

870127

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
GUADALAJARA**

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11.
2oj

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



**DETERMINACION DE BETALACTAMASAS EN
Escherichia coli A PARTIR DE UROCULTIVOS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

MARCELA HERNANDEZ RIVAS

ASESOR: Q. F. B. Socorro Pulido Garcia

GUADALAJARA, JAL. 1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I.- INTRODUCCION.....	1
II.- ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.....	4
2.1.- Estructura de los antibióticos betalactámicos.....	5
2.2.- Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos.....	5
III.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.....	8
IV.- BETA-LACTAMASAS COMO FACTORES DE RESISTENCIA.....	10
4.1.- Mecanismos de acción y tipos de betalactamasas.....	11
4.2.- Beta-lactamasas cromosómicas.....	11
4.3.- Beta-lactamasas plasmídicas.....	13
4.4.- Beta-lactamasas cromosómicas en la familia Enterobacteriaceae.....	14
4.5.- Beta-lactamasas plasmídicas en la familia Enterobacteriaceae.....	14
V.- INFECCIONES DE VIAS URINARIAS.....	15
VI.- Escherichia coli.....	16
VII.- METODOLOGIA.....	21
7.1.- Recolección de muestras.....	22
7.2.- Aislamiento primario.....	22
7.3.- Aislamiento selectivo.....	22
7.4.- Identificación bioquímica.....	23
7.5.- Técnica acidométrica para determinar la presencia de beta-lactamasas.....	28
VIII.- RESULTADOS.....	30
8.1.- Aislamiento primario.....	31
8.2.- Aislamiento selectivo.....	31
8.3.- Identificación bioquímica.....	31
8.4.- Técnica acidométrica para determinación de beta-lactamasas.....	32
IX.- CONCLUSIONES.....	36
X.- BIBLIOGRAFIA.....	39

INTRODUCCION.

I.- INTRODUCCION.

El concepto de ANTIBIOSIS, sustancias derivadas de un microorganismo vivo que puedan matar a otro, es casi tan antiguo como la misma ciencia microbiológica; sin embargo la aplicación terapéutica antibiótica es prácticamente reciente y aún así se observa que por el uso de éstos, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia y uno de éstos es la producción de enzimas que inactivan al antibiótico.

La investigación de cepas productoras de betalactamasas tiene importancia clínica porque: a) Una bacteria que exhiba capacidad de producción, es un marcador que indica, con alto coeficiente, la predicción de que será resistente a los antibióticos betalactámicos, situación que se comprueba cuando se realicen pruebas de sensibilidad y concentraciones inhibitorias mínimas; b) Este conocimiento permitirá tomar decisiones en la selección del antimicrobiano.

Se da a conocer estadísticamente la frecuencia con que aparecen en *Escherichia coli* las enzimas betalactamasas a partir de su primocultivo en urocultivos.

Se expone la experiencia y metodología del procedimiento de tal manera que su realización pueda ser incluida en la rutina del laboratorio bacteriológico, y por lo tanto utilizar los antibióticos adecuados en casos realmente justificados para evitar su mal manejo y no aumentar así la diseminación de cepas multiresistentes.

Se prefirió *Escherichia coli* porque es responsable del 75% de las infecciones de vías urinarias, incluyendo: cistitis, piel

tis, y pielonefritis.

Escherichia coli es un comensal normal del aparato gastrointestinal y a partir de éste se pueden infectar elementos anatómicos vecinos cuando traspasan barreras normales.

La invasión de las vías urinarias viene del exterior a través de la uretra; pero la infección renal se debe a 'diseminación' por vía hematógena.

ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS.

II.- ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.

2.1 ESTRUCTURA DE LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.

Los antibióticos beta-lactámicos incluyen: penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas. La estructura básica de las penicilinas consiste en un anillo tiazolidina unido a un anillo betalactámico el que a la vez se conecta con una cadena lateral. (Fig.1)

El núcleo de penicilina es en sí el requerimiento estructural para la actividad biológica, cualquier transformación metabólica o alteración química causa la pérdida de toda actividad antimicrobiana significativa. El papel de la cadena lateral determina muchas de las características antibacterianas y farmacológicas de el tipo de penicilina que se trate.

2.2 MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS.

Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de pared celular, esencial para el crecimiento y desarrollo bacterianos normales.

El peptidoglicano es un heteropolímero componente de esta pared que proporciona estabilidad mecánica rígida, debido a su estructura de enrejado con abundantes uniones cruzadas. (Fig.2)

Está compuesto de cadenas de glicano (residuos de dos aminoazúcares: N-Acetilglucosamina y Ac. N-Acetilmurámico) ligadas transversalmente por uniones peptídicas.

Su síntesis consta de tres etapas:

- 1) Formación de precursores (en el citoplasma).
- 2) Polimerización (se une a la membrana celular).
- 3) Transpeptidación (formación total de una ligadura cruzada fuera del citoplasma).

