

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA  
MENCION DE BIOQUIMICA CLINICA Y HEMATOLOGIA**



## **IDENTIFICACIÓN DE FLORA BACTERIANA EN CULTIVOS DE BILIS DE PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGIA BILIAR**

**ELABORADO POR:**

**Univ. Lourdes Yashira Plata Castelo**

**(Tesina de Grado para optar al Título de Licenciatura en Bioquímica. Mención  
Bioquímica Clínica y Hematología)**

**LA PAZ – BOLIVIA  
2008**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA  
MENCION DE BIOQUIMICA CLINICA Y HEMATOLOGIA  
INSTITUTO DE GASTROENTEROLOGIA BOLIVIANO - JAPONÉS**



**IDENTIFICACIÓN DE FLORA BACTERIANA EN CULTIVOS  
DE BILIS DE PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGIA BILIAR  
(JULIO 2006 – MARZO 2007 I.G.B.J)**

**ELABORADO POR:**

**Univ. Lourdes Yashira Plata Castelo**

**ASESORES:**

**Dr. Luis Enrique Rodríguez Quevedo**

**Jefe de Laboratorio IGBJ**

**Lic. Alberto Benitez Reyes**

**Responsable Sección Bacteriología**

**(Tesina de Grado para optar al Título de Licenciatura en Bioquímica. Mención  
Bioquímica Clínica y Hematología)**

**LA PAZ – BOLIVIA  
2008**

## **DEDICATORIA**

*A mi **mamita Carmen**, a quien amo, admiro y respeto mucho, por haberme regalado el don de la vida, te doy gracias por ser siempre un apoyo incondicional y por haber confiado en mí.*

*A mi **"pa" Rey**, por todo el amor que siempre me ha brindado y por haber sido el empuje a lo largo de mi camino.*

*A mis hermanos María del Carmen, Rey y César por todo su cariño apoyo y comprensión durante todo este tiempo.*

*A el amor de mi vida, quien me enseñó a amar de verdad.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Jehová Dios, por darme la oportunidad de vivir, de confiar en él y gozar de sus bendiciones.*

*Es especial el agradecimiento que expreso a todo el personal del laboratorio del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, por haber creado un ambiente de amistad que me dió plena libertad de trabajar y poder culminar este propósito.*

*Al Doc. Rodríguez, por su amistad, por todo el conocimiento impartido a lo largo del internado, y en la elaboración de este proyecto.*

*A un gran amigo Doc Albert por sus consejos, su sinceridad, su colosal apoyo, y por la virtud que tiene el momento de enseñar.*

*A mis grandes amigos Lenny, Pao, Noe, Nana, Carlita, Maris, Tivi y Andrés, por todo el tiempo compartido, el apoyo y la gran amistad que supimos cultivar. Sin dejar de lado a Liz, Nadia y Teddy por nuestras vivencias durante el internado.*

# INDICE

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
3. ANTECEDENTES .....	4
4. JUSTIFICACIÓN .....	5
5. MARCO TEORICO.....	6
5.1. VIAS BILIARES.....	6
5.1.1. ANATOMÍA DE VÍAS BILIARES.....	6
5.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BILIS .....	8
5.2. ENFERMEDADES DE LA VESÍCULA BILIAR.....	9
5.2.1. COLELITIASIS (Cálculos biliares) .....	9
5.2.2. COLECISTITIS.....	12
5.2.3. COLEDOCOLITIASIS Y COLANGITIS ASCENDENTE.....	16
5.3. BACTERIOLOGÍA DE LA BILIS .....	18
5.4. ENTEROBACTERIACEAE.....	20
5.4.1. CARACTERISTICAS PARA UNA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA.....	21
5.4.2. CARACTERISTICAS DE RELEVAMIENTO .....	23
5.4.3. SELECCIÓN DE MEDIOS DE AISLAMIENTO PRIMARIO .....	26
5.4.4. MEDIOS DE AISLAMIENTO ALTAMENTE SELECTIVOS USADOS .....	26
5.4.5. CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE IDENTIFICACIÓN.....	28
5.4.6. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN (BAUER – KIRBY).....	29
6. OBJETIVOS.....	30
6.1. OBJETIVO GENERAL .....	30
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30

7.	DISEÑO METODOLÓGICO .....	31
7.1.	TIPO DE ESTUDIO .....	31
7.1.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	31
7.2.	POBLACIÓN EN ESTUDIO .....	31
7.2.1.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	32
7.2.2.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	32
7.2.3.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	32
7.3.	DESCRIPCIÓN DE AMBIENTES DE TRABAJO .....	33
7.4.	INTERVENCIÓN .....	34
7.4.1.	MODELO TEÓRICO .....	34
7.4.2.	PROCEDIMIENTOS .....	35
7.4.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	37
7.5.	DEFINICIÓN DE PRESENCIA DE FLORA BACTERIANA EN CULTIVOS DE VESÍCULA BILIAR. ....	39
7.6.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES. ....	39
8.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	40
8.1.	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	40
8.2.	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN .....	40
8.2.1.	DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN GRUPO ETARIO .....	40
8.2.2.	GÉNERO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	43
8.2.3.	DISTRIBUCIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS AISLADOS. ....	44
8.2.4.	PERFIL DE SUCEPTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE SENSIBILIDAD DE Bauer Kirby, DE LAS ESPECIES AISLADAS .....	45
9.	DISCUSIÓN .....	55
10.	CONCLUSIONES .....	58
11.	RECOMENDACIONES .....	59
12.	BIBLIOGRAFÍA .....	61

## INDICE DE ANEXOS

*Anexo 1a.* MEDIOS SELECTIVOS DIFERENCIALES PARA LA RECUPERACIÓN DE *Enterobacteriaceae*.

*Anexo 1b.* MEDIOS ALTAMENTE SELECTIVOS PARA LA RECUPERACION DE *Enterobacteriaceae*. A PARTIR DE MUESTRAS GASTROINTESTINALES.

*Anexo 2.* PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

*Anexo 2a.* CALDO BASE CON TETRACIONATO

*Anexo 2b.* AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA

*Anexo 2c.* AGAR TSI

*Anexo 2d.* AGAR CITRATO DE SIMMONS

*Anexo 2e.* MEDIO SIM

*Anexo 2f.* CALDO LISINA DESCARBOXILASA DE FALKOW (LIA)

*Anexo 2g.* Agar MIO

*Anexo 2h.* CALDO DE VOGES-PROSKAUER (VP)

*Anexo 2i.* CALDO UREA

*Anexo 2j.* AGAR CLED

*Anexo 2k.* AGAR NUTRITIVO

*Anexo 2l.* AGAR MÜELLER HINTON

*Anexo 3.* PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN (BAUER – KIRBY)

*Anexo 4.* Tabla de la NCCLS para la interpretación de resultados de la familia *Enterobacteriaceae*

*Anexo 4a.* Tabla de la NCCLS para la interpretación de resultados de *Streptococcus viridans*

*Anexo 5.* CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *E. coli*.

*Anexo 6.* AMBIENTE DE TRABAJO: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA I.G.B.J.

*Anexo 7.* EQUIPOS DE TRABAJO LAB. MICROBIOLOGIA I.G.B.J.

## RESUMEN

**Objetivo:** Identificar la flora bacteriana en cultivos de bilis de pacientes sometidos a cirugía biliar.

**Lugar:** Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, La Paz, Bolivia. (Julio 2006 – Marzo 2007)

**Materiales y Métodos:** 52 pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 85 años, que ingresaron con diagnóstico de patología biliar aguda y no aguda, litiasica o no litiasica para ser sometidos a colecistectomía.

**Mediciones de los resultados principales:** Se realizó en cada uno, cultivo de bilis vesicular para determinar la frecuencia de infección biliar, identificar los especímenes más frecuentes y establecer la sensibilidad antibiótica específica de las bacterias.

**Resultados:** El número de cultivos positivos fue significativamente alto (44%). Los microorganismos aislados en más ocasiones fueron bacterias aerobias, con más frecuencia especies gram negativas (78.3%), entre estas *Escherichia coli* en (43.5 %) y *Klebsiella pneumoniae* (8.8%).

Los microorganismos bacilares Gram negativos se informaron con sensibilidad a antimicrobianos como carbapenémicos (imipenem), aminoglucosidos (Gentamicina), también a quinolonas fluoradas (ciprofloxacina) y cierta sensibilidad al Cloranfenicol en el caso de *Klebsiella pneumoniae*. Para enterococos y streptococos sensibilidad a la penicilina, vancomicina y clindamicina.

### **Conclusiones:**

La positividad de crecimiento para cultivos de bilis vesicular fue alta, siendo las enterobacterias aerobias: bacilos Gram negativos, las más frecuentemente encontradas, desvirtuando de alguna manera que la bilis es estéril. La información obtenida y transmitida en el presente estudio le permite al clínico tener una guía que le ayude a decidir una terapia antibiótica adecuada, en los casos asociados a patología biliar no aguda, litiasica o no litiasica.

**Palabras clave:** Cultivos, bacteriemia, resistencia, sensibilidad, bilis estéril, infección biliar.



## 1. INTRODUCCIÓN

La patología de vesícula biliar y vías biliares es motivo de interés permanente debido a que es una de las causas más frecuentes de ingreso en las instituciones hospitalarias de nuestro medio. Se calcula que aproximadamente el 10% de la población presenta enfermedad calculosa biliar. A su vez, esta entidad nosológica puede presentarse con sintomatología que sugiere una enfermedad inflamatoria con o sin infección sobre agregada.<sup>1</sup>

Se ha aceptado a través del tiempo que la bilis en condiciones normales es estéril. Sin embargo llama la atención que muchos pacientes sin antecedentes de cirugía biliar y sin cuadro infeccioso para el momento de la cirugía, presentan modificaciones histológicas de las paredes vesiculares compatibles con procesos infecciosos. “La bibliografía relacionada a trabajos bacteriológicos acaba con la premisa manejada de que la bilis es estéril, ya que existe la posibilidad de flora bacteriana biliar estrechamente asociada a sus procesos patológicos”<sup>2</sup>. Basados en lo mencionado en el presente trabajo se realizaron cultivos de la bilis vesicular para determinar la presencia o ausencia de bacterias tomando en cuenta que la bacteriemia positiva es un factor epidemiológico muy importante para predecir la posibilidad de infección de la herida quirúrgica.<sup>(1,3)</sup>

En el deseo de conocer la génesis de la bacteriología de la infección biliar, los trabajos en esta área se han orientado a ocuparse de la bacteriología de las vesículas patológicas, o mejor, de la infección biliar.

En los Servicios de Cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano – Japonés de la ciudad de La Paz, se utilizan tratamientos antibióticos preoperatorios en los diferentes pacientes que son sometidos a cirugía biliar, sin que exista una base bacteriológica y epidemiológica demostrada sobre el predominio bacteriano determinado, su resistencia y sensibilidad.

La resistencia antibiótica es un problema de salud pública creciente que se asocia con un aumento de la morbimortalidad de los pacientes y que de alguna manera repercute en la economía del paciente a causa de posible prolongación de internación hospitalaria.

El uso inapropiado de antibióticos es la principal causa del desarrollo de resistencia antibiótica.

Es por ello que surge la necesidad de determinar la frecuencia de infección biliar en pacientes sometidos a cirugía biliar, reducir el gasto terapéutico antibiótico al conocer la sensibilidad bacteriana específica e identificar el tipo o tipos de bacterias más frecuentes en la bilis y su espectro de sensibilidad a los antibióticos. Esta información será de utilidad para la elaboración de guías para la profilaxis antibiótica prequirúrgica en cirugía de vías biliares.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia antibiótica es un problema de salud pública creciente que se asocia con un aumento en la morbimortalidad de los pacientes que además repercute en la economía del paciente.

Considerando a las infecciones en cirugía digestiva incluida las vías biliares se dice que éstas representan un amplio grupo de infecciones (aprox. 15.5%)<sup>5</sup> y no resulta fácil establecer la verdadera incidencia de las mismas debido a la falta de coincidencia en las cifras que son publicadas por los distintos centros.<sup>4</sup>

Por otro lado no se conoce información de laboratorios del estado, que hayan determinado la posible flora bacteriana en bilis, tanto aerobia como anaerobia, su tratamiento antibiótico apropiado, dirigido a evitar el uso innecesario de la antibioticoterapia empírica profiláctica preoperatoria, la cual no cubre la totalidad de posibles bacterias implicadas.

**Es por esto que planteamos como un problema el hecho de desconocer género, especie, perfil de sensibilidad y resistencia bacteriana a los antimicrobianos en cirugías biliares en el Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés.**

### 3. ANTECEDENTES

Según la última actualización diciembre 2003 de la Sociedad Boliviana de Cirugía referente a patología de vesícula y vías biliares, luego de realizar un estudio en cuatro hospitales muy importantes del país: Hospital Obrero No 2 de la C.N.S., Hospital Clínico Viedma, Hospital Gastroenterológico Boliviano Japonés de Cochabamba y Hospital Japonés de Santa Cruz., asegurando, de esta manera, que son la representación de nuestro medio concluyen que la Patología de Vesícula y Vías Biliares en Bolivia es bastante frecuente ya que un 15,5% de las cirugías totales realizadas corresponden a ésta, además existe un índice de complicaciones como la Coledocolitiasis, en un 13,4%; Colangitis Aguda Supurada, en 1,9%; Pancreatitis, 4,1%; Fístula biliares, 0,8%; Enfermedades neoplásicas, 3,1% y otras.<sup>5</sup>

Algunos estudios, especialmente extranjeros, han demostrado la presencia de infección bacteriana en la vesícula biliar de pacientes colecistectomizados, ya sea por inflamación aguda, crónica o litiasis. Aun cuando existen marcadas diferencias en la positividad de los cultivos, los que fluctúan entre el 10 al 78%, dependiendo de una serie de variables como sexo, edad, presencia de inflamación aguda, obstrucción de la vía biliar, magnitud del procedimiento quirúrgico, etc<sup>6</sup>, casi invariablemente la mayoría de los estudios han demostrado que la flora intestinal aeróbica, específicamente *Enterobacteriaceas*, dan cuenta de alrededor del 80 al 100% de las infecciones de la vesícula biliar.<sup>5</sup> En orden de frecuencia la mayoría de los estudios coinciden en que *E. coli* representa al menos el 50% del total de gérmenes aeróbicos aislados, le siguen los *Streptococcus spp*, *Enterococcus spp* y *Enterobacter spp*. *Staphylococcus aureus* aparece en porcentajes menores a 10%. Por su lado *Salmonella spp*, ha sido señalada en una frecuencia variable y cuya importancia en la vesícula biliar con litiasis ha sido sobre enfatizada, no sólo por la condición de portador crónico, sino por su probable asociación con el cáncer de la vesícula biliar.<sup>(7,8 )</sup>

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El desconocimiento de la flora residente no permite establecer un esquema profiláctico preoperatorio real en cualquier tipo de cirugía a realizarse, siendo este esquema profiláctico de gran importancia ya que es considerado como elemento necesario e indispensable en el manejo estándar del paciente quirúrgico.

Un inadecuado esquema de antibioticoterapia preventiva o profiláctica, que no cumpla con los requisitos mínimos para su administración, conlleva el riesgo de desencadenar un proceso séptico en el paciente y caso extremo un brote de infección intrahospitalaria.

Es necesario conocer género, especie, perfil de sensibilidad y resistencia bacteriana a los antimicrobianos, para que exista una base bacteriológica y epidemiológica demostrada sobre el predominio bacteriano determinado, de esta manera con los datos obtenidos establecer un esquema profiláctico antimicrobiano apropiado.<sup>9</sup>

Sencillamente, la ausencia de los esquemas de profilaxis antibiótica o su inadecuada elaboración acarrea mayor morbilidad con prolongación de la estancia hospitalaria aumentando costos operativos con el consecuente perjuicio económico.

## 5. MARCO TEORICO.

### 5.1. VIAS BILIARES.

#### 5.1.1. ANATOMÍA DE VÍAS BILIARES.

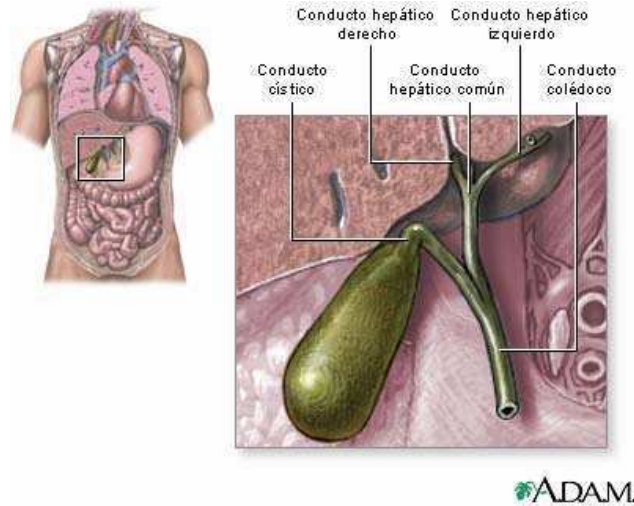


Fig. 1. Anatomía del sistema Biliar.

