

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



***“IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGIA QUE EMPLEA CARBON
ACTIVADO COMO REMOVEDOR DE ANTIBIOTICOS EN UROCULTIVOS
DEL HOSPITAL REGIONAL DEL CUSCO MINSA. AREQUIPA 2014”***

Tesis presentada por la Bachiller:
Giuliana Emilia Dalguerre Zanoni
Para optar el Título Profesional
de:

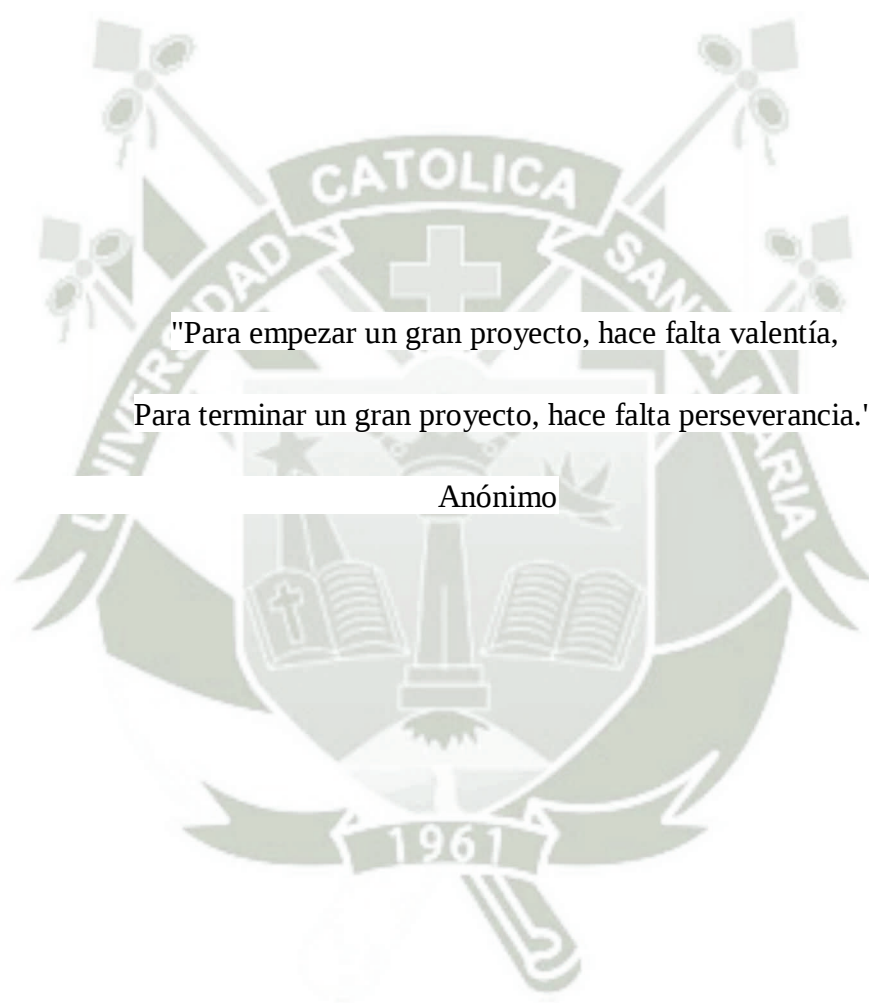
Químico Farmacéutico

Asesor:

Q. F. Jesús Mercedes Jave
Márquez

Arequipa – Perú

2015



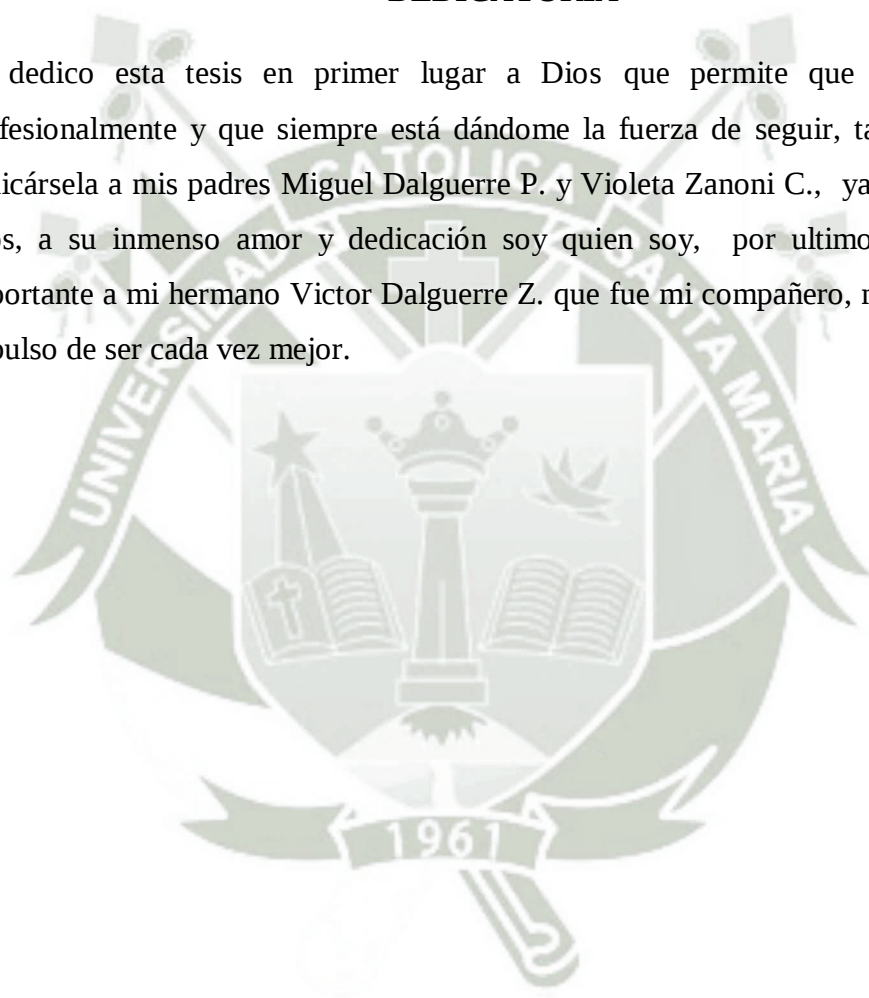
"Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía,

Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia."

Anónimo

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis en primer lugar a Dios que permite que pueda crecer profesionalmente y que siempre está dándome la fuerza de seguir, también quiero dedicársela a mis padres Miguel Dalguerre P. y Violeta Zanoni C., ya que gracias a ellos, a su inmenso amor y dedicación soy quien soy, por ultimo y no menos importante a mi hermano Victor Dalguerre Z. que fue mi compañero, mi amigo y mi impulso de ser cada vez mejor.



AGRADECIMIENTOS

Estoy Agradecida con Dios ya que sin el nada de esto sería posible, también estaré eternamente agradecida con mis padres el Dr. Blgo. Miguel Dalguerre Pérez y la Dra. Blga. Violeta Zaroni Castillo, quienes me guiaron, corrigieron y ayudaron en el desarrollo de la tesis, con ayuda del Laboratorio Clínico Biológico Especializado Cayetano Heredia, también agradezco al Dr. Blgo. Victor Sucnier Cruz y al personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional del Cusco MINSA, expreso mi reconocimiento y agradecimiento a la Dra. QF Jesús Mercedes Jave Márquez, docente principal de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa como mi asesora, guía y consejera en la presente, así mismo estaré por siempre muy agradecida por la ayuda, consejería, dedicación y tiempo de la QF. Mocita de la Fuente Torres, quien fue muy paciente y amable al momento de hacerme las debidas correcciones de esta investigación, finalmente a Jeremy Cuba Escobar por su aliento y apoyo incondicional.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
OBJETIVOS	6
HIPOTESIS	7
 CAPITULO I:	
MARCO TEORICO	
1. Cultivo microbiológico	8
1.1. Utilidad	8
1.2. Clasificación de los medios de cultivo	9
1.2.1. De acuerdo a la naturaleza y sus constituyentes	9
1.2.2. De acuerdo al uso del medio de cultivo	9
1.2.3. De acuerdo a su estado físico	10
1.2.4. Preparación	10
2. Carbón activado	10
2.1. Características	11
2.2. Proceso del carbón activado	11
2.3. Aplicaciones	12
2.3.1. Uso médico	12
2.3.2. Filtros para aire, gas comprimido y purificar el agua	12
2.3.3. Usos ambientales	12
2.4. Arkocapsulas carbón vegetal activado	13
3. Infección urinaria	13
3.1. Epidemiología	14
3.2. Etiología	14
3.3. Patogenia	15
3.4. Factores genéticos	15

3.5. Clasificación	16
3.6. Diagnóstico	16
3.7. Tratamiento	17
4. Urocultivo y antibiograma	18
4.1. Urocultivo	18
4.2. Agentes etiológicos	19
4.3. Toma de muestra	19
4.4. Análisis directo de sedimento de orina	19
4.5. Antibiograma	20
4.5.1 Utilidades	21
5. Mecanismos acción de fármacos utilizados en antibiograma	21
6. Mecanismos de resistencia de las bacterias	23
6.1. Resistencia bacteriana a aminoglucósidos (gentamicina)	24
CAPITULO II:	
MATERIALES Y METODOS	
1. Muestras	25
2. Equipos y materiales	25
2.1. Equipos	25
2.2. Materiales	26
2.3. Medios de cultivo y pruebas de identificación	26
2.4. Reactivos	26
3. Metodología	27
3.1. Planteamiento de distribución y proceso de muestras de orina	27
3.2. Preparación de material y medios de cultivo	29
3.3. Criterios de inclusión	30
3.4. Toma de muestra	30
3.5. Determinación de concentración de carbón activado útil como removedor de antibióticos.	30
3.6. Procedimiento de urocultivos de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que no han iniciado	32

un tratamiento antibiótico	
3.6.1. Patrón	33
3.6.2. Control positivo	34
3.7. Procedimiento de urocultivo de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que han iniciado un tratamiento antibiótico transitorio (gentamicina)	35
3.7.1. Control negativo	36
3.7.2. Grupo experimental	37
4. Determinación del costo de insumos básicos para la realización de la metodología	41
CAPITULO III:	
RESULTADOS Y DISCUSION	
1. Resultados de recopilación de muestras de orina	42
2. Resultados de la determinación de concentración de carbón activado útil como removedor de antibióticos	44
3. Resultados del procedimiento de urocultivos de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que no han iniciado un tratamiento antibiótico	45
4. Resultados del procedimiento de urocultivos de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que han iniciado un tratamiento antibiótico transitorio(gentamicina)	48
5. Resultados de la determinación del costo de insumos básicos para la realización de la metodología	54
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
ANEXOS	60
REFERENCIAS	95

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Mecanismo de acción de los antibióticos	21
Figura 2 Mecanismo de acción de la gentamicina	22
Figura 3 Diagrama de distribución y procedimiento de las muestras de orina	28
Figura 4 Preparación de medios de cultivo	32
Figura 5 Diferentes concentraciones de carbón activado en caldo BHI y muestra	33
Figura 6 Siembra de la orina en caldo BHI con carbón activado	34
Figura 7 Control Positivo: después de la incubación del caldo BHI, sembrado en Agar Mac Conkey y Agar sangre base con azida	35
Figura 8 Sembrado de la muestra de orina con antibiótico directamente a los medios de cultivo como control negativo	37
Figura 9 Procedimiento tratamiento de muestra de orina que contiene antibiótico con carbón activado y caldo BHI	38
Figura 10 Muestra de orina pre-tratada con carbón activado, sembrada en los medios Mac Conkey y Agar sangre base con azida	39
Figura 11 Resultados de crecimiento en Mac Conkey y Agar sangre base con azida con las distintas concentraciones de carbón activado	45
Figura 12 Resultados de crecimiento bacteriano en el urocultivo patrón de comparación y el control positivo	46
Figura 13 Resultados de comparación entre el control negativo y el grupo experimental	48
Figura 14 Antibiograma #16: gentamicina sensible #17: gentamicina resistente	49
Figura 15 Autoclave y estufa para esterilización de materiales	66
Figura 16 Agar Mac Conkey. 1: placa con el medio, 2: crecimiento bacteriano en el medio de cultivo	68

Figura 17	Agar sangre base con azida. 1: placa con medio 2: crecimiento bacteriano en el medio de cultivo	70
Figura 18	Agar Mueller Hinton en placa Petri	72
Figura 19	Agar Mueller Hinton. 1: antibiograma sin crecimiento bacteriano, 2: antibiograma con crecimiento bacteriano	72
Figura 20	Agar Manitol Salado. 1: sin crecimiento bacteriano (color original), 2: crecimiento bacteriano positivo; amarillo (manita positivo), fucsia (manita negativo)	74
Figura 21	Diferentes degradaciones percibidas cuando hay crecimiento en el medio TSI	78
Figura 22	Distintas degradaciones percibidas con el crecimiento en LIA	81
Figura 23	Positivo y negativo en urea	82
Figura 24	Positivo y negativo en Citrato de Simmons	84
Figura 25	Negativo (Indol negativo), positivo (Indol positivo)	86
Figura 26	Vista microscópica de Gram negativo y Gram positivo	87
Figura 27	Prueba de coagulasa positivo y negativo	88
Figura 28	Prueba de catalasa en portaobjetos A:negativo y B: positivo	89

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Resultados de la cantidad de urocultivos positivos según los medios de cultivo Mac Conkey y Agar sangre base con azida en muestras de pacientes con infección urinaria sin tratamiento antibiótico	47
Tabla 2 Control negativo y grupo de experimentación (25 muestras): positivos y negativos	50
Tabla 3 Resultados de la cantidad de urocultivos positivos según los medios de cultivo Mac Conkey y Agar sangre base con azida del grupo experimental	51
Tabla 4 Recuento numérico y porcentual según las bacterias aisladas en los urocultivos	51
Tabla 5 Recuento numérico y porcentual de resistencia bacteriana	52
Tabla 6 Incidencia de bacterias en infecciones urinarias del número total de muestras de la investigación	53
Tabla 7 Precio estimado por unidad procedimiento de removedor de antibióticos	55
Tabla 8 Recuento de placa y crecimiento de bacterias. Muestras de pacientes mujeres con infección urinaria, sin antibiótico-terapia	61
Tabla 9 Recuento de placa y crecimiento de bacterias. Muestras de orina de pacientes mujeres con infección urinaria, con antibiótico-terapia transitoria (gentamicina).	62
Tabla 10 Resultados de la bacteria aislada y del antibiograma de cada urocultivo. Muestras de orina de pacientes mujeres con antibiótico-terapia (gentamicina).	63

<i>INDICE DE ABREVIATURAS</i>	
A.	Acido
ADN	Acido dexosirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
AZ	Agar sangre base con azida
Caldo BHI	Blood Heart Infusion (caldo infusión cerebro corazón)
CSS	Citrato de Simmons
Eb.	<i>Enterobacter</i>
E.c.	<i>Escherichia coli</i>
Ej.	Ejemplo
ITU	Infecciones de Tracto Urinario
LIA	Lysine Iron Agar (agar lisina hierro)
MC	Agar Mac Conkey
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MOT	Motilidad
NEG	Negativo
POS	Positivo
RAB	Removedor de antibióticos
SMX	Sulfametoxazol
S.A.	Sociedad anónima
spp	Indica que se trata de varias especies del mismo genero
St.	<i>Staphylococcus</i>
TMP	Trimetoprim
TSI	Triple Sugar Agar (agar triple de azúcar)
UFC	Unidad formadora de colonias

RESUMEN

El objetivo de esta investigación es implementar una metodología que solucione un problema de salud pública que aqueja a muchos pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que por prescripción médica reciben tratamiento antibiótico de uso transitorio, para confirmar el diagnóstico se realiza un urocultivo pero el resultado no presenta crecimiento bacteriano ya que la bacteria puede estar siendo enmascarada por el antibiótico prescrito, el cual no permite la proliferación del agente patógeno. No hay un método que permita la remoción del antibiótico de la muestra de orina y proporcione condiciones adecuadas para un óptimo crecimiento bacteriano del urocultivo es por eso que esta tesis está enfocada en implementar una metodología sencilla, efectiva y económica que puede realizar el profesional de la salud utilizando carbón activado como removedor de antibióticos en cultivos microbiológicos de orina. Se utilizaron 50 muestras de orina de pacientes mujeres con edades entre 20 y 40 años que cumplían con los criterios de inclusión establecidos. El primer paso fue determinar la concentración de carbón activado útil como removedor de antibióticos para lo cual se realizó la metodología con 4 distintas concentraciones y los resultados demostraron que el crecimiento no varió en ninguna de ellas por lo que se optó por utilizar la mínima concentración de 28 mg para economizar el proceso. Las 50 muestras fueron divididas en dos grupos, (25 muestras por grupo). Para el primer grupo se utilizaron muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria sin haber iniciado un tratamiento

antibiótico y así poder demostrar que el carbón activado no produce alteración en el crecimiento bacteriano.

Con cada una de las 25 muestras de orina del primer grupo se realizó un patrón de comparación (sin carbón activado) y un control positivo (con carbón activado), el crecimiento bacteriano en ambos subgrupos demostró que el carbón activado no altera los resultados de los urocultivos. Para el segundo grupo se utilizaron muestras de orina de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que recibieron gentamicina como tratamiento de uso transitorio, para lo cual el grupo se dividió en dos subgrupos control negativo y grupo experimental, el control negativo dio como resultados en 21 casos (84%) fue negativo lo cual demuestra que el la bacteria está siendo enmascarada por el antibiótico, pero en 4 casos (16%) hubo crecimiento bacteriano esto se debió a la resistencia de la bacteria frente al antibiótico demostrado posteriormente por un antibiograma. En el grupo experimental se obtuvo en un 100% de los urocultivos crecimiento bacteriano lo que demuestra que el carbón activado es útil como removedor de antibióticos permitiendo la recuperación de la vitalidad y proliferación del agente patógeno causante de infección urinaria, logrando la identificación del mismo y la realización consecuente del antibiograma. Al identificar las bacterias causantes de las infecciones urinarias en la investigación se aisló al *Escherichia coli* 48%, *Enterobacter* 20%, *Staphylococcus aureus* 24% y al *Staphylococcus saprophyticus* 8% lo cual demuestra que las infecciones de tracto urinario son causadas en su mayoría por bacterias Gram negativas, dentro de los antibiogramas realizados se obtuvo que en un 80% la amikacina es el antibiótico con más incidencia de efectividad frente a las bacterias que provocan ITU y dejando al ácido nalidíxico como la opción menos efectiva con un 1% de sensibles.

Palabras clave: infección urinaria, metodología, sencilla, efectiva, económica, urocultivo, carbón activado, removedor de antibióticos

ABSTRACT

The objective of this research is to implement a methodology that addresses public health problem that afflicts many patients with presumptive diagnosis of urinary infection that receive antibiotic treatment prescription temporary use, to confirm the diagnosis urine culture is done but the result presents bacterial growth since bacteria may be being masked by the prescribed antibiotic, which does not allow the proliferation of the pathogen. There is a method that allows the removal of the antibiotic in the urine sample and provide adequate conditions for optimal bacterial growth in urine culture is why this thesis is focused on implementing a simple, effective and economical method that can perform professional health using activated as a remover of antibiotics in microbiological cultures of urine coal. 50 urine samples from female patients aged between 20 and 40 years who met the inclusion criteria were used. The first step was to determine the concentration of activated charcoal useful as a remover of antibiotics to which the methodology was performed with 4 different concentrations and the results showed that growth did not differ in any of them so it was decided to use the minimum concentration of 28mg to save the process. The 50 samples were divided into two groups (25 samples per group). For the first group patient samples were used for presumptive diagnosis of urinary tract infection prior to beginning antibiotic treatment and be able to demonstrate that activated carbon produced no alteration in bacterial growth. With each of the 25 urine samples from the first group a comparison pattern (no activated carbon) and a positive control (activated carbon) was performed, bacterial

growth in both groups showed that the activated carbon does not alter the results of the urine cultures.

For the second group of patients urine samples were used for presumptive diagnosis of urinary tract infection who received gentamicin for treatment of temporary use, for which the group was divided into two negative control and experimental subgroups, negative control gave as result 21 cases (84%) was negative which shows that the bacteria is being masked by the antibiotic, but in 4 cases (16%) had bacterial growth this was due to the resistance of bacteria against antibiotics subsequently demonstrated by an antibiogram. In the experimental group was obtained in 100% of urine bacterial growth demonstrating that the activated carbon is useful in the removal of antibiotics allowing recovery of vitality and growth of the pathogen that causes urinary tract infection, achieving its identification and the consequent realization of susceptibility.

By identifying the bacteria causing urinary tract infections in the investigation isolated the *Escherichia coli* 48%, *Enterobacter* 20%, *Staphylococcus aureus* 24% and *Staphylococcus saprophyticus* 8% which shows that urinary tract infections are caused mostly by bacteria negative bacteria within the antibiograms performed was obtained in 80% amikacin is more incidence of antibiotic effectiveness against bacteria that cause UTI and leaving nalidixic acid as the least effective option with 1% Sensitive.

Keywords: UTI, methodology, simple, effective, economical, urine, activated carbon remover antibiotics.

INTRODUCCION:

En pacientes con terapia antibiótica transitoria en curso, suministrada por prescripción médica basada exclusivamente en su sintomatología característica a la de una infección urinaria, el valor terapéutico personalizado del tratamiento recomendado, es incierto, y se corre el riesgo de prolongar e incluso empeorar el problema, ya que el antibiótico puede actuar como bactericida o como bacteriostático lo cual no se sabe con exactitud, por lo tanto es necesario confirmar la efectividad del antibiótico utilizado o disponer de una alternativa que le permita restablecer su salud, para lo cual se realiza un urocultivo que posibilitará un diagnóstico certero y un antibiograma que describa la serie de antibióticos que sean efectivos para erradicar la bacteria.

El problema está cuando el urocultivo da un resultado negativo a pesar de que el paciente aun presente sintomatología típica de infección urinaria y su sedimento urinario tenga un número significativo de piocitos y bacterias, lo cual podría indicar que el antibiótico está funcionando como bacteriostático mas no como bactericida, esta es la razón de esta investigación ya que este tipo de casos es un problema de salud pública, debido a los resultados negativos que encapsulan el verdadero resultado, por lo que esto produce que la infección no sea curada del todo y pronto sea un caso crónico que no permita que el paciente recupere su salud.

La solución a este problema es la implementación de una metodología innovadora, sencilla, económica y efectiva en la cual se efectuará un cultivo microbiológico de la muestra de orina que contenga al patógeno y al antibiótico, posteriormente con la adición de carbón activado, como removedor de antibióticos, permitirá la recuperación de la vitalidad del patógeno para consecuentemente ser identificado y sometido a un antibiograma con fines de terapia adecuada

El objetivo es demostrar que el uso del removedor de antibióticos no solamente es efectivo, económico y sencillo de realizar, sino que también es importante mencionar que el insumo utilizado el cual es carbón activado no afecta, ni inhibe el crecimiento bacteriano, pero si reacciona como adsorbente del antibiótico contenido en la muestra, permitiendo la proliferación de las bacterias que causan la infección urinaria.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Implementar una metodología que emplea el carbón activado como removedor de antibióticos en urocultivos.