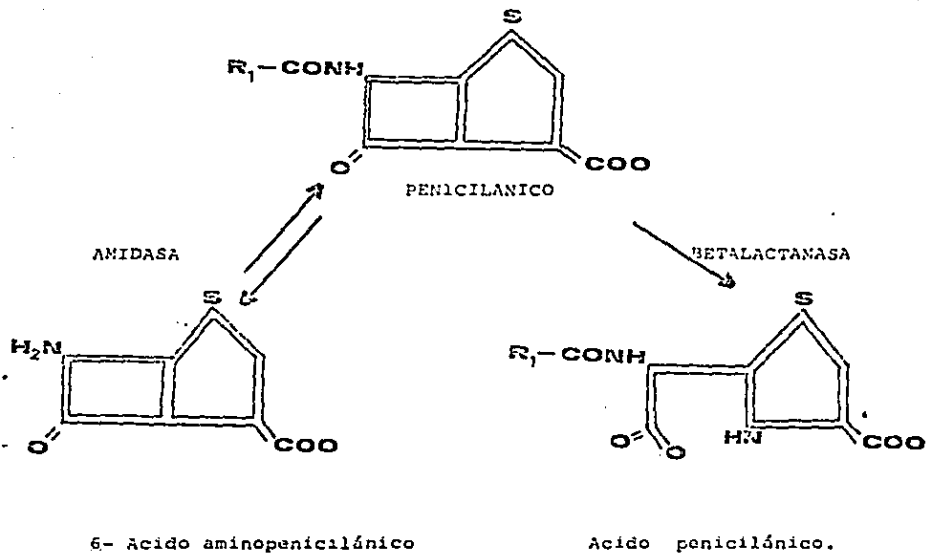


Fig.1. Efectos de las enzimas betalactamasa sobre los antibióticos penicilánicos.

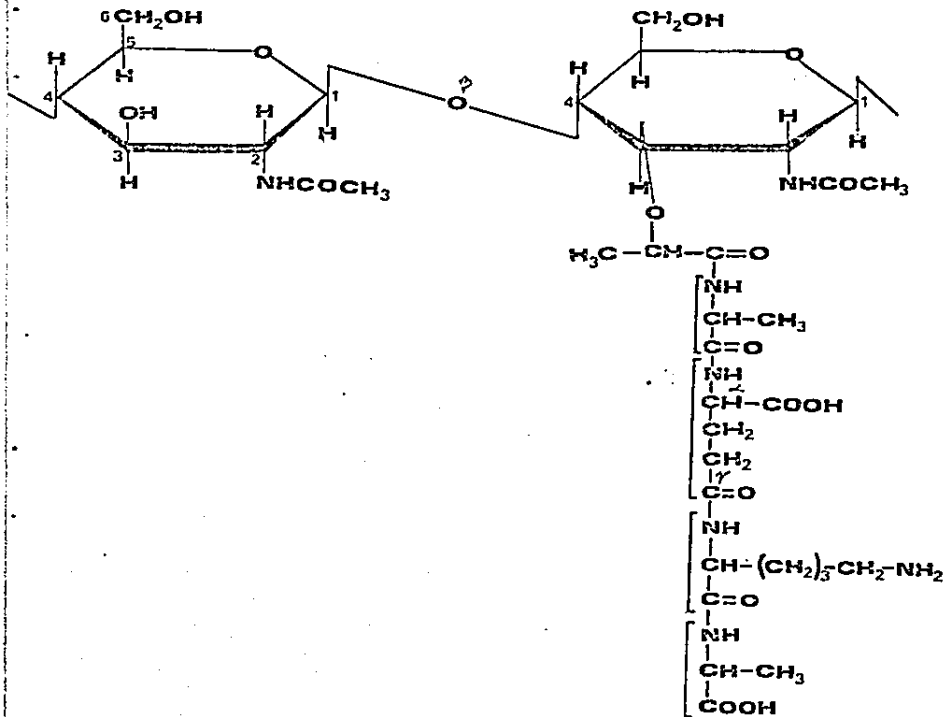


Fig.- 2 Estructura del peptidoglicano.

Esta última etapa es la que inhibe el anillo Beta-lactámico produciendo ciertos efectos.

Todas las eubacterias contienen múltiples moléculas de proteínas que se unen covalentemente a las penicilinas y a otros betalactámicos: P.F.P. (Proteínas Fijadoras de Penicilina); generalmente hay de tres a ocho P.F.P. diferentes en cada bacteria. Y se han de finido dos grupos:

1) P.F.P. de bajo peso molecular: no son afectadas por cefalosporinas, pero sí por muchas penicilinas, son más abundantes y no parecen ser necesarias para la viabilidad bacteriana.

2) P.F.P. de alto peso molecular: de mayor sensibilidad tanto a penicilinas como cefalosporinas; se encuentran en menor cantidad y si son esenciales para la viabilidad celular; al unirse el antibiótico beta-lactámico producen diversos desequilibrios. Las principales son:

a) P.F.P. 1A y P.F.P. 1B: Interservienen en el crecimiento longitudinal de la bacteria mediante reacciones de transpeptidación.

b) P.F.P. 2: Es probable que funcione como transpeptidasa; el resultado morfológico de la actividad del antibiótico sobre la proteína es la aparición de células ovales, grandes, que se lisan después de algunas horas.

c) P.F.P. 3: El betalactámico que afecta esta proteína desacopla las primeras etapas de la división bacteriana: iniciación de el septo y formación completa del mismo, en consecuencia se provoca filamentación.

Se puede concluir que los antibióticos beta-lactámicos inhiben la transpeptidación y el resultado es la síntesis de una pared debilitada, incapaz de resistir la presión osmótica-mecánica de la

celula en condiciones de crecimiento normal.

Para que un beta-lactámico actúe con eficacia debe ser estructuralmente similar a los sustratos fisiológicos como para permitir su reconocimiento por enzimas sensibles para la síntesis de la pared celular; debe producirse un enlace betalactámico muy reactivo que facilite la unión al sitio activo de la P.F.P. y debe haber mínima transferencia de penicilina ya modificada, o sea una inhibición irreversible.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS
BETA--LACTAMICOS.

III.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS

Los antibióticos beta-lactámicos han sido y son los de mayor consumo en el mundo, las principales razones son su baja toxicidad y su acción inhibitoria altamente selectiva.

