



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS
EN MUESTRAS DE PACIENTES QUE ACUDEN AL ÁREA DE
MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL PROVINCIAL GENERAL
“ISIDRO AYORA” DE LOJA DURANTE EL PERÍODO
ENERO-AGOSTO DEL 2009**

Tesis de Grado Previa a la Obtención del
Título de Bioquímico Farmacéutico

AUTORES:

Guamán Hurtado Jackeline Elizabeth
Hurtado Romero María Fernanda

DIRECTOR:

Dr. Escalante V. Luis Santiago

2010

CERTIFICACIÓN

Dr.
Luis Santiago Escalante V.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por las Srtas. Jackeline Elizabeth Guamán Hurtado y María Fernanda Hurtado Romero, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, 14 de junio de 2010

Dr. Santiago Escalante V.
DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodologías esquemas, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de sus autoras.

Jackeline Elizabeth Guamán Hurtado
María Fernanda Hurtado Romero

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A Dios por su gran amor hacia mí.

A mis padres por ser los pilares más importantes de mi vida que día a día me demuestran su amor, cariño y apoyo para seguir adelante. Por su energía y por su confianza brindada durante la carrera, quienes con su esfuerzo y apoyo incondicional me han permitido culminar con mis estudios superiores para convertirme en profesional.

A mis hermanos, Andrea y Beto, gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, los amo mucho.

Ma. Fernanda

Se la dedicó a toda mi familia por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional, en especial a mis padres: Gilberth, María y hermanos: Geovanny, Diana y Valeria quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad, es por ellos que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

A mis amigos y demás personas que nos ayudaron desinteresadamente, les agradezco con toda mi alma el haber llegado a mi vida y compartir momentos tristes y alegres, que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y nunca los olvidare.

Jackeline

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por demostrarnos tantas veces su existencia y con ello darnos fuerzas para salir adelante de cada tropiezo.

A nuestros padres y hermanos quienes con su paciencia y apoyo incondicional nos han permitido dar siempre un paso hacia delante en el logro de nuestras metas.

Al Dr. Santiago Escalante V. y a la Biq. Farmacéutica Janneth Simaluiza Docentes de la UTPL, Director y Co-tutora de la presente Tesis respectivamente. Quienes nos han sabido acoger de manera desinteresada y nos ha guiado generosamente en la realización del presente Trabajo.

A la Dra. Clara Bravo, por brindarnos parte de su tiempo y colaboración invaluable.

A nuestros amigos, quienes nos apoyaron en todo momento, y nos dieron fuerza para seguir adelante.

A todos y cada uno de nuestros maestros quienes con su sabiduría nos han orientado de manera teórica y práctica para poder culminar nuestros estudios superiores de la mejor manera.

Sinceramente: GRACIAS

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Nosotras, Jackeline Elizabeth Guamán Hurtado y María Fernanda Hurtado Romero declaramos ser autoras del presente trabajo y eximimos expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaramos conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Jackeline E. Guamán H.
AUTORA

Ma. Fernanda Hurtado R.
AUTORA

Dr. Santiago Escalante V.
DIRECTOR DE TESIS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Certificación.....	II
Autoría.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimiento.....	V
Contrato de Cesión de Derecho de Tesis.....	VI
Índice de Contenidos.....	VII
1. Resumen.....	1
1.1. Abstract.....	2
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. Introducción.....	4
3.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	6
3.1.1. Generalidades.....	6
3.1.2. Estructura.....	6
3.1.3. Antígenos.....	6
3.1.4. Patogenia.....	8
3.1.5. Clasificación.....	9
3.1.6. Diagnóstico.....	10
3.2. Infecciones Nosocomiales.....	17
3.3. Enterobacteriaceae de Importancia Médica.....	19
3.3.1. <i>Escherichia coli</i>	19
3.3.2. <i>Klebsiella</i>	21
3.3.3. <i>Proteus</i>	24
3.3.4. <i>Enterobacter</i>	28
3.3.5. <i>Shigella</i>	31
3.3.6. <i>Salmonella</i>	33
4. Materiales y Métodos.....	37
4.1. Población de Estudio.....	38
4.2. Técnicas microbiológicas.....	38
4.3. Interpretación de resultados de Pruebas Bioquímicas.....	38
4.4. Análisis Estadístico.....	38
5. Resultados.....	39
6. Discusión.....	57
7. Conclusiones y Recomendaciones.....	62