A diferencia del resto del aparato digestivo, la vesícula biliar no tiene *musculares mucosae* ni submucosa, por lo que solo esta formada por:

- 1) un revestimiento mucoso con una sola capa de células cilíndricas
- 2) una capa fibromuscular
- 3) una capa de tejido adiposo subseroso con arterias, venas, linfáticos, nervios y paraganglios
- 4) una cubierta peritoneal, salvo en la zona en la que la vesícula esta adosada o incluso dentro del tejido hepático. El epitelio de la mucosa forma numerosos pliegues finos y entrelazados que crean una superficie en panal de abejas. En el cuello de la vesícula, estos pliegues se unen formando las *válvulas espirales de Heister*, que se extienden hacia el conducto cístico. Estas válvulas, junto con la acción de la capa muscular, ayudan a retener la bilis en la vesícula entre las comidas. La rápida disminución de diámetro del cuello vesicular inmediatamente antes de desembocar en el cístico, constituye el lugar mas probable de impacto de los cálculos.<sup>10</sup>

En ocasiones, se encuentran pequeños canales tubulares (*conductos de Lushcka*) que minan la pared de la vesícula en las zonas adyacentes al hígado. Estos canales comunican con el árbol biliar intrahepático, pero solo en raras ocasiones forman conductos biliares accesorios permeables que penetran directamente en la luz vesicular. Puede haber pequeñas protrusiones de la mucosa vesicular que penetran en el interior de la pared muscular; su abundancia en casos de inflamación y formación de cálculos vesiculares indica que se trata de herniaciones adquiridas.<sup>10</sup>

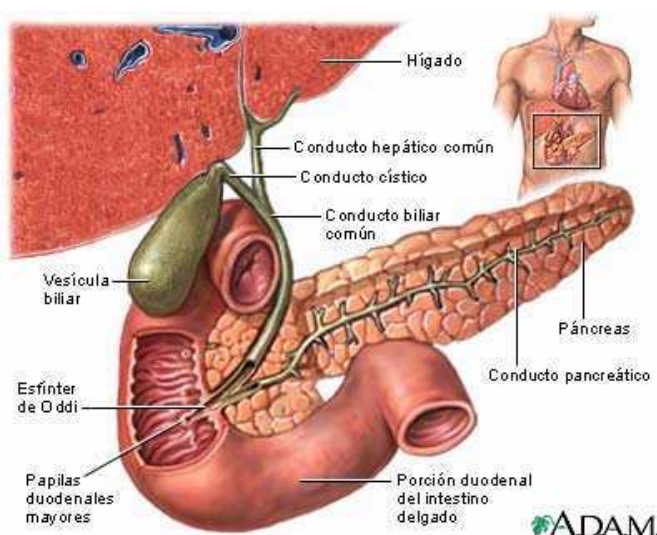


Fig. 2. Anatomía del sistema Biliar

El árbol biliar confluye en el colédoco, conducto que atraviesa la cabeza del páncreas a lo largo de unos 2 cm antes de verter su contenido en la luz intestinal a través de la *ampolla de Vater*. En el 60-70% de las personas, el conducto pancreático principal se une al colédoco para drenar juntos en un conducto común; el resto, los dos conductos siguen trayectos paralelos, sin unirse. Dispersas a lo largo de todo el árbol biliar intra y extrahepático se encuentra las glándulas secretoras de mucina, que son más prominentes cerca del extremo terminal del colédoco donde, en el estudio microscópico, aparecen como envaginaciones que se entrecruzan con el músculo liso espiral del esfínter de la ampolla.<sup>10</sup>

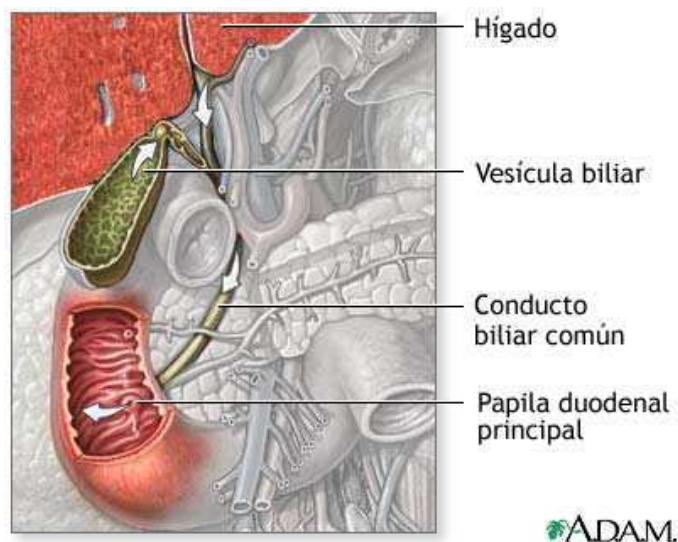


Fig. 3. Trayecto de la bilis.

### 5.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BILIS

La bilis hepática es un líquido rico en bicarbonato que contiene alrededor del 3% en peso de solutos orgánicos, de los que dos terceras partes corresponden a sales biliares (Fig. 4). Estas son el principal producto del metabolismo hepático del colesterol y consisten en una familia de esteroides hidrosolubles con cadenas laterales carboxiladas. Las sales biliares actúan como detergentes muy eficaces, solubilizando los lípidos insolubles en el agua secretados por el hígado hacia el árbol biliar y favoreciendo la absorción de los lípidos de la dieta en la luz intestinal. Los principales lípidos secretados (> 95%) son *lecitinas* (fosfatidilcolina), sustancias hidrófobas que, por si mismas, no son hidrosolubles en grado apreciable, y *colesterol*, una molécula esteroide prácticamente insoluble que sólo posee un grupo polar hidrófilo, En la bilis, *la solubilidad del colesterol aumenta varios millones de veces gracias a la presencia de las sales biliares y de la lecitina.*<sup>10</sup>

Alrededor del 95% de las sales biliares secretadas son ávidamente reabsorbidas en el intestino, sobre todo en el íleon, desde donde vuelven al



hígado a través del sistema porta. *La circulación enterohepática de las sales biliares constituye un mecanismo muy eficiente de reutilización de estas moléculas fisiológicas esenciales.*<sup>11</sup> No obstante, *la pérdida diaria fecal obligatoria de alrededor de 1 gramo de sales biliares constituye la vía principal de excreción del colesterol*, a la que se une una contribución menor de colesterol libre secretado directamente a la bilis.<sup>10</sup>

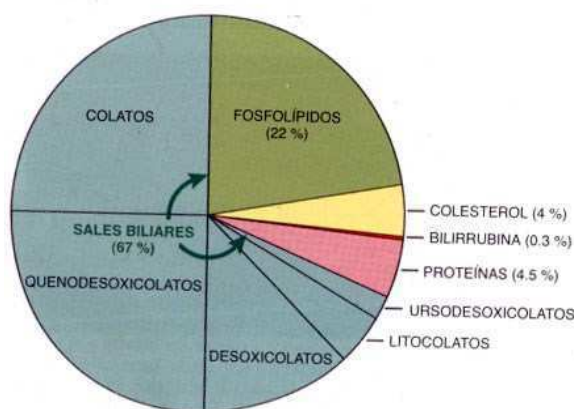


Fig. 4. Composición típica de los solutos de la bilis vesicular y hepática de una persona sana.

## 5.2. ENFERMEDADES DE LA VESÍCULA BILIAR

### 5.2.1. COLELITIASIS (Cálculos biliares)

Los cálculos biliares afectan al 10-20% de la población adulta de los países desarrollados. En Estados Unidos, se calcula que son más de 30'000'000 de personas las que tienen cálculos biliares, que en total arrojarían un peso conjunto de 25 a 50 toneladas.<sup>12</sup> Cada año se descubren cálculos vesiculares en alrededor de un millón de nuevos pacientes, de los que la mitad terminan por ser intervenidos. No obstante, casi todos estos cálculos (>80%) son "silentes" y la mayoría de las personas no tienen dolores biliares ni otras complicaciones durante decenios. Existen dos tipos de principales de cálculos: cálculos de colesterol, cálculos pigmentados y cálculos mixtos.

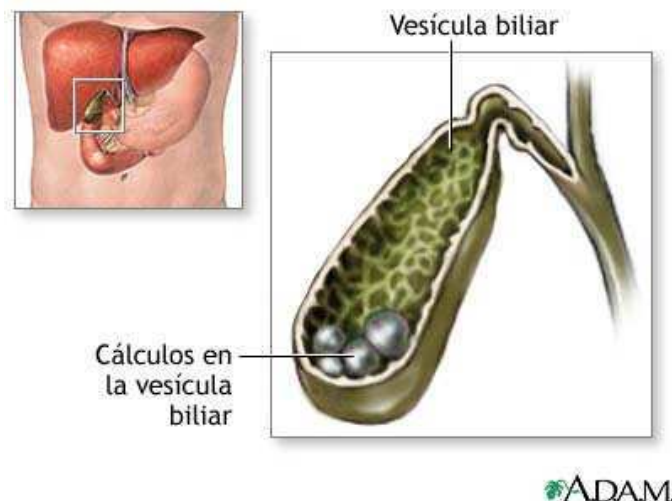


Fig. 5. Colelitiasis

### 5.2.1.1. FISIOPATOLOGÍA

**Cálculos de colesterol.** La agregación con las sales biliares hidrosolubles y con las lecitinas no hidrosolubles, actuando ambas como detergentes, es lo que permite que el colesterol sea soluble en agua. Cuando las concentraciones de colesterol superan la capacidad solubilizante de las bilis (supersaturación), aquél no puede ya permanecer disperso y precipita como cristales sólidos de monohidrato de colesterol. En la formación de los cálculos biliares de colesterol interviene una tetralogía de defectos simultáneos. (Fig. 6)

- La bilis ha de estar supersaturada de colesterol.
- La hipomotilidad de la vesícula biliar favorece la nucleación.
- Se acelera la nucleación del colesterol.
- La hipersecreción mucosa de la vía biliar atrapa los cristales, facilitando su agregación en cálculos.

Parece que el defecto primario es la hipersecreción biliar de colesterol, fenómeno posiblemente mediado por un mayor paso del colesterol circulante en

las lipoproteínas plasmáticas a la bilis y por regulación anormal de las vías de biosíntesis hepática del mismo. El exceso de colesterol libre es tóxico para la vesícula biliar cuando supera la capacidad de su mucosa para detoxificarlo por esterificación. La hipomotilidad, la hipersecreción de mucina y el consiguiente secuestro de bilis en la vesícula facilitan la precipitación y la agregación. Hay otras influencias ambientales que exacerbaban el vaciamiento defectuoso de la vesícula, como son el ayuno prolongado, el embarazo, la pérdida de peso rápida, la nutrición parental total y las lesiones de la medula espinal.<sup>10</sup>

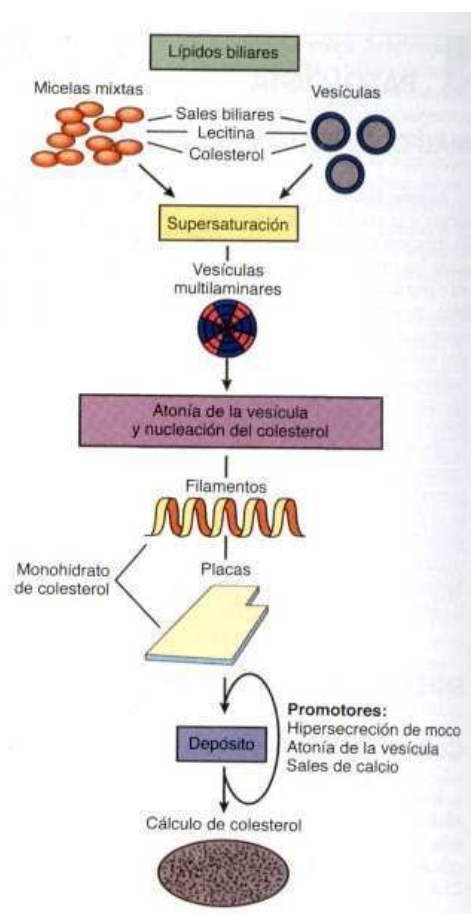


Fig. 6. Esquema de los cuatro factores que contribuyen a la colelitiasis; supersaturación, atonía de la vesícula, nucleación de cristales y depósito en la mucosa de la vesícula biliar.

**Cálculos pigmentados.** Los cálculos pigmentados son mezclas de sales cálcicas insolubles de bilirrubina no conjugada y de sales de calcio inorgánicas. La bilirrubina no conjugada normalmente un componente menor de la bilis, pero

su proporción aumenta cuando la infección de la vía biliar induce a la liberación de  $\beta$ -glucuronidasas microbianas, que hidrolizan los glucorónidos de bilirrubina. Por tanto las infecciones por *Escherichia coli*, *Ascaris lumbricoides* aumentan las probabilidades de formación de cálculos pigmentados. Otra posibilidad es que una hemólisis intravascular de lugar a un aumento de la excreción biliar de bilirrubina conjugada. Como, incluso en situaciones normales, una parte pequeña (alrededor del 1%) de los glucorónidos de bilirrubina sufren desconjugación en el árbol biliar, es fácil que, en presencia de hemólisis, se supere la hidrosolubilidad de la bilirrubina libre.<sup>10</sup>

## **5.2.2. COLECISTITIS**

La inflamación de la vesícula biliar puede ser aguda, crónica o aguda sobreañadida a la forma crónica. Casi siempre se asocia a cálculos biliares.<sup>10</sup>

### **5.2.2.1. COLECISTITIS AGUDA**

La colecistitis calculosa aguda es una inflamación aguda de la vesícula biliar desencadenada, en el 90% de los casos, por la obstrucción del cuello en la vesícula o del conducto cístico por un cálculo. Es la complicación principal de los cálculos biliares y la indicación mas frecuente de la colecistectomía de urgencia. La colecistitis aguda no calculosa se produce en una ausencia de cálculos biliares, generalmente en pacientes con enfermedades graves. La mayoría de estos casos se produce en las circunstancias siguientes:<sup>10</sup>

- 1) Postoperatorio de una intervención quirúrgica importante, no biliar
- 2) Traumatismos graves (accidentes de tráfico, lesiones de guerra).
- 3) Quemaduras graves
- 4) Insuficiencia multisistémica
- 5) Sepsis
- 6) Nutrición parenteral prolongada
- 7) Puerperio

### 5.2.2.2. FISIOPATOLOGÍA

La colecistitis calculosa aguda se debe a la irritación química y a la inflamación de la vesícula biliar obstruida. La acción de las fosfolipasas de la mucosa hidroliza las lecitinas lumbinales, convirtiéndolas en lisolecitinas. Desaparece la capa de glucoproteínas que normalmente protege a la mucosa y el epitelio queda expuesto a la acción detergente directa de las sales biliares. La motilidad de la vesícula biliar se altera y el aumento de la presión intraluminal dificulta la llegada de sangre a la mucosa. *Estos acontecimientos se producen en ausencia de infección bacteriana*, solo en estadios posteriores de la enfermedad puede desarrollarse una contaminación con microorganismos.<sup>10</sup>

Parece que la colecistitis aguda no calculosa se debe a una lesión isquémica directa. La arteria cística es una arteria terminal y la vesícula prácticamente no recibe circulación colateral alguna. Entre los factores que contribuyen a su desarrollo se encuentran los siguientes:<sup>13</sup>

- La deshidratación y la administración de múltiples transfusiones de sangre, con la consiguiente sobrecarga de pigmento.
- La éstasis de la vesícula biliar, como sucede en la nutrición parenteral o en la ventilación asistida.
- La acumulación de restos biliares, bilis viscosa y moco vesicular, que provocan la obstrucción del cístico, pese a la ausencia de cálculos biliares francos.
- La inflamación y el edema de la pared, que dificultan la irrigación del órgano.
- La contaminación bacteriana y la producción de lisolecitinas.

En 90% al 95% de los casos aparece como complicación de una colelitiasis (**colecistitis aguda litiásica**). En los restantes se produce en ausencia de

cálculos (**colecistitis aguda alitiásica**). Esta última forma se presenta preferentemente en pacientes graves sometidos a tratamiento en unidades de cuidados intensivos por politraumatismos, quemaduras, insuficiencia cardiaca o renal o por sepsis, con nutrición parenteral, respiración asistida o politransfundidos. En algunos casos, en especial diabéticos, inmunodeficientes o niños, se origina como consecuencia de una infección primaria por *Clostridium*, *Escherichia coli* o *Salmonella typhi*<sup>14</sup>.

### 5.2.2.3. COLECISTITIS AGUDA LITIÁSICAS

Se producen como consecuencia de la obstrucción del cístico por un cálculo en presencia de bilis sobresaturada. Se supone que los microcristales de colesterol y las sales biliares lesionan la mucosa vesicular y que ello favorece la invasión bacteriana y la activación de la fosfolipasa A2. Esta última libera ácido araquidónico y lisolecitina de los fosfolípidos. Mientras que la lisolecitina es citotóxica y aumenta la lesión mucosa, el ácido araquidónico origina prostaglandinas, las cuales actúan como proinflamatorios, aumentan la secreción de agua y favorecen la distensión vesicular. El aumento de presión dentro de la vesícula dificulta el flujo de sangre a través de sus paredes, lo que provoca su necrosis (gangrena vesicular) y perforación (10%). Consecuencias de esto último son: 1) peritonitis local o generalizada, 2) absceso local o 3) fístula colecistoentérica (0,1-0,2%). La infección bacteriana parece jugar un papel secundario, ya que en el momento de la cirugía se logran cultivos positivos sólo en el 50% al 70% de los casos. A pesar de ello, esta sobreinfección puede condicionar la formación de un empiema vesicular (2,5%), en especial en los ancianos y en los diabéticos. Los microorganismos que más comúnmente se descubren son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter spp.* En los casos más graves pueden encontrarse también anaerobios, tales como el *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* o *Pseudomonas*. *Salmonella typhi* se descubre en ancianos, diabéticos y portadores de litiasis biliar. En casos raros, preferentemente

también ancianos y diabéticos, se originan colecistitis enfisematosas. Los microorganismos implicados en esta forma de colecistitis son los *Clostridium spp.* (45%) y, eventualmente, estreptococos anaerobios y *E.coli* (33%).

### **5.2.2.3. COLECISTITIS AGUDA ALITIÁSICAS**

La fisiopatología de las colecistitis alitiásicas es aun más oscura, pero probablemente es multifactorial. La isquemia originada durante los periodos hipotensivos puede condicionar algunos casos, en especial en ancianos. En los politraumatizados, así como en los sometidos a cirugía muy agresiva y en los tratados con fármacos inotropos por hipotensión arterial, el aumento del tono vascular pudiera jugar un papel patogénico. En otros casos se ha atribuido a una hipersensibilidad a los antibióticos, en otros a la éstasis biliar determinada por el ayuno prolongado, la alimentación parenteral, el aumento de la viscosidad biliar (transfusiones masivas, deshidratación) o el espasmo del esfínter de Oddi (analgésicos opiáceos).

También en estos casos se supone que la litogenicidad de la bilis juega un papel importante. La infección bacteriana es, en general, secundaria, pero, cuando se produce, favorece la formación de una colecistitis gangrenosa (50%) o enfisematosa.