Sin embargo, las bacterias ya han desarrollado mecanismos de resistencia para estos antibióticos que se clasifican en cuatro categorías:

- 1) INACTIVACION: Actividad de enzimas modificadoras e inactivadoras del núcleo del antibiótico.
- 2) CAMBIOS METABOLICOS: Alteración en el control de beta-lactamasas.
- 3) PERMEABILIDAD ALTERADA: Membrana externa con permeabilidad disminuída.
- 4) MODIFICACION EN EL BLANCO: Cambios en las proteínas fijadoras de penicilina.

Dependiendo del caso, las bases genéticas de estos mecanismos se encuentran en plásmidos o en el cromosoma bacteriano; desde el punto de vista clínico y epidemiológico, los primeros son de mayor relevancia.

BETALACTAMASAS COMO FACTORES-DE RESISTENCIA.

IV.- BETALACTAMASAS COMO FACTORES DE RESISTENCIA.

4.1 MECANISMO DE ACCION Y TIPOS DE BETALACTAMASAS.

Las betalactamasas son enzimas bacterianas que actúan hidrolizando el enlace amida del anillo beta-lactámico; en el caso de la penicilina produce ácido peniciloico, molécula que no ejerce ninguna acción inhibitoria, y a consecuencia de ello el antibiótico pierde actividad. (Fig. 1).

Se ha demostrado la existencia de un número considerable de betalactamasas diferentes, codificadas por genes cromosómicos, a veces tantas por lo menos como especies bacterianas; existen, además, betalactamasas codificadas por genes extracromosómicos (plasmídicos), muchos de los cuales se encuentran formando parte de transposones.

Aunque las betalactamasas son características de los microorganismos que poseen glucopéptido en su pared celular, se ha descrito su presencia en algunas células eucarióticas como es el ejemplo de algunas levaduras.

4.2 BETALACTAMASAS CROMOSOMICAS.

Se ha aceptado que todas las bacterias con glucopéptido en su pared celular tienen en su cromosoma genes que codifican la producción de una enzima capaz de hidrolizar el anillo beta-lactámico.

En algunos tipos de bacterias son características de género, especie, y aún de subespecie. Y se han clasificado en dos tipos: Constitutivas e Inducibles.

Las betalactamasas cromosómicas constitutivas siempre están presentes y limitadas genéticamente en cantidad y actividad.

En el caso de las especies productoras de betalactamasas cromosómicas inducibles la síntesis está normalmente reprimida; la producción se inicia en presencia de un estímulo. Generalmente su producción es temporal (mientras dure el estímulo) y abundante. Son muy activas.

Las betalactamasas cromosómicas, como se indicó, contribuyen a delimitar el espectro de un antibiótico betalactámico; pero, además pueden ser causa de resistencia adquirida, ya que, por mutación pueden aparecer cepas hiperproductoras de estas enzimas.

En cuanto a *Escherichia coli*, se trata de una enzima constitutiva, en el sentido de que ni los antibióticos beta-lactámicos ni otros efectores externos modifican su expresión; sin embargo la expresión del gen estructural está regulada por la presencia de un atenuador líder.

Se han pronunciado teóricamente tres tipos de mutantes que producen mayor cantidad de betalactamasa cromosómica:

- a) Mutación en el atenuador, que puede abolir completamente la terminación de la transcripción y puede incrementar la producción de betalactamasa hasta cuatro o cinco veces.
- b) Mutación a nivel de un promotor.
- c) Amplificación repetitiva de un gen.

En las cepas de especies productoras de betalactamasa inducible, la causa de resistencia más frecuente es la mutación responsable de una alteración en el represor o atenuador que conduce a producción constitutiva de la enzima.

Este tipo de resistencia por mutación, aunque de graves consecuencias, únicamente es de difusión vertical. Su repercusión en clínica será significativa en la medida en que la descendencia di

recta de una cepa con estas características pueda difundirse por contacto directo o indirecto de un paciente a otro.

4.3 BETA LACTAMASAS PLASMIDICAS.

La producción de betalactamasas puede ser codificada por genes situados en plásmidos. La difusión de este mecanismo de resistencia es doble, por herencia vertical (de célula madre a célula hija) y por paso horizontal de los plásmidos, (por conjugación o transducción) a bacterias próximas.

Las propiedades más relevantes de los plásmidos para explicar la difusión de los genes que codifican las betalactamasas son: su gamma de huéspedes y su capacidad de autotransferencia por conjugación.

Los plásmidos conjugativos se encuentran en bacterias grampositivas y gramnegativas, con pocas excepciones existe una barrera absoluta para la transferencia de plásmidos entre estos dos grupos bacterianos. De modo similar, también existen limitaciones para la transferencia plasmídica entre bacterias gramnegativas aerobias facultativas y anaerobias estrictas.

Sin embargo, las características de los plásmidos serían solamente una explicación parcial de la distribución de estos determinantes de resistencia. Muchos de los genes que codifican estas betalactamasas forman parte de transposones, elementos genéticos que pueden integrarse en puntos diferentes de los ADN.

Estas propiedades de los plásmidos, unidas a la capacidad de transposición de los genes que codifican la síntesis de la mayoría de betalactamasas plasmídicas, contribuyen a su difusión. Así betalactamasas en un principio confinadas a un grupo bacteriano, pueden observarse, tarde o temprano en otras especies, inclusive-

vamente taxonómicamente alejadas.

En las bacterias gramnegativas las betalactamasas, a diferencia de lo que ocurre en las grampositivas, son enzimas que casi siempre están retenidas en espacios periplásmicos.