Objetivos Específicos:

- Establecer el método que permite el crecimiento bacteriano en urocultivos, de muestras de pacientes diagnosticados con ITU y tratamiento transitorio de gentamicina sometido previamente a carbón activado y demostrar su efectividad.
- Determinar a qué concentración el carbón activado es útil como removedor de antibióticos.
- Demostrar la influencia del antibiótico transitorio en los resultados del urocultivo sin tratamiento previo de carbón activado.
- Aislar e identificar los agentes patógenos que causan infecciones urinarias, y su incidencia.
- Demostrar que la metodología que emplea carbón activado como removedor de antibióticos, es económica.

HIPOTESIS

Dado que muchas veces pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria, reciben un tratamiento transitorio y este no ayuda a mejorar sus síntomas, se realiza un urocultivo y este resulta en un “falso negativo” debido a la influencia del antibiótico, es posible que implementando una metodología que emplea el carbón activado como removedor de antibióticos los resultados puedan ser positivos, de este modo se identifique a la bacteria patógena, se realice un antibiograma que permitirá una antibiótico-terapia adecuada.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1. CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Un cultivo microbiológico es un método que permite que las bacterias puedan proliferarse, teniendo en su contenido una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, hacen posible este hecho. Son esenciales e importantes en el laboratorio de microbiología, por lo que es importante que haya un control al momento de su fabricación, preparación, conservación y uso, lo que asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos ⁽¹⁾.

Es utilizado como el método principal para establecer un diagnóstico preciso al poder identificar a los agentes causales de enfermedades.

1.1.Utilidad:

Para la identificación para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, es necesario identificar al agente patógeno que está causando la enfermedad, para tratarla y

eliminarla de forma más rápida y efectiva, sin perjudicar al paciente; también permite conocer el nivel de evolución de la infección y establecer su eliminación ⁽²⁾.

Asimismo permite aislar e identificar bacterias u hongos que aunque no estén produciendo directamente enfermedad en el sitio donde se encuentran y esté provocando una colonización, lo cual pueda causar daño futuro o empeorar otras patologías (por ej. asma, urticaria, rosácea, prurito, acné, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia por deficiencia de hierro, entre otras patologías) ⁽³⁾.

Con el cultivo microbiológico se logra aislar e identificar al agente patógeno causante de la infección por lo que es importante la corroboración mediante un estudio clínico y poder realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (antibiograma), y hacer conocer cómo los antibióticos afectan al microorganismo que está produciendo la enfermedad, y de acuerdo a ello sea posible escoger el más efectivo y así optimizar el tratamiento de las infecciones, lo que hace que el tratamiento sea aun más específico según cada paciente.

1.2. Clasificación de los medios de cultivo:

1.2.1. De acuerdo a la naturaleza de sus constituyentes:

Medios naturales o complejos: están constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal, las que normalmente son complementadas por la adición de minerales y otras sustancias. En ellos los componentes y cantidades exactas presentes en ellos no son precisamente conocidas ⁽³⁾.

Medios definidos o sintéticos: son los medios que presentan una composición química definida cuali y cuantitativamente.

1.2.2. De acuerdo al uso del medio de cultivo:

- Medios de enriquecimiento: son medios que favorecen el crecimiento de microorganismos en general. Permiten la proliferación de un número mayor de microorganismos.

- Medios selectivos: usualmente contienen uno o más componentes inhibidores del crecimiento de los microorganismos con excepción de los que se quieren obtener en el cultivo ⁽⁴⁾. Están diseñados para el aislamiento de bacterias específicas.
- Medios diferenciales: Son medios que llevan indicadores de productos derivados de la actividad microbiana de los microorganismos. No contienen ningún tipo de sustancia con actividad antimicrobiana. Permiten mostrar características fisiológicas de los microorganismos y así poder identificarlos ⁽⁵⁾.

1.2.3. De acuerdo a su estado físico:

- Líquidos
- Semisólidos
- Sólidos

1.2.4. Preparación:

Los medios de cultivo se preparan usualmente en un laboratorio a partir de cada uno de sus constituyentes básicos si este no viene ya en polvo para lo cual se efectuará una rehidratación del medio, estos productos son asequibles comercialmente (medios de cultivo deshidratados) ⁽⁶⁾. Generalmente se prefiere el uso de los medios de cultivo deshidratados porque, además de tener una composición establecida, son fáciles de preparar y se tiene mayor probabilidad de obtener resultados reproducibles ⁽⁷⁾.

2. CARBÓN ACTIVADO

Carbón activado es un término genérico que describe una familia de adsorbentes carbonáceos altamente cristalinos y una porosidad interna altamente desarrollada^(a). Es un material que se caracteriza por contener una cantidad muy grande de microporos los cuales son poros menores a 1 nanómetro de radio. A causa de su alta

microporosidad, un solo gramo de carbón activado puede tener una superficie de 500m² o más.

2.1.Características:

El carbón activado puede tener un área superficial mayor de 500 m²/g, siendo fácilmente alcanzables valores de 1000 m²/g. Algunos carbones activados pueden alcanzar valores superiores a los 2500 m²/g.

Al observar con un microscopio electrónico, el carbón activado posee una estructura que muestra una gran cantidad de grietas y recovecos. En un nivel más profundo se encuentran zonas donde hay pequeñas superficies planas parecidas al grafito, las cuales están separadas solamente por algunos nanómetros, formando microporos. Estos microporos facilitan las condiciones que permiten su característica principal que es la adsorción^(a).

2.2.Proceso del carbón activado:

El proceso de producción del carbón activado se lleva a cabo a partir de la producción de carbón a partir de materiales como: cáscara de coco, cortezas de almendras, brea, petróleo, turba, nueces, palmeras u otras maderas, y carbón mineral⁽⁸⁾.

Este proceso se puede dividir en dos tipos:

Activación física (térmica): se lleva a cabo en dos etapas, la primera es la carbonización

que erradica elementos como hidrógeno y oxígeno para dar lugar a una estructura porosa con recovecos y la segunda etapa de gasificación del carbonizado en la cual se expone a una atmósfera oxidante que suprime los productos volátiles y átomos de carbono, produciendo un aumento en el volumen de poros y la superficie específica. Esto se realiza en distintos hornos a temperaturas cercanas a 1000°C.

Activación química: el material se impregna con un agente químico que puede ser ácido fosfórico o hidróxido de potasio y luego se calienta en un horno a 500-700°C. Los agentes químicos reducen la formación de material volátil y alquitranes,

aumentando el rendimiento del carbón. Por último, para la eliminación de ácido, el producto resultante es lavado ⁽⁸⁾.

2.3.Aplicaciones

2.3.1. Uso médico

El carbón activado es utilizado para tratar envenenamientos y sobredosis por ingestión oral ya que actúa como agente adsorbente.

Previene la absorción de la sustancia tóxica en el estómago ⁽⁹⁾.

Gracias a su propiedad adsorbente, también es utilizado en farmacia para cortar un proceso diarreico.

2.3.2. Filtros para aire, gas comprimido y purificar el agua

Los filtros con carbón activado se utilizan generalmente en la purificación de aire, agua y gases, para quitar vapores de aceite, sabores, olores y otros hidrocarburos del aire y de gases comprimidos ^(a).

2.3.3. Usos ambientales

- Recuperación de aguas superficiales y subterráneas
- Tratamiento de agua potable
- Purificación de aires
- Protección personal y colectiva (ej. máscaras de gas)

2.4.ARKOCAPSULAS CARBÓN VEGETAL ACTIVADO:

Composición de Arkocápsulas carbón vegetal:

Cada cápsula contiene 225 mg de carbón activado como principio activo.

Los demás componentes (excipientes) son:

- Gelatina utilizado para la cápsula.
- Almidón de maíz: es un polímero natural utilizado en la preparación de fármacos, cumple la función de aglutinante es decir es un agente que imparte cualidades cohesivas a los materiales en polvo y ayuda a obtener un libre flujo en las formulaciones sin que el tamaño y la dureza del principio activo se vea afectado durante la producción del fármaco ⁽¹⁰⁾.
- Estearato de magnesio: es un excipiente utilizado dentro de la fabricación de medicamentos en polvo, tabletas y cápsulas. En el caso de tableteo, este puede cumplir la función de lubricante sólido, como agente aglutinante, lo cual evita que se peguen los ingredientes durante la producción de comprimidos sólidos ^(11,12).

Aspecto del producto y contenido del envase:

Este medicamento se presenta en cápsulas duras, las que están envasadas en frascos de polivinilo marrón, cerrado con tapón de polietileno de baja densidad. Cada frasco contiene 50 cápsulas ^(b).

Titular de la autorización de comercialización y responsable de la fabricación:
ARKOPHARMA, S.A.

3. INFECCIÓN URINARIA

La infección urinaria, o infección del tracto urinario (ITU), es la presencia de agentes patógenos en la orina que causan infección en la uretra, la vejiga, el riñón o la próstata ⁽¹³⁾. La sintomatología que acompaña a una infección de tracto urinario es la que componen el síndrome miccional, así mismo es importante mencionar que las infecciones urinarias también pueden ser asintomáticas ^(d).

Desde el punto de vista microbiológico, cuando se manifiesta un crecimiento de 100.000 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) en una muestra de orina correctamente recogida existe una infección urinaria. Si existen síntomas urinarios o piuria se considera ITU con valores incluso menores a 100.000 UFC/mL. Cuando el recuento de colonias es superior a 10.000 UFC/mL y hay más de dos especies de bacterias indica que hubo contaminación de la muestra. Se considera

bacteriuria asintomática cuando, en ausencia de síntomas, hay más de 100.000 UFC/mL de un microorganismo en cultivo ⁽¹⁴⁾.

Ante una sintomatología común de ITU excluyendo causas como vaginitis, uretritis o prostatitis, se confirma la presencia de leucocitos en rango mayor a 10 x campo, en un sedimento urinario se puede hacer el diagnóstico de infección urinaria que implica la realización de un cultivo de orina, para identificar el microorganismo causante y establecer un tratamiento basado en el antibiograma ^(2,15).

3.1.Epidemiología

La incidencia de casos nuevos en un año, se acerca al 5% en el sexo femenino en los grupos de menor edad. A mayor edad se eleva esta tasa se eleva alrededor del 40%, aunque son infrecuentes las infecciones del tracto urinario en los hombres jóvenes, su riesgo se vuelve similar a la de las mujeres con el paso de los años ⁽¹⁶⁾.

Existen niveles altos de reincidencia para pacientes con infecciones del tracto urinario. Uno de ellos son la aparición de casos agrupados que se encuentra en lactantes y niños pequeños, ya que todavía no reciben tratamiento de posibles malformaciones del tracto urinario. Asimismo, en este grupo de edad se vuelven constantes las infecciones repetidas con escaso intervalo. Otro nivel de reincidencia se halla entre las mujeres adultas, probablemente por el aumento en la actividad sexual y una mayor susceptibilidad durante el embarazo. Las personas de la tercera edad de ambos sexos, son el tercer grupo con mayor presencia de la enfermedad, las razones de ello son el adelgazamiento de las vías urinarias por la degeneración relacionada con la edad, tales como la hiperplasia prostática en hombres y trastornos del útero en mujeres ^(5,17).

3.2.Etiología de la infección de la orina

Diversos gérmenes distintos pueden invadir el tracto urinario, pero los microorganismos más frecuentes son los bacilos Gram negativos como:

- *Escherichia coli*: provoca el 90% de las infecciones urinarias agudas en general ⁽¹⁸⁾.

- *Proteus* y *Klebsiella*: son las bacterias aisladas con más frecuencia en personas con litiasis.
- *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas*.
Entre las bacterias Gram positivas encontramos:
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Streptococo agalactiae*
- *Streptococo Beta hemolítico del grupo D de Lancefield (Enterococo)* ⁽¹⁹⁾.

3.3. Patogenia

Entre un 95 y 98% de casos, una infección del tracto urinario se produce con un incremento de agentes microbianos alojados a lo largo de la uretra. En los demás casos, como la infección del tracto urogenital se instala a través del torrente sanguíneo. El agente patógeno usualmente bacterias, en la mayoría de los casos procede del mismo cuerpo, fundamentalmente de la flora intestinal, a través de la apertura exterior de la uretra, viajando desde la uretra hasta la vejiga, donde se instala y se produce una inflamación de la vejiga llamada cistitis ^(2,13).

Cuando la colonización asciende en dirección al riñón, puede causar una inflamación de la pelvis renal, incluyendo la infección del propio tejido renal llamado pielonefritis, y, por último, colonización de la sangre (urosepsis) ⁽²⁰⁾.

Factores que aumentan el riesgo de una ITU:

- Actividad sexual
- Embarazo
- Obstrucción urinaria
- Contaminación en SSHH

3.4. Factores genéticos

El agente patógeno, para superar los mecanismos de defensa del hospedador, debe valerse de elementos propios. Los anticuerpos IgA que se encuentran en el urotelio o

epitelio del tracto urinario estos, actúan como un mecanismo de defensa que consiste en el flujo de líquido durante la micción haciendo que la vejiga en individuos sanos se mantenga estéril. La orina de por sí es eficaz únicamente frente a unas pocas especies bacterianas y puede incluso promover el crecimiento de muchos microorganismos patógenos ⁽²¹⁾.

Los factores que facilitan el acceso del germen durante el ascenso urinario incluyen la formación de una cápsula bacteriana, la producción de hemolisina para la disolución de los glóbulos rojos y la formación de filamentos pilosos celulares que permiten la fijación de las bacterias a la superficie del tejido de las vías urinarias. La mayor densidad de receptores sensibles a estos pili se encuentra en la entrada de la vagina, la vejiga, uréter y pelvis renal ⁽²²⁾.

3.5. Clasificación⁽²⁰⁾

Según donde se localiza la infección en el tracto urinario se considera:

- Uretritis: localizada en la uretra.
- Cistitis: localizada en la vejiga urinaria.
- Pielonefritis: localizada en los riñones.

Basado en la sintomatología ⁽²³⁾, se clasifican las infecciones urinarias en:

- Infección urinaria complicada y sus variedades
- Infección urinaria asociada a colocación de catéteres
- Infección urinaria en hombres
- Cistitis no complicadas en mujeres jóvenes
- Cistitis recurrentes en mujeres jóvenes
- Pielonefritis agudo no complicada en mujeres jóvenes
- Bacteriuria asintomática

3.6. Diagnóstico

El diagnóstico de una infección urinaria está basado en la realización de urocultivos

que muestran más de 100 mil unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de orina, el cual es un valor con gran especificidad que revela el diagnóstico de una verdadera infección, aún en pacientes asintomáticos ^(4,22). Sin embargo, en estudios recientes se ha establecido que un tercio o más de los casos de mujeres asintomáticas tenían UFC por debajo al acostumbrado de 100 mil por mililitro. Lo que mostró que un recuento de 100 UFC/mL es un valor altamente que predice una cistitis en mujeres asintomáticas ⁽¹³⁾.

Algunos laboratorios clínicos no reportan recuentos menores de 10 mil UFC/mL de orina. Debido a ello, las infecciones urinarias causadas por un reducido número de bacterias, muchas veces no llegan a ser detectadas.

3.7. Tratamiento

En base a una selección de antibióticos determinados como tratamiento de ITU se menciona a la terapia empírica y por diagnóstico microbiológico según la bacteria identificada.

Terapia empírica de antibióticos: si se trata de una cistitis no complicada, se trata empíricamente por tres días, en el caso de ser nitrofurantoina 7 días y fosfomicina un solo día ⁽²⁴⁾.

El tratamiento depende de:

- a. Los microorganismos que producen ITU con mayor frecuencia y sus respectivos patrones de sensibilidad en el medio.
- b. Las cualidades del antibiótico (espectro de actividad, absorción, distribución y eliminación).
- c. Tipo de ITU.
- d. Características del huésped ⁽²⁵⁾

Para iniciar un tratamiento empírico se opta por las fluoroquinolonas, las más utilizadas y conocidas son el levofloxacin y ciprofloxacino, la otra opción para este tipo de tratamiento puede ser amikacina y gentamicina el porqué de estas opciones es porque se ha demostrado que eliminan al microorganismo de los reservorios (intestino, vagina y uretra) con lo que disminuyen las recurrencias ⁽²⁶⁾.

Las opciones de tratamiento en mujeres jóvenes con diagnóstico presuntivo de ITU que presentan cistitis no complicada se les da una dosis de antibiótico-terapia o cursos de tres a siete días con antibióticos ⁽²⁷⁾. El tratamiento por más de siete días, aunque efectivo, está asociado a presentar efectos secundarios por lo que no suele indicarse más tiempo. El tratamiento con una sola dosis ofrece la ventaja de costos reducidos, mejor adherencia al tratamiento y una efectividad comparada a otros regímenes ⁽²⁸⁾.

Terapia basada en el diagnóstico microbiológico: cuando se realiza un urocultivo para detectar al agente patógeno causante de la infección urinaria, se concluye con un antibiograma en el cual se incluyen discos de sensibilidad de antibióticos que sirven para determinar posteriormente que antibióticos serán útiles en la terapia para la infección, para lo cual se seleccionan diferentes antibióticos que cubren tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas las más comunes son la nitrofurantoina, el levofloxacin, ciprofloxacino, amikacina, gentamicina, sulfametoxazol + trimetoprim, norfloxacino, doxiciclina, clindamicina, etc. ⁽²⁹⁾

4. UROCULTIVO Y ANTIBIOGRAMA

4.1. Urocultivo

El urocultivo es el cultivo de orina que se realiza para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática en pacientes con riesgo de infección.

Está basada en la presencia de un número significativo de bacterias (generalmente >100.000 UFC/mL.)

La piuria y la bacteriuria, son datos muy importantes para el diagnóstico de infección del tracto urinario, ya que prácticamente está presente en todas las infecciones urinarias. Una excepción es la bacteriuria asintomática en la que la piuria puede estar ausente ⁽²⁸⁾.

A través de distintos procesos bioquímicos se realiza la identificación de las bacterias según sea el crecimiento en los medios de cultivo selectivos de Gram

positivos y Gram negativos, lo cual permitirá la selección de antibióticos útiles para el proceso del antibiograma ⁽³⁰⁾.

4.2. Agentes etiológicos a investigar rutinariamente:

- *Escherichia coli*
- *Enterobacter spp.*
- *Staphylococcus spp.*
- *Klebsiella spp.*
- *Serratia spp.*
- *Enterococcus spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- *Proteus spp.*
- *Acinetobacter spp.*
- *Streptococo grupo B* (imprescindible en embarazadas)

Toma de muestras

La muestra deberá ser tomada con los genitales aseados y del segundo chorro de la primera orina del día en un frasco estéril ⁽¹³⁾.

4.3. Análisis directo de sedimento de orina (microscópico)

El sedimento urinario se obtiene tras la centrifugación de la muestra de orina, este consta de un medio diagnóstico auxiliar de infección urinaria ⁽³¹⁾. El procedimiento elegido debe permitir observar:

- **Células epiteliales:** la presencia en cantidad regular o abundante indica la inflamación del tracto urinario.
- **Leucocitos:** que muestran el indicio de presencia de infección, sobre todo la presencia de piocitos (acumulación de leucocitos).

- **Hematíes:** la presencia significativa de hematíes puede mostrar un posible daño renal o de tracto urinario evidenciado por una hemorragia.
- **Cristales:** la presencia de algunos cristales (como los uratos amorfos) podría indicar que el paciente tuvo fiebre lo cual confirma la infección.
- **Cilindros:** cuyo origen son las estructuras del riñón, algunos tipos de cilindros como los hialinos, nos muestran diferentes niveles de inflamación, otros como los leucocitarios infección renal, hemáticos hemorragia, céreos insuficiencia renal o rechazo a trasplante renal.

También se tiene un acápite denominado OTROS, donde se considera la presencia de parásitos como *Trichomonas*, hongos que suelen ser *Cándida*, y piocitos que son acúmulos de leucocitos muertos ⁽³²⁾.

Es importante mencionar que todo urocultivo debe estar acompañado siempre de un sedimento urinario de la muestra, lo que facilita la apreciación profesional de la magnitud del problema.

4.4. Antibiograma

El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones ⁽³³⁾.

Se considera como antimicrobiano cualquier sustancia con capacidad de matar o evitar la proliferación de los microorganismos y que sea útil como tratamiento en los pacientes con infección estos pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos (modificación química de un compuesto natural) ⁽³³⁾. La historia moderna de los antibióticos comienza con el descubrimiento de sustancias presentes en unos microorganismos capaces de matar a otros microorganismos. El uso de antibióticos produjo un avance enorme en la esperanza de recuperación de las personas que padecían procesos infecciosos, aunque también aumentaron los niveles de resistencia antibiótica ⁽³⁴⁾.

4.4.1. Utilidades:

La utilidad básica del antibiograma es la prescripción de un tratamiento antibiótico adecuado al paciente. Es necesario conocer si el microorganismo responsable de la infección posee mecanismos relacionados a la inmunidad frente a algún antibiótico para no incluirlo como terapia. En cuanto al tratamiento el antibiograma no sólo es necesario en la prescripción, también resulta útil en el seguimiento y en la confirmación de tratamientos empíricos. En ocasiones la enfermedad infecciosa puede resultar grave y se comienza el tratamiento antes de conocer los datos de sensibilidad de la cepa. El antibiograma tiene que confirmar, o en su caso corregir el tratamiento ^(35, 36).

5. MECANISMOS ACCIÓN DE FARMACOS UTILIZADOS EN ANTIBIOGRAMA

Es importante conocer los mecanismos mediante los cuales los fármacos producen sus acciones ⁽³⁷⁾. (Figura 1)

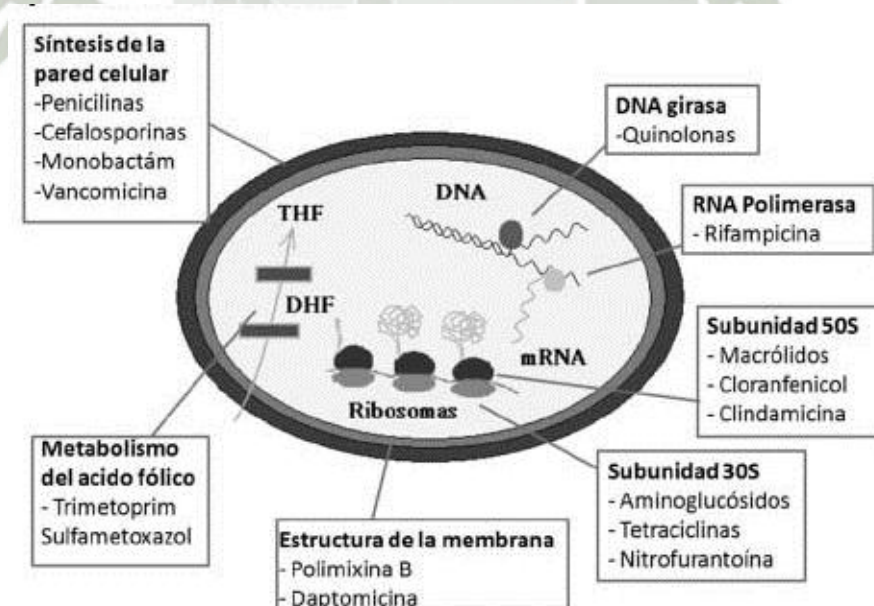


Figura 1: Mecanismo de acción de los antibióticos ^(e)

• **Aminoglucósidos:**

Amikacina: bactericida. Inhibe la síntesis proteica bacteriana.