### **5.2.2.3. COLECISTITIS CRONICA**

La colecistitis crónica puede ser una secuela de brotes repetidos de colecistitis aguda de intensidad variable, pero en muchos casos se desarrolla sin que existan antecedentes claros de ataque agudos. Como se asocia con colelitiasis en más del 90% de los casos, las poblaciones de pacientes son las mismas en ambos casos. La evolución de la colecistitis crónica es dudosa, ya que no esta claro que los cálculos biliares intervengan directamente en la producción de la inflamación ni el desarrollo del dolor. En la tercera parte de los casos es posible cultivar microorganismos, generalmente *E. coli* o *Enterococos*, en las muestras

de bilis. Los síntomas de la colecistitis crónica calculosa son similares a los de la forma aguda y oscilan entre el cólico biliar y un dolor leve del hipocondrio derecho o malestar epigástrico. Como la mayor parte de las vesículas extirpadas en intervenciones electivas por colelitiasis tienen colecistitis crónica, hay que admitir que los síntomas biliares suelen aparecer cuando los cálculos coexisten con una inflamación de bajo grado.<sup>10</sup>

**Fig. 7 Vesícula biliar con colecistitis crónica, colelitiasis y un pequeño tumor papilar a nivel del conducto cístico (macro)**



Aspecto macroscópico de vesícula biliar después de seccionarla longitudinalmente. Notar el engrosamiento de la pared, abundantes cálculos polihédricos y un pequeño tumor papilar en el conducto cístico



### 5.2.3. COLEDOCOLITIASIS Y COLANGITIS ASCENDENTE

Consideramos juntos estos cuadros, dada la gran frecuencia con que se presentan unidos. *La coledocolitiasis es la presencia de cálculos en el árbol biliar*, que sucede en alrededor del 10% de los pacientes con colelitiasis. En los países occidentales, casi todos los cálculos proceden de la vesícula biliar, aunque tanto los de colesterol como los pigmentados pueden formarse también en la vía biliar. En oriente, la incidencia de cálculos, generalmente pigmentados, ductales o intrahepáticos, es mucho más alta. La coledocolitiasis puede ser asintomática o producir síntomas de: 1) obstrucción, 2) pancreatitis, 3) colangitis, 4) abscesos hepáticos, 5) cirrosis biliar secundaria, 6) colecistitis aguda calculosa.<sup>10</sup>

*Colangitis es el término aplicado a la infección bacteriana de los conductos biliares.* Puede ser consecuencia de cualquier lesión que produzca obstrucción del flujo biliar, pero es más frecuente en la coledocolitiasis. Otras causas más raras son las sondas o catéteres permanentes, los tumores, la pancreatitis aguda, las estenosis benignas y, raras veces, los hongos, virus o parásitos. Lo más probable es que las bacterias penetren en las raíces biliares intrahepáticas a través del esfínter de Oddi, la infección recibe el nombre de *colangitis ascendente*. Los microorganismos más frecuentes son los aerobios gramnegativos como *E. coli*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Bacteroides* o *Enterobacter*, así como los *estreptococos* del grupo D. La colangitis se manifiesta por fiebre, escalofríos, dolor abdominal e ictericia, asociados a la inflamación aguda de la pared de los conductos biliares con entrada de neutrófilos en las luces. Cuando los síntomas son intermitentes, debe sospecharse una obstrucción parcial. La forma más grave de colangitis es la supurada, en la que una bilis purulenta ocupa y distiende los conductos biliares, extendiéndose hasta el tejido hepático, donde puede provocar abscesos. Como el cuadro tiende a estar dominado más por la sepsis que por la colestasis, en

estos pacientes inestables es necesario realizar un estudio diagnóstico y una intervención rápida.<sup>10</sup>

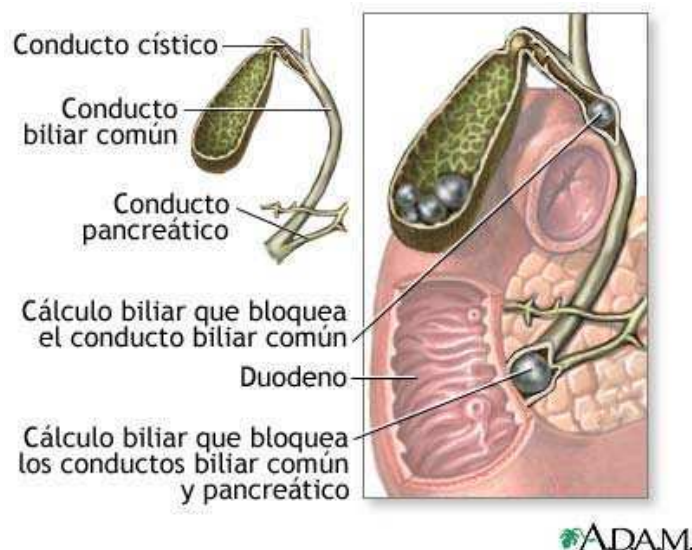


Fig. 8. Coledocolitiasis

### 5.3. BACTERIOLOGÍA DE LA BILIS

Los microorganismos más comúnmente aislados como causantes de infección de las vías biliares son los que constituyen la flora intestinal normal. En primer lugar, están los bacilos gramnegativos entéricos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp*). Gram positivos y anaerobios se aíslan con menor frecuencia. *Enterococcus spp*. es el gram positivo más habitual. Los anaerobios (*Bacteroides spp*, *Clostridium spp* y *Fusobacterium spp*) pueden aislarse junto a gram negativos como parte de una infección polimicrobiana si se usan las técnicas adecuadas. Los aislamientos de anaerobios son más frecuentes en pacientes con antecedentes de cirugía biliar o manipulaciones en el colédoco, en caso de infección crónica del tracto biliar o en la vejez. Del mismo modo, los anaerobios se asocian a cuadros clínicos más graves. La duración y severidad de los síntomas, la edad avanzada y la ictericia, son factores que predicen la existencia de bacterobilia. Como corolario, se acepta que la vía ascendente desde el intestino es la forma habitual de infección de la vía biliar.<sup>15</sup>

**COLECISTITIS.** Los cultivos de bilis de poco más de la mitad de los pacientes con colecistitis aguda son positivos. Por otra parte, la bacterobilia puede darse en pacientes asintomáticos. Es rara la existencia de bacteriemia acompañando al episodio (menos del 10 %) en los episodios no complicados.<sup>15</sup>

<b>Bacterias</b>	<b>Bilis (%)</b>
<i>Clostridium spp.</i>	5 – 10
<i>Bacteroides spp.</i>	5 – 15
Otros grampositivos	0 – 5
<i>Enterococcus spp.</i>	10 – 20
Otros gramnegativos	5 – 15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 – 10
<i>Enterobacter spp.</i>	5 – 15
<i>Klebsiella spp.</i>	15 – 25
<i>Escherichia coli</i>	25 – 50

**Tabla 1.** Espectro de bacterias aisladas en bilis de pacientes con colangitis. (% porcentajes estimativos)

**COLANGITIS.** El cultivo de la bilis, los cálculos y las prótesis biliares son positivos en más del 90 % de los casos de colangitis. En contraste con la colecistitis, la bacteremia ocurre en más del 50 % de los pacientes con colangitis. Los microorganismos más frecuentes tienen una distribución similar a la del cultivo biliar excepto el *Enterococo* que es raro en hemocultivos. La presencia en sangre de anaerobios (*Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens*) es variable. La frecuencia de los asilamientos en bilis aparece en la Tabla 1. En caso de pacientes portadores de prótesis biliar, endoscopia reciente de la vía biliar o antibioterapia de amplio espectro, la bilis se puede colonizar con flora resistente, en concreto *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>15</sup>

#### 5.4. ENTEROBACTERIACEAE

Los bacilos gramnegativos pertenecientes a *Enterobacteriaceae* son los aislamientos bacterianos recuperados con más frecuencia de muestras clínicas. Distribuidos en la naturaleza en forma amplia, estos microorganismos se encuentran en el suelo y el agua, sobre las plantas y, como indica el nombre de la familia, dentro del tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales.<sup>16</sup>

Los miembros de *Enterobacteriaceae* pueden ser incriminados en virtualmente cualquier tipo de enfermedad infecciosa y recuperados de cualquier muestra recibida en el laboratorio. Los pacientes inmunocomprometidos o debilitados son altamente susceptibles a las infecciones adquiridas en los hospitales, después de la colonización con cepas ambientales o a continuación de procedimientos invasivos, como cateterización, broncoscopia, colposcopia o biopsias quirúrgicas, en las cuales las membranas mucosas se traumatizan y se cortan.<sup>16</sup>

El shock endotóxico es una manifestación potencialmente letal de la infección por bacterias gramnegativas, incluidas las *Enterobacteriaceae*. Las endotoxinas son lipopolisacáridos farmacológicamente activos que están contenidos dentro de las paredes celulares de las especies gramnegativas. Estos lipopolisacáridos están estructurados en tres capas: 1) una porción variable externa de carbohidratos que determina la especificidad antigénica, 2) un core medio de polisacárido que es estructuralmente similar entre las especies y 3) una porción lipídica central altamente conservada llamada lípido A.<sup>16</sup>

#### 5.4.1. CARACTERÍSTICAS PARA UNA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA

Algunas de las claves iniciales por las que un aislamiento desconocido recuperado de muestras clínicas puede pertenecer a *Enterobacteriaceae* son mencionadas a continuación.<sup>16</sup>

En muestras que no sean heces, una preparación teñida con Gram puede revelar células bacilares y cocobacilares gramnegativas cortas y gordas, (Fig. 9) cuyo tamaño varía de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  de ancho, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo. Sin embargo la diferenciación de especies no puede hacerse sobre la única base de la morfología con la tinción de Gram.<sup>16</sup>



Fig. 9. Coloración Gram, Bacilos Gram negativos cortos rechonchos, típicos de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*

La característica morfológica de la colonia de un microorganismo que crece en un medio sólido puede ser una segunda clave. Típicamente, los miembros de *Enterobacteriaceae* producen colonias mucoides o secas relativamente grandes, de color gris opaco, en agar sangre; esto último sugiere cepas de *Klebsiella pneumoniae*. La hemólisis en agar sangre es variable y no es distintiva. (Fig. 10)

Las colonias aparecen como una película delgada o una onda (un fenómeno conocido como dispersión o Swarming) y sugieren que el microorganismo es

móvil y probablemente una especie de *Proteus*.(Fig.11) Las colonias aparecen rojas en agar MacConkey o tienen brillo verde metálico sobre agar eosina azul de metileno (EMB), lo cual indica que el microorganismo es capaz de formar ácido a partir de la lactosa presente en el medio.<sup>16</sup>



Fig. 10 Grandes colonias rosadas, mucoides, brillantes, en agar MacConkey típicas de muchas especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*



Fig. 11. Aspecto invasor de una especie de *Proteus* en una placa de agar Chocolate

La diferencia de *Enterobacteriaceae*, sin embargo, se basa primariamente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas dirigen el metabolismo de las bacterias a lo largo de uno o mas caminos que pueden ser detectados por medios especiales usados en las técnicas de cultivo in Vitro. Los sustratos sobre los cuales pueden reaccionar estas enzimas están incorporados al medio de cultivo, junto con un indicador que puede detectarse por la utilización de sustrato o por la presencia de productos metabólicos específicos. Mediante la selección de series de medios que miden las diferentes características metabólicas de los microorganismos que se deben ensayar, puede determinarse un perfil bioquímico para hacer una clasificación de especies.<sup>16</sup>

## 5.4.2. CARACTERISTICAS DE RELEVAMIENTO

La identificación definitiva de los miembros de *Enterobacteriaceae* puede requerir una batería de pruebas bioquímicas. Pueden evitarse un tiempo considerable y una probable identificación errónea si se hacen unas pocas observaciones preliminares para asegurar que el microorganismo que se va a probar pertenece a este grupo. Si el microorganismo es un gram negativo de otro grupo, puede ser necesario usar un juego de características diferentes del que se usa comúnmente para la identificación de *Enterobacteriaceae*. Con unas pocas excepciones, todos los miembros de *Enterobacteriaceae* demuestran las siguientes características:<sup>16</sup>

- Fermentadores de Glucosa
- Citocromo oxidasa negativa
- Reducción de nitrato a nitrito

### 5.4.2.1. UTILIZACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

El término fermentación se usa también en forma algo laxa en referencia a la utilización de los hidratos de carbono por bacterias, con términos como **fermentadores de lactosa** o **no fermentadores de lactosa**. Por definición, la fermentación es un proceso metabólico de oxido-reducción que tiene lugar en un entorno anaerobio, en el que el sustrato orgánico sirve como aceptor final de hidrogeno (electrones) en lugar de oxigeno. En sistemas bacteriológicos, este proceso se detecta por observación del cambio de color de los indicadores de pH como consecuencia de la formación de productos ácidos. La acidificación del medio de cultivo puede ocurrir a través de la degradación de hidratos de carbono por otros caminos distintos de la fermentación, o puede haber en algunos medios ingredientes distintos de los hidratos de carbono que resulten en productos finales ácidos. Aunque la mayoría de las bacterias que metabolizan los hidratos de carbono son anaerobias facultativas, la utilización

puede no ocurrir siempre bajo estrictas condiciones anaerobias, como se observa en la producción de productos ácidos por colonias bacterianas que crecen sobre la superficie del agar. Aunque todas las pruebas usadas para medir la habilidad de un microorganismo para degradar enzimáticamente un “azúcar” en productos ácidos no son “fermentativas”, estos términos serán usados por conveniencia en el resto del texto.<sup>16</sup>

Muchas bacterias incluidas todas las *Enterobacteriaceae*, fermentan la glucosa a través de la **vía de Embden – Meyerhof** para formar ácido pirúvico. Sin embargo, la manera en que el ácido pirúvico se utiliza varía entre las especies bacterianas. Los destinos alternativos del ácido pirúvico son el resultado de una variedad de caminos de fermentación que rinden productos finales bastante diferentes.<sup>16</sup>

Las bacterias se diferencian por el hidrato de carbono que metabolizan y por los tipos de cantidades de ácidos que producen. Estas diferencias en la actividad enzimática sirven como una de las características bioquímicas más importantes por las cuales se reconocen las especies. La figura 3 muestra la fermentación de tres moléculas de glucosa por medio de dos vías alternativas. Por ejemplo, la fermentación de la glucosa por *Escherichia coli* ocurre por medio de la vía de fermentación ácido mixta y resulta en la producción de grandes cantidades de ácido acético, láctico y fórmico, con una marcada disminución del pH en el medio de prueba. Esta es detectada por la prueba del rojo de metilo. Por otro lado el grupo *Klebsiella – Enterobacter- Hafnia – Serratia* metaboliza el ácido pirúvico primariamente a través de la vía butilén-glucólica, produciendo acetilmetilcarbinol (acetoína) y una prueba de Voges-Proskauer positiva (VP). Nótese que los principales productos finales de esta última vía son alcoholes, y solo se produce una pequeña cantidad de ácido, por lo tanto la prueba del rojo de metilo en general es negativa para este grupo de microorganismos.<sup>16</sup>



El gas resultante de la fermentación bacteriana es primariamente una mezcla de hidrogeno y dióxido de carbono formado por el clivaje del ácido formico. Es una regla aceptada que cualquier bacteria que forma gas en un medio para probar hidratos de carbono primero debe formar ácido, lo cual es evidente en el esquema de EMP. Algunas especies de *Enterobacteriaceae* carecen de la enzima deshidrogenada y no pueden formar ácido formico y como resultado de esto no pueden formar ni siquiera trazas de CO<sub>2</sub> (Por ejemplo la mayoría de las especies de *Shigella*). Por el contrario, los microorganismos que usan la vía butilén glucolítica (es decir VP positivos) producen cantidades copiosas de CO<sub>2</sub>. Por lo tanto, cuando se observan grandes cantidades de gas, se debe considerar el grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* como la identificación probable.<sup>16</sup>

#### **5.4.2.2. ACTIVIDAD CITOCROMO OXIDASA**

Cualquier microorganismo que desarrolle actividad citocromo oxidasa siguiendo los procedimientos y las condiciones de la prueba, se excluye de *Enterobacteriaceae*, La reacción de color que se desarrolla debe ser interpretada dentro de los 10 a 20 segundos porque muchos microorganismos, incluidos miembros seleccionados de *Enterobacteriaceae*, pueden producir reacciones falsas negativas demoradas.<sup>16</sup>

#### **5.4.2.3. REDUCCION DE NITRATOS**

Todas las *Enterobacteriaceae* con excepción de ciertos tipos de *Pantoea* (*Enterobacter*) *agglomerans* y ciertas especies de *Serratia* y *Yersinia*, reducen los nitratos a nitritos. Debido a que el periodo de incubación que se requiere para llevar a cabo la prueba de reducción de nitritos es variable (3 a 24 horas, según el sistema usado), no se usa comúnmente para hacer un relevamiento previo de aislamientos bacterianos desconocidos. Más bien, la prueba se emplea en la mayoría de los laboratorios para confirmar la clasificación correcta

de un microorganismo desconocido o como ayuda en la determinación e identificación de especies de bacterias. Cualquier medio basal que soporte el crecimiento y contenga 0.1% de concentración de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) es adecuado para llevar a cabo la prueba. El caldo nitrato o agar nitrato inclinado son las formas de presentación del medio usado más comúnmente en laboratorios clínicos.<sup>16</sup>

#### **5.4.3. SELECCIÓN DE MEDIOS DE AISLAMIENTO PRIMARIO**

Deben usarse medios de cultivo selectivos para recuperar especies de bacterias importantes de las muestras que pueden alojar una mezcla de microorganismos.<sup>16</sup>

Se dispone de tres tipos generales de medio para la recuperación de *Enterobacteriaceae* de muestras clínicas que potencialmente alojan bacterias mixtas: 1) medio no selectivo para aislamiento primario (p. ej. Agar sangre, agar chocolate); 2) agar selectivo y diferencial (p. ej. Agar MacConkey y Hectoen entérico); y 3) caldos de enriquecimiento<sup>16</sup> (Ver Anexo 1a)