4.4 BETALACTAMASAS CROMOSOMICAS EN LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

En la familia Enterobacteriaceae la influencia de la betalactamasa cromosómica de las diferentes especies es decisiva en la respuesta a los antibióticos betalactámicos. Sus características les permiten distribuirse en tres grupos:

- a) Betalactamasas constitutivas y poco activas.
- b) Betalactamasas constitutivas y relativamente activas.
- c) Betalactamasas inducibles y muy activas.

4.5 BETALACTAMASAS PLASMIDICAS EN LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

En la familia Enterobacteriaceae las betalactamasas plasmídicas desempeñan un papel importante como causa de resistencia adquirida. Los plásmidos portadores de los genes que codifican estas betalactamasas, pueden alcanzar cualquiera de los géneros o especies y por tanto pueden ser producidos por todos ellos, aunque más frecuentemente en unos que en otros.

Estas betalactamasas suman en su actividad la correspondiente a la betalactamasa cromosómica.

INFECCIONES DE VIAS URINARIAS.

V.- INFECCIONES DE VIAS URINARIAS.

Las infecciones de las vías urinarias son sumamente frecuentes; algunas son además rebeldes a tratamiento y su probabilidad de recaída es altísima.

Escherichia coli es la causante de más del 75% de las infecciones de vías urinarias; incluyendo cistitis, pielitis y pielonefritis e incluso bacteriuria; en casos de infecciones por otros microorganismos, la regla es que existan antecedentes de introducción de una sonda o algún otro instrumento en las vías urinarias.

La edad y sexo son factores acompañantes a estos tipos de problemas. Existen en el 1-4% de las mujeres desde la infancia hasta la edad de gestación, cuando aumenta la frecuencia; pero su mayor incremento se presenta alrededor de los sesenta años; después de esa época disminuye al 2% de las mujeres.

En los hombres, las infecciones son raras por debajo de los cincuenta años y en grupos de más edad son notablemente menos comunes que en las mujeres.

Son frecuentes en el 4-8% de las mujeres embarazadas y otro incremento se presenta cuando se aplica cateterismo al momento o después del parto.

Cualquier obstáculo al libre flujo de orina: tumor, constricción, cálculos; causa aumento de infección.

La elección del agente antimicrobiano adecuado, implica alta responsabilidad por los problemas de resistencia a antibióticos ya expuestos.

Debe llevar consigo la orientación del laboratorio donde previamente hayan determinado su sensibilidad *in vitro*.

Como no hay fármaco uniformemente activo contra todas las cepas de *Escherichia coli*; varias son las sustancias posiblemente eficaces: tetraciclinas, ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, polimixina B, cefalosporinas y penicilinas.

Siendo uno de los puntos importantes, la determinación de la producción de betalactamasas por esta bacteria como factor de resistencia a penicilina y cefalosporinas; se propone un método, su experiencia y metodología para su fácil realización en el laboratorio y que pueda ser incluido en la rutina microbiológica, así como el resultado estadístico de la frecuencia de producción de estas enzimas por *E.coli*.

Escherichia coli.

VI. *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, no formador de esporas, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, que se reconoce como única especie, y su serotipificación se basa en la distribución de sus antígenos O, H, y K; (somático, flagelar y capsular, respectivamente).

Por ser fermentador de lactosa se incluye en el grupo de bacterias coliformes, junto con *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.

Los bacilos coliformes son anaerobios facultativos, y su crecimiento óptimo se efectúa a 37°C.

Escherichia coli es comensal del aparato gastrointestinal, pero puede infectar otros órganos anatómicos. El interés en esta investigación es la invasión a vías urinarias.

Una de las características de *Escherichia coli* es que sigue la vía de producción de ácidos mixtos, dando positiva la prueba de rojo de metilo y negativa la de Voges-Proskauer; característica que la distingue de los demás grupos pertenecientes a los coliformes y a otros miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Normalmente *Escherichia coli* es susceptible a una variedad amplia de antibióticos de amplio espectro, entre los cuales se incluye: tetraciclinas, cloranfenicol, ampicilinas, eritromicinas, neomicina, estreptomycinina y sulfonamidas.

Sin embargo, presenta resistencia frecuente a muchos medicamentos, debido principalmente a plásmidos, aunque también a genes cromosómicos.

Por lo tanto por ser un organismo que invade comúnmente otro tipo de órganos, se propone la siguiente metodología para investi-

gar su producción de betalactamasas.

METODOLOGIA.

VII.- METODOLOGIA.

7.1 RECOLECCION DE MUESTRAS:

Se debe recoger la muestra de orina en un frasco completamente estéril y después del aseo adecuado.

La orina favorece el crecimiento de los gérmenes por lo que es absolutamente necesario se efectúe el cultivo en la hora siguiente a su recolección o que se mantenga en refrigeración a 4° C hasta el momento necesario.

7.2 AISLAMIENTO PRIMARIO.

PLACA FRACCIONADA:

1) Preparar tres diluciones de orina, con agua destilada estéril en tubos esterilizados de tapón de rosca.

1:10 - 1 ml. de orina - 9 ml. de agua destilada.

1:100 - 1 ml. de dilución 1:10- 9 ml. de agua destilada.

1:1000- 1 ml. de dilución 1:100- 9 ml. de agua destilada.

2) Pasar 1 ml. de cada dilución a cajas de petri previamente esterilizadas.

3) Cubrir la dilución con 15-20 ml. de agar cuenta gérmenes fundido y enfriado y mezclar bien haciendo girar las cajas.

4) Incubar 24 hrs. a 37°C.