Gentamicina: bactericida. Penetra en la bacteria y se une a las subunidades ribosomales 30S y 50S inhibiendo la síntesis proteica. (Figura 2)

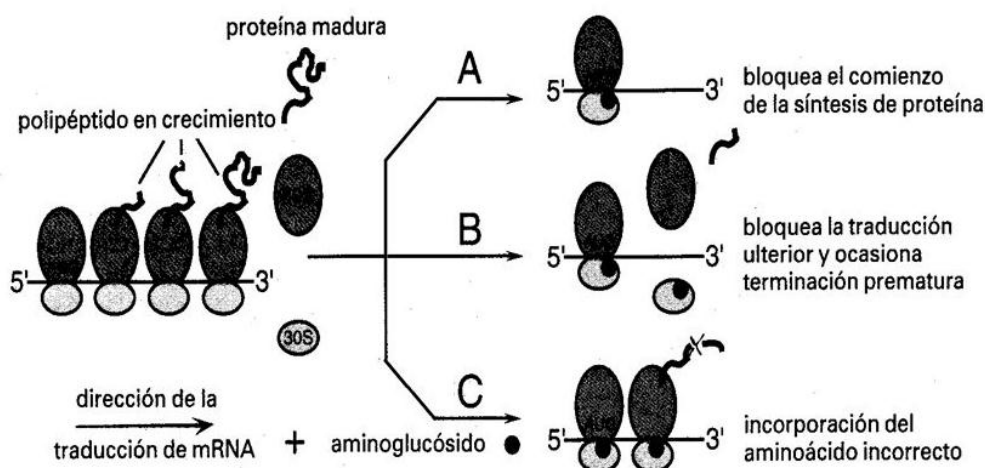


Figura 2: Mecanismo de acción de la gentamicina ⁽³⁸⁾

• **Nitrofuranos^(f):**

Nitrofurantoina: bactericida. Interfiere en los procesos enzimáticos de respiración celular, metabolismo glucídico y síntesis de pared bacteriana ⁽³⁹⁾.

• **Quinolonas^(f):**

Ácido nalidíxico: bactericida. Interfiere con la ADN-polimerasa bacteriana, interfiriendo con la síntesis de ADN. La resistencia al ácido nalidíxico se suele desarrollar con bastante rapidez.

Ciprofloxacino: bactericida. Interfiere en la replicación de ADN bacteriano por inhibición de la ADN-girasa y topoisomerasa IV bacterianas.

Levofloxacin: bactericida. Actúa sobre el complejo ADN-ADN girasa y sobre la topoisomerasa IV ⁽³⁹⁾.

Norfloxacin: bactericida, inhibidor de la ADN-girasa bacteriana.

• **Penicilinas^(f):**

Amoxicilina: bactericida. Inhibe la acción de peptidasas y carboxipeptidasas impidiendo la síntesis de la pared celular bacteriana.

Amoxicilina + ácido clavulánico: bactericida. Bloquea síntesis de pared celular bacteriana e inhibe β -lactamasas. Amplio espectro.

6. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en el *Mycoplasma* en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos), pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra ^(41,42).

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción.

Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

1) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En los Gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las Gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también

el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas

2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos)⁽³⁶⁾. Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos.

6.1. RESISTENCIA BACTERIANA A AMINOGLUCÓSIDOS (GENTAMICINA)

El principal mecanismo de resistencia en enterobacterias, *Pseudomonas*, *estafilococos* y *Enterococos* está representado por la inactivación enzimática mediada por plásmidos, pero existen otros mecanismos como alteraciones en la permeabilidad de la membrana y/o mutaciones cromosómicas. Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos ^(41,43).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1. MUESTRAS

Muestra Biológica:

Muestras de orina de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria obtenidas del Laboratorio Clínico Biológico Especializado Cayetano Heredia y muestras urinarias de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que por protocolo del hospital recibieron como antibiótico-terapia transitoria a la Gentamicina estas fueron obtenidas del Hospital Regional de Cuscode del MINSA.

2. EQUIPOS Y MATERIALES

2.1. EQUIPOS

- Autoclave 24L.ALL AMERICAN 25X
- Estufa MEMMERT
- Incubadora MEMMERTBM400
- Balanza analítica DENVER INSTRUMENT

2.2. MATERIALES

- Placas Petri de 10 x 150 mm.
- Frascos de vidrio 250mL, 500mL.
- Probetas 1000mL.
- Tubos de ensayo con tapa hermética 13 x 100 mm.
- Asas de Kolle
- Pipetas descartables estériles de 1mL.
- Tubos de ensayo para medio de diferenciación 12 x 75 mm.
- Mechero de bunsen

2.3. MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS DE IDENTIFICACION

- Agar sangre base con azida CDH MICROGEN
- Agar Mac Conkey MERCK
- Agar Mueller Hinton MERCK
- Agar Manitol Salado MERCK
- Caldo BHI MERCK
- Citrato de Simmons MERCK
- LIA MERCK
- TSI MERCK
- UREA MERCK
- SIM MERCK

2.4. REACTIVOS

- Reactivo de Kovac
- Arkocápsulas carbón activado vegetal ARKOPHARMA
- Peróxido de hidrogeno
- Plasma citratado de conejo
- Metanol

- Cristal violeta
- Alcohol - acetona
- Lugol
- Fucsina
- Aceite de inmersión

3. METODOLOGIA

Las condiciones establecidas en la metodología para la identificación de cada muestra contienen dos códigos: uno asignado por el hospital, y otro asignado para el trabajo según el orden de recepción de la muestra, cada placa de cultivo contiene dos muestras divididas por una línea en medio de la placa.

3.1 Planteamiento de distribución y proceso de muestras de orina

Antes de empezar la parte experimental del estudio, se realizó el planteamiento de la cantidad y distribución de muestras que fueron utilizadas, lo cual es importante al momento del proceso ya que esto permite que la investigación tenga una secuencia ordenada que podrá observarse a lo largo del estudio, para esto se realizó un diagrama (Figura 3) en el que se describe en primer lugar que para esta investigación se utilizó un total de 50 muestras de orina, las cuales fueron divididas en dos grupos según su contenido.

Las primeras 25 muestras de orina fueron obtenidas del laboratorio clínico biológico especializado “Cayetano Heredia” el cual es un laboratorio particular situado en la ciudad del Cusco, dichas muestras fueron seleccionadas según el criterio de inclusión mencionada más adelante (pág.30), estas muestras pertenecen a pacientes mujeres, con diagnóstico presuntivo de infección urinaria, cada muestra fue utilizada para realizar dos tipos de análisis microbiológicos, primero se llevó a cabo el procedimiento de un urocultivo tradicional realizado como “Patrón” de comparación, paralelamente se procedió con la realización del “Control positivo” el cual es un urocultivo previamente tratado con carbón activado, el motivo de esta parte de la

investigación fue demostrar que el carbón activado no altera el crecimiento bacteriano ni inhibe la proliferación de bacterias en el medio de cultivo.

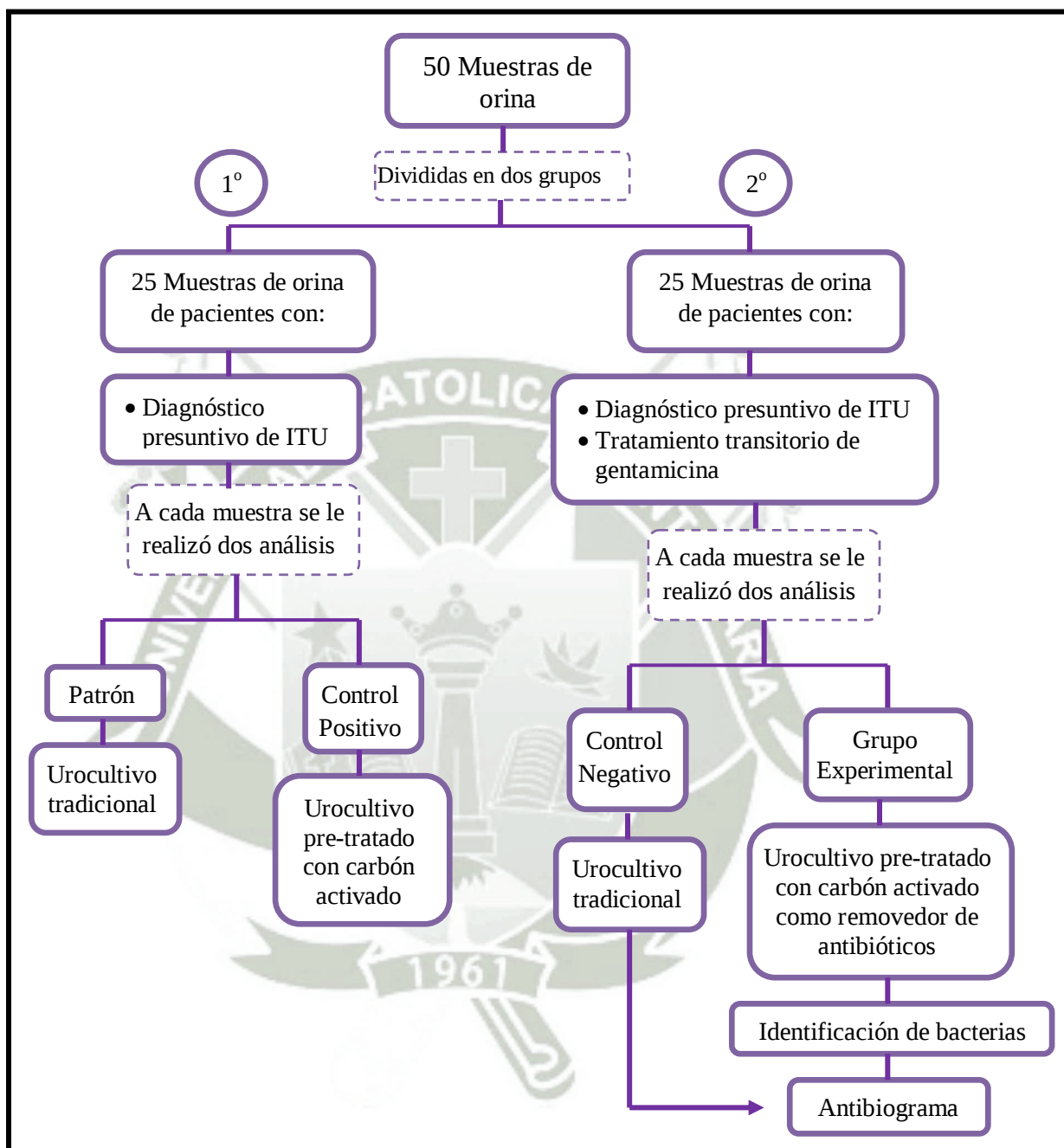


Figura 3: Diagrama de distribución y procedimiento de las muestras de orina.

El segundo grupo de 25 muestras de orina fueron obtenidas del Hospital Regional del Cusco MINSA, según el criterio de inclusión (pág.30), dichas muestras pertenecen a pacientes mujeres, con diagnóstico presuntivo de infección urinaria y

como tratamiento transitorio se les administró gentamicina, antibiótico de primera elección según el protocolo del Hospital Regional del Cusco, esta opción de tomar pacientes del hospital fue para estandarizar el proceso de la investigación.

A cada muestra se le realizó dos tipos de análisis microbiológicos, primero se consideró al “Control negativo” el cual fue realizado como un urocultivo de forma tradicional, la realización de este es importante ya que debe tener un resultado de crecimiento negativo debido a que el antibiótico está inhibiendo el crecimiento bacteriano que causa la infección urinaria, el cual es el motivo fundamental de la realización de esta investigación ya que al no haber crecimiento, no es posible la identificación de la bacteria que está afectando al paciente y por lo tanto tampoco permite la realización de un antibiograma que ayudara al médico a escoger una antibiótico-terapia adecuada que sea eficaz para restablecer la salud del paciente. En el caso de haber crecimiento bacteriano en el control negativo, es debido a la resistencia de la bacteria al antibiótico el cual es evidenciado por un antibiograma. Paralelamente se consideró al “Grupo experimental” el cual fue tratado previamente, a través de una metodología que emplea el carbón activado como removedor de antibióticos, permitiendo la proliferación de la bacteria patógena en el urocultivo, luego se llevó a cabo la identificación de la bacteria, ya que es importante observar la incidencia de las bacterias causantes de infecciones urinarias, y por último se realizó el antibiograma que describe si la bacteria es sensible o resistente frente a la gentamicina.

3.2 Preparación de material y medios de cultivo

Para iniciar el estudio se procedió a realizar la esterilización del material (Anexo 4), lo que es importante ya que se utilizó medios de cultivo preparados de manera estéril asegurando las buenas prácticas de manejo de material y de esa manera evitar la contaminación de los medios de cultivo.

Los principales medios de cultivo utilizados en la investigación fueron Agar Mac Conkey, el cual aísla específicamente a bacterias Gram negativas y Agar sangre base con azida que aísla a bacterias Gram positivas. Además de los distintos agares utilizados para la identificación de las bacterias Gram negativas.

La preparación del material estéril y de los medios de cultivo (Anexo 4) fueron realizados en el laboratorio clínico biológico especializado “Cayetano Heredia” en Cusco.

3.3. Criterios de inclusión

La selección de cada muestra de orina fue tomada según los siguientes criterios:

- Pacientes mujeres entre 20 y 40 años de edad.
- Para el primer grupo de 25 muestras de orina, pacientes con diagnóstico presuntivo de ITU.
- Para el segundo grupo de 25 muestras de orina, pacientes con diagnóstico presuntivo de ITU y tratamiento antibiótico transitorio de gentamicina por prescripción médica.
- La muestra debía ser turbia ya que era posible que sea positiva.
- A través de un sedimento urinario fue posible observar la cantidad de piocitos y bacterias que denota la presencia de infección urinaria.

3.4. Toma de muestra

La toma de muestra de orina es muy importante ya que es necesario que la muestra sea lo más estéril posible lo cual es esencial para obtener un resultado confiable.

Previo a la toma de muestra cada paciente se realizó un aseo genital con agua y jabón, seguidamente procedió a miccionar manteniendo abiertos los labios vaginales superiores, permitiendo un flujo directo al frasco estéril, la muestra fue de la primera orina del día y el segundo chorro. Una vez cerrado el frasco la muestra de orina fue utilizada para el examen directo de sedimento urinario, para el procedimiento de removedor de antibióticos y para sembrar el urocultivo.

3.5. Determinación de concentración de carbón activado útil como removedor de antibióticos

Este procedimiento fue llevado a cabo para determinar la concentración del carbón

activado útil como removedor de antibióticos y para saber si esta produce alguna alteración del crecimiento microbiano bajo las distintas concentraciones.

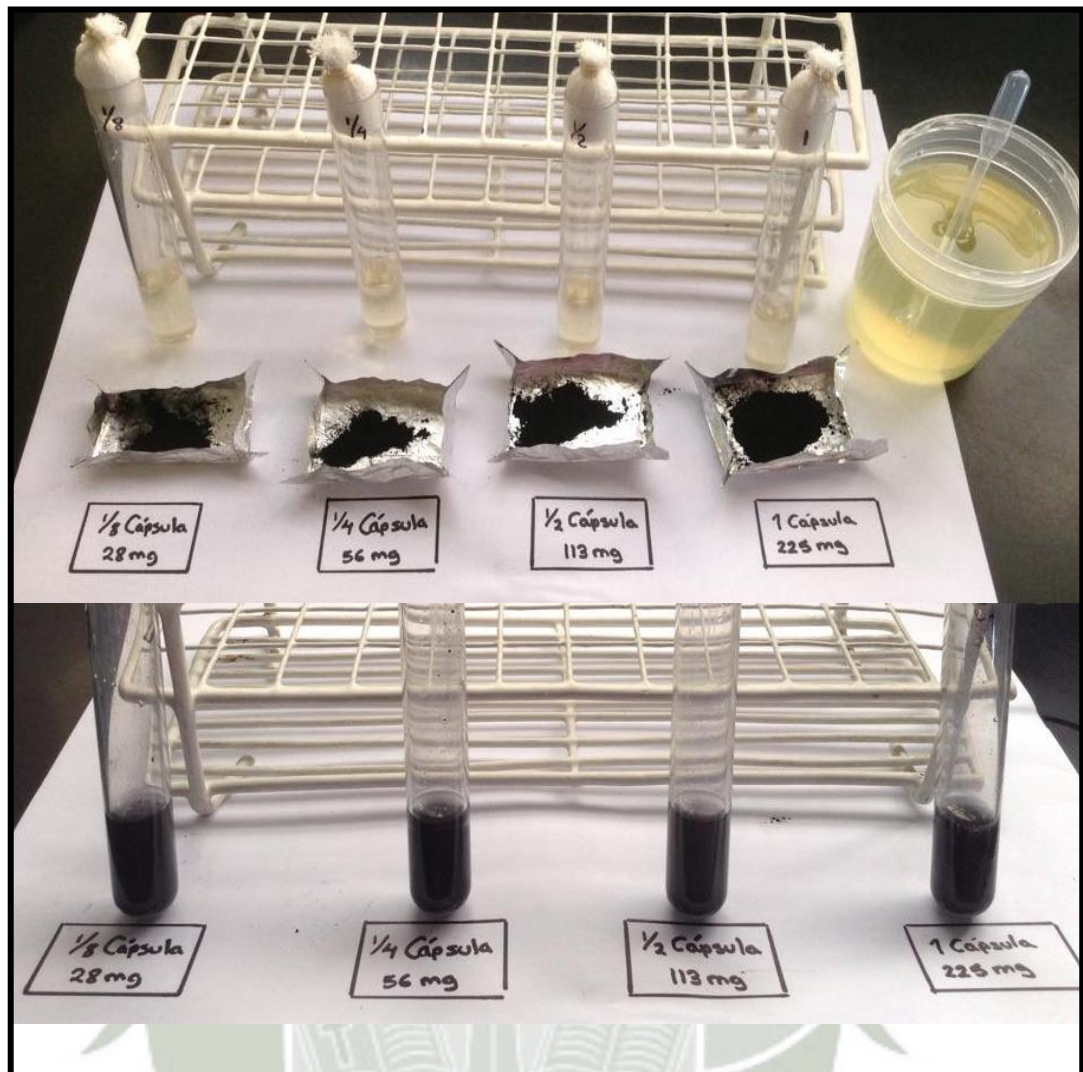
Es importante saber que el insumo utilizado como removedor de antibióticos para este estudio fue carbón activado de Arkocápsulas 225mg.

En una balanza analítica calibrada, se pesó 4 diferentes concentraciones de carbón activado, obteniendo 225mg. el cual es equivalente al contenido de una cápsula, 113mg. que es media cápsula, 56mg. que es cuarta cápsula y 28mg. que es igual a la octava parte de una capsula, seguidamente en cuatro tubos de ensayo estériles se añadió 3mL de caldo BHI, a cada tubo se le adicionó cada una de las distintas concentraciones de carbón activado previamente pesadas, posteriormente en cada tubo con una pipeta descartable se agregó 1mL de la muestra de orina de una paciente con diagnóstico presuntivo de ITU y tratamiento transitorio de gentamicina, luego se agitó levemente cada tubo y se cerró con el tapón de algodón (Figura 4) y se procedió a llevarlos a la incubadora a una temperatura de 37°C y se dejó por 24 horas.

Pasado el tiempo indicado se retiraron los frascos de la incubadora, se removió el tapón de cada tubo y frente al mechero, con el asa de Kolle calibrada, de manera vertical, se sacó una azada de orina del frasco estéril y se sembró en forma de estría en el medio

Agar Mac Conkey y de la misma manera se procedió a realizar en el medio sangre base con azida seguidamente se incubó los medios a 37°C durante 24 horas (Anexo 3.1), Una vez pasadas las 24 horas se retiró las placas de la incubadora y a través de una lámpara de luz blanca se observó el crecimiento bacteriano según cada concentración de carbón activado utilizado en cada urocultivo.

En los grupos tanto del control positivo como del grupo experimental, en el que se realizó el urocultivo con removedor de antibióticos se utilizó 28mg de carbón activado en base a esta parte de la investigación.



**Figura 4: diferentes concentraciones de carbón activado en caldo BHI
y muestra**

3.6. Procedimiento de urocultivos de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que no han iniciado un tratamiento antibiótico

Para esta parte de la investigación se utilizó 25 muestras de orina y por cada una de ellas se realizaron dos análisis microbiológicos uno como patrón de comparación y el otro como control positivo.

Para ahorrar en insumos y acelerar cada procedimiento de los cultivos se utilizó una placa dividida en dos para dos muestras de orina.

Previamente a cada muestra se le realizó un examen microscópico de sedimento urinario confirmando así la presencia de piocitos y bacterias.

3.6.1. Patrón

El patrón se realizó como comparación del control positivo el cual fue importante al momento de realizar el recuento de colonias presentes en ambos urocultivos.

Antes de la siembra agitamos el frasco para que la muestra esté homogénea, seguidamente se procedió a destapar el frasco estéril donde se depositó la muestra de orina, luego con un asa de Kolle calibrada utilizada de forma vertical se recolectó una azada de la orina y se procedió a sembrar en estría en el Agar Mac Conkey, de la misma manera se recolectó otra azada de orina para sembrar en estría en el Agar sangre base con azida (Figura 5), después se llevó los medios a la incubadora que está a 37°C y se mantuvo allí por 24 horas. Pasadas las 24 horas se procedió a retirar las placas de la incubadora, se observó el crecimiento bacteriano y a través de una lámpara de luz blanca se procedió al recuento de colonias (Anexo 3.2) lo cual es importante ya que con cada resultado se comparó el control positivo.



Figura 5: sembrado de orina con agente patógeno, en medios de Cultivo Agar Mac Conkey y Agar sangre base con azida

3.6.2. Control positivo

Paralelamente al patrón de comparación se realizó el control positivo, la razón de esta parte de la investigación es demostrar que el carbón activado no inhibe ni altera el crecimiento bacteriano de un urocultivo realizado con muestras de orina con agente patógeno causante de ITU, sin antibiótico.

