona , glucosa, sacarosa , lactosa y tiosulfato.El rojo fenol es un indicador de pH que oscila entre 6,8 cuando vira a amarillo y es rojo cuando vira mas de este pH , Esta preparación es para bacterias anaerobias la inoculación se debe realizar en pico en el interior del agar sin tocar el fondo.



Resultados	Symbol	Interpretacion
Rojo/amarillo	K/A	Solo fermenta glucosa ,cataboliza peptona
Amarillo/Amarillo	A/A	Fermenta glucosa y lactosa o sacarosa

Rojo/rojo	K/K	No fermentadora , cataboliza la peptona.
Rojo/no cambia de color	K/NC	No fermentadora, Peptona uso de aerobios.
Amarillo/Amarillo con burbujas	A/A,G	Fermenta glucosa y lactosa o sacarosa, productora de gas.
Rojo/Amarillo con burbujas	K/A,G	Solo fermenta gas y produce gas .
Rojo/Amarillo con burbujas y precipitado negro.	K/A,G, H2S	Solo fermenta glucosa produce gas y produce H ₂ S
Rojo/Amarillo con precipitado negro	K/A, H2S	Solo fermenta glucosa y produce H ₂ S
Amarillo/Amarillo con precipitado negro	A/A, H2S	Fermenta las tres azucares y produce H ₂ S
No cambio/no cambio	NC/NC	No hay fermentacion

A = producción de ácido; K=Reaccion alcalina; G=Produccion de gas, H2S = Reducción de sulfuro.

ANEXO 8. Citrato

Fundamento: mediante esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

El medio incluye citrato de sodio como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato como única fuente de carbono también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoníaco, llevando a la alcalinización del medio. El medio lleva un indicador, el azul de bromotimol, que es amarillo a pH ácido, verde a pH neutro y azul a pH alcalino.

* **Medio de cultivo: Medio de citrato de Simmons.**

El medio se reparte en tubos de ensayo y una vez estériles se inclinan en pico de flauta.

* **Técnica:** sembrar en pico de flauta el microorganismo obtenido en medio sólido

(los caldos pueden aportar elementos nutritivos que pueden falsear los resultados), procurando no tocar con el asa el medio, porque sustancias nutritivas de éste podrían igualmente falsear los resultados. Incubar a 37° C de 24-48 horas.

* **Lectura e interpretación de resultados:**

- Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta tras 24-48 horas de incubación.
- Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color (el medio permanece de color verde.)
- Si se observa crecimiento sin cambio de color, se confirmará la positividad de la prueba incubando el tubo 24 horas más, durante las que suele aparecer el color azul.

* **Interés:** esta prueba junto con las de **Indol, Rojo de Metilo y Voges Proskauer** constituyen el **IMVC** y sirven, junto con otras pruebas para la diferenciación de los géneros de las Enterobacteriaceas.

Tiene un indicador que es el azul bromotimol el cual cambia de color cuando el citrato es amarillo metaboliza productos ácidos y cuando cambia a azul indica que es un producto alcalino y si no cambia de color y se mantiene verde representa un test positivo listo para usar .

Citrato

Enterobacter cloacae: positivo

Eschericia coli: negativo

Klebsiella pneumoniae: positivo



ANEXO 9. SIM (reducción de sulfuro , producción de indol y motilidad)

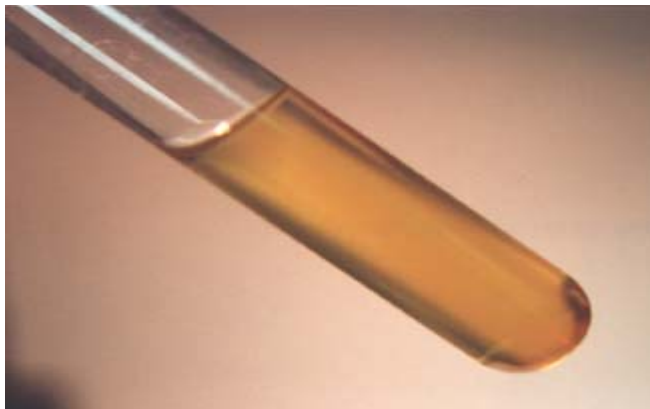
Reducción de sulfuro .-Esta prueba se utiliza para identificar bacterias capaces de reducir sulfuro , esta particularidad importante diferencia con certeza bacteria entericas en general.

Principio .-El sulfuro de hidrogeno puede formarse en una putrefacción anaeróbica respiratoria . el medio contiene cisteina que es un aminoácido también contiene ácido sulfúrico y bisulfato de sodio , peptona o sulfato ferroso.El H_2O reacciona con el sulfato ferrosos , formando un precipitado negro.El precipitado negro esta presente en un test positivo para la producción de H_2O , no precipita cuando es negativo.

Producción de Indol .- El test de indol sirve para identificar la producción de indol usando la enzima triptofanasa , este componente es diferente en cada Enterobacteria. La enzima convierte el amino ácido del triptofano en amonio y ácido piruvico , el producto es el indol este metabolito identifica con el reactivo de Kovac's contiene ácido clorhídrico y dimetilaminobenzaldehido y alcohol cuando forma un anillo rojo indica la presencia de indol cuando no es ese color es negativo.

Motilidad .- Cuando este medio aparezca inoculado indica motilidad.

La concentración en el medio limita momentáneamente la motilidad de la bacteria frente al área de sembrado , la motilidad se detecta con una difusión grande radial alrededor de la línea de sembrado.



ANEXO 9. UREASA

Fundamento: mediante esta prueba determinamos la capacidad del microorganismo de desdoblar la urea en CO₂ y amoníaco por acción de la enzima ureasa. Se visualiza el proceso debido a que la alcalinidad que se produce origina un cambio de color en el indicador que lleva incorporado el medio.

Esta prueba se puede realizar en tubo con medio sólido o sobre discos de papel de filtro.

1.- Prueba en tubo

*** Medio de cultivo: Medio de Christensen:**

El medio se esteriliza en el autoclave. Se deja enfriar hasta 50-55°C y a esta temperatura se le añaden 100 ml de solución de urea al 20% en agua destilada, esterilizada por filtración. Se distribuye el medio asépticamente en tubos estériles y se deja enfriar en posición inclinada.

*** Técnica:** sembrar el pico de flauta con un inóculo denso e incubar a 35-37°C durante 1-6 días, observando las primeras 6 horas y luego cada 24 horas.

*** Lectura e interpretación de resultados:**

Se considera la prueba [+], es decir, el microorganismo será ureasa [+] si debido a la alcalinización del medio, éste toma una coloración roja-rosácea.

*** Interés:** todas las especies del género *Proteus* dan positiva esta reacción dentro de las 6 primeras horas, virando la superficie del medio a color rojo-rosáceo. Se puede así diferenciar el género *Proteus* de otros microorganismos ureasa [+] retardados como especies de *Klebsiella* o *Enterobacter*, así como de microorganismos ureasa [-] como *E.coli*.

2.- Prueba en discos de papel de filtro

*** Técnica:** con una solución de urea se impregna un disco de papel de filtro colocado en una placa de Petri; se toma una colonia del microorganismo a estudiar y se frota sobre el disco húmedo.

*** Lectura e interpretación de resultados:**

Si el disco vira a rosado o rojo en los dos minutos siguientes indica positividad de la prueba.

*** Interés:** todas las especies del género *Proteus* dan positiva esta prueba.

**ANEXO 11. Bacteria productoras del efecto betalac-tamasa
(efecto huevo)**