8. Referencias Bibliográficas.....	64
9. Anexos.....	71
9.1. Tinción Gram.....	71
9.2. La siembra.....	72
9.3. Pruebas Bioquímicas.....	74

1. RESUMEN

Las infecciones ocasionadas por enterobacterias se han convertido en una de las patologías infecciosas más frecuentes ya que persisten en la actualidad como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, tanto en pacientes ambulatorios como hospitalizados, su naturaleza dinámica justifica el estudio epidemiológico de las mismas. Es por eso que se realizó un estudio para determinar la incidencia de enterobacterias y la sensibilidad de los microorganismos prevalentes frente a los antimicrobianos, entre enero-agosto 2009, en el Hospital Provincial General "Isidro Ayora" de Loja.

Las enterobacterias aisladas con mayor frecuencia fueron *Escherichia coli* (60.2%) y *Enterobacter aerogenes* (20.5%), obtenidas principalmente de orina y de secreciones de tejidos blandos y piel.

La *Escherichia coli* presentó resistencias superiores para GEN (59.2%), CXM (57.1%), AMC (54.3%), SXT (50.5%) y NOR (50%); y, resistencias más bajas para AMK (4%) CRO (19.4%) y NIT (9.1%). El *Enterobacter aerogenes* presentó resistencias superiores a CIP (90%), AMC (61.1%), CXM (85.2%), GEN (79.2%) y SXT 60.7%, y más bajas para NIT (10%) y FOS (5.2%). Los alarmantes porcentajes de resistencia hallados en nuestro trabajo avalan la necesidad de un uso más racional de los antibióticos; además creemos importante la vigilancia y actualización periódica de la etiología infecciosa y la necesidad de que nuestra ciudad cuente con un hospital que integre la red nacional de investigación de resistencias antimicrobianas, para guiar de manera adecuada futuras conductas terapéuticas.

Palabras clave: Enterobacterias, incidencia, resistencia antimicrobiana, patologías infecciosas, antibióticos.

1.1. SUMMARY

Infections caused by enterobacteria have become one of the most common infectious diseases and that persist today as a major cause of morbidity and mortality in both ambulatory and hospitalized patients, their dynamic nature justifies the epidemiological study of the same. That's why a study was conducted to determine the incidence of enterobacteria and the sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents prevalent between Januarys to August 2009, at the Provincial General Hospital "Isidro Ayora" in Loja.

The Enterobacteriaceae most frequently isolated were *Escherichia coli* (60.2%) and *Enterobacter aerogenes* (20.5%), obtained mainly from urine and secretions of soft tissue and skin.

The *Escherichia coli* presented higher resistance to GEN (59.2%), CXM (57.1%), AMC (54.3%), SXT (50.5%) and NOR (50%) and lower resistance to AMK (4%) CRO (19.4%) and NIT (9.1%). *Enterobacter aerogenes* showed higher resistance to CIP (90%), AMC (61.1%), CXM (85.2%), GEN (79.2%) and SXT 60.7% and lower for NIT (10%) and FOS (5.2%). The alarming rates of resistance found in this study support the need for a more rational use of antibiotics important we also believe ongoing surveillance of infectious etiology and the need for our city hospital to have an integrated national network antimicrobial resistance research to guide future behavior appropriate therapeutic.

Key words: *Enterobacteriaceae*, incidence, antimicrobial resistance, infectious diseases, antibiotics.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el porcentaje de pacientes infectados por Enterobacterias en muestras que son recolectadas por el Área de Microbiología del Hospital Provincial General “Isidro Ayora” de Loja.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Conocer la especie de enterobacteria más frecuente.
- Correlacionar la especie de enterobacteria más frecuente con los diferentes tipos de muestras analizadas.
- Determinar la resistencia o sensibilidad de las bacterias a los antibióticos.
- Contribuir con información estadística importante para las entidades de salud.