Es importante que al comparar el resultado del patrón con el control positivo, a través de un recuento de colonias, el crecimiento bacteriano sea el mismo.

Para el procedimiento del control positivo se utilizó un tubo de ensayo de vidrio estéril, al cual, frente al mechero se le añadió 3mL de caldo BHI, en seguida con una pipeta descartable se adicionó 1mL de la muestra de orina previamente



Figura 6: Siembra de la orina en Caldo BHI con Carbón Activado

homogenizada, y 28 mg de carbón activado (Figura 6), luego se cerró el tubo con un tapón, posteriormente se llevó el tubo a la incubadora a 37°C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas se procede a retirar el tubo de la incubadora y frente al mechero destapamos el tubo y con el asa de Kolle calibrada en sentido vertical se toma una azada de la muestra del tubo con removedor de antibióticos y se procedió a sembrar por estría en Agar Mac Conkey, se realizó de la misma manera la toma la muestra del tubo previamente incubado y se sembró en Agar sangre base con azida (Figura 7), luego se llevó a incubación a una temperatura de 37°C dejar que permanezca en la incubadora durante 24 horas.

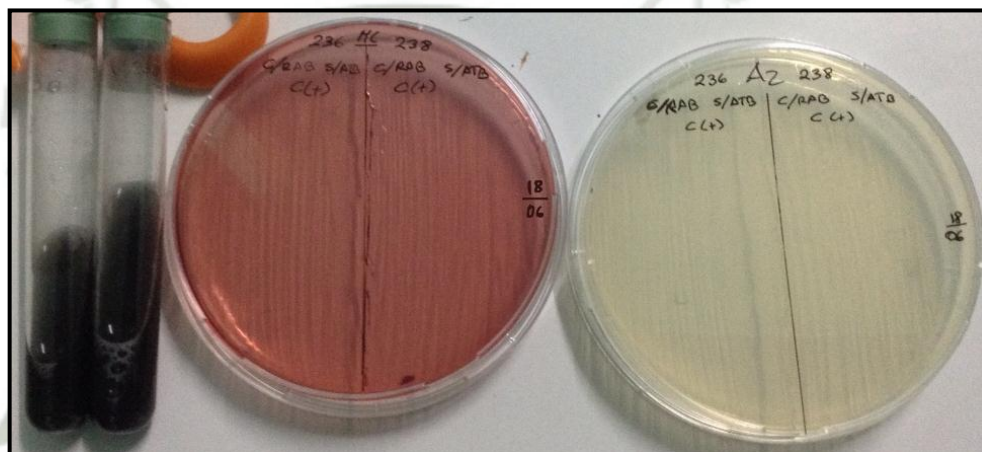


Figura 7: Control Positivo: después de la incubación del Caldo BHI, Sembrado en Agar Mac Conkey y Base de Agar Sangre con azida

Una vez pasadas las 24 horas, se procedió a observar el crecimiento bacteriano en ambos medios de cultivo y se realizó el recuento de colonias (Anexo 3.2) el cual fue significativo al momento de la comparación con el Patrón ya que el crecimiento debía ser el mismo.

3.7. Procedimiento de urocultivo de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que han iniciado un tratamiento antibiótico transitorio (gentamicina)

Para esta parte de la investigación se utilizó 25 muestras de orina con el agente

patógeno causante de ITU y gentamicina, cada muestra sirvió para realizar el control negativo y la metodología que emplea carbón activado como removedor del antibiótico.

Para ahorrar en insumos y acelerar cada procedimiento de los cultivos se utilizó una placa dividida en dos para dos muestras de orina.

Para la realización del procedimiento del estudio de esta parte de la investigación se planteó un flujograma de trabajo el cual está especificado en el Anexo 1.

Previamente a cada muestra se le realizó un examen microscópico de sedimento urinario confirmando así la presencia de piocitos y bacterias, y una tinción Gram lo cual fue útil al momento de la identificación de las bacterias presentes en el urocultivo previamente tratado con carbón activado.

3.7.1. Control negativo

El control negativo es el motivo del porqué de esta investigación ya que al realizar un urocultivo tradicional en el que la muestra contiene al agente patógeno y antibiótico, el resultado es negativo debido a que el efecto del antibiótico enmascara a la bacteria, el motivo puede deberse a que el antibiótico está actuando como bactericida o bacteriostático lo cual no puede comprobarse porque el resultado es negativo es decir no hay crecimiento bacteriano, lo cual imposibilita una posterior identificación de la bacteria y el antibiograma. El control negativo sirvió como patrón de comparación con los urocultivos realizados con carbón activado.

En el caso de que el control negativo resulte positivo, se debe a que la bacteria es resistente al antibiótico, lo que se evidencia a través de la realización de un antibiograma utilizando el antibiótico en un disco de sensibilidad para demostrar la resistencia.

El procedimiento del control negativo se lleva a cabo frente al mechero para asegurar la asepsia del proceso, antes de comenzar la siembra, se agitó el frasco que contiene la muestra de orina para homogenizarla, y con el asa de Kolle calibrada en sentido vertical se tomó una azada de la muestra de orina y se procedió a sembrar por estría en el Agar Mac Conkey y del mismo modo se tomó una azada de muestra y se sembró por estría en el Agar sangre base con azida (Figura 8), luego se llevó las

placas a la incubadora y se colocó a una temperatura de 37°C y se dejó en ella durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas se retiraron las placas de la incubadora, y se procedió a observar si en ellas presentaba crecimiento bacteriano o no, y se realizó el recuento de colonias según especificado en el procedimiento del Anexo 3.2.



Figura 8: Sembrado de la muestra de orina con antibiótico directamente a los Medios de cultivo como Control Negativo

3.7.2. Grupo Experimental

En esta parte del estudio se implementó la metodología que emplea carbón activado como removedor de antibióticos, que permitirá la revitalización y la proliferación del agente patógeno causante de la infección urinaria, posibilitando la identificación de la bacteria y la realización de un antibiograma en el que se observó la resistencia o sensibilidad de la bacteria frente al antibiótico que permite la elección personalizada de una antibiótico-terapia adecuada para restablecer la salud del paciente.

Para el procedimiento de la metodología con las muestras del grupo experimental, se utilizó un tubo de ensayo de vidrio estéril, al cual, frente al mechero se le añadió 3mL de caldo BHI, en seguida con una pipeta descartable, se adicionó 1mL de la muestra de orina previamente homogenizada, y 28 mg de carbón activado (Figura 9),

luego se cerró el tubo con un tapón y se agitó levemente el tubo con el objetivo de mezclar el medio de enriquecimiento, la orina y el carbón activado, posteriormente se llevó el tubo a la incubadora a 37°C y se mantuvo allí durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas se procede a retirar el tubo de la incubadora y frente al mechero



Figura 9: Procedimiento tratamiento de muestra de orina que contiene antibiótico con carbón activado y Caldo BHI.

destapamos el tubo y con el asa de Kolle calibrada en sentido vertical según el procedimiento indicado en el anexo 3.1, se tomó una azada de la muestra del tubo con removedor de antibióticos y se procedió a sembrar por estría en Agar Mac Conkey, realizar de la misma manera la tomó la muestra del tubo previamente incubado y se sembró en Base de Agar Sangre con azida (Figura 10), luego se llevó a incubación a una temperatura de 37°C dejar que permanezca en la incubadora durante 24 horas.

Una vez cumplido el tiempo de incubación se procedió a retirar las placas de la incubadora, se observó el crecimiento bacteriano, se colocó las placas frente a una

lámpara de luz blanca la cual permitió una mejor visibilidad de las colonias presentes en el cultivo, se observó el resultado y se procedió a realizar el recuento de colonias procedimiento que se especifica en el Anexo 3.2. Después se procedió a la identificación de la bacteria causante de infección urinaria.

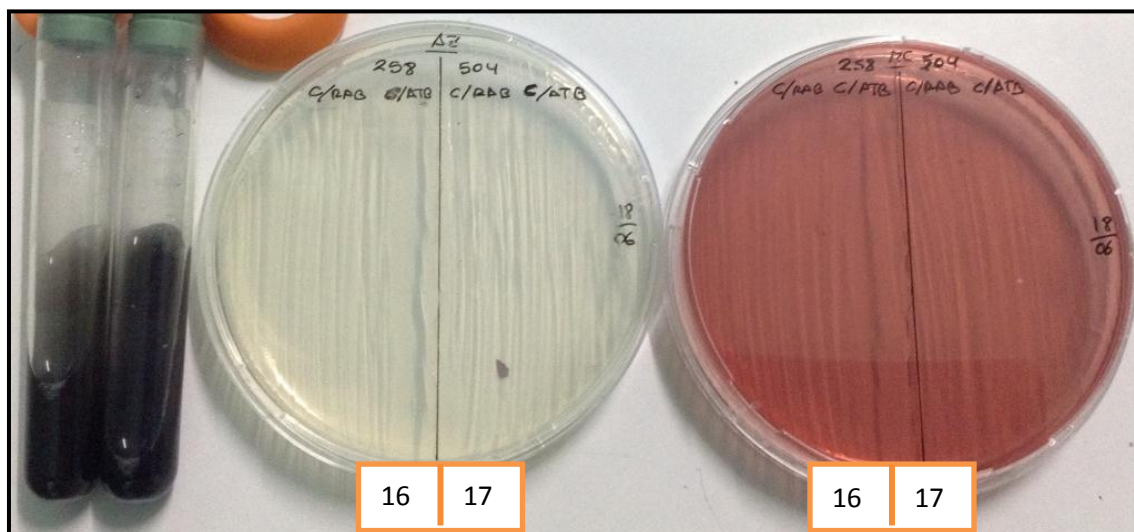


Figura 10: Muestra de orina Pre-tratada con carbón activado, sembrada en los Medios Mac Conkey y Agar sangre base con azida

Si el crecimiento bacteriano daba un recuento >100.000 UFC/ml el resultado es positivo y es así que se procedió a la identificación según el agar en el que creció. Para el crecimiento bacteriano en el medio Agar Mac Conkey debido a que este aísla a bacterias Gram negativas se realizó un diagrama de identificación especificado en el Anexo 8.2 y 8.3 según las bacterias aisladas en el estudio, para iniciar la identificación se tomó en cuenta que previo al urocultivo se realizó una tinción Gram de la muestra de orina, cuyo procedimiento se indica en el Anexo 6.1, seguidamente se procedió a utilizar las pruebas de identificación bioquímica TSI, LIA, Citrato de Simmons, UREA, SIM, previamente preparados según procedimientos especificados en el Anexo 6.2, y refrigerados para su uso posterior, se procedió a sembrar las colonias en cada medio y luego se incubó a 37°C por 24 horas. Pasado el tiempo, con ayuda de un manual de identificación (Anexo 7) se procede a observar los resultados y de acuerdo a las características en cada medio,

se identifica a la bacteria aislada.

El crecimiento de bacterias gran positivas observadas en el Agar sangre base con azida seguido de su identificación posee un protocolo propuesto en un diagrama de identificación el mismo que esta especificado en el Anexo 8.1.

Para iniciar la identificación se tomó en cuenta que previo al urocultivo, paralelo al examen microscópico del sedimento de orina, se realizó una tinción Gram de la muestra, cuyo procedimiento se indica en el Anexo 6.1, luego se procedió a la identificación de las bacterias utilizando una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano sembrado en Agar manitol salado y llevándolo a incubación a 37°C durante 24 horas, luego que paso el tiempo se retira la placa de la incubadora y se procede a observar el crecimiento, si este dio una coloración amarilla, lo cual indica que la bacteria hidrolizó el medio acidificándolo y produciéndole ese color, se toma una muestra del crecimiento bacteriano de la placa y se realiza la prueba de la catalasa, cuyo proceso esta especificada en el Anexo 6.3 ,el cual será útil para finalmente identificar la bacteria aislada, si el crecimiento presenta una coloración fucsia se deberá proceder a sembrar una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano tomado con un asa en forma de aguja para sembrar en el medio urea y después de llevar a incubación a 37°C por un tiempo de 24 horas, se procede a observar si hay presencia de crecimiento, este es un paso importante para la identificación de la bacteria Gram positiva.

Paralelamente se realizó la prueba de la coagulasa, proceso mencionado en el Anexo 6.2, la cual nos ayudó a determinar si el germen a identificar es de la familia de *Staphylococcus* o de *Streptococos*.

El siguiente paso fue la realización del antibiograma, procedimiento especificado en el Anexo 3.3, el cual fue importante ya que gracias a los resultados de sensibilidad y resistencia primero se pudo demostrar, que si existió crecimiento bacteriano en algún control negativo, se debe a la resistencia de la bacteria frente al antibiótico, y si es que no lo hubo se demostró la sensibilidad de la bacteria al antibiótico.

4. Determinación del costo de insumos, elementos y materiales básicos para la realización de la metodología

Se determinó el precio de los insumos que son el carbón activado y el caldo BHI, un elemento descartable que es una pipeta de 1 mL y un tubo de vidrio, útiles para realizar la metodología. También se tomó un costo aproximado de la esterilización del material. El presupuesto total incluye el costo del análisis por una muestra de orina.



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

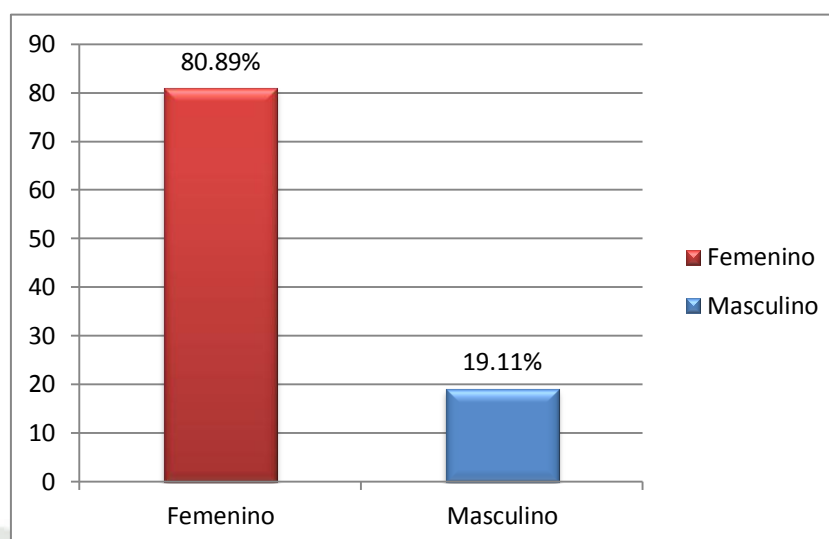
A cada muestra se le asignó un código interno de uso hospitalario y se ordenó en forma numérica de acuerdo al orden de realización de cada cultivo.

Se tomó como resultado positivo según recuento de colonias el cual esta expresado en unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

1. Resultados de recopilación de muestras de orina

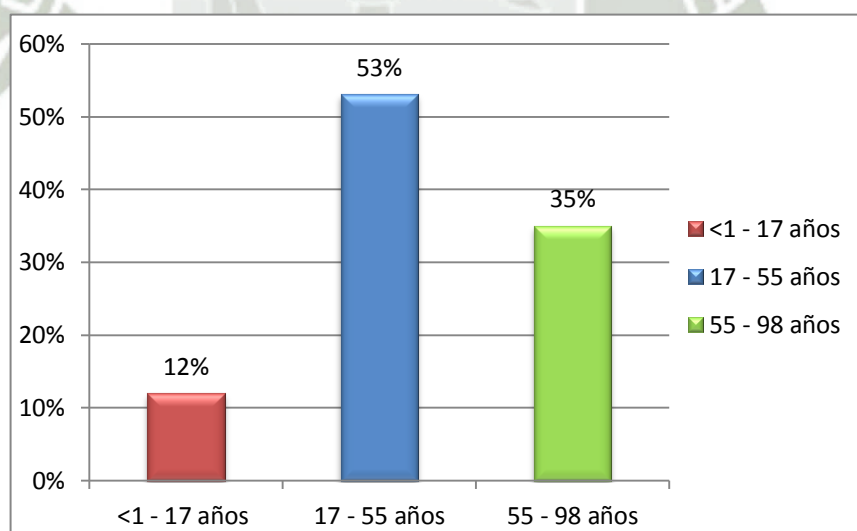
Según una investigación realizada el 2012 sobre "Sensibilidad antibiótica en urocultivos en pacientes atendidos en el hospital III Goyeneche" ⁽⁴⁴⁾, figura que la incidencia del sexo femenino en cuanto a infecciones urinarias es de un 80.89% dicha cifra supera a la incidencia de infecciones urinarias en el sexo masculino que en este caso es de 19.11%, es por la incidencia que se optó por escoger muestras de pacientes femeninas ya que la idea fue estandarizar la investigación para acaparar el grupo más afectado por esta enfermedad (Grafico1). Otro parámetro utilizado en esta parte de la investigación fue la edad de las pacientes mujeres que se tomarían en cuenta para dicho estudio, en el cual se estandarizó un promedio entre 20 y 40 años tomando como referencia una investigación realizada en Chile en el año 2008⁽⁴⁵⁾ que menciona que entre los 17 y 55 años de edad

Grafico 1: Incidencia de infección urinaria según sexo del paciente ⁽⁴⁴⁾



se encuentra mayor incidencia de infecciones urinarias en mujeres llegando a un 53% el cual supera al resto de la edad estudiada hasta los 98 años de edad es decir que desde el

Grafico 2: Incidencia de ITU en mujeres según edad



Fuente: Elaboración propia en relación a la investigación mencionada ⁽⁴⁵⁾

año de edad hasta los 17 años la incidencia de infecciones urinarias en mujeres es de un 12% y en cuanto a la edad de 55 a los 98 años es de 35% (Grafico 2).

Son diferentes los motivos de las causas de infecciones urinarias pero una de las más importantes a mencionar en esta investigación es la reinfección continua de las

pacientes debido a una cronicidad de dicha enfermedad causada por la resistencia que adquieren las bacterias a los antibióticos, por la repetitividad de la toma de un antibiótico prescrito de forma empírica.

En el protocolo del urocultivo se considera la realización de un sedimento urinario, el mismo que fue tomado como criterio de inclusión en caso de ser positivo, es decir donde se observa la presencia de piocitos y de gérmenes móviles, de acuerdo a como menciona el autor del libro atlas de sedimento urinario ⁽³¹⁾, el sedimento urinario se considera como un medio diagnóstico, es decir como un indicio de que la presencia de piocitos y de bacterias más el diagnóstico presuntivo del médico agrandan la posibilidad que el paciente este presentando un cuadro de infección urinaria.

Otro modo de estandarizar la investigación fue el de tomar pacientes hospitalizadas en el área de ginecología del hospital regional del Cusco MINSA, esta decisión fue tomada ya que a pacientes que ingresan con una sintomatología avanzada de infección urinaria se le interna para monitorizar su tratamiento, progreso y recuperación, como protocolo se les administra la gentamicina el cual es muy utilizado para ITU, este antibiótico es administrado de uso transitorio ya que no necesariamente la hora del ingreso del paciente coincide con el horario de atención del área de bacteriología donde se realizan los urocultivos, por lo cual al día siguiente se envían muestras de la primera orina del día, pero esta ya contiene al antibiótico lo cual puede provocar un falso negativo en el diagnóstico del laboratorio.

2. Resultados de la determinación de concentración de carbón activado útil como removedor de antibióticos

En los resultados obtenidos en las placas de Agar Mac Conkey y Agar sangre base con azida con las diferentes concentraciones utilizadas (28mg, 56mg, 113mg, y 225mg) **no hubo** diferencia de crecimiento bacteriano (Figura 11) evidenciado en el recuento de colonias que fue $>1 \times 10^5$ UFC/mL, en todas, por lo cual podemos concluir que todas las concentraciones de carbón activado fueron útiles como removedor de antibióticos por lo que se optó por utilizar la mínima concentración (28 mg de carbón activado) para reducir el costo del procedimiento ya que de este

modo podrá realizarse ocho procedimientos con una sola capsula de carbón activado.

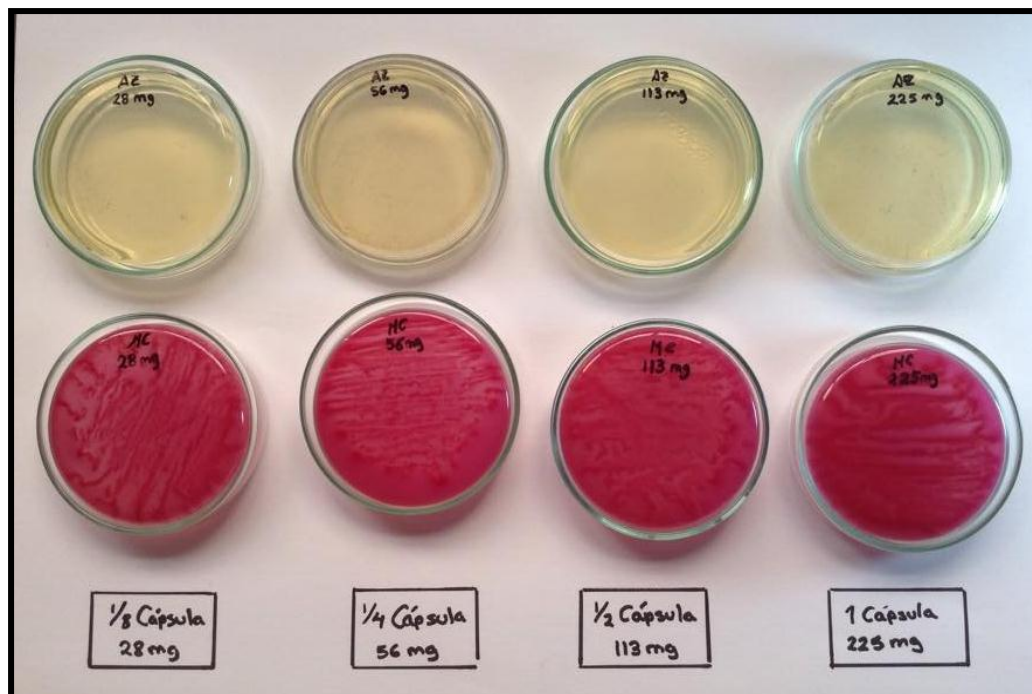


Figura 11: Resultados de Crecimiento en Mac Conkey y Agar sangre base con azida con las distintas concentraciones de carbón activado

3. Resultados del procedimiento de urocultivos de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección urinaria que no han iniciado un tratamiento antibiótico.

Los resultados obtenidos en esta parte de la investigación fueron realizados y comparados a través de un recuento de colonias (Anexo 3.2), los 25 urocultivos realizados como patrón fueron útiles para comparar el crecimiento con los urocultivos realizados con removedor de antibióticos, es decir el grupo de control positivo (Figura 12).