#### **5.4.4. MEDIOS DE AISLAMIENTO ALTAMENTE SELECTIVOS USADOS PRINCIPALMENTE PARA MUESTRAS GASTROINTESTINALES.**

Los medios se hacen altamente selectivos mediante el agregado de una variedad de inhibidores a sus fórmulas, generalmente en concentraciones mas altas que en agar MacConkey o EMB. Estos medios son usados primariamente para inhibir el crecimiento de *E. coli* y otros coliformes, pero permiten el crecimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella* a partir de muestras de materia fecal.<sup>16</sup>

Los medios selectivos formulados para uso en laboratorio clínico, mas comúnmente usados son el *Salmonella-Shigella* (SS), el agar xilosa-lisina-

desoxicolato (XLD) y el agar Hektoen entérico (HE). Estos se describen en el recuadro 2 (Ver Anexo 1b).<sup>16</sup>

La decisión respecto de cual de estos medios usar para la recuperación de patógenos entéricos de muestras fecales depende de la preferencia personal y de las especies que van a ser seleccionadas. En general estos medios se emplean en el laboratorio clínico para la recuperación de *Salmonella* y *Shigella* de muestras de materia fecal diarreica, o en laboratorios de salud pública para investigar una posible contaminación fecal de suministros de agua y comida. Virtualmente todas las especies crecen bien en presencia de sales biliares, lo cual explica por que la vesícula biliar a menudo sirve como reservorio en los seres humanos portadores. Se agregan sales biliares al medio selectivo debido a que otras especies de bacilos entéricos, incluidas algunas de las cepas de *Shigella* más exigentes, crecen poco o no crecen. El agar SS y el HE contienen concentraciones relativamente altas de sales biliares y están bien adaptados para la recuperación de especies de *Sallmonella* de muestras muy contaminadas con otros bacilos coliformes. Sin embargo a causa de su efecto inhibitorio sobre la recuperación de ciertas cepas de especies de *Shigella*, no se recomienda el uso de rutina de agar SS como único medio selectivo para el aislamiento de patógenos entéricos de muestras de materia fecal.<sup>16</sup>

El agar XLD contiene lactosa, sacarosa y xilosa, por lo tanto, los microorganismos que fermentan estos hidratos de carbono forman colonias amarillas. Las bacterias incapaces de fermentar estos hidratos de carbono no producen ácido y forman colonias sin color. Los microorganismos que producen sulfuro de hidrógeno forman pigmento negro que comienza desde el centro de la colonia. El agar XLD también contiene lisina. Esto es importante porque muchas especies de *Salmonella* fermentan la xilosa y, por lo tanto, inicialmente producen colonias amarillas en XLD, pero dado que estas especies contienen lisina descarboxilasa, las colonias revierten a rosado después de que se utilice una pequeña cantidad de la xilosa del medio. La lactosa y la sacarosa, agregadas en exceso, previenen que los coliformes lisina positivos reviertan de

manera similar. Dado que la descarboxilación de la lisina resulta en la formación de aminas fuertemente alcalinas, puede aparecer un halo rosado claro alrededor de las colonias en el agar XLD. Las colonias negras sin halo rosado son más sugestivas de cepas productoras de sulfuro de hidrógeno de especies de *Proteus*.<sup>16</sup>

#### 5.4.5. CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE IDENTIFICACIÓN

Aunque la identificación preliminar de *Enterobacteriaceae* se basa posiblemente en las características de las colonias y las reacciones bioquímicas en medios de aislamiento primarios, otras técnicas de identificación de especies requieren la determinación de características fenotípicas adicionales que reflejan el código genético y la identidad única de los microorganismos que se prueban. No es posible comentar la variedad de diferentes pruebas y numerosos esquemas disponibles para la identificación final de especies de *Enterobacteriaceae*.

Recuadro 1. PRUEBAS USADAS PARA MEDIR LAS CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>
--

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Utilización de Hidratos de Carbono</li> <li>▪ Actividad de <i>o</i>-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-galactopiranosido (ONPG)</li> <li>▪ Producción de indol</li> <li>▪ Rojo de metilo</li> <li>▪ Prueba de Voges-Proskauer (producción de acetil-metil-carbinol [acetoína])</li> <li>▪ Utilización de citrato</li> <li>▪ Producción de ureasa</li> <li>▪ Descarboxilación de la lisina. La ornitina y la arginina</li> <li>▪ Producción de fenilalanina desaminasa</li> <li>▪ Producción de sulfuro de hidrógeno</li> <li>▪ Movilidad</li> </ul> |
|---|

Sin embargo, en el Recuadro 1 se enumeran varias de las pruebas ampliamente usadas en los laboratorios clínicos para medir las características metabólicas por las cuales pueden identificarse todas las especies de *Enterobacteriaceae* con excepción de unas pocas especies raras y atípicas.<sup>16</sup> (Ver Anexos 2a -2i)

#### **5.4.6. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN (BAUER – KIRBY)**

Un comité del NCCLS (Nacional Comité for Clinical Laboratory Standards) evalúa y revisa continuamente el procedimiento de difusión con discos. El establecimiento de una prueba estándar nacional para la difusión con discos no solo ha permitido un control de calidad mas exacto, sino también una comparación válida de los resultados entre los diferentes laboratorios que utilizan este procedimiento. El comité publica actualizaciones periódicas con nueva información y cambios sugeridos por los usuarios. Es importante mantener la actualización de procedimiento. El diámetro del halo que se forma en la prueba no tiene sentido sin referencia a los correlatos y guías interpretativas de la concentración inhibitoria mínima (CIM) publicados por el NCCLS.<sup>15</sup> (Ver Anexo 3)

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar la flora bacteriana en cultivos de bilis de pacientes sometidos a cirugía biliar.

### 6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar género y especie de las bacterias aisladas con más frecuencia en muestras de bilis de pacientes sometidos a cirugía biliar.
- Determinar la frecuencia de infección biliar en muestras de bilis de pacientes sometidos a colecistectomía
- Analizar la distribución de las bacterias aisladas, según su afinidad a coloración Gram.
- Determinar el perfil de Sensibilidad y Resistencia a antimicrobianos de las especies aisladas, con la prueba de difusión de Bauer- Kirby.
- Analizar si la infección biliar, tiene efecto sobre la edad y/o sexo de los pacientes objetos de estudio.

## 7. DISEÑO METODOLÓGICO

### 7.1. TIPO DE ESTUDIO

El estudio realizado es de tipo **experimental, descriptivo y de corte transversal**. Se determinó frecuencia de infección biliar, se identificó el tipo o tipos de bacterias más frecuentes en la bilis, su espectro de sensibilidad a los antibióticos en pacientes sometidos a colecistectomía en el Servicio de Cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano-Japonés, que ingresaron con diferentes diagnósticos de patología biliar, durante Julio de 2006 a Marzo de 2007.

#### 7.1.1. ANALISIS ESTADISTICO

En base a los datos obtenidos en el Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés, se realizó el análisis de los resultados. Se utilizó estadística descriptiva, con cálculo de medidas de tendencia central y dispersión. Los datos fueron analizados utilizando el programa Stata® 8.0.

Para evaluar si los resultados obtenidos difieren entre si de manera significativa respecto a sus medias, utilizamos el *t de student*, con un nivel de confianza de 0.05 (el 0.05 significa 95% de que los grupos en realidad difieran significativamente entre si y 5% de posibilidad de error).

### 7.2. POBLACIÓN EN ESTUDIO

Las unidades de análisis del presente estudio fueron 52 muestras de bilis vesicular, obtenidas de pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 85 años, hospitalizados en el Servicio de Cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano-Japonés, con diferentes diagnósticos de patología biliar sometidos a colecistectomía, durante Julio de 2006 a Marzo de 2007.

### **7.2.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Se tomaron muestras de bilis de fondo vesicular de las vesículas de los pacientes sometidos a colecistectomía, por lo tanto no se solicitó consentimiento firmado.

El resultado obtenido fue reportado de inmediato al Servicio de Cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés.

### **7.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Para el presente estudio fueron incluidos todos aquellos pacientes sometidos a colecistectomía, en el servicio de cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, de los cuales se pudo obtener una muestra de bilis de fondo vesicular, durante el periodo de Julio de 2006 a Marzo de 2007

### **7.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Pacientes colecistectomizados, en el servicio de cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, de los cuales fueron abiertas las vesículas en quirófano y mantenidas en formol para enviarlas directamente al servicio de patología.

Pacientes colecistectomizados, en el servicio de cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, en los que se encontró que el lito ocupaba toda la vesícula o gran parte de ella, donde era muy difícil recolectar bilis de fondo vesicular.



### **7.3. DESCRIPCIÓN DE AMBIENTES DE TRABAJO**

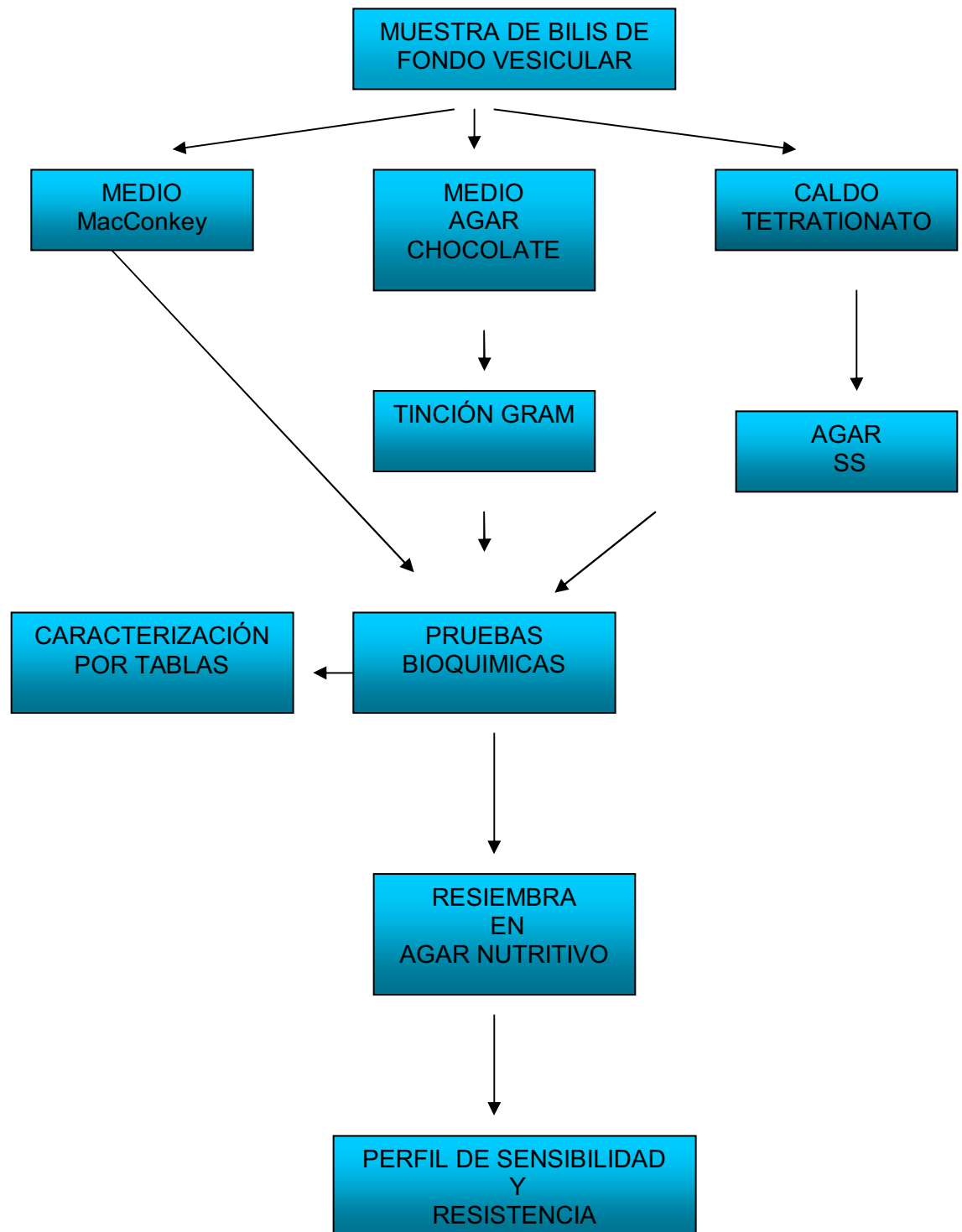
El procesamiento de las muestras se realizó en instalaciones del área de Bacteriología del Laboratorio Clínico del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, ubicado en la zona de Miraflores en la Avenida Saavedra dentro de los predios del Hospital General.

Las muestras se recolectaron durante el periodo que abarca el mes de Julio de 2006 hasta fines de Marzo de 2007.

Con la colaboración del personal del servicio de cirugía del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés, se pudo obtener algunas vesículas intactas para proceder personalmente a la obtención de la muestra de bilis.

## 7.4. INTERVENCIÓN

### 7.4.1. MODELO TEORICO



## 7.4.2. PROCEDIMIENTOS

### 1ª. Sesión.

- Se preparó todo el material a ser usado: Reactivos de Kovac's,  $\alpha$ -naftol, hidróxido de potasio, solución de lugol, caldo tetrionato, agar Mac Conkey, agar chocolate y SS. También se preparó (TSI, CITRATO, SIM, LIA, MIO, VP y UREA)

### 2ª. Sesión.

- Inmediatamente después de practicada la colecistectomía (laparoscópica y convencional) por el servicio de cirugía, recolectamos las muestras de bilis vesicular mediante punción de la pieza quirúrgica (vesícula), utilizando jeringa estéril de 10 cc con aguja N° 21.
- De forma inmediata se enviaron las muestras contenidas en la jeringa estéril a la sección de bacteriología del laboratorio clínico del Instituto de Gastroenterología Boliviano-Japonés, para ser procesadas en los siguientes 30 minutos.
- Las muestras de bilis fueron sembradas en placas de agar Mac Conkey, agar Chocolate, Caldo Tetrionato con 3 gotas de lugol, y se las dejó en proceso de incubación a 37°C por 18-24 h. para aislamiento primario.

### 3ª Sesión

- Pasadas las 24 horas se procedió a la siembra del caldo Tetrionato al medio selectivo (agar SS) para nuevamente llevar a incubación a 37°C por 18-24 h.

#### **4ª Sesión**

- Pasado el periodo de incubación en los medios de aislamiento (agar MacConkey y agar SS); luego de la observación del aspecto y características de las posibles colonias sospechosas, elegimos diferentes colonias aisladas para realizar pruebas bioquímicas: (KIA, SIM, LIA, MIO, CITRATO, VP y UREA) y llevarlas a incubación a 37°C por 18-24h.

#### **5ª Sesión**

- Luego de estas 24 h. por medio de tablas se procedió a la caracterización de los microorganismos y dependiendo de esto se hizo la resiembra de los microorganismos sospechosos del medio TSI en agar nutritivo y se llevo a incubación a 37°C por 18-24h , para realizar al día siguiente la prueba de Sensibilidad por difusión con discos de Bauer-Kirby.

#### **6ª Sesión**

- Se preparó ese mismo día agar Mueller-Hinton dependiendo de la cantidad de microorganismos patógenos encontrados y se llevo a atemperar el medio, una vez atemperado el medio procedimos a la realización del antibiograma correspondiente utilizando la prueba de Sensibilidad por difusión con discos de Bauer-Kirby bajo normas de la National Committe for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). (Anexo 3)

#### **7ª Sesión**

- Al día siguiente con la ayuda de una regla se midieron los halos presentados y por medio de tablas de la NCCLS (Anexo 4 y 4a) se reportaron los resultados de Sensibilidad y Resistencia. Y como paso final se procedió a redactar los resultados, discusión y conclusiones.

### 7.4.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

#### 7.4.3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

- **Autoclave** (121°C) SAKURA (NEOCLAVE ASV-3022) JICA
- **Balanza Analítica** SARTORIUS (MC 1 Laboratory LC 220 S) JICA
- **Incubadora** /27°C – 37°C) EYELA (SOFT INCUBATOR SLI-1000ND) Y SAKURA TOKYO JAPAN (INCUBATOR IF-3B)JICA
- **Refrigerador** (4°C) TOSHIBA (SF 491 J 3) e HITACHI (r-643 M) JICA
- Agujas esteriles N° 21G
- Placas petri estériles
- Pipetas de vidrio (5,10,20ml)
- Matraz erlenmeyer (500 ml)
- Probetas ( 10 – 500 ml)
- Propipetas
- Pinza estéril
- Hisopos estériles
- Mechero
- Aguja bacteriológica
- Asa bacteriológica
- Tubos con tapa rosca
- Tubos de ensayo
- Portaobjetos
- Gradillas

#### 7.4.3.2. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo TETRACIONATO
- Agar MacConkey
- Agar SS
- Agar Chocolate
- Agar NUTRITIVO
- Agar MULLER – HINTON
- TSI
- CITRATO
- SIM
- LIA
- MIO
- VP
- UREA

#### 7.4.3.3. REACTIVOS

- Agua destilada
- Solución Fisiológica
- Escala 0,5 Mac Farland
- Solución de Lugol
- Solución de hidróxido de potasio al 40%
- Solución de  $\alpha$ -naftol
- Reactivo de Kovac's

#### 7.4.3.4. PANEL DE ANTIBIOTICOS

- |                                       |               |         |                   |
|---------------------------------------|---------------|---------|-------------------|
| • Amoxiclavulanico                    | (AMC)         | 10 ug.  | <i>Repycotec</i>  |
| • Ceftazidime                         | (CAZ)         | 30 ug.  | <i>Repycotec</i>  |
| • Ceftriaxona                         | (CRO)         | 30 ug   | <i>Repycotec</i>  |
| • Cloranfenicol                       | (CHL)         | 30 ug.  | <i>Repycotec</i>  |
| • Ciprofloxacina                      | (CIP)         | 5 ug.   | <i>Bioanalyse</i> |
| • Clindamicina                        | (CLI)         | 2 ug.   | <i>Repycotec.</i> |
| • Eritromicina                        | (ERY)         | 15 ug.  | <i>Repycotec.</i> |
| • Gentamicina                         | (GEN)         | 10 ug.  | <i>Bioanalyse</i> |
| • Imipenem                            | (IPM)         | 10 ug.  | <i>BBL</i>        |
| • Penicilina                          | (PEN)         | 10 u.i. | <i>Repycotec</i>  |
| • Sulfamethoxazole-Trimethoprim (SXT) | 23.75/1.25ug) |         | <i>BBL</i>        |
| • Vancomicina                         | (VAN)         | 30 ug   | <i>Repycotec.</i> |

## 7.5. DEFINICIÓN DE PRESENCIA DE FLORA BACTERIANA EN CULTIVOS DE VESÍCULA BILIAR.

Partiendo con la bibliografía relacionada a trabajos bacteriológicos, que acaba con la premisa manejada de que la bilis es estéril,<sup>2</sup> definimos a la bacteribilia como positiva ante la presencia de bacterias en cultivos de vesícula biliar.