5) Estimar las colonias en un contador Quebec y escoger la placa que de entre 30 y 300 colonias. Multiplicar por la dilución y obtener el número total de bacterial por mililitro de orina.

Según KASS el recuento bacteriano en la orina de pacientes infectados muestra más de 100,000 (10^5) microorganismos/ml.

7.3 AISLAMIENTO SELECTIVO.

1.- Resembrar directamente una colonia de la caja de agar nutritivo (tras previa correlación de un frotis al Gram de presencia de bacilos gram negativos) a una caja de agar Mac Conkey ó EMB (Eosina- azul de metileno).

2.- Incubar 24 hrs. a 37°C.

Escherichia coli es el típico fermentador de lactosa, por lo tanto es el parámetro principal utilizado para descartar si se trata o no de esta bacteria.

El agar de Mac Conkey contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas y de algunas especies gram negativas exigentes.

La lactosa es el único hidrato de carbono en este medio. Y *E. coli* forma colonias con tono rojo debido al viraje del indicador rojo neutro (es rojo a un pH menor de 6.8), ya que produce grandes cantidades de ácidos. Sus colonias están rodeadas de una zona de bilis precipitada.

Otra de sus características es que casi todas sus colonias son secas.

El agar EMB (Eosina-Azul de metileno) fue utilizado también ya que contiene estos colorantes de anilina que se combinan precipitando a un pH ácido. *Escherichia coli* produce colonias color negro verdoso con brillo metálico inconfundibles. El agar EMB tiene la ventaja de revelar la naturaleza mucóide de algunas cepas de *E. coli* debido a un aumento de producción de sustancias polisacáridas en este medio y que en otro medio podrían ser confundidas con *Klebsiella*.

7.4 IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

De los cultivos positivos presuntivos de *Escherichia coli*

se procede a una batería esencial para identificación: Agar hierro de Kligler, SIM e IMViC.

La clasificación de las bacterias está basada en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas que están codificadas por el cromosoma bacteriano.

Estas enzimas guían el metabolismo bacteriano por diferentes vías que se pueden detectar con diferentes pruebas in vitro.

Escherichia coli cuenta con las siguientes características:

PRUEBA O SUSTRATO	
INDOL	POSITIVO
ROJO DE METILO	POSITIVO
VOGES-PROSKAUER	NEGATIVO
CITRATO DE SIMMONS	NEGATIVO
SULFURO DE HIDROGENO	NEGATIVO
UREASA	NEGATIVO
MOVILIDAD	POSITIVO O NEGATIVO
GELATINA	NEGATIVO
LISINA DESCARBOXILASA	TARDIO
ARGININA	TARDIO
ORNITINA	TARDIO
FENIL ALANINA DESAMINASA	NEGATIVO
MALONATO	NEGATIVO
GAS A PARTIR DE GLUCOSA	POSITIVO

PRUEBA O SUSTRATO

LACTOSA**POSITIVO****SACAROSA****TARDIO**

Tabla 1.- Características del metabolismo bacteriano de *E. coli*.

a) Agar hierro de Kligler: De la placa de agar de Mac Conkey debe tomarse una sola colonia aislada de *E. coli*. Se inocula con un alambre recto, con el cual se atraviesa la parte profunda del tubo tras retirar el alambre se estría el pico.

Incubar a 35° C. de 18 - 24 hrs.

La fermentación bacteriana de lactosa es más compleja que la de glucosa. La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa conectadas por un átomo de oxígeno, que forma lo que se llama unión galactósida. Por hidrólisis se destruye esta unión liberándose los dos monosacáridos. Para que una bacteria utilice la lactosa deben estar presentes dos enzimas: la beta-galactósido-permeasa, que permite la trans migración de beta-galactósidos a través de la pared celular bacteriana y la beta-galactosidasa, requerida para la hidrólisis de la unión beta-galactósido. Las degradaciones ácidas finales provienen de la degradación de la glucosa. (vía Embden-Meyerhof).

Los resultados obtenidos en el Kligler se interpretan de la siguiente forma:

Pico ácido/Fondo ácido: glucosa y lactosa fermentadas. Es característico de coliformes fermentadores de lactosa como *E. coli* y el grupo *Klebsiella-Enterobacter*. No hay producción de gas H₂S.

b) Indol: (SIM: sulfhídrico, indol, motilidad): se inocula el medio de SIM, por picadura, se incuba a 35°C de 48-72 hrs. Para su lectura se utiliza el reactivo de KOVAK. Revisar motilidad.

El indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de degradar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco.

El indol se detectó en el medio apropiado, observando la aparición de un color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el medio, segundos después de añadir el reactivo y es indicativo de presencia de indol.

Se utilizó reactivo de Kovac, aunque menos sensible, ya que emplea alcohol anílico como diluyente que es capaz de extraer suficiente indol del medio acuoso sin la necesidad de añadir cloroformo como extrayente.

c) Rojo de metilo-Voges Proskauer: Inocular este caldo a 35°C de 48-72 hrs.

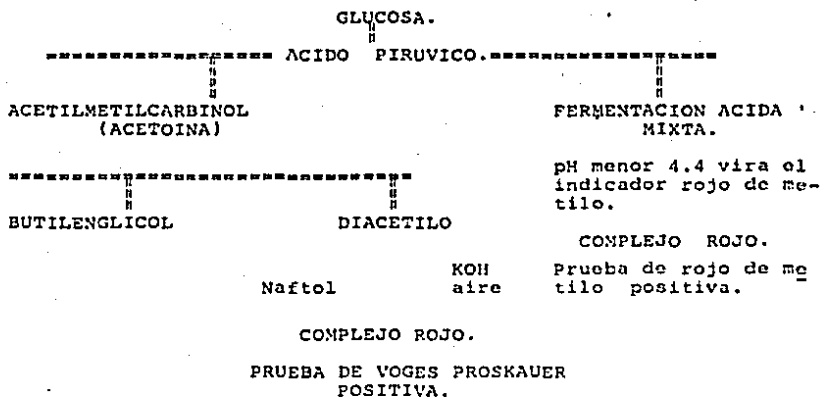
Rojo de metilo: al término de la incubación añadir 0.6 ml del indicador rojo de metilo.