Según una investigación realizada en el año 2006 de infección de tracto urinario y manejo antibiótico ⁽⁴⁶⁾ estableció que un tercio o más de los pacientes, mayoritariamente mujeres sintomáticas, tiene conteos de UFC por debajo de 1×10^5 UFC/mL y presentan ITU esto se contrastó con la sintomatología, donde se observó

que tenía relación a la levedad de sus síntomas, en cambio personas que tenían un conteo mayor a esa cifra, en

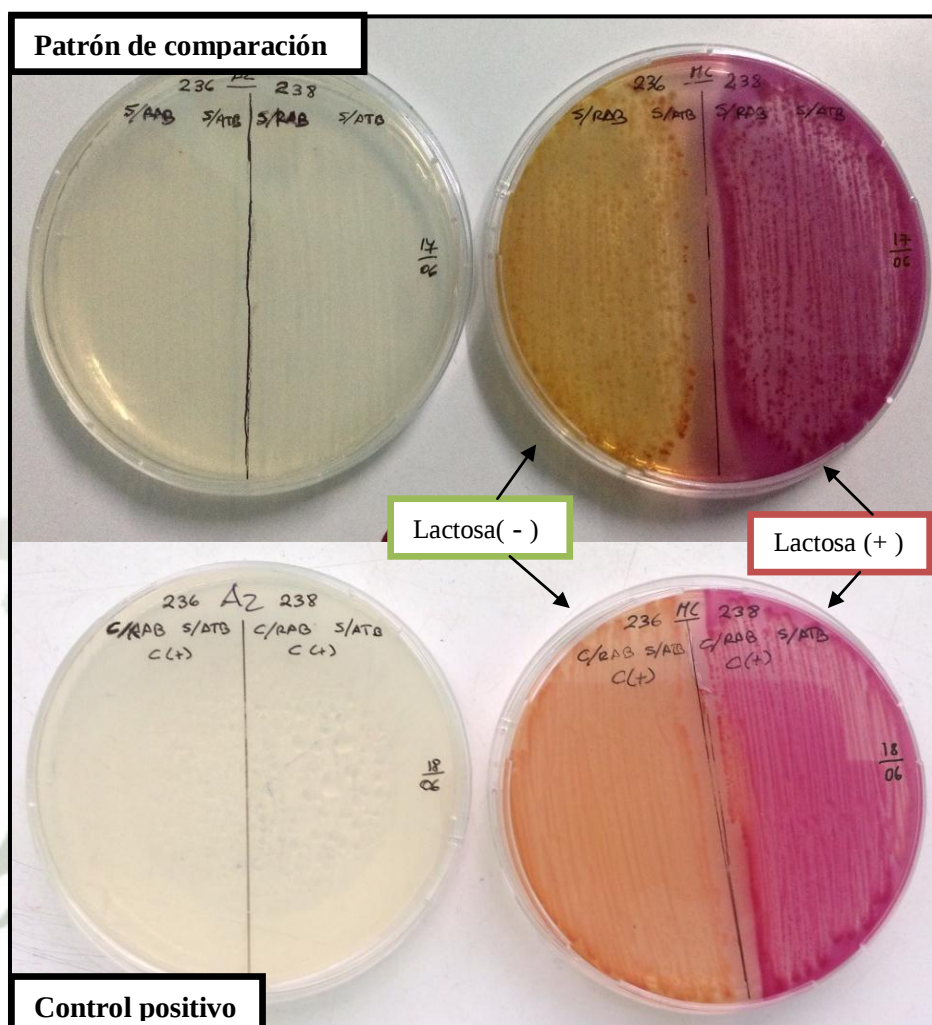


Figura 12: Resultados de crecimiento bacteriano en el urocultivo Patrón de comparación y el control positivo

relación a su sintomatología aguda, presentaban una condición grave y con probabilidad de ser una reinfección. Es por esto que se tomó en cuenta casos críticos de pacientes mujeres hospitalizadas que presentaban casos de reinfección o casos crónicos de ITU ya que es un grupo importante de personas a las que es necesario ayudar a restablecer su salud.

Tanto en el grupo Patrón como en el grupo del control positivo se encontró resultados de un crecimiento bacteriano $> 1 \times 10^5$ UFC/mL, al comparar el crecimiento bacteriano de cada placa, para cada muestra, se obtuvo que el crecimiento dio un resultado igual en cuanto a recuento de colonias, es decir como

ejemplo tomare a la muestra rotulada con el número 2 (Anexo 2.1), el cual en el Patrón de comparación hubo un crecimiento bacteriano considerado positivo con un recuento $> 1 \times 10^5$ UFC/mL en el agar Mac Conkey y al realizar el urocultivo previamente tratado con carbón activado, se obtuvo un crecimiento bacteriano considerado positivo con un recuento de $> 1 \times 10^5$ UFC/mL de este mismo modo en el 100% de los casos realizados en la comparación de ambos grupos se obtuvo el mismo resultado por lo cual se demostró que el carbón activado no produjo una alteración en el crecimiento bacteriano, y debido a que en cada caso creció solamente en uno de los agares que selecciona a los Gram positivos o Gram negativos, lo cual indica que no produjo contaminación en la otra placa, por lo que concluimos que el carbón activado tampoco contamina al medio de cultivo produciendo un falso positivo, también es importante mencionar que a pesar de la presencia del carbón activado no se inhibió la proliferación del agente patógeno demostrando que el carbón activado no adsorbe a la bacteria siendo posible el crecimiento bacteriano.

El medio de cultivo Mac Conkey (MC) aísla a bacterias Gram Negativas y el Agar sangre base con azida (AZ) aísla Gram positivas, lo que es importante mencionar ya que los resultados en esta parte de la investigación indicó que el 76% de las infecciones urinarias son causadas por Gram negativos y el 24% por Gram positivos, lo cual se especifica en la Tabla 1.

TABLA 1

Resultados de la cantidad de urocultivos positivos según los medios de cultivo Mac Conkey y Agar sangre base con azida en muestras de pacientes con infección urinaria sin tratamiento antibiótico

Medios de Cultivo	POSITIVOS	
	#	%
MC*	19	76
AZ*	6	24

*MC: Agar Mac Conkey

*AZ: Agar sangre base con azida

4. Resultados del procedimiento de urocultivos de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo infección urinaria que han iniciado un tratamiento antibiótico transitorio (gentamicina)

Los resultados detallados del crecimiento bacteriano obtenido en esta parte de la investigación, según el recuento de colonias está especificado en el Anexo 3.2.

Para explicar los resultados en cuanto a ambos grupos, tomamos las muestras 16 y

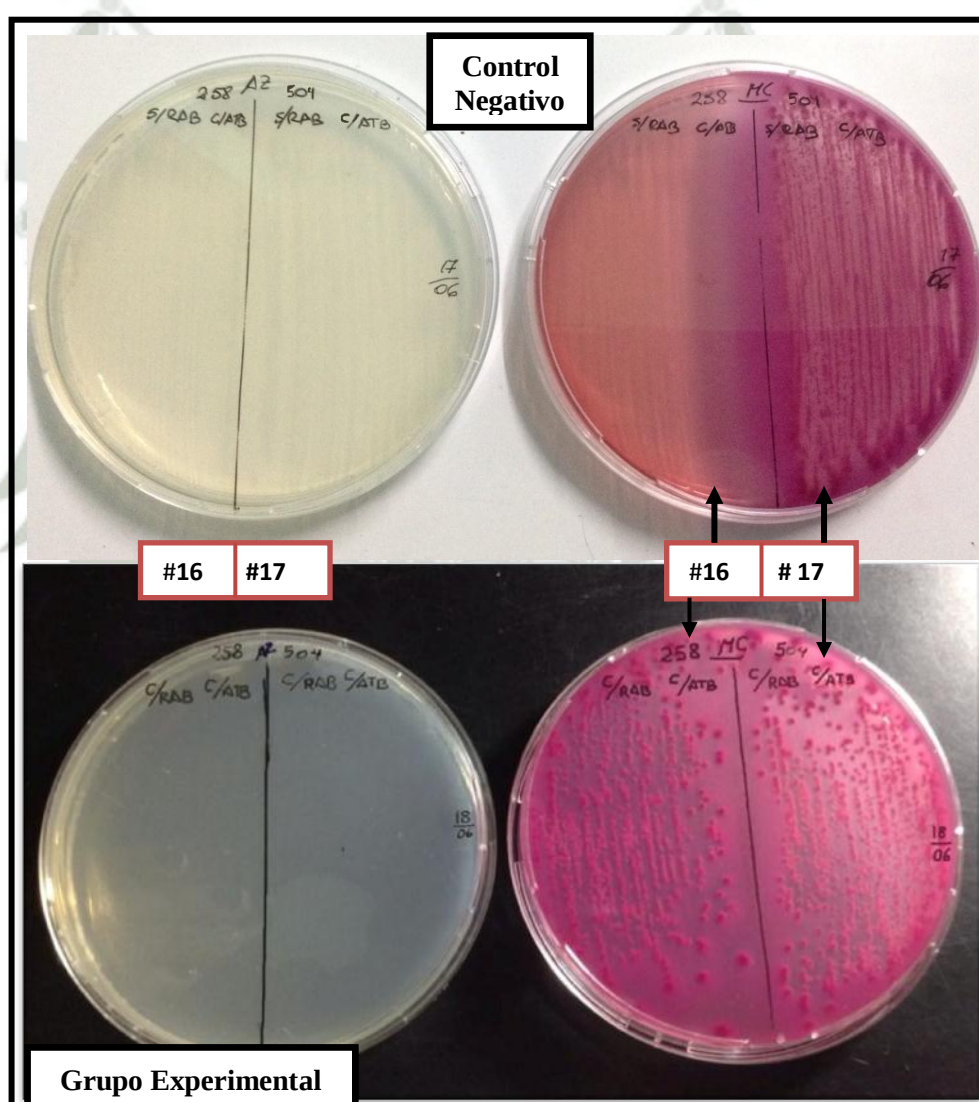


Figura 13: resultados de comparación entre el control negativo y el grupo experimental

17 como ejemplo de comparacion, la Figura 13 revela que en la muestra 16 el resultado del control negativo no se observa crecimiento bacteriano y en el urocultivo realizado con la misma muestra para el grupo de experimentacion si presenta crecimiento lo cual demuestra que el carbón activado sirvió como removedor de antibiótico y permitió la proliferacion bacteriana. En cambio en la muestra 17 se observa que el control negativo presenta crecimiento bacteriano a pesar del antibiótico y en el urocultivo realizado con carbón activado tambien hubo presencia de crecimiento bacteriano.

La presencia de crecimiento bacteriano en el control negativo de la muestra 17 al igual que en los otros tres casos iguales a este, demostró a través de un antibiograma que se debe a la resistencia que presenta la bacteria frente al antibiótico, por lo cual al no ser efectivo fue posible la proliferación y crecimiento de la bacteria en el medio, en cambio en el caso de la muestra 16 el antibiograma evidencia que la bacteria es sensible al antibiótico el cual en un urocultivo tradicional enmascara el agente patógeno evitando su crecimiento bacteriano en el medio (Figura 14)

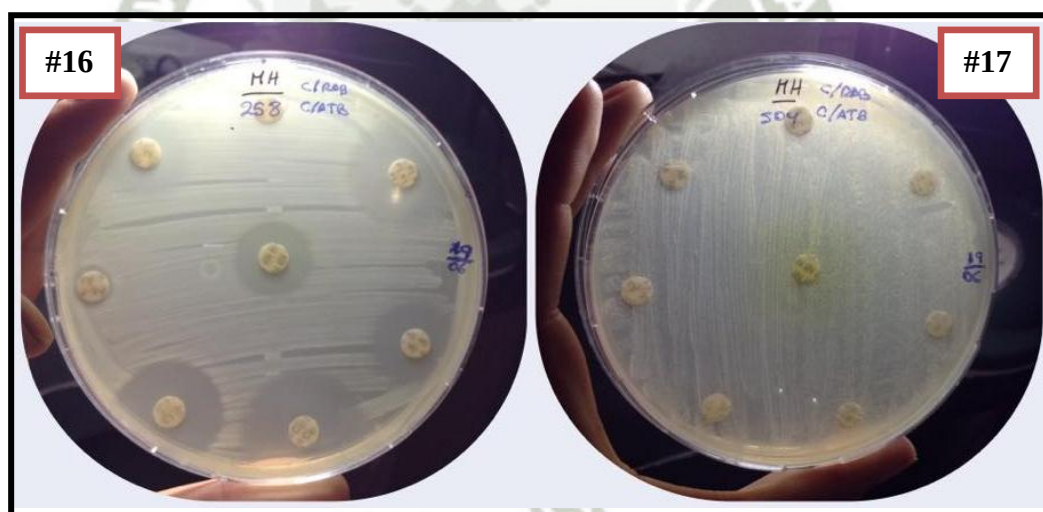


Figura 14: antibiograma #16: gentamicina sensible #17: gentamicina resistente

De las 25 muestras de orina de pacientes mujeres con antibiótico-terapia sin removedor de antibióticos (control negativo) 21 muestras resultaron negativas es decir el 84% y 4 que representa el 16% resultó en urocultivos positivos, de estos 4 urocultivos el 100% crecieron en Agar Mac Conkey entre ellos 3 fueron *Escherichia coli* y 1 *Enterobacter* lo cual podría indicarnos que las bacterias Gram negativas son

más propensas a ser resistentes a la gentamicina.

TABLA 2
Control negativo y grupo de experimentación (25 muestras): positivos y negativos

MUESTRAS CON ANTIBIOTICO	UROCULTIVOS	NUMERO	PORCENTAJE
CONTROL NEGATIVO♦ S/RAB	NEGATIVOS	21	84%
	POSITIVOS	4	16%
GRUPO DE EXPERIMENTACION♦ C/RAB	NEGATIVOS	0	0%
	POSITIVOS	25	100%

♦ **Control Negativo:** Muestras de orina de pacientes con infección urinaria, con tratamiento antibiótico pero sin tratamiento de removedor de antibióticos.

♦ **Grupo de experimentación:** Muestras de orina de pacientes con Infección urinaria, con tratamiento antibiótico y con tratamiento previo de removedor de antibiótico (carbón activado).

Las muestras procesadas con removedor de antibiótico (grupo experimental) resultaron en urocultivos positivos en todas las 25 muestras lo cual hace del carbón activado 100 % efectivo, útil y eficaz. Información que se encuentra en la tabla 2. Luego del proceso del grupo de control negativo, en el caso de los urocultivos realizados con las muestras de las pacientes mujeres que presentan infección urinaria y que se les administró de forma transitoria la gentamicina (grupo experimental), los resultados detallados se especificaron en el Anexo 2.2.

El crecimiento bacteriano presente en el Agar Mac Conkey representa a un 68% de bacterias Gram negativas y los resultados positivos en Agar sangre base con azida representan al 32% de bacterias Gram positivas (Tabla 3) que fueron posteriormente identificadas y de acuerdo a esto se llevó a cabo el antibiograma con los antibióticos específicos de acuerdo a su eficacia frente a cada grupo de bacterias.

TABLA 3

Resultados de la cantidad de urocultivos positivos según los medios de cultivo Mac Conkey y Agar sangre base con azida del grupo experimental

Medios de Cultivo	POSITIVOS	
	#	%
MC*	17	68
AZ*	8	32

*MC: Agar Mac Conkey

*AZ: Agar sangre base con azida

Observando el total de urocultivos realizados, es decir de las 50 muestras, obtuvimos un número de cultivos positivos en Agar Mac Conkey el cual es capaz de aislar bacterias Gram negativas y otro número de urocultivos positivos en Agar sangre

TABLA 4

Incidencia de bacterias en infecciones urinarias del número total de muestras de la investigación

	CONTROL POSITIVO (25 Muestras)		GRUPO EXPERIMENTAL (25 muestras)		TOTAL (50Muestras)	
	#	%	#	%	#	%
MEDIOS DE CULTIVO						
AGAR MAC CONKEY	19	76%	17	68%	36	72%
AGAR SANGRE BASE CON AZIDA	6	24%	6	32%	14	28%

base con azida el cual aísla a bacterias Gram positivas. Según la tabla 4 podemos deducir que 36 del total de las muestras representadas por el 72% de bacterias

causantes de infección urinaria fueron Gram negativas y 14 muestras representadas por el 28% fueron bacterias Gram positivas aisladas en esta investigación que son la causa de infección urinaria de las pacientes, en su mayoría son bacterias Gram negativas dentro de ellas las ya mencionadas *Escherichia coli* y *Enterobacter*.

Luego se realizó la identificación de bacterias y se halló que el porcentaje más alto de agentes patógenos aislados en la investigación está representado por un 48% que pertenece al *Escherichia coli* lo cual demuestra que las infecciones urinarias en mujeres, en mayor proporción son causadas por Gram negativos y en este caso por *Escherichia coli* (Tabla 5). Las bacterias identificadas en este estudio demuestran que las bacterias Gram negativas más comunes encontradas en infecciones urinarias son el *Escherichia coli* y el *Enterobacter* y dentro de las bacterias Gram positivas están el *Staphylococcus aureus* y el *Staphylococcus saprophyticus* representado con un 8% ya que fue el que se identificó en menor cantidad.

TABLA 5

Recuento numérico y porcentual según las bacterias aisladas en los urocultivos

Bacteria Aislada	#	%
<i>Escherichia coli</i>	12	48 %
<i>Enterobacter</i>	5	20 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	24 %
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	8 %

Después de realizada la identificación de las bacterias se llevó a cabo el procedimiento del antibiograma en el que se observó la resistencia bacteriana frente a los antibióticos, clasificados en “Sensible, Intermedio y Resistente” para el reporte de cada una de las muestras utilizadas en esta parte de la investigación, los resultados y datos específicos por cada paciente están indicadas en el Anexo 2.3.

Se utilizó un total de 9 antibióticos seleccionados por protocolo del laboratorio “Cayetano Heredia” donde se realizaron los antibiogramas y se realizó una

clasificación según resistencia bacteriana frente a dichos antibióticos y se realizó una tabla de la resistencia versus cada antibiótico en porcentajes y números los cuales están indicados en la tabla 6, se realizó 25 antibiogramas en los que se demostró que el antibiótico menos efectivo para ITU según la investigación es el ácido nalidíxico ya que este está representado por un 76% de resistencia bacteriana frente a dicho antibiótico, el resultado del antibiótico más efectivo para ITU según la investigación es la amikacina debido a que este representa el 80% de sensibles, en relación a una investigación realizada el 2006 acerca de “Etiología bacteriana y sensibilidad en urocultivos de pacientes con ITU” ⁽⁴⁷⁾ se halló que la amikacina es en un 89.5% sensible para infecciones de tracto urinario en mujeres, lo cual coincide con el resultado obtenido en esta investigación ya que está representada por el porcentaje más alto de sensibilidad frente a los demás antibióticos.

TABLA 6
Recuento numérico y porcentual de resistencia bacteriana

Antibiótico	RESISTENTES		SENSIBLES		INTERMEDIOS	
	#	%	#	%	#	%
Amikacina	1	4	20	80	4	16
Amox A. Clav	6	24	15	60	4	16
Nitrofurantoina	6	24	13	52	6	24
Levofloxacino	6	24	12	48	7	28
Gentamicina	4	16	9	36	12	48
Ciprofloxacino	12	48	9	36	4	16
Amoxicilina	13	52	9	36	3	12
A. nalidixico	19	76	1	4	5	20

- SENSIBLE al antibiótico indica su eficacia frente a la bacteria.
- RESISTENTE al antibiótico indica la ineficacia de este frente a la bacteria.
- INTERMEDIO que indican que no llegan a un punto de ser completamente sensibles pero tampoco son del todo resistentes para la bacteria.

Según una investigación realizada el 2014 informado por la OMS ⁽⁴⁸⁾ en la cual menciona que la resistencia bacteriana prolonga la duración de la infección urinaria y aumenta el riesgo de cronicidad y muerte. Lo que es importante ya que como se vio en los resultados de resistencia, la gentamicina solo resultó “Sensible” en un 36% lo que puede deberse a que ya que es un antibiótico prescrito como primera opción según el protocolo del Hospital Regional del Cusco MINSA, los pacientes reincidentes de infecciones urinarias adquieren una resistencia al antibiótico debido a que son varias veces que se le administra el mismo fármaco, lo que hace que si bien puede ser detenida la proliferación de la bacteria, actuando como bacteriostático, la infección no es completamente curada, por lo tanto es probable que el paciente pueda volver a infectarse y de ese modo empeorar sus síntomas o adquirir una infección urinaria silenciosa que afecte a otros órganos componentes del tracto urinario provocando otras enfermedades paralelas que compliquen cada vez más el estado de salud del paciente evitando su recuperación, es por eso la importancia de un urocultivo que no solamente confirme la presencia de ITU, sino que también permita que los resultados del antibiograma den una o más opciones de antibióticos útiles para erradicar a la bacteria y de este modo lograr que el paciente se recupere, ya que esa es la misión de los profesionales de la salud.

5. Resultados de la determinación del costo de insumos básicos para la realización de la metodología

Dentro de los procedimientos estándares de microbiología no existe una metodología con empleo de un removedor de antibióticos para urocultivos, ni un producto que contenga removedor de antibiótico para urocultivos, el único producto comercial relacionado, es un frasco de removedor de antibióticos exclusivamente para hemocultivos, su nombre comercial es “ Hemo-rab” el cual consta de resinas sintéticas que se encargan de atrapar al antibiótico en el proceso microbiológico del hemocultivo, según una investigación sobre hemocultivos con resinas ⁽⁴⁹⁾ indica que la remoción de antibióticos fue efectuado al 100% y que produjo un impacto en el ámbito clínico, microbiológico y social, pero que no pudo obtenerse un impacto en el ámbito económico ya que a pesar de la utilidad, el producto tiene un alto precio que

no está al alcance de todas las clases sociales, por lo tanto tampoco es rentable para todos los laboratorios que lo obtienen ya que no hay una mayoría de pacientes que puedan pagar el excedente por el uso de este en el proceso del hemocultivo.