3. INTRODUCCIÓN

Las infecciones ocasionadas por enterobacterias se encuentran distribuidas a nivel mundial afectando al ser humano, especialmente en edades extremas, niños del 1 al 3% y en ancianos el 37% (Guerrero *et al.*, 2007; Muñoz, 2007). Las enterobacterias se han convertido en una de las causas más importantes para el desarrollo de las infecciones nosocomiales y de las adquiridas por la comunidad, representando del 80 al 95% de los aislamientos bacterianos (SOPs, 2007), estas bacterias provocan infecciones urinarias en un 43%; infecciones de heridas quirúrgicas 24%; neumonías 14 % y otros 7% (Ramis *et al.*, 2007).

Un informe emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2002 reportó que las enfermedades infecciosas fueron la segunda causa de muerte, aproximadamente en un 25%, mientras que en el 2008 fue el 16.8%. En Ecuador para el 2006 estas representaron el 20% de las defunciones (OMS, 2007) y en el 2008 el porcentaje descendió al 13.6% (INEC, 2008). Para la ciudad de Loja en el 2005, las enterobacterias fueron una de las causas de morbilidad, representando el 8,7% de la población (INEC, 2007).

En el Hospital “Carlos Andrade Marín” de Quito, el Departamento de Laboratorio Clínico reportó que las infecciones adquiridas por este tipo de bacterias correspondieron al 80%, siendo una de las principales causas de mortalidad y del aumento de la morbilidad, sobre todo en pacientes hospitalizados (Nuñez *et al.*, 2003). En la clínica son motivo de preocupación, debido a que estos bacilos Gram negativos presentan gran capacidad de adquirir resistencia; la OMS considera que “El uso abusivo de los antibióticos es una de las principales causas del incremento de la resistencia bacteriana, uno de los mayores problemas de salud pública”. La prescripción no adecuada y abusiva de los antibióticos, la prolongación de los planes más allá de lo necesario, la aplicación de dosis no óptimas, la irregularidad en la toma de las drogas, son los principales factores que en la actualidad han llevado al incremento de la tasa de resistencia antimicrobiana (Álvarez, 2007). Es así que el 70% de las

infecciones, son resistentes a uno o más antibióticos, incluso a los más modernos, como las cefalosporinas de tercera generación (Salas *et al.*, 2006; Ramón *et al.*, 2008).

En países desarrollados, para el aislamiento e identificación de enterobacterias se han implementado nuevas técnicas de diagnóstico, diseñadas con el objetivo de reducir los tiempos de respuesta, aumentar la eficiencia y mejorar la relación coste-eficacia (Snyder *et al.*, 2008). Estos sistemas se basan en reacciones de pH, reacciones enzimáticas, utilización de fuentes de carbono, detección visual del crecimiento bacteriano o la detección de ácidos grasos volátiles y no volátiles por cromatografía de gases (O'Hara., 2005; Julák, 2007).

La ejecución de estudios específicos de prevalencia e incidencia es muy importante, debe abarcar el desarrollo de datos epidemiológicos primordiales que sirvan de referencia local significativa, que permitan establecer una estadística adecuada con valores actuales de infecciones por enterobacterias en una población determinada (Hospital Provincial General "Isidro Ayora" de Loja). A la vez un estudio adecuado y específico debe contribuir con el correcto manejo del paciente en forma individualizada, permitir tomar decisiones en cuanto al tratamiento empírico, haciendo un uso racional de los medicamentos, ayudando a bajar los costos de manejo en el paciente, disminuir la resistencia de ciertas cepas a medicamentos, así como también permitirá desarrollar proyectos subsecuentes para el buen funcionamiento en el diagnóstico y manejo de las infecciones por este tipo de bacterias.

Este problema de salud no es ajeno a nuestra ciudad, es parte de la realidad de pacientes hospitalarios y ambulatorios por lo que hemos considerado pertinente que la presente investigación se enfoque en establecer el porcentaje de pacientes infectados por enterobacterias, su resistencia o sensibilidad antimicrobiana, mediante el desarrollo de técnicas convencionales logrando así la implementación de un referente epidemiológico para la ciudad de Loja sobre este tipo de infecciones.