Voges-Proskauer: al término de la incubación añadir 0.6 ml de alfa-naftol al 5% y 0.2 ml de KOH al 40%. Dejar reposar de 10-15 minutos.

Las bacterias que siguen la vía de la producción de ácidos mixtos, producen suficiente ácido como para mantener el pH por debajo de 4.4 contra el sistema estabilizador del pH del medio, por lo tanto todas las copas de Escherichia coli dan la prueba positiva de Rojo de Metilo.

Algunos grupos de bacterias convierten el acetil-metilcarbinol en diacetilo por acción de KOH y oxígeno atmosférico. El diacetilo se convierte en un complejo rojo por adición de alfa-naftol y creatina indicando que la prueba es positiva. Por lo tanto *E. coli* es Voges-Proskauer negativa.

El siguiente esquema muestra las dos vías alternativas (ácidos mixtos y butilenglicol) para el metabolismo del piruvato formado por fermentación de glucosa.



d) Citrato de Simmons: Incubar por picadura y estría este medio e incubar a 35°C por 24-48 hrs.

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, metabolito constituyente del ciclo de Krebs. Algunas bacterias pueden obtener energía por vía distinta de la de fermentación de hidratos de carbono, utilizando citrato como única fuente de carbono. *Escherichia coli* no cuenta con esta característica, por lo tanto da una prueba negativa.

La prueba se detecta por medio de la formación de subproductos alcalinos en un medio que contiene citrato como única fuente de carbono. Da un desarrollo de un color azul intenso en 24-48 hrs la prueba positiva.

7.5 TECNICA ACIDOMETRICA PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE BETA-LACTAMASAS.

Una vez identificada E. coli proceder a ésta prueba.

Reactivo: A 16.6 ml de agua destilada se le adicionan 2.0 ml de solución de rojo de fenol al 0.5% y 20 millones de unidades de penicilina G potásica. Se mezcla perfectamente y se ajusta a pH de 8.5 dejando caer gota a gota el NaOH 1N.

La coloración obtenida debe ser violeta intenso y se deposita en cantidades de 0.5 ml en tubos de tapón de rosca. Debe almacenarse en congelación hasta ser utilizada.

Se prepara una suspensión bacteriana de la cepa pura, mayor de 10^7 unidades formadoras de colonias por cada ml, lo que equivale a una densidad mayor al estandar de Mac. Farland No. 4

Comprobar que el reactivo al descongelarse tenga un pH de 8.5

La mezcla debe estar a temperatura ambiente. Adicionar un ml. de la solución bacteriana. Después de reposar 15 minutos, se considera positivo cuando la solución adopta un color amarillo y es indicativo de presencia de betalactamasa positivo.

La presencia de betalactamasa produce la ruptura del anillo de penicilina con producción de ácido penicilánico, produciendo acidez en el medio, que está a un pH de 8.5. La presencia de rojo de fenol como indicador, cuando está presente el ácido penicilánico produce una caída del pH a 6.8 o menos y produce un vi

raje de la suspensión a un color amarillo que es indicativo de la presencia de la enzima.

RESULTADOS.

VIII.- RESULTADOS.

8.1 AISLAMIENTO PRIMARIO:

Un urocultivo positivo es aquel que contiene más de 100,000 microorganismos por mililitro de orina. Se escogió el método de placa fraccionada, porque es el que obtiene exactamente unidades formadoras de colonias.

Todos los cultivos positivos (100 muestras) fueron recolectados de las placas con dilución 1:1000, pues es donde desarrollaron de 100 a 300 colonias. Los positivos en la dilución 1:100 fueron indicativos únicamente de contaminación, quizás por mal empleo de las instrucciones de aseó.

8.2 AISLAMIENTO SELECTIVO:

Ya que *Escherichia coli* es el típico fermentador de lactosa; los resultados de la resiembra en el agar de Mac Conkey que contiene lactosa como único hidrato de carbono fueron de desarrollo de colonias con tono rojo debido al viraje del indicador rojo neutro; y claramente se ven colonias rodeadas de una zona de bilis precipitada. Todas son colonias secas.

En el agar EMB (Eosina-Azul de Metileno), *Escherichia coli* produjo colonias color negro verdoso con brillo metálico inconfundibles. Solo dos cepas revelaron naturaleza mucóide, que al meterles la batería de bioquímicas si se comprobó que fueran *Escherichia coli*.