En el caso de la metodología implementada empleando carbón activado en urocultivos, el costo es mínimo ya que los insumos son de precio accesible y el material es descartable y el tubo de vidrio es reusable ya que se puede esterilizar y volver a utilizar, en el caso del carbón activado se utilizó capsulas de ARKOCAPSULAS el cual tiene un precio de 40 nuevos soles el frasco de 50 capsulas, lo cual hace de 0.80 céntimos de sol por cápsula, con una cápsula se realiza 8 análisis con removedor de antibióticos, entonces por análisis el costo sería de 0.10 céntimos de sol, el frasco de 1 libra de caldo BHI tiene un precio de 246 nuevos soles, se utiliza 52 g para un litro, pero en el caso de un tubo para un análisis realizado con la metodología solo se necesita 3 ml, por lo que se

TABLA 7

Precio estimado por unidad procedimiento de removedor de antibióticos

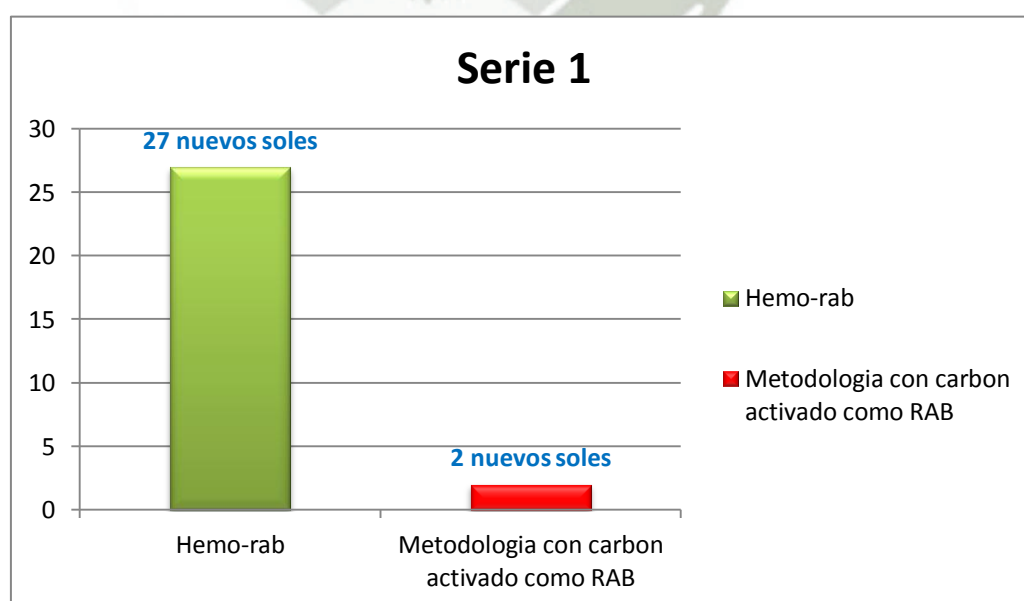
Insumos y materiales	Precio por un análisis. en nuevos soles
Carbón activado ARKOCAPSULAS (50 cápsulas)	0.10
Caldo BHI (1 Libra)	0.10
Pipetas descartables 100 unidades	0.30
Tubos de ensayo	1.50
Esterilización y lavado del material reutilizable	1.00
TOTAL	2.00

necesitara 156 mg y en costo sale a 0.08 céntimos de sol pero lo aproximaremos a 0.10 céntimos de sol, las pipetas desechables de 1mL vienen por cientos, el ciento tiene un precio de 30 nuevos soles lo que le da a la unidad un precio de 0.30 céntimos de nuevo sol, los tubos de ensayo utilizados fueron de 13x100, por unidad tiene un precio de 0.50 céntimos de nuevo sol, un precio estimado de la esterilización y lavado de este material reutilizable se determinó como 1 nuevo sol, la suma de los precios da un total de dos soles (Tabla 7), los cuales pueden ser asumidos por el laboratorio o pueden sumarse al precio de la realización de un urocultivo, de una manera u otra es accesible para ambos casos.

En comparación de precios en cuanto al producto comercial para hemocultivos y a la metodología empleando carbón activado como removedor de antibióticos para urocultivos, hay una gran diferencia ya que el Hemo-rab tiene un precio de 27 nuevos soles por unidad de frasco lo cual aumenta un gran costo al precio de un urocultivo tradicional, en cambio esta metodología solo aumenta un estimado de 2 nuevos soles al urocultivo (Grafico 3), lo cual lo hace sumamente económico para su realización en los laboratorios privados y hospitales en los que se pida urocultivo con removedor de antibióticos.

Grafico 3

Diferencia de precios entre el producto comercial y la metodología con carbón activado como removedor de antibióticos



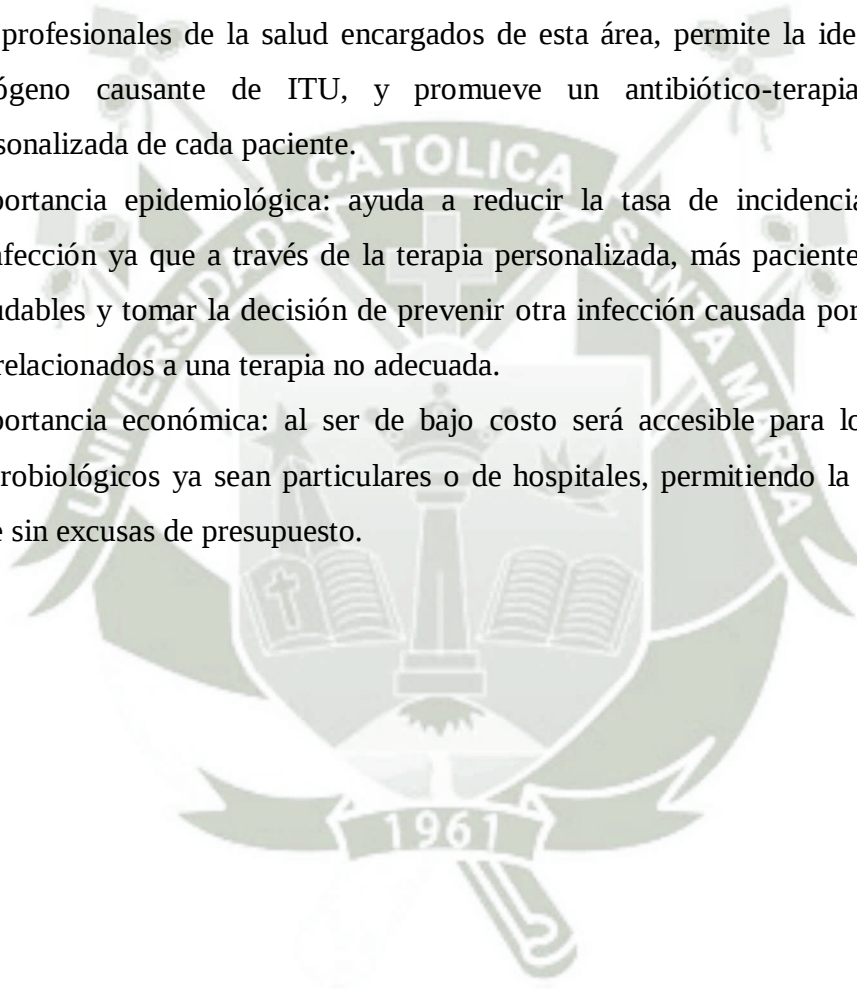
Concluyo mencionando que esta metodología tiene una importancia clínica, microbiológica, epidemiológica y económica porque resuelve la problemática de salud pública demostrando haber sido efectiva, útil, sencilla de realizar y económica lo cual es trascendental para los profesionales de la salud tanto como para los usuarios.

Importancia clínica: soluciona un problema de salud pública evitando el empeoramiento de la salud del paciente y permitiendo su recuperación.

Importancia microbiológica: permite la realización sencilla de su procedimiento para los profesionales de la salud encargados de esta área, permite la identificación del patógeno causante de ITU, y promueve un antibiótico-terapia adecuada y personalizada de cada paciente.

Importancia epidemiológica: ayuda a reducir la tasa de incidencia de ITU por reinfección ya que a través de la terapia personalizada, más pacientes podrán estar saludables y tomar la decisión de prevenir otra infección causada por otros factores no relacionados a una terapia no adecuada.

Importancia económica: al ser de bajo costo será accesible para los laboratorios microbiológicos ya sean particulares o de hospitales, permitiendo la realización de este sin excusas de presupuesto.



CONCLUSIONES

- El 100% de las muestras procesadas bajo esta metodología presentaron crecimiento bacteriano significativo de un urocultivo positivo, lo que demostró la utilidad y eficacia del carbón activado como removedor de antibióticos.
- El tratamiento previo de la muestra de orina con carbón activado, en caldo cerebro corazón, permite la proliferación bacteriana, útil para su identificación y respuesta antibiótica.
- La mínima concentración de carbón activado (28mg) fue suficiente para que la metodología sea útil.
- Los resultados negativos de los urocultivos realizados para control negativo, demostraron la influencia del antibiótico prescrito que enmascara un falso negativo ya que en el urocultivo realizado posteriormente con carbón activado si presento crecimiento bacteriano.
- Los agentes patógenos causantes de infecciones urinarias aislados en esta tesis fueron *Escherichia coli* (48%), *Enterobacter* (20%), *Staphylococcus aureus* (24%), *Staphylococcus saprophyticus* (8%).
- Los resultados del precio que se necesita para la realización de la metodología es de dos nuevos soles sobre el precio de un urocultivo tradicional, lo que demuestra que es económica.

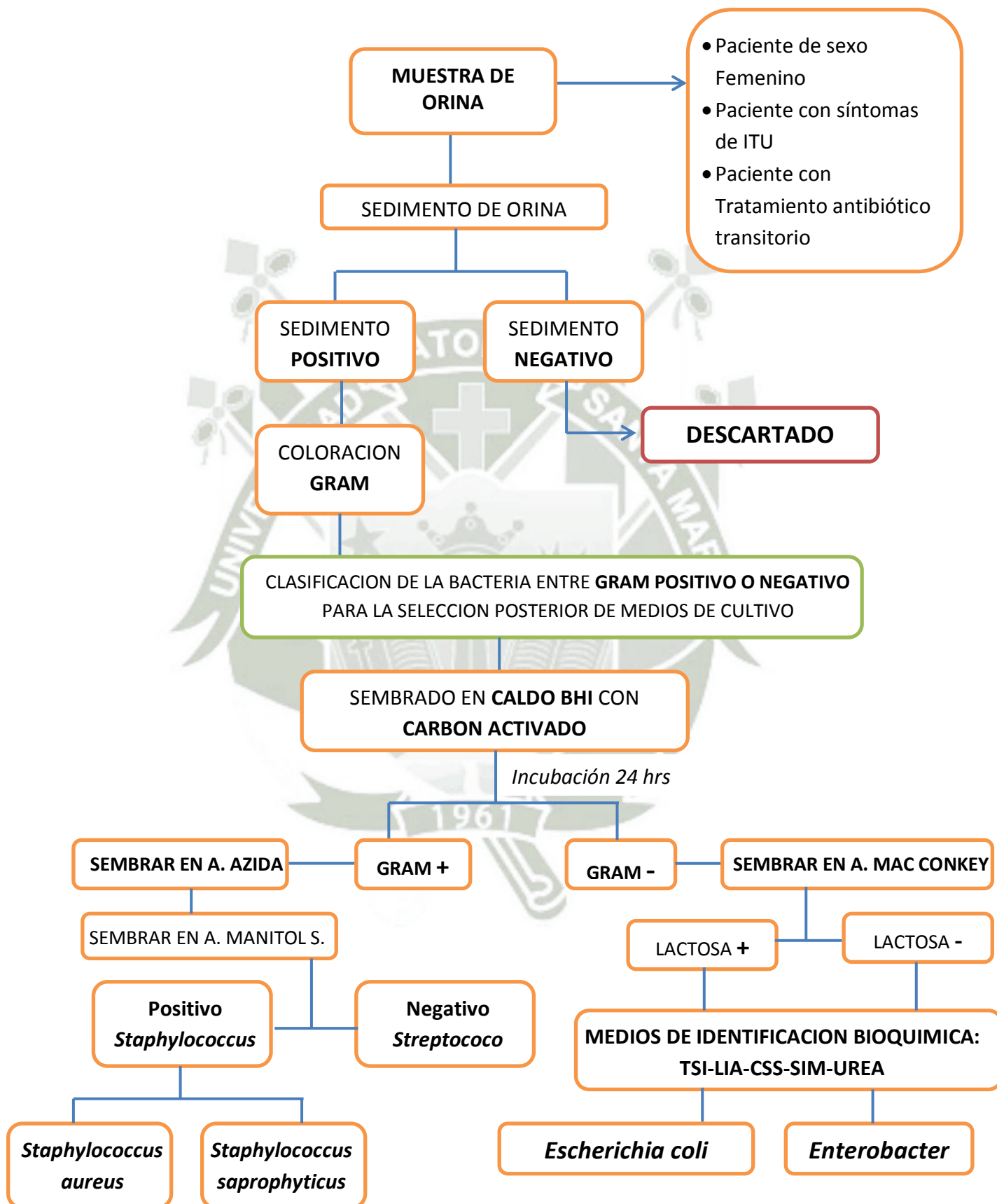
RECOMENDACIONES

1. Dar a conocer este método ya que será útil en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes lo cual reducirá la tasa de pacientes con infecciones urinarias crónicas y complicaciones
2. Probar la metodología con otras muestras biológicas tales como heces, secreción faríngea, etc.
3. Realizar la metodología con pacientes que estén tomando otros antibióticos.
4. Probar si la metodología ayuda a aislar otro grupo de bacterias diferente a las que fueron determinadas en este estudio



ANEXOS

ANEXO 1: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO DE INVESTIGACION



ANEXO 2: TABLAS COMPLETAS DE RESULTADOS

ANEXO 2.1.

TABLA 8

Recuento de placa y crecimiento de bacterias. Muestras de pacientes mujeres con infección urinaria, sin antibiótico-terapia

Número de muestras		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Código muestras		300	304	708	702	675	709	653	655	372	574	319	431	311	415	312	378	382	390	236	238	302	568	874	421	512
S/RAB Patrón	MC	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG
	AZ	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS
C/RAB C (+)	MC	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG
	AZ	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS

LEYENDA:

- **POS:** positivo (> 100.000 UFC/mL)
- **NEG:** negativo
- **MC:** Agar Mac Conkey
- **AZ:** Sangre Agar Base con azida
- **S/RAB:** Sin removedor de antibióticos
- **C/RAB:** Con removedor de antibióticos
- **C(+):** Control positivo

ANEXO 2.2

TABLA 9

Recuento de placa y crecimiento de bacterias. Muestras de orina de pacientes mujeres con infección urinaria, con

Número de muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Código muestras	315	330	314	316	248	413	308	418	252	439	369	330	329	309	407	258	504	301	568	574	240	242	558	247	239
S/RAB C (-)	MC	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	AZ	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
C/RAB Grupo experimental	MC	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
	AZ	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS

antibiótico-terapia transitoria (gentamicina).

LEYENDA:

- **POS** : positivo (>100.000 UFC/ mL)
- **NEG**: negativo
- **MC**: Agar Mac Conkey
- **C(+)**: Control positivo
- **AZ**: Sangre Agar Base con azida
- **S/RAB**: Sin removedor de antibióticos
- **C/RAB**: Con removedor de antibióticos

ANEXO 2.3

TABLA 10

**Resultados de la bacteria aislada y del antibiograma de cada urocultivo.
Muestras de orina de pacientes mujeres con antibiótico-terapia (gentamicina).**

Antibiótico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Se aisló:	St.a	E.c	E.c	St.a	Eb	E.c	E.c	E.c	Eb	Eb	E.c	E.c	St.a	St.a	Eb	E.c	E.c	E.c	E.c	E.c	St.a	St.s	Eb	St.a	St.s
A. Nalidíxico	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
Amikacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S
Amoxicilina	R	S	S	S	S	R	R	R	S	I	S	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R
Amox A. Clav	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	R	S	S	R	S	R	I	S	R
Ciprofloxacino	R	S	S	I	S	R	S	R	I	R	R	I	S	S	R	S	I	R	S	R	R	R	S	R	R
Gentamicina	I	S	S	S	I	I	R	I	S	S	I	I	I	S	R	S	R	S	I	R	I	I	S	I	I
Levofloxacino	I	S	S	S	S	R	R	I	S	I	R	I	S	S	I	S	S	I	I	R	S	R	S	S	R
Nitrofurantoina	R	I	R	R	S	R	S	R	S	S	R	I	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S

LEYENDA:

- A. : Acido
- E.c: *Escherichia coli*
- Eb: *Enterobacter*

- St.a: *Staphylococcus aureus*
- St.s : *Staphylococcus saprophyticus*
- R : Resistente

- I : Intermedio
- S : Sensible

ANEXO 3: PROCEDIMIENTOS

4.1. Siembra de orina con asa calibrada⁽²³⁾

Principio: El número de microorganismos aislados por mililitro en el urocultivo puede ayudar en el diagnóstico diferencial de las IU. Las asas de plástico o de alambre disponibles en el comercio están calibradas para cargar un volumen conocido de líquido cuando se manipulan en forma correcta lo que permite que el microbiólogo calcule el número de microorganismos presentes en la muestra original de acuerdo con las UFC desarrolladas en los cultivos

Método:

1. Se flamea un asa calibrada y se la deja enfriar sin tocar ninguna superficie.
2. Se mezcla la orina con cuidado y se quita la tapa del recipiente.
3. Se inserta el asa en sentido vertical en la orina para permitir que esta se cargue en ella
4. Se siembra en estría la orina contenida en un asa sobre la superficie de la placa de agar
5. Sin flamear de nuevo se vuelve a insertar en sentido vertical el asa en la orina para sembrar el volumen contenido en ella en una segunda placa, se repite el procedimiento para cada placa que desee utilizarse
6. Se incuban las placas durante por lo menos 24 horas a 35-37°C

4.2. Recuento de colonias UFC^(2,43)

El número de bacterias de una muestra puede determinarse directamente por recuento del número total de células por recuento de viables en placa (Células capaces de dividirse sobre o dentro de un medio sólido, también se refieren como unidades formadoras de colonias UFC).

Procedimiento:

Finalizado el tiempo de incubación, observar a través de una lámpara de luz blanca y realizar el conteo de colonias que se observan en toda la placa petri, si las colonias son contables pintar con un marcador para que de este modo no se confundan las que ya fueron contadas y las que aún faltan contar.

Una vez terminado el conteo se aplica la siguiente fórmula para obtener el número de UFC/ml

El número de colonias se multiplica por 1000 si el ansa es de 0.001mL y por 100 si el ansa es de 0.01 para determinar la cantidad de microorganismos por 1mL de la muestra original.

4.3.Procedimiento convencional de Antibiograma⁽¹³⁾

Una vez realizado el urocultivo con un asa de Kolle se toma una pequeña cantidad de muestra del crecimiento bacteriano que se observa en el medio de cultivo utilizado, en un tubo estéril se coloca un mililitro de agua destilada, y se mezcla con la muestra utilizando el ansa de Kolle frente al mechero y con un hisopo estéril se saca una muestra y se procede a sembrar en el Agar Mueller Hinton y con una pinza se coloca cada disco de sensibilidad que según el laboratorio se utiliza.

ANEXO 4: ESTERILIZACION DE MATERIAL

Procedimiento de esterilización de material de laboratorio ⁽⁵⁰⁾

1. Esterilizar el material usado presuntamente infeccioso en autoclave (descontaminación)
 2. Acondicionar el material limpio para ser esterilizado.
 - a) placas de Petri
 - b) tubos de ensayos
- Autoclave: (vapor a presión)

Para lograr una esterilidad confiable el método estándar es el vapor saturado, en autoclave, a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. En el caso de descontaminación el tiempo puede extenderse a 30 minutos.

Los recipientes a colocar en la autoclave no deberán estar totalmente llenos y deben tener tapas flojas o estar tapados con algodón con una sobretapa para permitir la ebullición libre y la liberación del aire disuelto.

3. Lavar el material de vidrio con lejía y abundante agua y dejar secar

4. Envolver el material de vidrio seco en papel craft y colocar a la estufa a 160°C durante 2 horas.

5. Retirar el material de vidrio estéril y dejar enfriar



Figura 15: autoclave y estufa para esterilización de materiales

ANEXO 5: PREPARACION DE MEDIOS

5.1. MEDIOS DE AISLAMIENTO

A) MEDIOS DE AGAR EN PLACA PETRI

1. AGAR MACCONKEY

Este medio selectivo diferencial se utiliza para el aislamiento y diferenciación de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa, de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, aguas y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo.⁽²⁾

Su fórmula cumple con los requerimientos de armonización de Farmacopeas Europea, japonesa y estadounidense.

Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva⁽⁵¹⁾. El agar es el agente solidificante.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Composición

Digerido pancreático de gelatina 17,0 g

Digerido pancreático de caseína 1,5 g

Digerido péptico de tejido animal 1,5 g

Lactosa 10,0 g

Mezcla de sales biliares 1,5 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Agar 13,5 g

Rojo neutro 30,0 mg

Cristal violeta 1,0 mg

Agua destilada 1.000ml.

pH final $7,1 \pm 0,2$

Preparación

Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se debe evitar el sobrecalentamiento. Enfriar entre 45°C y 50°C , colocar 20 mL de medio por cada placa y dejar solidificar.



Figura 16: Agar Mac Conkey 1: placa con el medio, 2: crecimiento bacteriano en el medio de cultivo

2. AGAR SANGRE BASE CON AZIDA

Medio adecuado para el aislamiento de estreptococos y estafilococos de diversos materiales, debido a que la azida sódica inhibe la flora Gram negativa. Adicionado con sangre, este medio es adecuado para estudiar reacciones de hemólisis. ^(3,13)

Fundamento

Este medio puede ser usado para los aislamientos primarios de estafilococos y estreptococos a partir de materiales diversos de importancia sanitaria, compuestos de una flora mixta. La presencia de pluripectona y extracto de carne, proveen nutrientes para el desarrollo de microorganismos, aún de aquellos con exigencias nutricionales. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. A la concentración empleada, la azida de sodio ejerce un efecto bacteriostático solamente sobre los microorganismos Gram negativos, favoreciendo el desarrollo de los Gram positivos.

Composición (en gramos por litro)

Pluripectona	10.0	azida de sodio	0.2
Extracto de carne	3.0	Agar	15.0
Cloruro de sodio	5.0	pH final:	7.2 ± 0.2

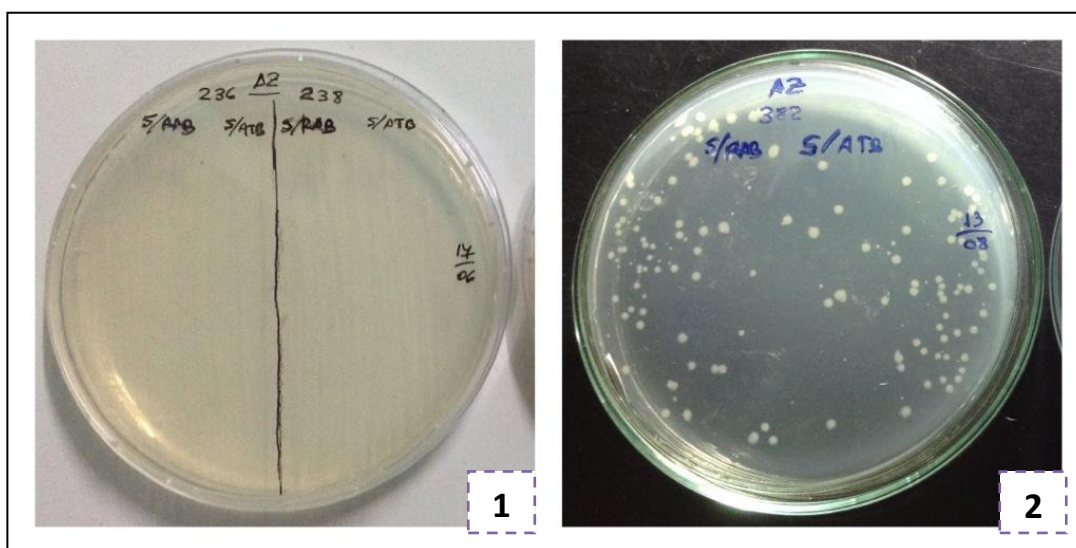


Figura 17: Base de Agar Sangre con azida 1: placa con medio 2: crecimiento bacteriano en el medio de cultivo

Preparación

Disolver 33 g de polvo deshidratado por litro de agua destilada. Mezclar calentando a ebullición por 1 o 2 minutos. Esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C. Si se prepara agar sangre, agregar asépticamente y a temperatura ambiente, un 5% de sangre estéril desfibrinada; mezclar bien y verter en placas de Petri.