## 7.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.

La definición operacional de los indicadores utilizados para el estudio se observan en la tabla 2.

**Tabla 2. Definición operacional de los indicadores del estudio**

<b>Variable</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo</b>	<b>Escala</b>	<b>Instrumento de medición</b>
<b>Flora bacteriana (bacteribilia)</b>	Presencia de bacterias en cultivos de vesícula biliar	Dicotómica	Positiva Negativa	Diagnóstico bacteriológico
<b>Frecuencia de infección biliar</b>	Numero de cultivos positivos	Porcentual	Porcentual	Hoja de registro
<b>Frecuencia de Especies bacterianas</b>	Tipo de bacteria aislada	Nominal	Genero, Especie	Bioquimiotipia
<b>Sensibilidad a antibioticos</b>	Capacidad de respuesta del microorganismo ante antibioticos	Nominal	Susceptible Intermedio Resistente	Antibiograma (Bauer-Kirby/NCCLS)

## 8. RESULTADOS

### 8.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se realizó la descripción de la población total de los pacientes que ingresaron a cirugía biliar realizada en el Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés con diferentes diagnósticos de patología biliar.

### 8.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Se consideraron dentro de estas, la distribución de la población de acuerdo a grupo etáreo, género, diagnóstico bacteriológico y finalmente perfil de sensibilidad y resistencia.

#### 8.2.1. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN GRUPO ETAREO

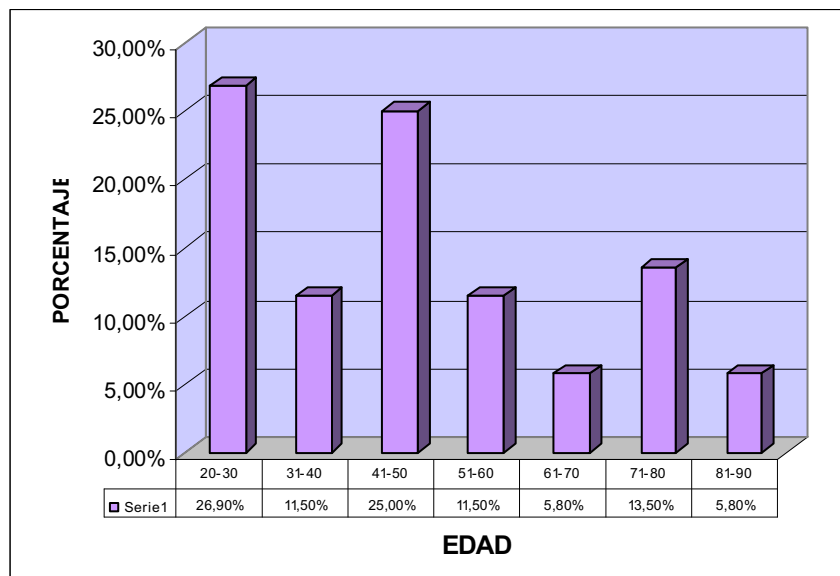


Fig. 12. Distribución de pacientes según grupo etáreo



**Tabla 3. Distribución de los pacientes sometidos a cirugía biliar según grupos etarios.**

<b>Edad (años)</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Porcentajes (%)</b>
20-30	14	26.9 %
31-40	6	11.5 %
41-50	13	25.0 %
51-60	6	11.5 %
61-70	3	5.8 %
71-80	7	13.5 %
81-90	3	5.8 %
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>100 %</b>

En la Tabla 3. se observa la distribución según grupo etáreo de los pacientes incluidos en el estudio. Entre 20 y 30 años hubo 14 pacientes que representan el mayor porcentaje (26.9 %), entre 41 y 50 años hubo 13 pacientes (25.0 %), luego se indican de manera sucesiva los rangos etáreos de 31 a 40 años con 6 pacientes (11.5%), de igual manera con 6 pacientes de 51 a 60 años, y en los grupos erarios de 61 a 70 y 81 a 90 años hubo 3 pacientes (5.8%) en cada uno, respectivamente.

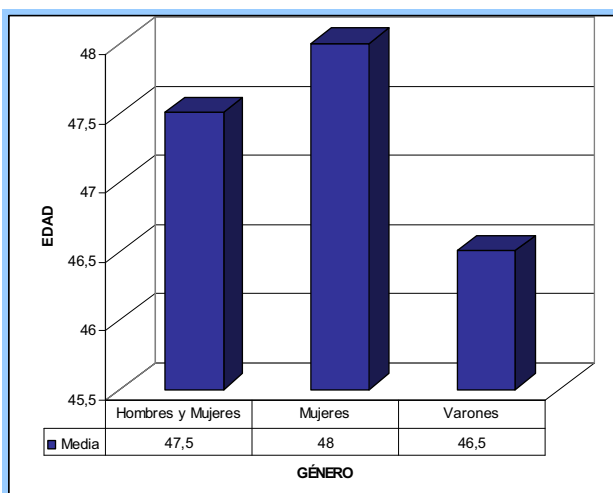


Fig. 12. Distribución de pacientes según promedio de edad de hombres y mujeres.

**Tabla 4. Promedios de edad de hombres y mujeres**

Edad (años)	Media	Desviación estándar	Rango	Población
<b>Hombres y Mujeres</b>	47,5	19,1	20 - 85	52
<b>Mujeres</b>	48,0	21,9	20 - 85	33
<b>Varones</b>	46,5	13,4	23 - 80	19

La variable edad fue registrada en el total de la población de estudio (52 pacientes) las edades mínima y máxima fueron de 20 y 85 años respectivamente, el promedio de edad fue 47,5 años, con una desviación estándar de 19,1. Mediante la prueba de t de student se realizó la comparación de los promedios de edad entre hombres y mujeres, donde se evidenció que ambos promedios son similares ya que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,39$ ), como se observa en la Tabla 4.

## 8.2.2. GÉNERO DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

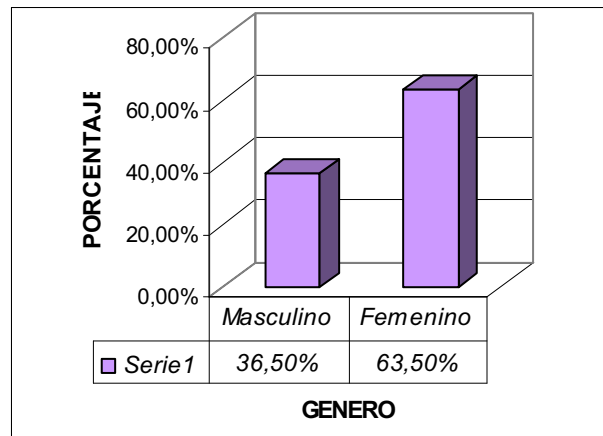


Fig. 12. Distribución de pacientes colecistectomizados según género.

Tabla 5. Pacientes colecistectomizados según género.

Género	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	19	36.5 %
Femenino	33	63.5 %
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>100,00%</b>

Como podemos observar en la Tabla 5, la afectación de los pacientes según su sexo demostró que 33 (63.5%) de los pacientes pertenecía al sexo femenino y en menor cantidad 19 (39.5%) de los pacientes pertenecían al sexo masculino.

### 8.2.3. DISTRIBUCIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS AISLADOS.

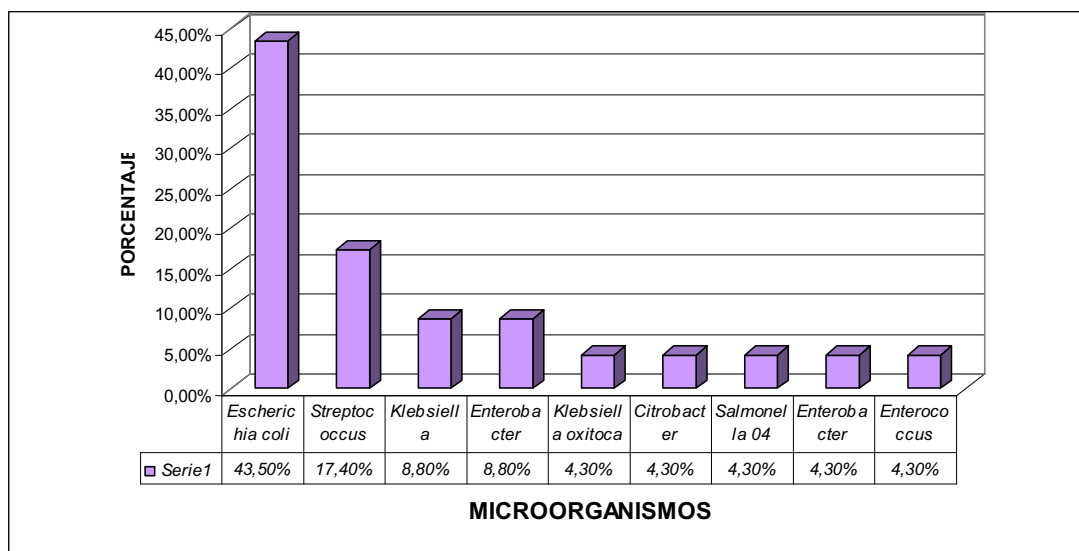


Fig. 12. Distribución de la frecuencia de microorganismos aislados.

**Tabla 6. Distribución de la frecuencia de los microorganismos aislados en muestras de bilis en pacientes colecistectomizados.**

Microorganismos	Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>Escherichia coli</i>	10	43.5 (%)
<i>Streptococcus viridans</i>	4	17.4 (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	8.8 (%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	8.8 (%)
<i>Klebsiella oxitoca</i>	1	4.3 (%)
<i>Citrobacter freundii</i>	1	4.3 (%)
<i>Salmonella 0<sub>4</sub></i>	1	4.3 (%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	4.3 (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	4.3 (%)
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>100 (%)</b>

La distribución por resultados bacteriológicos de los cultivos mostró que hubo 23 cultivos positivos (44 %) y hubo 29 cultivos negativos (56 %).

Los microorganismos aislados según su frecuencia, se pueden observar en la Tabla 6, *Escherichia coli* se aisló en 10 (43.5 %) de los cultivos, *Streptococcus viridans* fue aislado en 4 (17.4 %), *Klebsiella pneumoniae* al igual que *Enterobacter cloacae* fueron aislados en 2 (8.8%) cultivos y luego 5 tipos de bacterias que fueron aisladas 1 (4.3%) vez cada una.

Los microorganismos aislados se valoraron según su afinidad a la coloración de Gram. De los 23 microorganismos encontrados 18 (78.3%) fueron bacilos Gram negativos y las bacterias Gram positivas fueron aisladas en 5 (21.7%) de los cultivos positivos.

#### **8.2.4. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE SENSIBILIDAD DE Bauer Kirby, DE LAS ESPECIES AISLADAS.**

La distribución de los microorganismos aislados y su sensibilidad antibiótica reportada se puede observar en las tablas 7-15. Las claves de abreviaciones de los antimicrobianos son las siguientes: AMC = Amoxiclavulanico, CAZ = ceftazidima, CHL = cloranfenicol, CIP = ciprofloxacino, CLI = clindamicina, CRO= ceftriaxona, ERY = eritromicina, GEN = gentamicina, IPM = imipenem, PEN = penicilina, SXT = trimetoprim-sulfametoxazol, VAN = vancomicina.

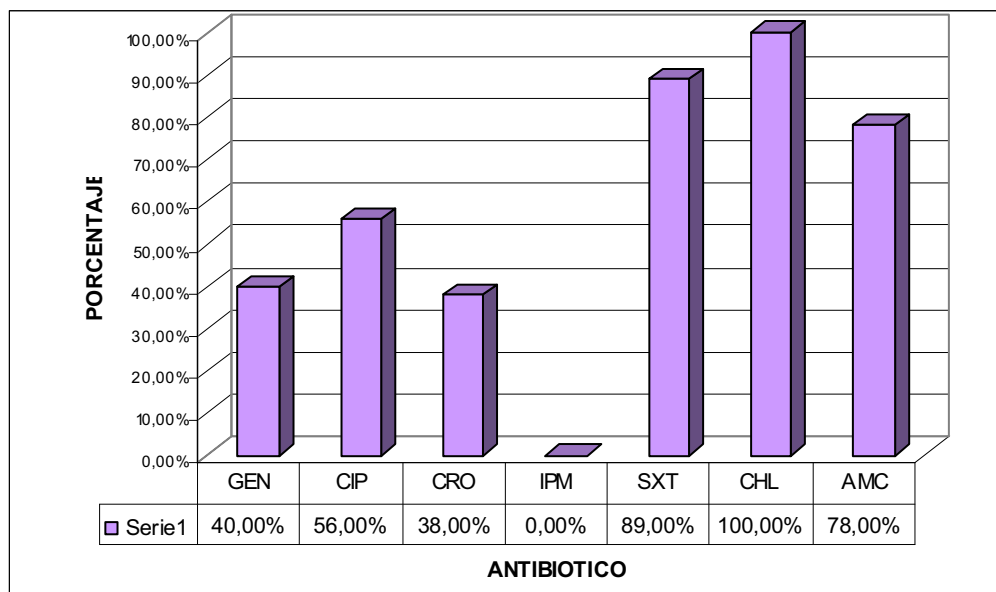


Fig. 12. Porcentaje de resistencia de cepas de *Escherichia coli* por antibiótico.

Tabla 7. Porcentaje de resistencia de cepas de *Escherichia coli* por antibiótico.

GEN		CIP		CRO		IPM		SXT		CHL		AMC	
n	R %	n	R %	n	R %	n	R %	n	R %	n	R %	n	R %
5	40	9	56	8	38	10	0	9	89	3	100	9	78

En la Tabla 7, podemos observar que en su totalidad *Escherichia coli* presento sensibilidad a **Imipenem** del grupo cabarpenémico. Con menor porcentaje consideramos la sensibilidad a Gentamicina (aminoglucósido) y Ceftriaxona, cefalosporina de tercera generación.

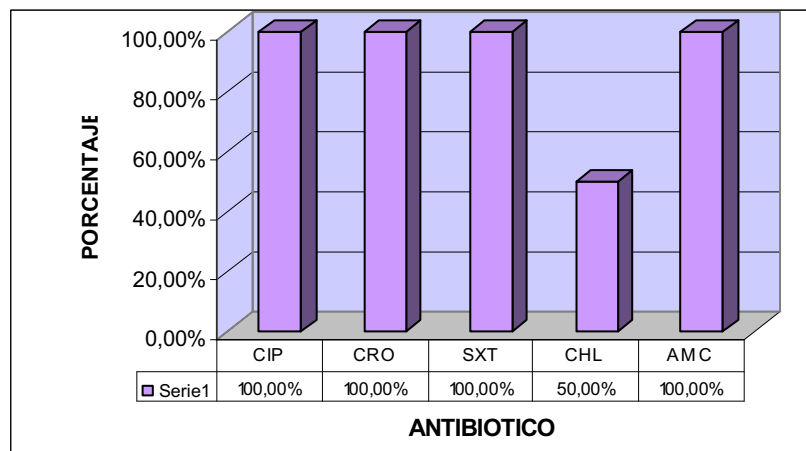


Fig. 13. Porcentaje de resistencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* por antibiótico.

Tabla 8. Porcentaje de resistencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* por antibiótico.

CIP		CRO		SXT		CHL		AMC	
n	R %	n	R %	N	R %	n	R %	N	R %
2	100	2	100	2	100	2	50	2	100

En el caso de las cepas de *Klebsiella* se observa en las Tablas 7-8 que la mayoría tuvo el mismo patrón de resistencia antibiótica, presentado únicamente sensibilidad en 50% a **Cloranfenicol** en el caso de *Klebsiella pneumoniae*.

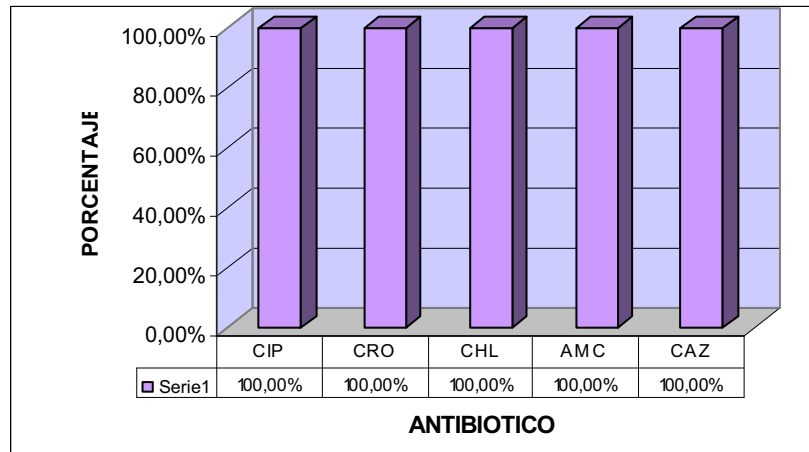


Fig. 14. Porcentaje de resistencia de cepas de *Klebsiella oxitoca* por antibiótico.

Tabla 9. Porcentaje de resistencia de cepas de *Klebsiella oxitoca* por antibiótico.