8.3 IDENTIFICACION BIOQUINICA.

La batería de identificación reveló los siguientes resultados para las 100 cepas de *Escherichia coli*:

GLUCOSA	POSITIVO
LACTOSA	POSITIVO

SULFURO DE HIDROGENO	NEGATIVO
INDOL	POSITIVO
MOTILIDAD	POSITIVO O NEGATIVO
CITRATO	NEGATIVO
ROJO DE METILO	POSITIVO
VOGES-PROSKAUER	NEGATIVO

a) Agar hierro de Kligler: Los resultados en este medio se interpretaron de la siguiente manera:

Pico ácido/Fondo ácido: Glucosa y lactosa fermentadas. Es característico para todas las cepas de *Escherichia coli* que se aíslan.

b) Indol: Para todas las cepas se observó el desarrollo del color fucsia característico en la interfase del reactivo y el medio.

c) Rojo de metilo: Todas las cepas de *Escherichia coli* tienen la capacidad de dar esta prueba positiva, ya que mantiene estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vence la capacidad amortiguadora del sistema. Por lo tanto se observaron en todos los ensayos, la aparición del viraje a un color rojo.

d) Prueba de VOGES-PROSKAUER: Todas las cepas de *Escherichia coli* dan la prueba negativa, ya que produce ácidos pero no 2,3-butienglicol; por lo tanto se observa el caldo con el mismo color del reactivo (amarillo) sin viraje.

e) Utilización de Citrato: *Escherichia coli* da la prueba negativa por lo tanto se observó el medio sin crecimiento ni cambio de color completamente verde.

8.4 METODO ACIDOMETRICO PARA DETERMINACIÓN DE BETA-LACTAMASAS.

De 100 muestras identificadas como *Escherichia coli*, dio una producción de positivos para beta-lactamasas de 27. O sea que el 27% de las cepas de *Escherichia coli* son resistentes a los antibióticos.

betalactámicos.

Esto se interpreta en el sentido de que la probabilidad de una cepa de *Escherichia coli* registrada como positiva por el método acimétrico es 0.27 .

Sin embargo en la práctica clínica, se túvieran por ejemplo a procesar 10 muestras de urocultivo para determinación final de presencia de betalactamasas, y se quiera saber cual es la probabilidad de que exactamente una muestra resulte positiva; para ello es necesario emplear una distribución estadística, la DISTRIBUCION BINOMIAL, pues sirva para reflejar la probabilidad exacta de obtener en determinado evento o ensayo una muestra positiva.

Esta distribución conduce a uno de dos resultados posibles, mutuamente excluyentes (o es positivo o es negativo), y donde consideramos a todos los ensayos como independientes; es decir, el resultado de cualquier ensayo particular, no es afectado por el resultado de cualquier otro ensayo.

Es decir, la probabilidad resultante de que una muestra sea positiva en un conjunto de 10 no será la misma en la que el ensayo sea de un conjunto de 20 muestras.

La ecuación de la distribución Binomial es la siguiente:

$$f(x) = \binom{n}{x} \cdot q^{n-x} \cdot p^x \quad \text{donde: } \binom{n}{x} = n! / x!(n-x)! \quad \text{para } x = 0, 1, 2, \dots, n$$

n = Número de muestras a procesar.

x = Variable aleatoria (número de muestras positivas en n ensayos).

p = Muestra con resultado positivo.

q = Muestra con resultado negativo.

Osea que la probabilidad exacta de que una muestra nos resulte positiva en un conjunto de 10 muestras es la siguiente:

$$f(1) = \binom{10}{1} (0.73)^9 (0.27) =$$

$$f(1) = (10! / 9! 1!) (0.73)^9 (0.27) = 0.16$$

Por lo tanto siempre deberá tomarse en cuenta este detalle probabilístico, según el número de muestras que se estén tratando en el momento.

El esquema estadístico se representa de la siguiente manera:

Calculando la distribución binomial de la obtención de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 muestras positivas. Se obtuvo la siguiente tabla que posteriormente se graficó:

x	PROBABILIDAD
0	$(10! / 0! 10!) (0.27)^0 (0.73)^{10} = 0.0429$
1	$(10! / 1! 9!) (0.27)^1 (0.73)^9 = 0.1589$
2	$(10! / 2! 8!) (0.27)^2 (0.73)^8 = 0.2645$
3	$(10! / 3! 7!) (0.27)^3 (0.73)^7 = 0.2609$
4	$(10! / 4! 6!) (0.27)^4 (0.73)^6 = 0.1688$
5	$(10! / 5! 5!) (0.27)^5 (0.73)^5 = 0.0758$
6	$(10! / 6! 4!) (0.27)^6 (0.73)^4 = 0.0231$
7	$(10! / 7! 3!) (0.27)^7 (0.73)^3 = 0.0048$
8	$(10! / 8! 2!) (0.27)^8 (0.73)^2 = 0.0006$
9	$(10! / 9! 1!) (0.27)^9 (0.73)^1 = 0.00005$
10	$(10! / 10! 0!) (0.27)^{10} (0.73)^0 = 0.000002$
	SUMA = 1.0000

Como se puede observar la región de 1 a 4 muestras positivas es la de probabilidad más alta. Esto es de mucha significancia en la clínica porque es de alto riesgo el valor esperado de muestras positivas en un conjunto de muestras a tratar.