3. AGAR MUELLER HINTON

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes ⁽⁵²⁾

Fundamento:

Este medio es utilizado en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que se detallan a continuación: presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, es útil para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos.

Composición (en gramos por litro)

Infusión de carne	300.0	Agar	15.0
Peptona ácida de caseína	17.5	pH final:	7.3 ± 0.1
Almidón	1.5		

Preparación:

Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a $45^{\circ}\text{--}50^{\circ}\text{C}$ y distribuir a cajas de Petri (o agregar los suplementos que se desee) hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).



Figura 18: Agar Mueller Hinton en placa Petri

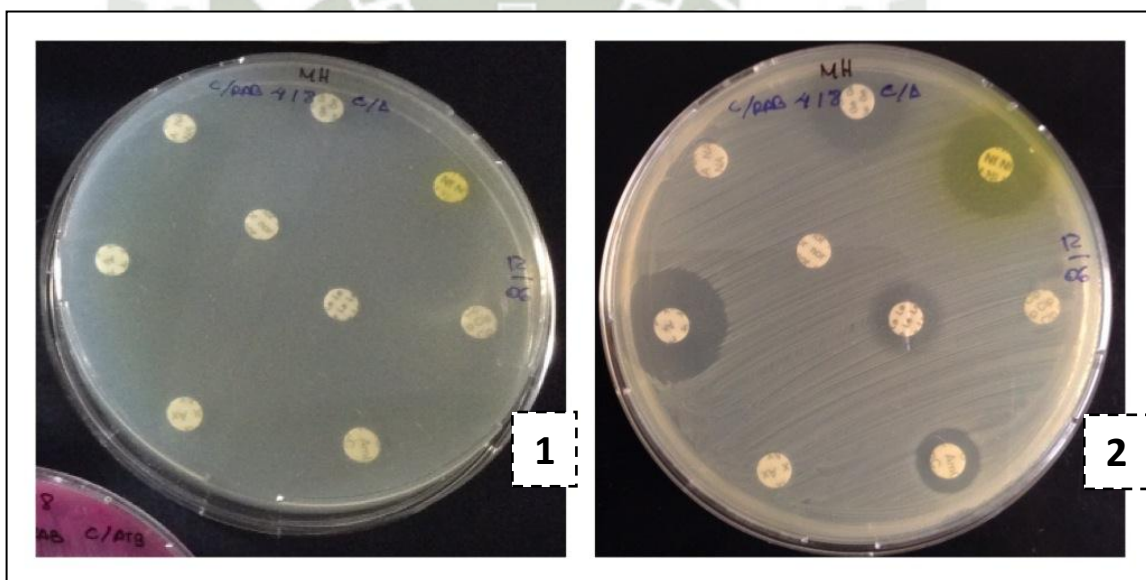


Figura 19: Agar Mueller Hinton: 1: antibiograma sin crecimiento bacteriano, 2: antibiograma con crecimiento bacteriano

4. AGAR MANITOL SALADO

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos.

Es recomendado para el aislamiento de *Staphylococcus* patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria. También, este medio puede utilizarse para el cultivo de especies halófilas de *Vibrio*, si no se dispone de medios apropiados (TCBS Medio, Medio Marino, etc.), aunque algunas especies pueden no desarrollar⁽⁵³⁾

Fundamento

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los *Staphylococcus* coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los *Staphylococcus* coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las colonias sospechosas, se repicarán en un medio sin exceso de cloruro de sodio para efectuarles, posteriormente, la prueba de la coagulasa⁽⁵⁴⁾.

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH.

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. Los *Staphylococcus* crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol.

Los *Staphylococcus* coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

Los *Staphylococcus* que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

Composición (en gramos por litro)

Extracto de carne1.0	Agar15.0
Pluripeptona10.0	Rojo de feno10.025
d-Manito 110.0	pH final: 7.4 ± 0.2
Cloruro de sodio75.0	

Preparación

Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a $118-121^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

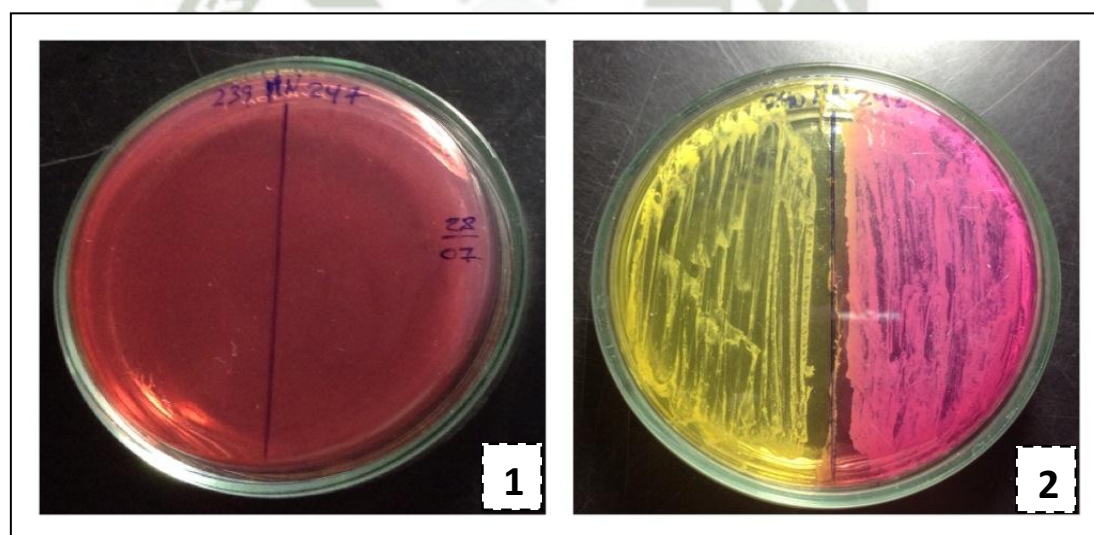


Figura 20: Agar Manitol Salado: 1: sin crecimiento bacteriano (color original), 2: crecimiento bacteriano positivo; amarillo (manita positivo), fucsia (manita negativo)

B) MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

1. CALDO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN

Medio líquido adecuado para el enriquecimiento y cultivo de bacterias aerobias y anaerobias, de microorganismos exigentes como *Streptococos*, *Neumococos* y otros microorganismos de difícil desarrollo ^(2,55)

Con el agregado de 20 UI de penicilina y 100 µg/mL de amikacina, se utiliza este medio para el cultivo de hongos patógenos.

Fundamento

Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer.

Los nutrientes de este caldo son muy apropiados para los hemocultivos, ya que en esta infusión desarrollan todas las especies de estreptococos excepto los tiol y piridoxal dependientes.

Los *Staphylococcus* que crecen en esta infusión suelen dar mejores reacciones en la prueba de la coagulasa.

Composición (en gramos por litro)

Infusión de cerebro de ternera	200.0	Glucosa	2.0
Infusión corazón vacuno	250.0	Fosfato disódico	2.5
Peptona	10.0	pH final:	7.4 ± 0.2
Cloruro de sodio	5.0		

Preparación

Suspender 37 g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los tubos que no se usen inmediatamente deberán calentarse en un baño hirviendo para la eliminación del oxígeno retenido. Enfriar rápidamente sin agitar.

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro, sin precipitado.

Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8°C.

Siembra

Por inoculación directa de la muestra o del microorganismo en estudio.

Incubación

El tiempo, la temperatura y la atmósfera de incubación, serán las óptimas y dependerán del microorganismo que se esté investigando.

Resultados

Examinar los tubos para evaluar el crecimiento por turbiedad.

5.2. MEDIOS DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA

Medios realizados en tubo:

1. TSI Agar

Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en la base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa ya la producción de ácido sulfhídrico ⁽⁵⁶⁾

Fundamento

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa en los hidratos de Carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones f^{3+} , los cuales si se combinan con el ácido sulfhídrico, producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. Por fermentación de azúcares, producen Ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, vira de color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio reduce un sulfuro de hidrógeno el cual reacciona con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Composición (en gramos por litro)

Extracto de carne	3.0	Sulfato de hierro y amonio	0,2
Pluripectona	20.0	Tiosulfato de sodio	0,2
Cloruro de sodio	5.0	Rojo de fenol	0.025
Lactosa	10.0	Agar	13.0
Sacarosa	10.0	pH final:	$7,3 \pm 0,2$
Glucosa	1.0		

Preparación

Suspender 62,5 g del Polvo Por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar estufa Agitación Frecuente, el total de hervir 1 o 2 Minutos Hasta Disolución. Llenar hasta Tercera parte de los Tubos de Ensayo. Esterilizar a 121 ° C por 15 Minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

Resultados

1-K/A: Pico alcalino / Fondo acido (rojo pico / Fondo amarillo). El microorganismo Solamente fermenta la glucosa

2-A/A: Pico acido / Fondo acido (pico amarillo / Fondo amarillo). El microorganismo fermenta glucosa, lactosa y / o sacarosa

3 K/K: Pico alcalino / Fondo alcalino (pico rojo / Fondo rojo). El microorganismo es no fermentador de azúcares

4-La Presencia de burbujas, o ruptura del Medio de Cultivo, indica que el microorganismo producir gas CO₂

5-El ennegrecimiento del Medio que indica el microorganismo produce Ácido sulfhídrico



Figura 21: diferentes degradaciones percibidas cuando hay Crecimiento en el medio TSI

2. Agar LIA

Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, especialmente *Salmonella sp.*, basado en la decarboxilación/desaminación de la lisina y en la producción de Ácido Sulfhídrico ⁽⁵⁵⁾

Fundamento:

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. el citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, hijo los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es el color amarillo de un pH igual o menor a 5.2, y de color de violeta un pH igual o alcalde de un 6.8. Por decarboxilación de la lisina, sí producir cadaverina amina la, que alcaliniza el medio y esto producir el viraje del indicador al violeta color. la decarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio acido, he aquí porque es necesaria que la glucosa fermentada previamente mar. Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa, hijo de pero que fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero una las 24 horas de incubación sí observa el pico de color de violeta debido al consumo, tenerife peptonas, y el fondo amarillo. La producción de sulfuro de hidrógeno, sí visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro. Las cepas de los genero *Proteus*, providencia y algunas cepas de *Morganella*, desaminan la lisina, esto producir un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno-forma del color rojizo de las naciones unidas en la superficie del medio.

Composición (en gramos Por litro)

Peptona de gelatina 5.0

Extracto de levadura 3.0

Glucosa 1.0

Lisina 10.0

Citrato de hierro y amonio 0,5

Tiosulfato de sodio 0.04

Púrpura de bromocresol 0.02

Agar 15.0

pH final: $6,7 \pm 0,2$

Preparación

Suspender 35g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber unos 15 minutos. Calentar cuidadosamente, agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en pico de flauta dejando fondo de las naciones unidas verticales apto para la punción.

Resultados

1. K/K: Decarboxilación de la lisina:

-Prueba Positiva: Pico violeta / Fondo violeta

-Prueba Negativa: Pico violeta / Fondo amarillo.

2. R/A: Desaminación de la lisina:

-Pico rojizo / Fondo amarillo. Esto sucede con cepas del Género *Proteus*, *Providencia* y alguna cepas de *Morganella sp.*

3. Producción de Ácido sulfhídrico:

-Prueba Positiva: ennegrecimiento del Medio (especialmente en el Límite del pico y Fondo)

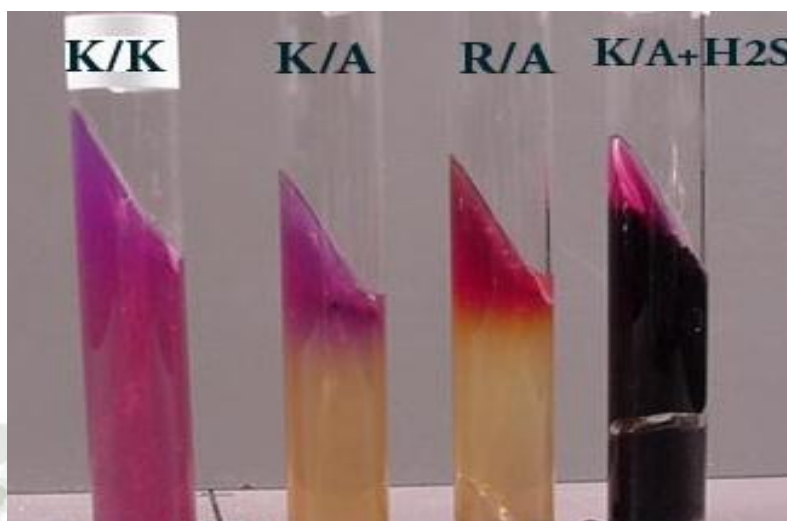


Figura 22: Distintas degradaciones percibidas con el crecimiento en LIA

3. UREA

Medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica. Se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea, tales como *Proteus sp.* otras enterobacterias y *Staphylococcus*⁽⁵⁵⁾

Fundamento

En el medio de cultivo, la tripteína y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH.

Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima

ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea, como especies de *Enterobacter* o *Klebsiella*.

Composición (en gramos por litro)

Tripteína 1.0
Glucosa 1.0
Cloruro de sodio 5.0
Fosfato monopotásico 2.0
Rojo de fenol 0.012
Agar 15.0
pH final: 6.8 ± 0.2



Preparación

Figura 23: Positivo y negativo en Urea

Suspender 24 g de polvo en 950 ml de agua destilada. Dejar reposar 2 minutos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 50 ml de una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración o cloroformo. Fraccionar en tubos de hemólisis y solidificar en pico de flauta con fondo profundo.

4. CITRATO DE SIMMONS

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía ⁽⁵⁵⁾

Fundamento

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el

citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

Composición (en gramos por litro)

Citrato de sodio 2.0

Cloruro de sodio 5.0

Fosfato dipotásico 1.0

Fosfato monoamónico 1.0

Sulfato de magnesio 0.2

Azul de bromotimol 0.08

Agar 15.0

pH final: 6.9 ± 0.2

Preparación

Suspender 24,2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5

minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

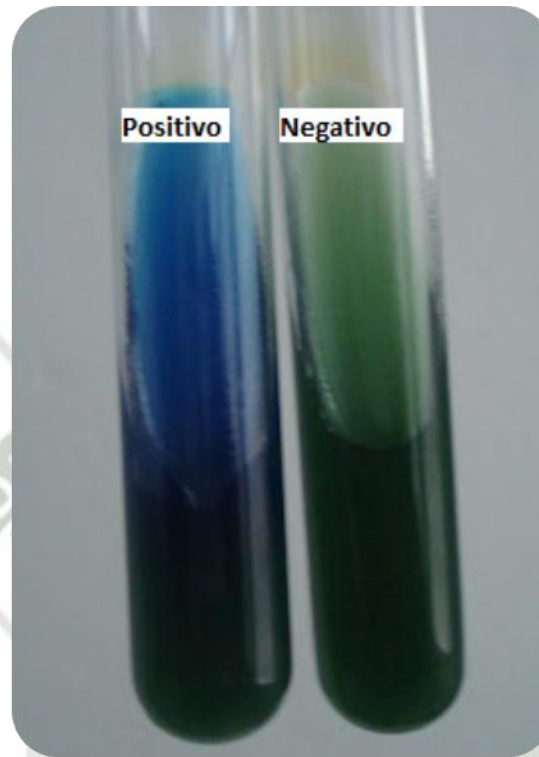


Figura 24: Positivo y negativo en Citrato de Simmons

5. SIM

Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de Indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo ⁽⁵⁵⁾

Es útil para diferenciar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Fundamento

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar Indol. En el

proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El Indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

Composición (en gramos por litro)

Tripteína 20.0

Peptona 6.1

Sulfato de hierro y amonio 0.2

Tiosulfato de sodio 0.2

Agar 3.5

pH final: 7.3 ± 0.2

Preparación

Suspender 30g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver; calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir unos 4ml en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical.

Resultados

Móviles cepas: producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra. Cepas inmóviles: se observa crecimiento solamente en la línea de siembra.

Cepas H_2S positivas: Ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio

Cepas H_2S negativas: El medio permanece cambiado de colores

Cepas Indol positivas: Desarrollo de colores rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's de Erlich

Cepas Indol negativas: cambio pecado de color.



Figura 25: Negativo (Indol negativo), positivo (Indol positivo)

ANEXO 6: PRUEBAS ENZIMATICAS

6.1.Tinción de GRAM

Nos permite diferenciar a las bacterias GRAM negativas de las GRAM positivas

A través de una tinción, dentro de lo cual la tinción azul indica que la bacteria es Gram positivo mientras que la tinción roja de las bacterias representa a los Gram negativos ^(2, 26,27)

Procedimiento:

- Se extiende la muestra recogida (que suele ser líquida o viscosa) en un portaobjetos de cristal, y se deja secar al aire.
- Se fija al calor del mechero el portaobjetos; así, las bacterias quedan pegadas en la superficie.
- Se añade cristal violeta, un colorante que tiñe todas las bacterias de color púrpura. Se debe dejar durante un minuto para que haga efecto.
- Se lava la muestra coloreada con agua
- Aplicar el lugol durante un minuto y lavar
- Decolorar con alcohol-acetona para desteñir las bacterias que se deben teñir con el cristal violeta. Es la parte más importante de la prueba, ya que si se deja demasiado tiempo se desteñirían todas las bacterias. Después se lava de nuevo con agua para eliminar el alcohol.
- Se añade fucsina por 30 segundos
- Secar y leer al microscopio con el objetivo de 100X con aceite de inmersión

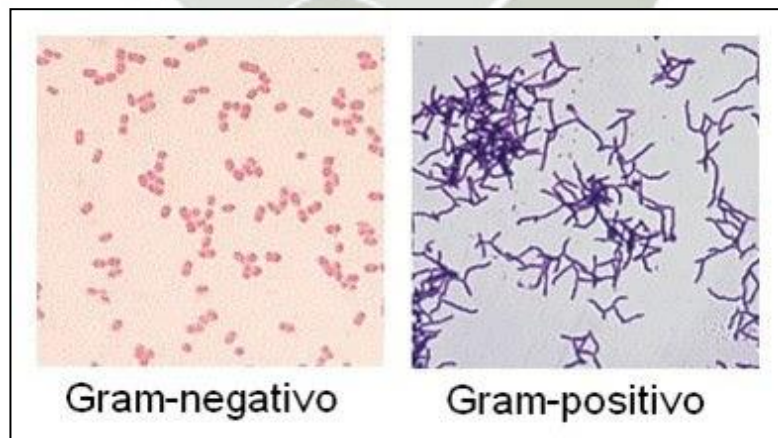


Figura 26: Vista microscópica de Gram negativo y Gram positivo

6.2. Prueba de la coagulasa

Objetivo: permite separar *Staphylococcus aureus*, que posee coagulasa, de las otras especies de *Staphylococcus* que genéricamente se las denomina *Staphylococcus* coagulasa negativos ⁽⁷⁾

Procedimiento: se mezcla varias colonias en un tubo con 0,5 ml de plasma citratado de conejo. Se incuba a 35 °C y se chequea la formación del coágulo a las 4 horas. Si es negativo se reincuba toda la noche y se procede a su lectura a las 18 horas. La lectura a las 4 horas es fundamental porque en alguna oportunidad puede suceder que las fibrinolisinases de *Staphylococcus aureus* lisen el coágulo luego de 18 horas de incubación y de esta manera se produzcan un test falso negativo.

Interpretación de resultados: se observa la formación de un coágulo total o parcial si el test es positivo.

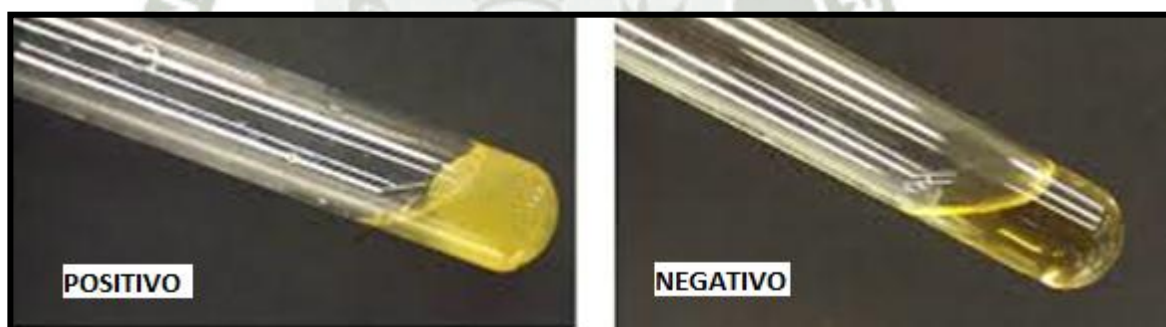


Figura 27: Prueba de coagulasa positivo y negativo

6.3. Prueba de la catalasa

Fundamento: la enzima catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno ^(2,13)

De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares.

Procedimiento: se coloca una gota de H_2O_2 al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfiere una porción de colonia sobre el H_2O_2 realizándose una emulsión. En lo posible debe tomarse la colonia a partir de un medio sin sangre, ya que los eritrocitos tienen actividad de catalasa y pueden falsear los resultados. Esta prueba también puede realizarse a partir de un cultivo en tubo, simplemente colocando unas gotas de H_2O_2 dentro del mismo ⁽⁵⁷⁾.