CIP		CRO		CHL		AMC		CAZ	
n	R %	n	R %	N	R %	n	R %	n	R %
1	100	1	100	1	100	1	100	1	100

En el caso de las cepas de *Klebsiella* se observa en las Tablas 7-8 que la mayoría tuvo el mismo patrón de resistencia antibiótica, presentado únicamente sensibilidad en 50% a **Cloranfenicol** en el caso de *Klebsiella pneumoniae*.



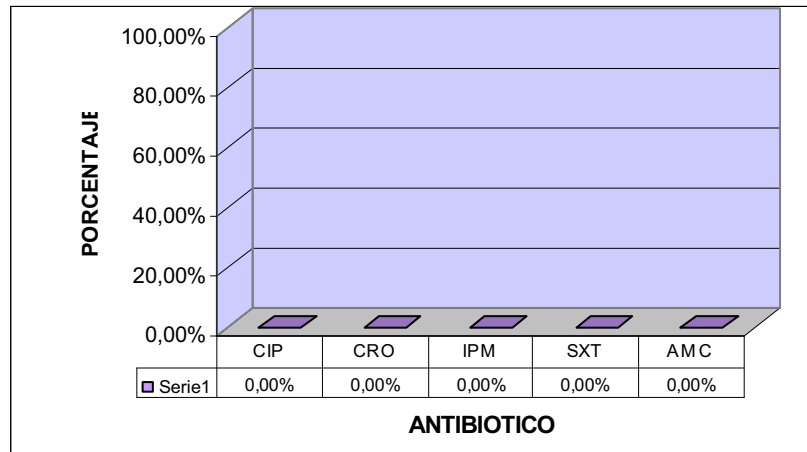


Fig. 15. Porcentaje de resistencia de cepas de *Salmonella O4* por antibiótico.

Tabla 10. Porcentaje de resistencia de cepas de *Salmonella O4* por antibiótico.

CIP		CRO		IPM		SXT		AMC	
n	R %	n	R %	N	R %	n	R %	n	R %
1	0	1	0	1	0	1	0	1	0

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de la única especie de *Salmonella* que aislamos, nos indica un alto grado de sensibilidad a los diferentes antibióticos probados, como podemos observar en la Tabla 10.

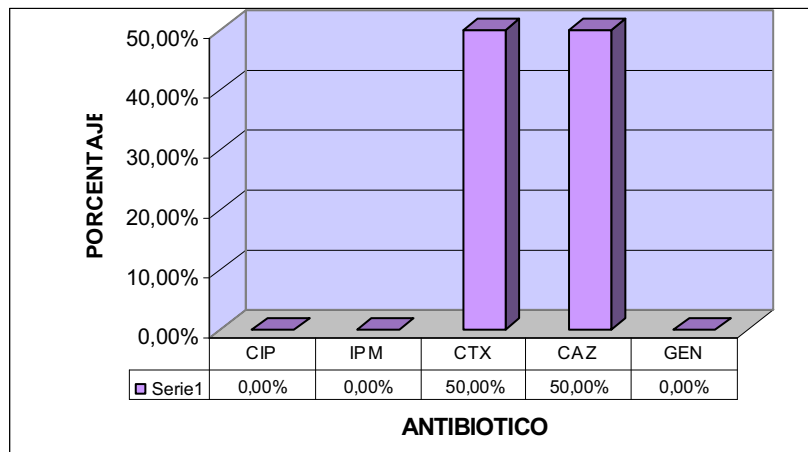


Fig. 16. Porcentaje de resistencia de cepas de *Enterobacter cloacae* por antibiótico.

Tabla 11. Porcentaje de resistencia de cepas de *Enterobacter cloacae* por antibiótico.

CIP		IPM		CTX		CAZ		GEN	
n	R %	n	R %	N	R %	n	R %	n	R %
2	0	2	0	2	50	2	50	2	0

Se puede observar en la Tabla 11, que las cepas de *Enterobacter cloacae* muestran altas tasas de susceptibilidad frente a Ciprofloxacina, imipenem, y gentamicina.

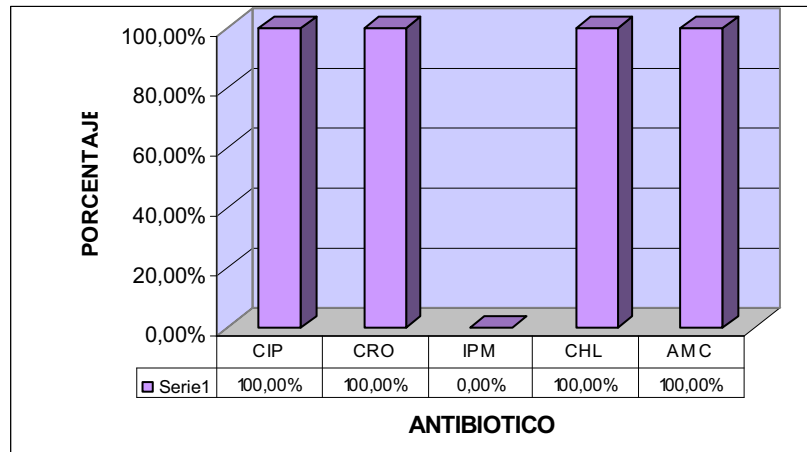


Fig. 17. Porcentaje de resistencia de cepas de *Enterobacter aerogenes* por antibiótico.

Tabla 12. Porcentaje de resistencia de cepas de *Enterobacter aerogenes* por antibiótico.

CIP		CRO		IPM		CHL		AMC	
n	R %	n	R %	N	R %	n	R %	n	R %
1	100	1	100	1	0	1	100	1	100

La cepa de *Enterobacter aerogenes* mostró resistencia en la mayoría de los antibióticos probados como fue el caso de la ciprofloxacina, ceftriaxona, cloranfenicol y amoxiclavulanico. Frente a imipenem como en otros casos de enterobacterias se observa un 100% de sensibilidad.

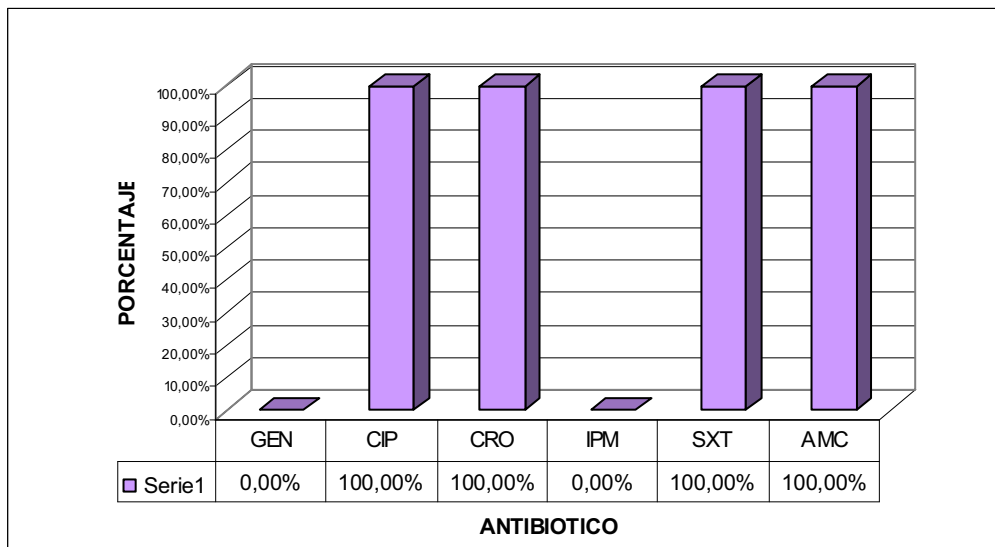


Fig. 18. Porcentaje de resistencia de cepas de *Citrobacter freundii* por antibiótico.

Tabla 13. Porcentaje de resistencia de cepas de *Citrobacter freundii* por antibiótico.

GEN		CIP		CRO		IPM		SXT		AMC	
n	R %	n	R %	n	R %	n	R %	n	R %	n	R %
1	0	1	100	1	100	1	0	1	100	1	100

Aminoglucosidos como la gentamicina y carbapenémicos como imipenem presentaron porcentajes elevados de actividad frente a la cepa de *Citrobacter freundii*

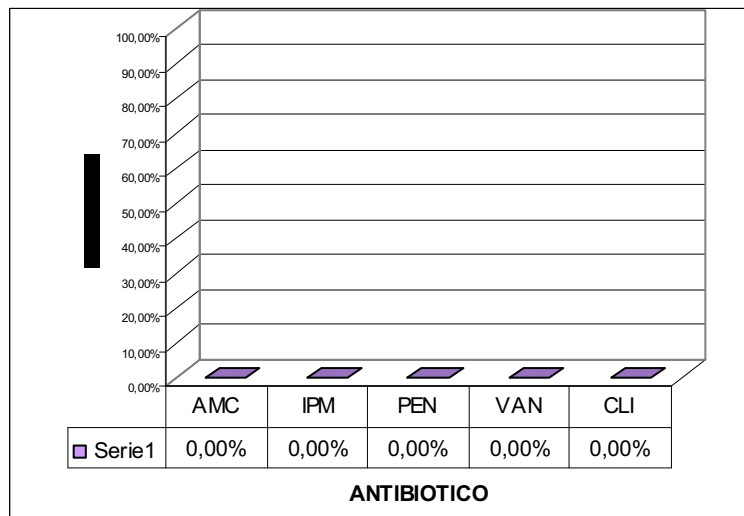


Fig. 19. Porcentaje de resistencia de cepas de *Enterococcus faecalis* por antibiótico.

Tabla 14. Porcentaje de resistencia de cepas de *Enterococcus faecalis* por antibiótico.

AMC		IPM		PEN		VAN		CLI	
N	R %	n	R %	N	R %	n	R %	N	R %
1	0	1	0	1	0	1	0	1	0

La sensibilidad para los casos Gram positivos aislados fue hacia penicilina, vancomicina y clindamicina, como se puede observar en las Tablas 14 y 15.

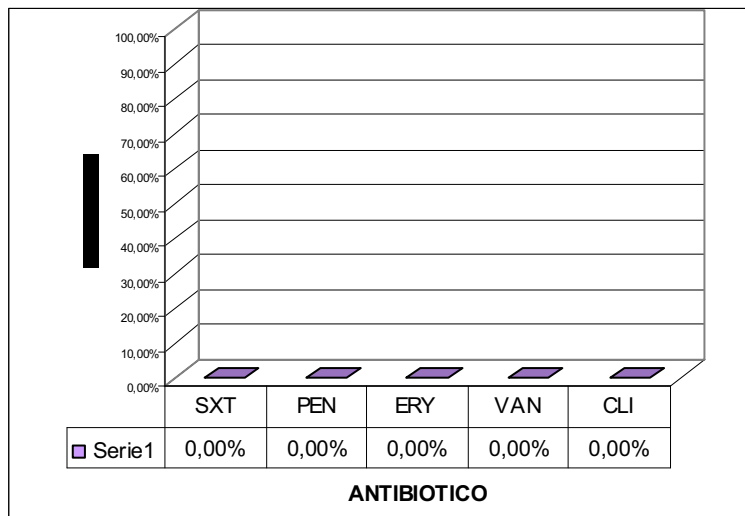


Fig. 20. Porcentaje de resistencia de cepas de *Streptococcus viridans* por antibiótico.

Tabla 15. Porcentaje de resistencia de cepas de *Streptococcus viridans* por antibiótico.

SXT		PEN		ERY		VAN		CLI	
N	R %	n	R %	N	R %	n	R %	n	R %
4	0	4	0	4	0	4	0	4	0

La sensibilidad para los casos Gram positivos aislados fue hacia penicilina, vancomicina y clindamicina, como se puede observar en las Tablas 14 y 15.

## 9. DISCUSIÓN

La distribución por edad de los pacientes incluidos en el presente estudio se analiza en la Tabla 4. Se puede observar cómo el 52% de los pacientes objeto de estudio, se encuentran en los grupos de edades entre 20 y 30 con un 27% y entre 41 y 50 con un porcentaje de 25%, es decir segunda y cuarta décadas de la vida.

Podríamos relacionar estos grupos etáreos con la patología biliar no aguda litiásica debido a la multiparidad, así como a la ganancia asociada de peso corporal.

Al analizar la distribución de los pacientes según sexo ,en el presente estudio, observamos que no se encontró una significativa relación estadística intersexo, a pesar de que la mayoría de nuestros pacientes pertenecen al sexo femenino, que en nuestra serie fue de 33 mujeres que representan el 63.5 %. Comparando este hecho con otras investigaciones, la relación estadística intersexo que existe en las publicaciones de otros países es de 5:1 con un margen de significancia mas notorio.

Dentro de los factores que condicionan la mayor frecuencia de aparición de esta patología en el sexo femenino tenemos la multiparidad, hecho que ocurre en nuestro medio, asimismo, debido a que la población que recurre a nuestros hospitales presenta algún grado de obesidad y el metabolismo lipídico esta firmemente relacionado con el metabolismo biliar.

Al analizar la distribución según los resultados obtenidos en los cultivos de bilis vesicular, era de esperarse una frecuencia relativamente baja de crecimiento bacteriano en los medios de cultivos, ya que se afirma tradicionalmente que la bilis es estéril, sin embargo nuestro estudio desvirtúa esta aseveración, ya que se reportan un total de 29 (44%) casos de cultivos

positivos, resultado obviamente muy elevado si se compara con la poca información actualizada disponible dirigida al estudio de este tema. Estos resultados pueden deberse, al hecho de que estos pacientes tienen habitualmente muchos años padeciendo su patología, lo cual ha producido de algún modo algún grado de disquinesia de las vías biliares externas y o a la obstrucción total o parcial del conducto cístico por cálculos vesiculares.

Al analizar la Tabla 6, donde se agrupan los microorganismos aislados según su frecuencia, se observa que los microorganismos que más crecieron y fueron aislados, fueron *Escherichia coli* en 10 (43.5%) cultivos y *Streptococcus viridans* en 4 (17.4%), seguida de cultivo positivo para *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter Cloacae* (8.8%) en 2 ocasiones; crecieron además especies de *Klebsiella oxitoca*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella O<sub>4</sub>*, *Enterobacter aerógenes* y *Enterococcus faecalis* solo en una ocasión, todos los anteriormente nombrados del género aerobias.

Al analizar la distribución de los microorganismos según su afinidad a la coloración Gram; podemos concluir que el 78.3% de las bacterias aisladas fueron Gram negativas y un 21.7% de las bacterias aisladas Gram positivas.

La distribución de los microorganismos y su sensibilidad antibiótica reportada puede verse en las Tablas 7 a 15, donde se puede apreciar que los microorganismos bacilares Gram negativos se informaron con sensibilidad a antimicrobianos como carbapenémicos (imipenem), aminoglicosidos (Gentamicina), así como también a los antibióticos tipo quinolonas fluoradas (ciprofloxacina).y cierta sensibilidad al Cloranfenicol en el caso de *Klebsiella pneumoniae*.

Se ha reportado de manera creciente resistencia de estas enterobacterias bacilares a un número cada vez mayor de antibióticos, por lo cual deben ser incorporados con cierta frecuencia nuevos antibióticos.



Los microorganismos cocos Gram positivos fueron sensible a los antibióticos del tipo de penicilinas, glucopeptidos como la vancomicina y lincosamidas como la clindamicina.

Estos resultados tienen similitud a otras investigaciones, pero presentan diferencias mas notorias cuando se comparan con investigaciones internacionales, quienes presentan un mayor porcentaje de resistencia en su medio y tendencia manifiesta de empeorar su situación.

## 10. CONCLUSIONES

Los pacientes entre 20 y 31, 40 y 51 años de edad, y los del sexo femenino, fueron los mas afectados por la patología biliar.

La positividad de crecimiento para cultivos de bilis vesicular fue alta, ya que se alcanzó un 44% del número total de muestras, siendo las enterobacterias aerobias: bacilos Gram negativos (78,3%) las mas frecuentemente encontradas. Con estos resultados podemos desvirtuar que la bilis es estéril.

De los bacilos Gram negativos, los mas aislados fueron *Escherichia coli* (43.5%) y *Klebsiella pneumoniae* (8.8%). Se estableció la sensibilidad de los bacilos Gram negativos a los antibióticos del grupo carbapenemicos, aminoglicosidos y quinolonas y en el caso de enterococos y streptococos a la penicilina, vancomicina y clindamicina.

La información obtenida y transmitida en el presente estudio le permite al clinico tener una guía que le ayude a decidir una terapia antibiótica adecuada, en los casos asociados a patología biliar no aguda, litiasica o no litiásica. Puesto que al resolver este problema nos permitimos recomendar al cirujano el antibiótico con mayores posibilidades de resultar eficaz en sus propuestas de políticas antibióticas. Al mismo tiempo, la posibilidad de vigilar patrones de resistencia y la incidencia de patógenos bacterianos permite a los hospitales mantenerse actualizado en política de manejo de antibióticos.

## 11. RECOMENDACIONES

Sabiendo que la resistencia antibiótica es un problema de salud pública creciente que se asocia con un aumento de la morbimortalidad de los pacientes, nos permitimos considerar como una necesidad la profilaxis antibiótica aplicada en la colecistectomía.

Es por esto que recomendamos a las instituciones pertinentes realizar estudios de flora predominante, determinar su perfil de sensibilidad y resistencia. Hacer pública la información recolectada para que con toda esa información se haga posible la vigilancia de patrones de resistencia y la incidencia de patógenos bacterianos, lo cual permite a los hospitales mantenerse actualizados en política de manejo de antibióticos.

En base a esto podrán también elaborar su esquemas profilácticos, recomendar al cirujano el antibiótico con mayores posibilidades de resultar eficaz en sus propuestas de políticas antibióticas.

Debería realizarse profilaxis antibiótica y cultivos bacterianos en todos los pacientes que acuden a los centros hospitalarios a ser sometidos a cirugía de vesícula biliar, para evitar la prolongación de su estancia hospitalaria y el consecuente perjuicio económico.