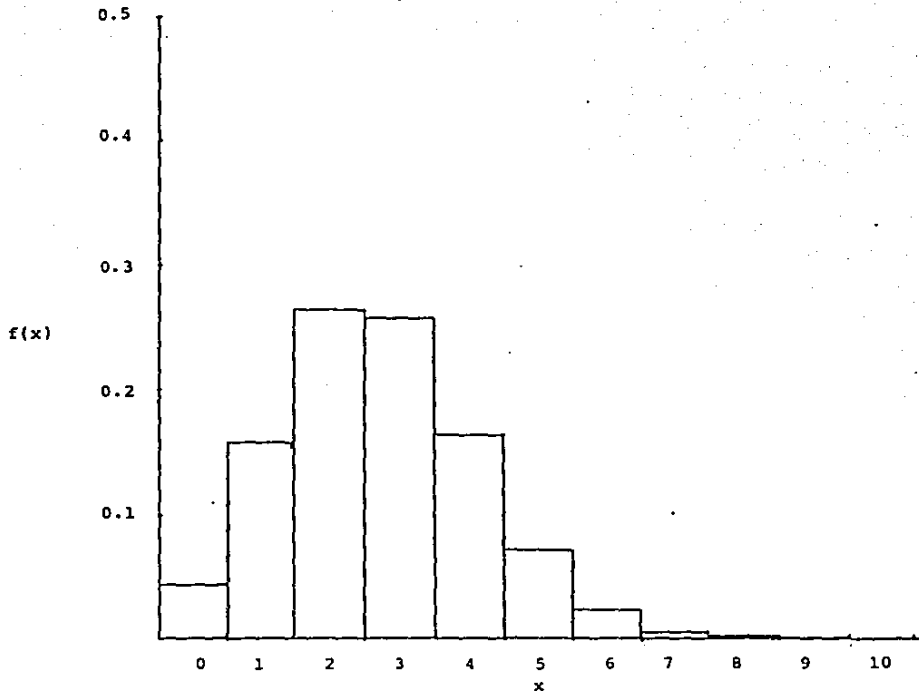


Fig.- 3 Distribución de probabilidad binomial

CONCLUSIONES.

IX.- CONCLUSIONES.

Es muy importante la decisión a tomar sobre el antimicrobiano para combatir una infección. Es fundamental tratar de evitar la producción de cada vez más, cepas resistentes a los antibióticos que el hombre tiene a su alcance.

Por lo tanto, la comunicación entre el médico y paraclínica es trascendental; es necesario investigar en todo cultivo que se obtenga una cepa, que se suponga o se tenga casi la certeza de que sea mutante u obtenga fácilmente resistencia, se practiquen pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, antes de seleccionar cualquier antibiótico.

Después de expuesta la experiencia y metodología de este sistema acidométrico para determinación de betalactamasas en *Escherichia coli*; es de consideración sea incluido en la rutina bacteriológica de cualquier laboratorio, tanto por su bajo costo, como por ser muy seguro y de fácil realización; añadiendo además que una bacteria que exhiba capacidad de producción de la enzima, es un marcador que indica, con alto coeficiente, la predicción de que será resistente a antibióticos betalactámicos; situación que puede comprobarse cuando se realicen pruebas de sensibilidad y concentraciones inhibitorias mínimas; pudiendo evitar este paso para este tipo de antibióticos, y hacer estas pruebas solo para las restantes opciones; reduciendo aún más el costo del proceso.

Este método puede ser aplicado a bacterias, tanto gram negativas como gram positivas; siendo así más amplia su utilidad.

Los antibióticos de elección para infecciones del tracto urinario causadas por *Escherichia coli* son sulfonamidas y ampicilina; siendo la ampicilina un antibiótico betalactámico es necesario realizar esta prueba.

A pesar de que la betalactamasa de tipo cromosómico en *Escherichia coli*, es de tipo constitutivo, y que ningún efector externo pueda modificar su expresión, se conoce que existe el peligro de los mutantes y esto es una de las razones por las que se trata de evitar su propagación.

Pero también las betalactamasas plasmídicas desempeñan un papel importantísimo como causa de resistencia, los genes que las codifican pueden alcanzar cualquier género y especie y por lo tanto ser producidas posteriormente por bacterias gram positivas.

El realizar este método no solo protege a un solo paciente, sino a toda la población.

Por lo tanto no olvidar, el porcentaje relativamente alto de probabilidad de que una copia *Escherichia coli* sea betalactamasa positiva es igual a 0.27. Y considerando las probabilidades particulares en realidad, del número de muestras o situación que se presente.

Además considerando que *Escherichia coli* no ocupa uno de los primeros lugares en producción de estas enzimas, como otras bacterias; por lo que aún más debe tomarse todo en cuenta.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA.

Freeman B., TRATADO DE MICROBIOLOGIA DE BURROWS,
Segunda Edición, México, Interamericana, 1984, 499-517.

Finagold, Martin, DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO,
Sexta Edición, Argentina, Panamericana, 1983, 94-100 y
227-260.

Koneman, Allen, Kowell, Sommers, DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO,
Segunda Edición, México, Panamericana, 1985, 152-200.

Goodman Gilman A, Goodman, LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA
TERAPEUTICA, Segunda Edición, México, Panamericana, 1982,
1106-1140.

Mac Faddin, PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE
BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA, Segunda Edición, México,
Panamericana, 1984.

González Pedraza, Carmolinga Payares, DETERMINACION DE BETA-
LACTAMASAS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS, Infectología, Vol. 6,
No. 7: 192-203, 1982.

Cruz González, MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LAS ENTEROBAC-
TERIAS A LOS ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS, Infectología, -
Vol. 5, No.3: 148-169, 1986.

Cruz González, MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LAS ENTEROBAC-
TERIAS A LOS ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS, Infectología, -
Vol. 6, No.2: 127-175, 1986.

Abalia, Vargas, Rodríguez, PLASMIDOS ASOCIADOS A FACTORES
DE VIRULENCIA EN CEPAS HOSPITALARIAS DE ESCHERICHIA COLI -
AISLADAS DE INFECCIONES URINARIAS, Microbiología Clínica,
Vol. 5: 432-451, 1987.

Gwynn, Lynn, REGROWTH OF ESCHERICHIA COLI AND OTHER BACTE-
RIA AFTER THE BACTERICIDAL ACTION OF BETA-LACTAM ANTIBIOTIC,
The Journal of Infectious Diseases, Vol. 144: 263-279, 1981.