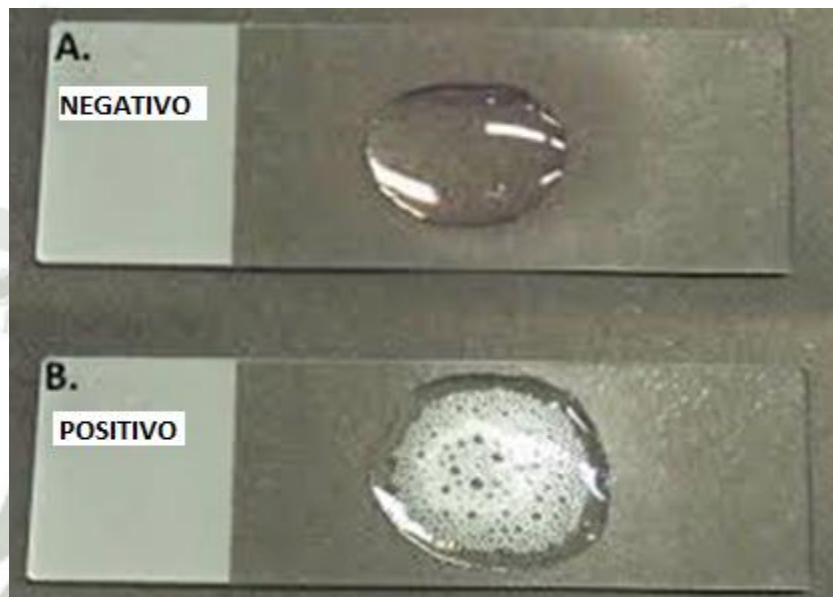


Figura 28: prueba de catalasa en portaobjetos A. Negativo y B. Positivo

ANEXO 7: CUADRO DE IDENTIFICACION DE GRAM NEGATIVOS

GRUPO I HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVOS								
ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GA S	H ₂ S	LIA	INDOL	UREA	CITRAT O	MOTILIDAD	ENTEROBACTER IA
K/A	NEG	POS	K/K	NEG	NEG	NEG	POS	<i>Salmonella typhi</i>
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GA S	H ₂ S	LIA	INDOL	UREA	CITRATO	MOTILIDAD	ENTEROBACTERI A
K/A	2+	4+	K/K	NEG	NEG	POS	POS	<i>Salmonella</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/K	NEG	NEG	POS	POS	<i>Salmonella arizonae</i>
K/A o A/A	2+	4+	K/A	NEG	NEG	POS	POS	<i>Citrobacter</i>
K/A o A/A	2+	4+	R/A	NEG/POS	POS	POS	POS	<i>Proteus</i>
K/A	2+	4+	K/K	POS		NEG	POS	<i>Edwarsiella</i>

K=alcalino

A= acido

R= rojo

N= neutro

U + = rojo

U - =amarillo

Cit + = azul

Cit - =verde

NEG: Negativo

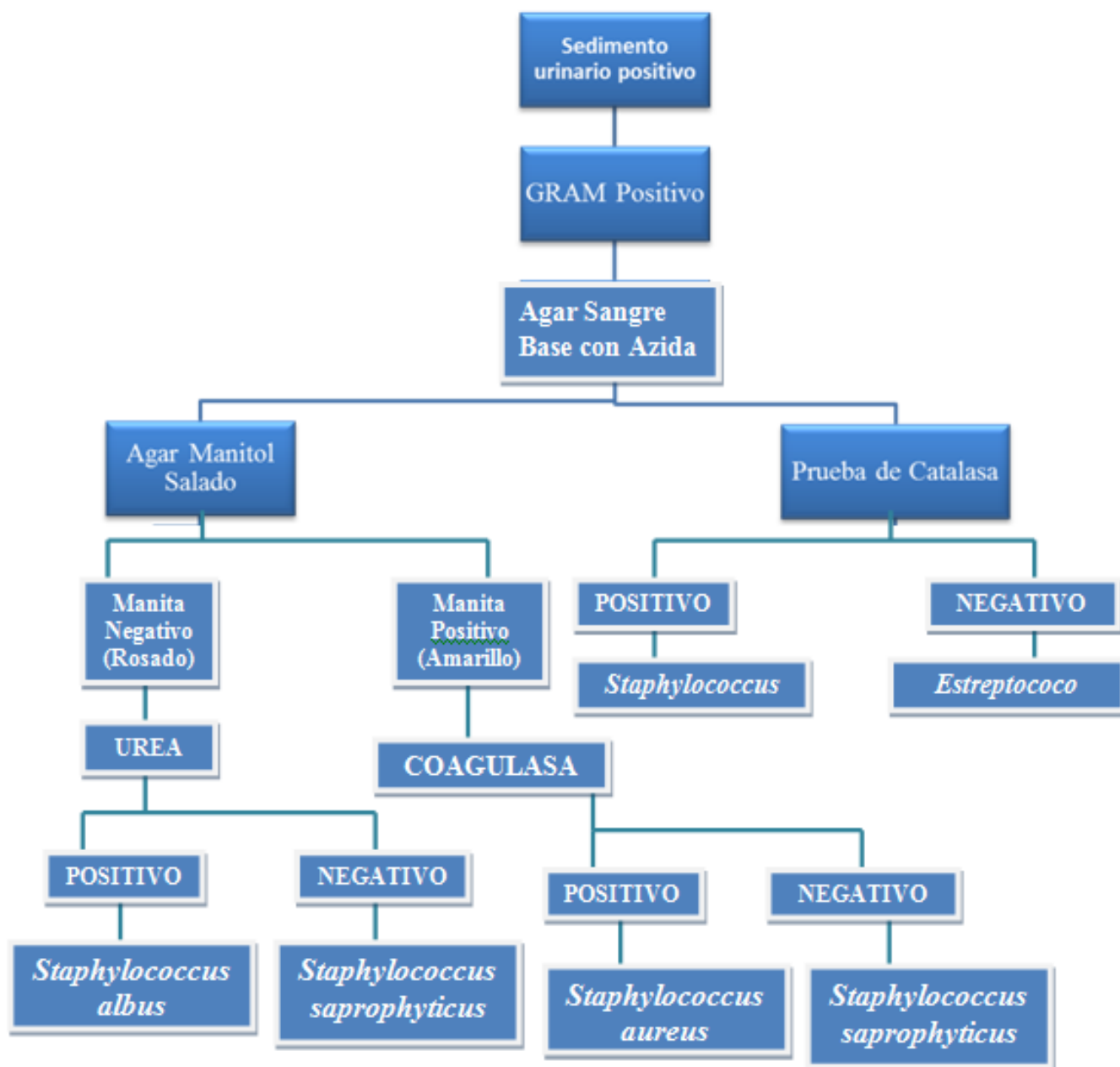
POS: Positivo

GRUPO II HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) NEGATIVOS								
ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	UREA	CITRATO	MOTILIDAD	ENTEROBACTERIA
K/A	NEG	NEG	K/A	NEG/POS	NEG	NEG	NEGATIVO	<i>Shigella</i>
A/A o K/A	NEG	NEG	K/K o K/N	POS	NEG	NEG	(+/-)	<i>Escherichia</i>
A/A o K/A	NEG	NEG	K/A	NEG/POS	POS	POS	POS	<i>Enterobacter</i>
A/A	NEG	NEG	K/K	NEG	NEG	POS	POS	<i>Serratia</i>
K/A	NEG	NEG	R/A	POS	NEG	POS	POS	<i>Proteus</i>
K/A	NEG	NEG	R/A	POS	NEG	POS	POS	<i>Providencia</i>
A/A	NEG	NEG	A/A o K/A	NEG/POS		NEG	NEG	<i>Yersinia</i>
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)								
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	UREA	CITRATO	MOTILIDAD	ENTEROBACTERIA
A/A o K/A	2+	NEG	K/K o K/A	POS	NEG	NEG	(+/-)	<i>Escherichia</i>
A/A	4+	NEG	K/K	NEG/POS	POS	POS	NEG	<i>Klebsiella</i>
A/A o K/A	3+	NEG	K/K o K/A	NEG	POS	POS	POS	<i>Enterobacter</i>
K/A o A/A	2+	NEG	K/K	NEG	NEG	POS	POS	<i>Serratia</i>
K/A	(+)	NEG	K/A o R/A	POS	POS	POS	POS	<i>Proteus</i>
K/A	1+	NEG	K/A o A/A	NEG	NEG	POS	POS	<i>Paratyphi</i>

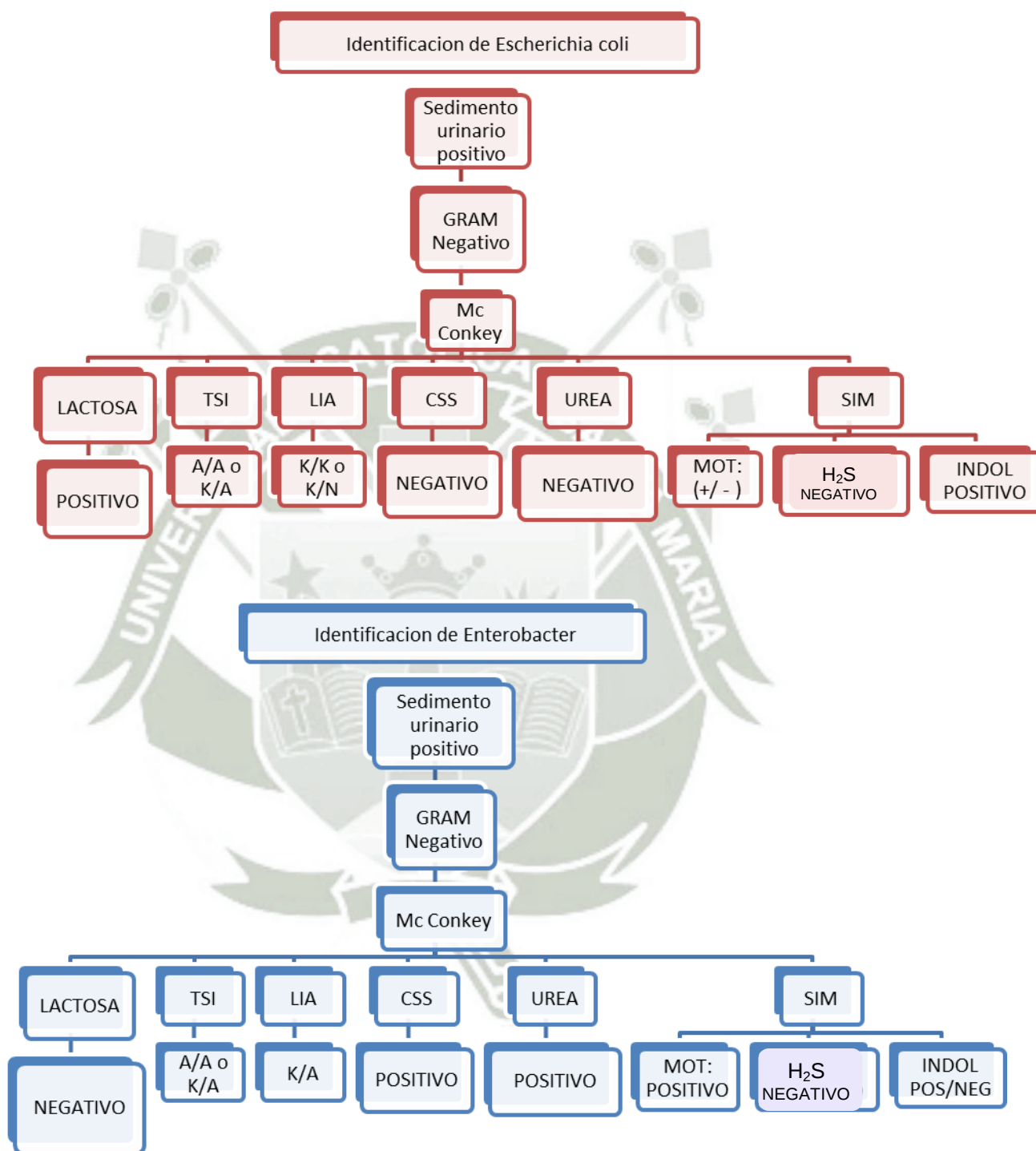
Fuente: Manual de Identificación de Oscar Grados

ANEXO 8: IDENTIFICACION DE BACTERIAS

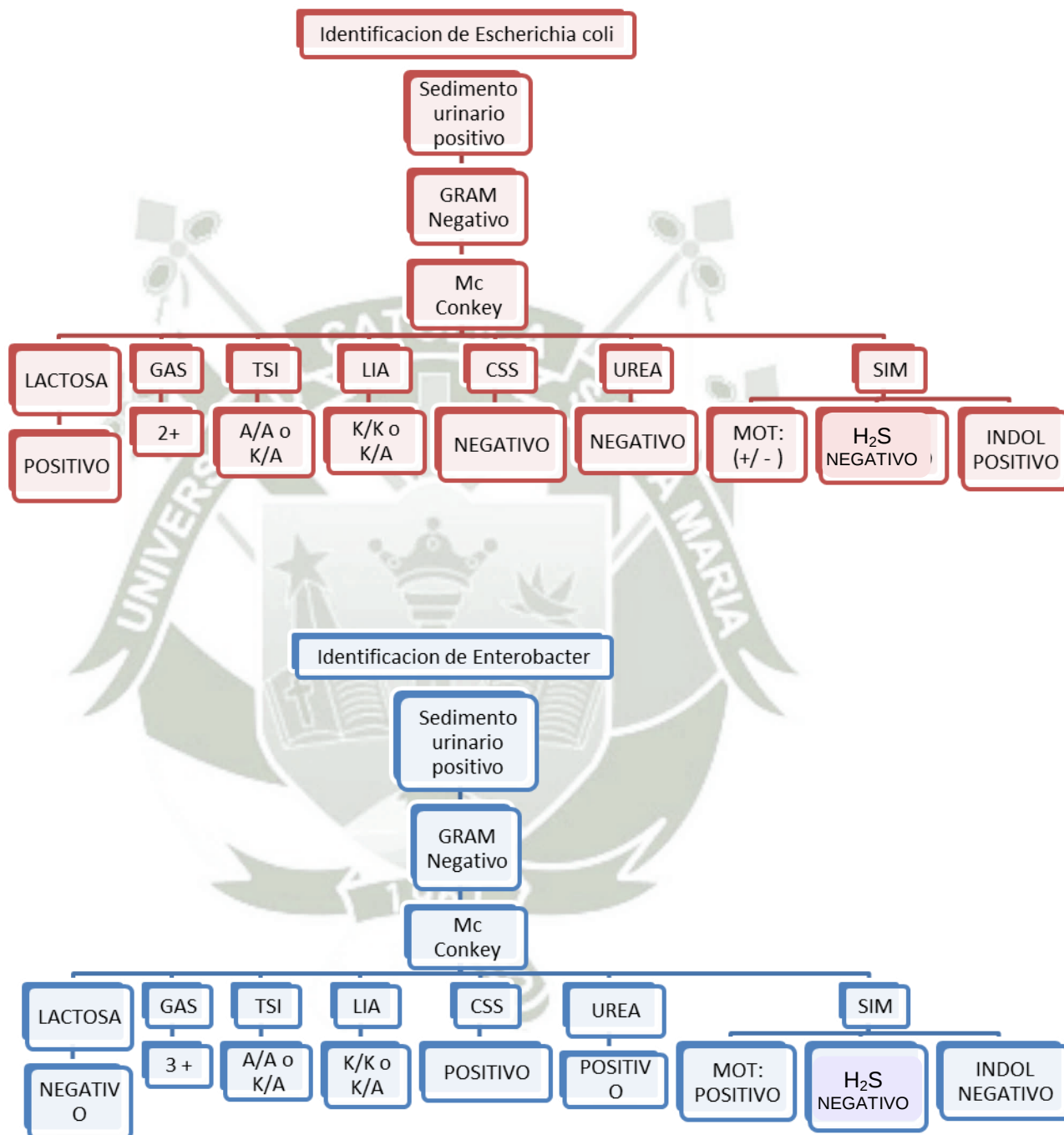
8.1. Procedimiento de identificación de bacterias Gram positivas



8.2. Procedimiento de identificación de bacterias (gas CO₂ negativo) H₂S negativo



8.3. Procedimiento de identificación bacterias (gasCO₂positivo) H₂S negativo



REFERENCIAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alina M.D. Llop Hernández 2001 Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo I
2. Betty A. Forbes 2009 Diagnóstico Microbiológico 12^{va} Edición SECCION 14 Parte VII Infecciones urinarias
3. P. García Martos, Fernando Paredes Salido, María Teresa Fernández del Barrio 1994 Microbiología clínica práctica 2^a Edición
4. Hugo Humberto Montoya Villafane 2da edición 2008 Microbiología básica para el área de la salud y afines
5. Marta Negroni 2009 Microbiología Estomatológica 2^a Edición
6. Evelyn Rodríguez Cavallini 2005 Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio
7. Luis Roberto Alarcón 2001 Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición.
8. Norma Nudelman 2004 Química sustentable
9. Farreras R, Rozman C. Medicina interna. 14 ed. Madrid: Harcourt-Brace; 2000. p. 869-71
10. Alfonso R. (DRT) Gennaro Ed. Médica Panamericana, 2003 Remington Farmacia / Remington The Science and Practice of Pharmacy Volumen 1
11. Josep Eladi Baños Díez, Magí Farré Albaladejo España, 2002 Principios de farmacología clínica
12. Gonzalo Hernández Herrero, Alfonso Moreno (COL) Gonzalez, Francisco Zaragoza (COL) Garcia, Alberto Porras (COL) Chavarino 2010 MediPharm. Tratado de Medicina Farmacéutica
13. Koneman 2008 Diagnóstico microbiológico 6^{ta} Edición
14. J. Keith Struthers, Roger P. Westran 2005 Bacteriología clínica
15. Fernando Dalet, Gerardo del Río 1997 Infecciones urinarias

16. Larry G. Reimer, Michael L. Wilson and Melvin P. Weinstein. 1997. Update on Detection of Bacteremia and Fungemia, Clinical Microbiology Reviews, vol10 N° 3
17. Sobel JD, Kaye D. Urinary tract infections. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 5ª Edición. New York: Churchill Livingstone; 2000. p.773-805
18. Dra. A. Andreu Barcelona España 2005 Etiología y Sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la Infección urinaria. ELSEVIER Journal
19. Judith Rojas Vera 2012 Agente etiológico más Frecuente en infección Urinaria Recurrente
20. L. Hernando Avendaño 2008 Nefrología clínica 3ª Edición
21. Jawetz, Melnick y Adelberg 2010 Microbiología médica, 25va. Edición
22. Manuel de la Rosa Fraile, José Prieto Prieto España, 2003 Microbiología en ciencias de la salud: conceptos y aplicaciones
23. Patton JP, Nash DB, Abrutyn E. Urinary tract infection: economic considerations. Med Clin North Am 1991; 75: p.495-513
24. Marcelo Daniel Peretta 2005 Reingeniería farmacéutica: principios y protocolos de la atención al paciente
25. Campbell-Walsh Urología 2008 9ª Edición Alan J. Wein, Louis R. Kavoussi, M.D., Andrew C. Novick, Alan W. Partin, M.D. Vol. 3 p.1885,2323
26. Rafael Zaragoza Crespo, Zaragoza Crespo, Cardona, Pemán García, Salavert Lleti 1ra Edición 2008 Microbiología Aplicada al Paciente Crítico
27. Jesús Medina Asensio 2000 Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones
28. A. Pascual Hernández 2013 Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica es la Publicación Oficial de la Sociedad Española SEIMC Journal microbiología clínica España
29. Oscar Grados Manual de Identificación bacteriológica en microbiología
30. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case 2007 Introducción a la Microbiología 9ª Edición p. 587-592

31. Sabine Althof, Joachim Kindler, Robert Heintz 2003 El sedimento urinario: atlas, técnicas de estudio, valoración
32. Susan King Strasinger, Marjorie Schaub Di Lorenzo 2010 Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales
33. Juan Ignacio Alós Cortés 2009. Atlas del antibiograma
34. Lorenzo, Moreno González, Leza, Lizasoain Hernández, Moro Sánchez, Portolés Pérez, Pedro Lorenzo Fernández 18va Edicion 2008 Velázquez. Farmacología Básica y Clínica
35. A Gelabert-Mas. Barcelona España 2006 Evolución de la Resistencia antibiótica en las Infecciones urinarias. ELSEVIER Journal
36. Gilberto Ángel Mejía, Mauricio Ángel Ramelli 2006 Interpretación clínica del laboratorio 7ª Edición. p. 363-365
37. Patrick R. Murray Manual de Microbiología Clínica 1999 7ª Edición
38. Michael J. Curtis, Morley Sutter 1999 Farmacología Integrada
39. Goodman y Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica II tomos 1998 novena edición
40. Heinz Lüllmann, Klaus Mohr, Lutz Hein 6ta Edicion 2010 Farmacología: texto y atlas
41. García Rodríguez JA, García Sánchez 1997 Resistencias bacterianas y antibioterapia. En: Eficacia in vivo Eficacia in vitro. E. Madrid-Barcelona: ed Doyma, S.A.,; 39-50.
42. Martínez Freijo P. 1997 Integrones: nueva causa de resistencia a antibióticos. Rev Esp Quimioterapia; 10: 191-194
43. Gómez J, Hernández-Cardona JL. Los aminoglucósidos: significación clínica. En Tratamiento Antimicrobiano. Madrid: Emisa, 1997; 227-239.
44. Palomino Mormontoy Karol Italo, Sensibilidad antibiótica en urocultivos de pacientes atendidos en el Hospital III Goyeneche, Arequipa 2012
45. Revista de Chile 2008 Infectología al día, Infección urinaria recurrente en la mujer. Journal
46. Echevarria Zarate Juan, Sarmiento Elsa, Osore Plengue Fernando 2006, Infección de tracto urinario y manejo antibiótico

47. Aguirre Gutierrez Victor Jesus, Etiologia bacteriana y sensibilidad en urocultivos de pacientes con ITU del Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza de Arequipa-2006
48. OMS, 2014, El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo.
49. García C Patricia. y Pérez C.Carlos, 2013, Hemocultivos con resinas
50. Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico 12va edición 2009pag. 584
51. Roger y Stanier Microbiología segunda edición 1998
52. Guillem Prats Microbiología Clínica Médica 1ra edición reimprimida 2008
53. P. Garcia Martos tercera edición 1996, Microbiología clínica práctica - Página 135
54. Evelin Rodriguez Cavallini 2005 Bacteriologia General Principios y prácticas de laboratorio
55. Jean F. MacFaddin 3ra Edición 2003 Pruebas Bioquimicas para la identificación de bacterias de importancia clinica
56. Carlos Gamazo Ignacio López-Goñi Ramón Díaz España 2005 Manual práctico de microbiología

REFERENCIAS DE INTERNET

- a. Carbón activado
<http://www.canromex.com/sitio/index.php/filtros-y-membranas/filtros-de-carbon-activado>
- b. Arkocapsulas de Carbón Activado:
http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/60618/FT_60618.pdf
- c. HemoRab Hemocultivos con Resinas
http://www.britanialab.com/productos/222_inserto_es.pdf
- d. Infección de tracto urinario en adultos. (2004) Digital Urology. Cohn EB, Schaeffer AJ
<http://www.duj.com/Article/Schaeffer/Schaeffer.html>
- e. Mecanismo de acción de los antibióticos
<http://www.scielo.org.com>

f. Mecanismos de acción

<http://www.vademecum.es>

g. Procedimiento de recuento de colonias:

www.pomif.com