Tomar en cuenta que desde la introducción de la profilaxis antibiótica en 1960, han disminuido marcadamente la incidencia de complicaciones infecciosas en cirugías del tracto biliar y por otro lado la cirugía laparoscópica, es el método más utilizado en la actualidad para colecistectomía electiva, debido al mínimo dolor postoperatorio, corta estadía hospitalaria, reanudación más rápida de la ingesta de alimentos y reinserción laboral, y una considerable disminución en las complicaciones sépticas.

Un esquema presentado compara grupos de pacientes sometidos a colecistectomía laparoscópica electiva (excluyendo aquellos con colecistitis

aguda activa), en los cuales se le administra 30 minutos antes de la anestesia 2g de cefotaxima (IV), o 1g de cefotetam (IV), o 1g de cefazolina (IV), o cefuroxima 1,5g (IV); y al segundo grupo solución fisiológica isotónica como placebo. El porcentaje total de complicaciones infecciosas fueron entre 1,8 y 2,4% y 0,4% de infecciones en el sitio quirúrgico en los grupos que reciben profilaxis, diferencia no significativa estadísticamente con respecto a los grupos tratados con placebo. Los microorganismos aislados más frecuentemente fueron *Escherichia coli* (37%) seguido de *Klebsiella* (27,5%).

## 12. BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup> RIVERA M. *Nocardia*. Rev mex Microbiol. 1997;35:189-191
- <sup>2</sup> BALOWS , HANSLER, HERMANN, ISENBERG, SHADONNY. **Manual of clinical microbiology**. Washington D.C., 1999; 451-456
- <sup>3</sup> BEAMAN BL *Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Oerskovia* and other aerobic actinomycetes of medical importance. 1996;69-112-117.
- <sup>4</sup> TAMAYO y DOCOBO **Profilaxis antimicrobiana en cirugía digestiva**. Departamento de cirugía general y digestiva. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.
- <sup>5</sup> Sociedad Boliviana de Cirugía  
Ultima actualización Diciembre 2003, cyberbago@bago.com.bo  
Copyright © 2001 www.bago.com.bo
- <sup>6</sup> FIGUEROA **Cirugía de la vía biliar**. Bolivia Hospital San Juan de Dios 1969;16:328-32.
- <sup>7</sup> NEERCELLES, SEPULVEDA, PINTO, GIGLIO, CAMPOS. **Estudio bacteriológico de la bilis en pacientes operados por patología biliar** Rev Med Chile 1983;11:397-403
- <sup>8</sup> LEVINNE, FERRECCIO, BLACK, GERMANIER, AND TYPHOID COMMITTEE. **Precise estimation of the number of chronic carriers of Salmonella typhi** I, Santiago de Chile. J Infect Dis 1982; 146:724-6
- <sup>9</sup> HERNANDEZ, ARAUJO y OSORIO. **Identification of bacterial flora in bile cultures of patients subjected biliar**. Rev. Kasmera 2002; 30: 63-2002
- <sup>10</sup> ROBBINS. **Patología estructural y funcional**. 6ª ed.
- <sup>11</sup> CAREY, LA MONT. **The enteropatic circulación**. 2ª ed. New York. 1988
- <sup>12</sup> CAREY, O'DONOVAN. **Gallstone disease: current concepts on the epidemiology, patogénesis and management**. 5ª ed. New York –U.S.A. Editorial McGraw-Hill. 1984, (139-168)
- <sup>13</sup> CRAWFORD. **Cellular and molecular biology of the inflamed liver**. Curr Opin Gastroenterol 13:175-185. 1997.
- <sup>14</sup> SOLIS Y MUÑOZ, **Colecistitis Aguda**. 37: 371-372 (pdf)

---

<sup>15</sup> GARAU. **IX Peritonitis y otras infecciones intraabdomianles**. Protocolos Clínicos SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica)

<sup>16</sup>KONEMAN, ALLEN, JANDA, SCHRECKENBERG y WINN. **Diagnostico microbiológico**. 5ª. ed. Buenos Aires – Argentina. Editorial Médica Panamericana, 1999.

# ANEXOS

## *Anexo 2.* PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

### *Anexo 2a.* CALDO BASE CON TETRATIONATO

Marca: Becton Dickinson – Difco

El caldo base con Tetrionato y solución yodo-yodurada, se emplea como un medio de enriquecimiento selectivo para aislar la *Salmonella* de heces fecales, orina, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Las sales del medio y el yodo inhiben muchas otras bacterias.

#### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Peptona de carne.....	2.5
Peptona de caseína.....	2.5
Sales biliares.....	1.0
Carbonato de calcio.....	10.0
Tiosulfato de sodio.....	30.0

**Preparación.** Se suspenden 46 g. del polvo en un litro de agua destilada. Mézclase bien y caliéntese hasta su ebullición. Se enfría a 45° C o menos, y se agregan 20 mL. de una solución de yoduro. Mézclase y distribúyase en porciones de 10 mL. en tubos estériles. No se caliente después de haber agregado la solución de yoduro. El caldo base con Tetrionato se puede guardar durante algún tiempo, pero el medio ya completo se debe emplear el mismo día de su preparación.



### **Solución Yodo-Yodurada (Solución de Lugol)**

Yodo.....6 g.

Yoduro de potasio.....5 g.

Agua.....20 mL.

**Usos.** El caldo con Tetracionato ya completo, se emplea como medio de enriquecimiento para la investigación de bacilos entéricos del género Salmonella. Uno o dos gramos de heces fecales, productos alimenticios sospechosos u otros materiales, se mezclan con 10 mL del caldo y la mezcla se incuba durante 12 a 24 horas. A partir del cultivo enriquecimiento, posteriormente se siembran placas en estría con agar con Desoxicolato, agar de Mac-Conkey, agar con Verde Brillante, u otros medios diferenciales.

**Aspecto del medio preparado:** suspensión blanca lechosa.

## *Anexo 2b.* AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA

Marca: bioBrás

Código: 415330

Lote: 010

El agar para Salmonellas y Shigellas es un medio diferencial selectivo para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, especialmente los que pertenecen a los géneros *Shigella* y *Salmonella*.

### **Formula en gramos por litro de agua destilada:**

Extracto de carne de res.....	5.0
Peptona de caseína.....	2.5
Peptona de carne.....	2.5
Lactosa.....	10.0
Mezcla de sales biliares.....	8.5
Citrato de sodio.....	8.5
Tiosulfato de sodio.....	8.5
Citrato férrico amoniacal.....	1.0
Agar.....	13.5
Verde brillante.....	0.00033
Rojo neutro.....	0.025

pH final  $7.0 \pm 0.2$  a 25°C

**Preparación.** Se suspenden 60 g. del polvo en un litro de agua destilada. Déjese reposar durante 5 minutos y mézclase hasta que se obtenga una suspensión homogénea. Se calienta agitando de cuando en cuando y se hierve durante 1 minuto para disolverlo. No se esterilice en autoclave.

Enfríese de 45 a 50° C y distribúyase en cajas de Petri, empleando 20 mL. por placa. Se deja solidificar el medio parcialmente destapado. Identificar y almacenar a 2-8°C.

**Usos.** El agar para Salmonella y Shigella puede inocularse con heces fecales, torundas rectales, orina u otros materiales que se sospeche contengan bacilos entéricos. Se recomienda inocular al mismo tiempo una placa de un medio con sales biliares puras, con menor poder inhibitorio, tal como el agar con Desoxicolato o el agar Lactosado. Incúbese durante 18 a 24 horas. Las colonias de especies que no fermentan la lactosa son incoloras, en tanto que las de coliformes u otros organismos que si la fermentan son rosadas o rojas.

**Aspecto del medio preparado:** rosa anaranjado.

## *Anexo 2c. AGAR TSI*

### **AGAR CON TRES AZÚCARES Y HIERRO**

Marca: BBL

Lote: DODRZB

El agar con tres azúcares y hierro lo ideó Hajna para diferenciar los bacilos entéricos gramnegativos por su capacidad de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (SH<sub>2</sub>).

#### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Digesto pancreático de caseína.....	10.0
Digesto péptico de tejido animal.....	10.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Lactosa.....	10.0
Sacarosa.....	10.0
Glucosa (Dextrosa).....	1.0
Sulfato férrico amónico.....	0.2
Tiosulfato de sodio.....	0.2
Rojo fenol.....	0.025
Agar.....	13.0

pH final 7.3 ± 0.2 a 25°C

**Preparación.** Se suspenden 59.4 g. del polvo en un litro de agua destilada. Mézclase bien y caliéntese agitando de vez en cuando. Hiérvase durante 1 o 2 minutos para disolver. Distribúyase en tubos de ensayo, llenándolos hasta su tercera parte. Esterilícese a no más de 118°C durante 15 a 17 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada, de tal manera que produzcan fondos profundos. Identificar y almacenar a 2-8 °C.

**Usos.** El agar TSI inclinado se debe inocular a partir de las colonias seleccionadas o de otras fuentes apropiadas. El cultivo se puede estriar en la porción inclinada y picar en el fondo profundo. Los cultivos se leen después de 18 a 48 horas de incubación.

La formación de ácido se indica por el cambio a amarillo del color del rojo de fenol. La sacarosa permite la separación de los proteus, como el vulgaris, de las Salmonellas. Los organismos que fermentan la lactosa y/o la sacarosa (coliformes, paracolon y Proteus) producen una superficie inclinada amarilla y por ello no se pueden confundir con otros.

Los miembros del género Salmonella que son positivos a la glucosa y negativos a la lactosa, producen el enrojecimiento de la superficie inclinada y la acidificación del fondo en los tubos de agar.

## **Interpretaciones.**

### **A) Utilización del hidrato de carbono.**

#### **1. Fermentación de la glucosa solamente.**

a) En pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo.

b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo.

1. Si también se produce gas SH<sub>2</sub> el precipitado negro puede ocultar la acidez.
2. Existe acidez en la capa profunda, que se registra como tal.

#### **2. Fermentación, tanto de la glucosa como de la lactosa.**

a) Pico de flauta. Reacción ácida. Color amarillo.

b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo.

1. El *Citrobacter freundii* produce también SH<sub>2</sub> además de fermentar ambos hidratos de carbono.
2. Sin embargo, existe una condición ácida en la capa profunda, que se registra como tal aunque no se observe.

**3. No fermentación de la glucosa ni de la lactosa (no entéricos)**

a) Pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo.

b) Capa profunda.

1. Organismo aeróbico. No se observa crecimiento. No hay cambio de color. El color es el mismo del tubo no inoculado. Color anaranjado rojizo. Si no hay seguridad, comparar con el tubo no inoculado.
2. Organismo facultativo. Reacción alcalina. Color rojo.

**4. No fermenta ni la glucosa ni la lactosa; bastante común.**

a) Pico de flauta.

1. Crecimiento solamente.
2. No hay cambio de color; el mismo del tubo no inoculado.

b) Capa profunda.

1. Crecimiento solamente.
2. No hay cambio de color; el mismo del tubo no inoculado.

**B) Producción de gas.**

**1. Aerogénico.**

a) Producción de gases: CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

b) Se manifiesta por lo siguiente:

1. Una sola burbuja de gas.
2. Burbujas en el medio.

3. Desdoblamiento del medio.
4. Desplazamiento completo del medio del fondo del tubo, dejando un área clara.
5. Ligera muesca del medio en el costado del tubo.

2. Anaerogénico: no hay producción de gases.

**C) Producción de ácido sulfhídrico (SH<sub>2</sub>):** la presencia de un precipitado negro (sulfuro ferroso) se manifiesta por:

1. Un color negro distribuido por toda la capa profunda y que enmascara la acidez; puede haber una ligera evidencia en el pico de flauta.
2. Un anillo negro cerca de la parte superior de la capa profunda.
3. Un precipitado negro distribuido por la capa profunda, pero que no oculta totalmente la acidez.

Buscar siempre las tres características: 1) fermentación de los hidratos de carbono; 2) producción de gases (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>), y 3) producción de SH<sub>2</sub>. Registrar todas las observaciones.

**Aspecto del medio preparado:** naranja rojizo.

## *Anexo 2d.* AGAR CITRATO DE SIMMONS

Marca: Becton Dickinson - Difco

El agar citratado de Simmons se usa para diferenciar las bacterias entéricas gramnegativas, basándose en la capacidad de los microorganismos de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad. Algunas bacterias pueden obtener energía de una forma que no es la fermentación de hidratos de carbono utilizando citrato como única fuente de carbono. La evaluación de esta característica es importante en la identificación de muchas Enterobacteriaceae. La utilización de citrato se detecta en un medio con citrato por la producción de productos intermedios alcalinos. El medio incluye citrato de sodio, un anión, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con la producción de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), llevando a la alcalinización del medio a partir de la conversión del  $\text{NH}_3$  en hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). El indicador es azul de bromotimol, que es amarillo con un pH menor de 6 y azul con un pH por encima de 7.6.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Fosfato monoamónico.....	1.0
Fosfato dipotásico.....	1.0
Citrato de sodio.....	2.0
Sulfato de magnesio.....	0.2
Cloruro de sodio.....	5.0
Azul de bromotimol.....	0.08
Agar.....	15.0

pH final  $6.8 \pm 0.1$  a  $25^\circ\text{C}$

**Preparación.** Se suspenden 25.3g del polvo en un litro de agua destilada. Déjese remojar durante 5 a 10 minutos. Se mezcla bien y se calienta suavemente agitando de vez en cuando hasta que el medio hierva durante 1 o 2 minutos.



Distribúyase en tubos y esterilícese en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar en posición inclinada, aunque también se puede emplear como medio en placas. Identificar y almacenar a 2-8°C.

**Usos.** Se pueden hacer cultivos en placa, o si se prefiere el medio inclinado, se inocula estriando la superficie y picando el fondo. Solo los organismos que utilizan el citrato como única fuente de carbono crecen en el agar citratado de Simmons. La aparición de un crecimiento visible va acompañado en general de un cambio alcalino (azul) del indicador.

### **Interpretaciones.**

1. Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta.
2. Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color (verde).

### **Controles.**

Control positivo: *Enterobacter aerogenes*

Control negativo: *Escherichia coli*

**Aspecto del medio preparado:** verde.

## *Anexo 2e.* MEDIO SIM

Marca: Difco

Lote: 94923

El medio SIM se emplea para determinar la movilidad de flagelados, producción de SH<sub>2</sub> por la utilización de cisteína-HCl, producción de ácido indol-pilúvico (IPA) por la utilización del triptófano y la detección de la reacción el indol con el reactivo de Kovac`s.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Peptona.....	30.0
Extracto de carne.....	3.0
Citrato férrico amónico.....	0.2
Tiosulfato de sodio.....	0.025
Agar.....	3.0

pH final 7.3 ± 0.2 a 25°C

**Preparación.** Se suspenden 36 g. del material seco en un litro de agua destilada. Mézclase bien y cuando se obtenga la suspensión uniforme, caliéntese agitando de cuando en cuando y hiérvase durante un minuto o hasta su disolución. Se distribuye y esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Identificar y almacenar a 2-8°C.

**Usos.** El medio SIM es útil para la identificación habitual de bacilos entéricos. Ordinariamente se reparte en tubos de ensayo llenos hasta la mitad, que se inoculan con aguja por piquete en el centro, hasta la mitad de su profundidad. Se incuban durante 18 a 24 horas o por tiempo mayor. La reacción de sulfuros se indica por el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de inoculación.

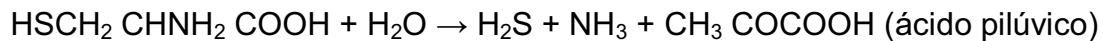
Su alto contenido en Trypticase lo hace ideal para la producción de indol. La movilidad se evidencia por el crecimiento lejos de la línea de inoculación.

## **Interpretaciones.**

### **A) Motilidad.**

1. Prueba positiva (motilidad): los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio, provocando turbiedad. Pueden mostrar un crecimiento en estrías vellosas.
2. Prueba negativa (sin motilidad): crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra; el medio circundante se mantiene claro.
3. Medio de control (no inoculado): no hay crecimiento, el medio se mantiene incoloro y claro.

### **B) Acido sulfhídrico.**



1. Positivo: se observa ennegrecimiento del medio.

a) Siguiendo la línea de inoculación.

b) En toda la capa superficial.

2. Negativo: no se observa ennegrecimiento.

### **C) Acido indol-pilúvico (IPA)**

Triptófano → ácido indol-pilúvico + Fe (color café, en presencia de oxígeno, solo en la superficie del medio)

### **D) Indol.**

Triptófano → (triptofanasa) → indol

Indol + Kovac`s (p-dimetilaminobenz-alaldehido) → roindol (color rojo claro)

1. Prueba positiva: un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica.
2. Prueba negativa: no se produce color en la capa alcohólica; toma el color del reactivo de Kovac`s (amarillo).
3. Variable: un color anaranjado en la superficie del medio debido a desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser un precursor de la formación de indol.

**Aspecto del medio preparado:** ámbar claro.

## *Anexo 2f.* CALDO LISINA DESCARBOXILASA DE FALKOW (LIA)

Marca: Becton Dickinson

Código: 4311363

Lote: 1000BODHLA

El objetivo de esta prueba es medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar a la lisina y formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Peptona.....	5.0
Citrato de hierro y amonio.....	0.5
Extracto de levadura.....	3.0
Glucosa (Dextrosa).....	1.0
L-lisina.....	10.0
Tiosulfato de sodio.....	0.04
Púrpura de bromocresol.....	0.02
Agar.....	13.5

pH final  $6.7 \pm 0.2$  a 25°C

**Preparación.** Pesar exactamente 4.95 gramos del medio en 150 mL de agua destilada. Ebulir por 1 minuto. No autoclavar. Homogeneizar y dispensar en tubos de ensayo, en volumen de 3mL. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Identificar y almacenar a 2-8 °C.

**Usos.** En un primer paso casi todos los microorganismos descomponen la glucosa; el pH del medio vira hacia el rango ácido (bajo 6.0) y cambia a color amarillo. La reacción de descarboxilación de aminoácidos comienza de un rango ácido. La reacción produce aminas y el pH del medio vira hacia la alcalinidad y el color cambia hacia púrpura.

### **Interpretaciones.**

1. Prueba positiva: púrpura turbio a un púrpura amarillento apagado (producido por la cadaverina)
2. Prueba negativa: color amarillo claro y brillante (solamente fermentado por la glucosa).

**Aspecto del medio preparado:** lila.

## *Anexo 2g.* Agar MIO

Marca: Acumedia

Código: 7389A

Lote: 0101-104

Este medio es utilizado para la identificación de enterobacterias con base en la motilidad, actividad de ornitina descarboxilasa y producción de indol.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Digesto enzimático de gelatina.....	10.0
Digesto enzimático de caseína.....	10.0
Extracto de levadura.....	3.0
Dextrosa.....	1.0
Púrpura de bromocresol.....	0.002
L-ornitina.....	5.0
Agar.....	2.0

pH final  $6.5 \pm 0.2$  a 25°C

**Preparación.** Disolver 31 gramos de medio en 1 litro de agua destilada. Ebulir por 1 minuto. No autoclavar. Homogeneizar y dispensar en tubos de ensayo, en volumen de 3 mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Identificar y almacenar a 2-8°C.

**Usos.** Los cultivos son inoculados por punción e incubados por 18-24 horas a 35°C  $\pm$  2°C. Las reacciones de motilidad y de ornitina descarboxilasa son vistas

antes de colocar el reactivo de Kovac`s. La motilidad se indica por turbidez del medio o por crecimiento difuso a partir de la línea de inoculación. La ornitina descarboxilasa se indica por un color púrpura del medio. La ornitina negativa produce un color amarillo en el fondo del tubo, que puede ser púrpura al final. Para la prueba del indol adicionar 3-5 gotas del reactivo de Kovac`s y agitar suavemente el tubo. La aparición de un color rosa o rojo es interpretada como prueba positiva de indol.

### **Interpretaciones.**

1. Prueba positiva: color púrpura.
2. Prueba negativa: color amarillo en el fondo.

**Aspecto del medio preparado: lila.**



## REACTIVO DE KOVAC`S

Disolver 1 gramo de p-dimetilaminobenz-aldehido en 75 mL de alcohol amílico (o iso-amílico) y añadir 25 mL de HCl concentrado, para su utilización se debe agregar 5 gotas de reactivo de Kovac`s directamente a un tubo incubado de 24 a 48 hrs. y luego agitar suavemente el tubo.

El indol (benzilpirrol), es un producto de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias poseedoras de la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y deaminar triptófano con producción de indol. Esta es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos y es particularmente útil para diferenciar *Escherichia coli* que es positiva de miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* que son negativas.

**Fundamento.** La prueba de indol se basa en la formación de un complejo de color rosa cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehido. Esta es la sustancia química activa en los reactivos de Kovac`s y Ehrlich. Deberá usarse un medio rico en triptófano.

En la práctica se emplean medios combinados como sulfuro-indol-motilidad (SIM), motilidad-indol-ornitina (MIO).

**Interpretación.** La aparición de un color rosado fucsia en la interfase del reactivo y el caldo (o medio) pocos segundos de haber agregado 5 gotas del reactivo es indicativo de la presencia de indol y constituye una prueba positiva.

### **Controles.**

Control positivo: *Escherichia coli*

Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*

## *Anexo 2h.* CALDO DE VOGES-PROSKAUER (VP)

Elaboración propia.

Voges y Proskauer, fueron los primeros en observar la reacción de color rojo producida por los medios de cultivo apropiados luego del tratamiento con hidróxido de potasio. Más tarde se descubrió que el producto activo en el medio formado por metabolismo bacteriano era acetil-metil-carbinol, un producto de la vía del butileno glicol. El ácido pirúvico, un compuesto fundamental formado en la degradación fermentativa de la glucosa, es metabolizado a través de cierto número de vías metabólicas, según los sistemas enzimáticos de las diferentes bacterias. Una de estas vías da como resultado la producción de acetoína (acetil-metil-carbinol). Microorganismos como miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* producen acetoína como producto final principal del metabolismo de la glucosa. En presencia de oxígeno atmosférico e hidróxido de potasio al 40%, la acetoína es convertida en diacetilo y el  $\alpha$ -naftol sirve como catalizador para producir un complejo de color rojo. El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Polipeptona.....	7
Glucosa.....	5
Fosfato dipotásico.....	5

pH final  $6.8 \pm 0.1$  a  $25^{\circ}\text{C}$

**Preparación.** Disolver la fórmula en 1000 mL de agua destilada. Homogeneizar y dispensar en tubos de ensayo, en volumen de 3 mL. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Identificar y almacenar a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

**Usos.** Después de incubar toda la noche estos tubos se añadirán 3 gotas del reactivo **A** y 3 gotas del reactivo **B**; una reacción positiva (color rojo) aparece en el curso de 5 minutos.

Acetoína + O → diacetil + H<sub>2</sub>O

Diacetil + KOH + material grupo guanidino (incluida en la peptona) + α-naftol → presencia de color rojizo o rosado.

### **Interpretaciones.**

1. Reacción VP positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína)
2. Reacción VP negativa: color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aún así la reacción es negativa (debido a la reacción de los reactivos al mezclarse).

### **Controles.**

Control positivo: *Klebsiella pneumoniae*

Control negativo: *Escherichia coli*

**Aspecto del medio preparado:** Ámbar claro.

## **REACTIVO A**

### **(Hidróxido de Potasio, 40%, agente oxidante)**

Hidróxido de potasio.....40 g

Agua destilada.....100 mL

**Preparación.** Pesar rápidamente el hidróxido de potasio y disolverlo en menos de 100 mL de agua destilada en un vaso. Este reactivo es muy higroscópico. Colocar el vaso en un baño de agua fría circulante para controlar la temperatura. Enfriar y trasvasar la solución de KOH a un frasco volumétrico de 100 mL agregando agua destilada, c.s.p. 100 mL. Guardar en un frasco para reactivos de vidrio recubierto de polietileno o parafina y rotular correctamente. Este KOH puede ser sustituido por hidróxido de sodio NaOH al 40%. El KOH y el NaOH son soluciones sumamente cáusticas; evitar el contacto con la piel para impedir dolorosas quemaduras.

## **REACTIVO B**

### **( $\alpha$ -naftol , 5%, intensificador del color)**

$\alpha$ -naftol (l-naftol).....5 g

Alcohol etílico (absoluto).....100 mL

**Preparación.** Disolver el  $\alpha$ -naftol en menos de 100 mL de alcohol etílico absoluto. Trasvasar la solución a un frasco volumétrico de 100 mL y agregar alcohol etílico absoluto, c.s.p. 100 mL. Guardar en un frasco para reactivos rotulado correctamente.

## *Anexo 21.* CALDO UREA

Marca: Scharlau Microbiology

Lote: 9564

El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar urea siguiendo la reacción química. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, dando como resultado alcalinización y aumento del pH del medio.

**Preparación.** Disolver 19 gramos de medio en 950 mL de agua destilada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50-55 °C. Añadir en forma aséptica 50 mL de una solución de urea al 40%. Mezclar y distribuir en forma aséptica en tubos de ensayo a 0.5 mL por tubo. El pH final es  $6.8 \pm 0.2$  a 25°C. Identificar y almacenar a 2-8°C. (La urea se descompone con el ca lentamiento).

### **Interpretaciones.**

1. Reacción positiva: color rojo rosado intenso en todo el caldo. Solamente especies de *Proteus*.
2. Reacción negativa: no se produce cambio de color (amarillo anaranjado).
- 3.

### **Controles.**

Control positivo: *Proteus sp*

Control negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922

**Aspecto del medio preparado:** naranja claro.

## *Anexo 2j.* AGAR CLED

Marca: Difco

Este medio es utilizado para el cultivo y conteo de Bacterias Gram (+) y Gram (-) en urocultivos. El medio presenta la ventaja de impedir la formación de un “velo o película” de *Proteus* en su superficie.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Bacto Beef Extract.....	3.0
Bacto Peptone.....	4.0
Bacto Tryptone.....	4.0
Bacto L-Cystine.....	0.128
Bacto Lactose.....	10.0
Bacto Agar.....	15.0
Bacto BromThymol Blue.....	0.02

pH final  $7.3 \pm 0.2$  a 25°C

**Preparación.** Rehidratar el medio suspendiendo 36 gramos en 1 litro de agua destilada o desionizada. Calentar hasta el punto de ebullición para disolver completamente. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C. Identificar y almacenar a 2-8°C.

**Aspecto del medio preparado:** verde.

## *Anexo 2k.* AGAR NUTRITIVO

Marca: Biobrás Diagnósticos

Orden: 415534

Lote: 0000000949

Medio de uso general en laboratorio, indicado para cultivo de gérmenes poco exigentes. Puede ser usado en bacteriología sanitaria, humana e industrial.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Agar bacteriológico.....	15.0
Cloruro de sodio.....	8.0
Extracto de carne.....	3.0
Peptona de gelatina.....	5.0

pH final  $6.8 \pm 0.2$  a 25°C

**Preparación.** Disolver 31 gramos en 1 litro de agua destilada. Hidratar por 10-15 minutos. Mezclar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar hasta 45-50°C. Distribuir 15-20 mL por cada placa de Petri estéril. Si no fuera usado el mismo día, almacenar de 2-8°C en posición invertida. El medio preparado es válido por 6.8 semanas.

**Aspecto del medio preparado:** ámbar claro.

## *Anexo 2*. AGAR MÜELLER HINTON

Marca: Biobrás Diagnósticos

Orden: 415802

Lote: 0000003475

Medio rico en nutrientes recomendado para la realización de antibiogramas, por la técnica de difusión de discos, descrita por la NCCLS.

### **Fórmula en gramos por litro de agua destilada:**

Hidrolizado ácido de caseína.....	17.5
Extracto de carne.....	2.0
Amido de batata.....	1.5
Agar bacteriológico.....	17.0

pH final  $7.4 \pm 0.2$  a 25°C

**Preparación.** Disolver 38 gramos en 1 litro de agua destilada. Hidratar por 10-15 minutos. Mezclar agitando frecuentemente y hervir por 1 minuto. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar hasta 45 a 50°C. Para preparar agar sangre agregar asépticamente 5% de sangre de carnero desfibrinada estéril. Para preparar agar chocolate agregar 500 mL de una solución de hemoglobina al 2% estéril a 500 mL del medio con concentración doble (38 g → 500 mL). Luego calentar el agar sangre a 80°C por 10 minutos hasta que el medio adquiriera un color chocolate. Homogeneizar y poner de 20-25 mL por cada caja Petri. Si no fuera a usar el mismo día, guardar el medio sin sangre a 2-4°C en forma invertida. El medio preparado vale por una semana.

**Aspecto del medio preparado:** levemente opalescente o de color ámbar.



## *Anexo 3.* PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN (BAUER – KIRBY)

### PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR BAUER-KIRBY

#### **Procedimiento:**

El procedimiento de Bauer-Kirby estandarizado por la NCCLS sigue la siguiente secuencia:

- Preparación de inóculo.
- Estandarización del inóculo.
- Inoculación en placas de agar.
- Aplicación de discos de antibióticos.
- Incubación de las placas de agar.
- Medición de halos de inhibición.
- Interpretación de resultados según normas de la NCCLS.

#### **Preparación del inóculo.**

##### **1. Método de suspensión directa:**

- Cultivo fresco con 18-24 horas de incubación.

Seleccionar 3 a 5 colonias de la misma morfología, tocando la parte superior de cada colonia con un anza, transferir las colonias directamente en: Solución Fisiológica o Caldo Mueller-Hinton e inmediatamente sembrar en el medio de cultivo.

#### **B. Estandarización del inóculo.**

Con el patrón de turbidez = 0.5 Mc Farland  
=  $1.5 - 2 \times 10^8$  UFC/mL

Para estandarizar el inóculo por comparación con el patrón de turbidez, debe transferirse el patrón en un tubo que tenga las mismas características del tubo donde se preparará la suspensión bacteriana a estudiar, utilizar además una tarjeta blanca con rayas negras de diferente grosor que permiten servir de contraste para la comparación simultánea del patrón y el inóculo.

### **C. Características del crecimiento.**

Para sembrar el inóculo debe utilizarse el medio de cultivo adecuado en el que desarrollará el microorganismo, así para:

- Bacterias de rápido desarrollo: Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Vibrio cholerae*, etc. sembrar en Agar Muëller-Hinton.

### **D. Inoculación de las placas.**

Homogenizar el inóculo, introducir un hisopo estéril en la suspensión, hacer rotar por las paredes del tubo para eliminar el excedente, luego sembrar suavemente sobre la superficie del medio en tres direcciones, haciendo girar la caja petri en un ángulo de 65°, esto permitirá una distribución homogénea del inóculo.

### **E. Aplicación de discos de antibióticos.**

- Sacar los antimicrobianos dos horas antes para que adquieran la temperatura ambiente antes de ser utilizados
- No usar más de 6 discos para placas de 100 mm, ni más de 12 discos por placa de 150 mm de diámetro, (suficiente un representante por familia de antibióticos), mayor número de discos provoca superposición de halos de inhibición que dificultan la lectura.
- Verificar la carga de discos a utilizar de acuerdo al microorganismo.
- Colocar los discos sobre la superficie del agar, presionar ligeramente sobre el disco para que no se despegue.
- La distancia entre disco y disco debe ser de 2.5 cm y de disco al borde de la caja de 2 cm.
- Una vez colocado el disco no debe ser removido, pues inmediatamente difunde el antimicrobiano sobre al agar.

### **F. Incubación de las placas.**

- Después de colocados los discos, incubar las placas de agar en forma invertida en estufa a 35°C.

### **G. Medida de zonas de inhibición.**

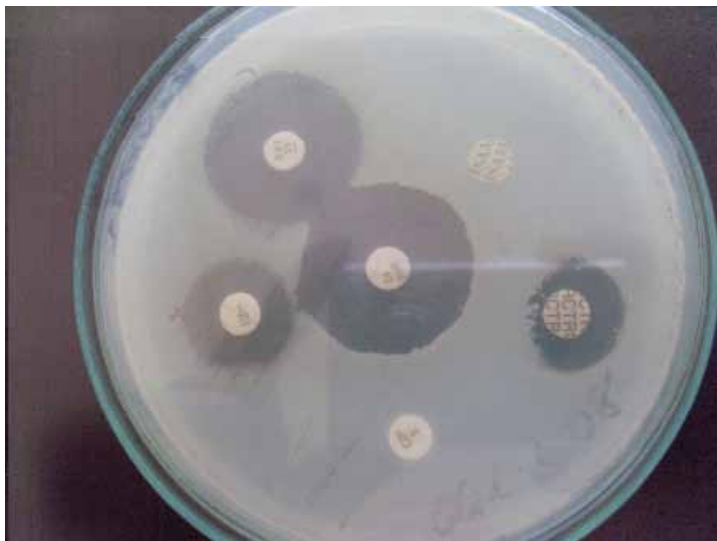
Antes de realizar las lecturas de zonas de inhibición debemos verificar:

- Que el crecimiento sea confluyente (uniforme) de no ser así repetir la prueba.
- Medir el área que muestre inhibición a ojo desnudo.
- Las zonas de inhibición deben ser uniformes y circulares.
- Medir con regla o calibre sosteniendo la caja petri en forma invertida, sobre un fondo oscuro y con luz reflejada.
- Cualquier deformación producida en los halos, deberá estudiarse para detectar mecanismos de resistencia que estuviera exhibiéndose, para inferir la Resistencia o Sensibilidad a determinados antimicrobianos.
- Colonias mayores en área de inhibición deben ser subcultivadas y reidentificadas.
- Algunos microorganismos muestran un leve crecimiento dentro la zona de inhibición de cotrimoxazol, trimetoprima y otras sulfonamidas (doble halo), leer el halo externo no el interno.
- En *Proteus mirabilis* ignorar el “swarming” o invasión de la zona de inhibición.

#### H. Interpretación de resultados.

Utilizar las tablas de la NCCLS, cada grupo de microorganismos tiene una tabla específica que va desde la Tabla 2A a 2I. Estas tablas se actualizan una vez por año. Para la interpretación existen tres categorías:

- Sensible.
- Intermedio.
- Resistente.



**Anexo 4.** Tabla de la NCCLS para la interpretación de resultados de la familia *Enterobacteriaceae*

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Amoxiclavulanico</b>	≤ 13	14 - 17	≥ 18
<b>Ceftriaxona</b>	≤ 13	14 - 20	≥ 21
<b>Sulfamethoxazole Trimethoprim (SXT)</b>	≤ 10	11 – 15	≥ 16
<b>Imipenem (IPM)</b>	≤ 13	14 – 15	≥ 16
<b>Ciprofloxacín (CIP)</b>	≤ 15	16 – 20	≥ 21
<b>Gentamicina (GN)</b>	≤ 12	13 - 20	≥ 21
<b>Cloranfenicol (CHL)</b>	≤ 12	13 - 17	≥ 18

**Anexo 4a.** Tabla de la NCCLS para la interpretación de resultados de *Streptococcus viridans*

<b>Antibiótico</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Penicilina (PEN)</b>	-	-	≥ 24
<b>Eritromicina (ERY)</b>	≤ 15	16 – 20	≥ 21
<b>Vancomicina (VAN)</b>	-	-	≥ 17
<b>Clindamicina (CLI)</b>	≤ 15	16 – 18	≥ 19
<b>Sulfamethoxazole Trimethoprim (SXT)</b>	≤ 10	11 – 15	≥ 16

*Anexo 5.* CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE *E. coli*.



Superficie de placas de agar BEM que muestran el brillo verdoso producido por los miembros de las *Enterobacteriaceae* fuertemente fermentadoras de la lactosa.



*Anexo 6.* AMBIENTE DE TRABAJO: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA I.G.B.J.



## *Anexo 7.* EQUIPOS DE TRABAJO LAB. MICROBIOLOGIA I.G.B.J.

- **Autoclave** (121°C) SAKURA (NEOCLAVE ASV-3022) JICA



- **Incubadora** /27°C – 37°C) EYELA (SOFT INCUBATOR SLI-1000ND)  
Y SAKURA TOKYO JAPAN (INCUBATOR IF-3B)JICA