3.1 *Enterobacteriaceae*

3.1.1 Generalidades

Se llama de esta manera a un grupo muy diverso de bacterias que tienen como hábitat natural el intestino del hombre y de varias especies animales (Ocaña *et al.*, 2007). Esta familia está formada por bacilos Gram negativos de 1.0 a 6.0 μm , se caracterizan porque no forman esporas, son capaces de crecer rápidamente tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (es decir, son anaerobios facultativos), su movilidad es variable (dependiendo de la presencia o no de flagelos), la mayoría producen fimbrias y *pilis*. Muchos de ellos forman cápsula y microcápsula, tienen unos requerimientos nutricionales sencillos: todas fermentan la glucosa; algunas con producción de ácido y gas, reducen los nitratos a nitritos, son catalasa-positivos y oxidasa–negativos (Romero, 2007).

3.1.2 Estructura

Las bacterias gram negativas están compuestas por una membrana citoplasmática (membrana interna), una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa se localiza el espacio periplásmico relleno de una sustancia denominada periplasma, la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias (Holst, 2007).

La membrana externa contiene diversas proteínas, siendo una de ellas las porinas o canales proteicos que permiten el paso de ciertas sustancias. También presenta unas estructuras llamadas lipopolisacáridos (LPS), formadas por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina) (Gerald *et al.*, 2006).

3.1.2.1 Antígenos

Las enterobacterias pueden presentar diversos antígenos: el antígeno somático o antígeno O, los antígenos capsulares K

(polisacáridos específicos de tipo), las proteínas flagelares H y el antígeno de las fimbrias F (Figura 1).

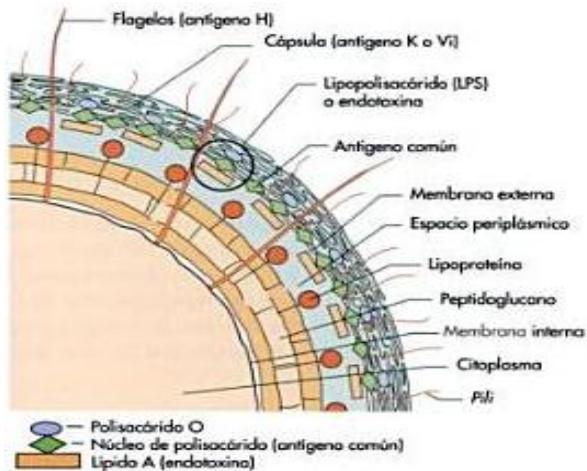


Figura 1.1. Antígenos de las Enterobacteriaceae.

Fuente: Murray *et al.*, 2006

Los **antígenos específicos O** se encuentran en la pared de la bacteria, estos son en su mayoría polisacáridos o proteínas.

Los **antígenos K** son los que se encuentran en la cápsula de aquellas bacterias que pueden formar macrocápsula, microcápsula o capa mucilaginosa; generalmente estos antígenos están formados por polisacáridos. Intervienen en la acción patógena por sus propiedades antifagocitarias.

Los **antígenos H** son los que se encuentran en los flagelos de las bacterias que poseen estos organelos, son de naturaleza proteica.

Antígeno de las fimbrias F, las cepas fimbriadas presentan antígenos proteicos relacionados con la capacidad de adherencia en las células epiteliales. Serológicamente son heterogéneos y permiten dividir las cepas en serotipos F.

Todos estos antígenos forman un complejo sistema inmunológico que nos permite identificar las especies. Sin embargo se debe tener en mente que algunos determinantes antigénicos se encuentran presentes en dos o más especies de un género, y aún en géneros o familias diferentes, por lo cual se pueden presentar reacciones cruzadas que deben evitarse en el momento de la identificación (Romero,2007; Murray *et al.*, 2006).

3.1.3 Patogenia

Se han identificado numerosos factores de virulencia en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Algunos son comunes a todos los géneros, mientras que otros son específicos de las cepas virulentas.

Endotoxinas: la endotoxina es un factor de virulencia que comparten las bacterias Gram negativas aerobias y algunas anaerobias. Muchas de las manifestaciones sistémicas de las infecciones por bacterias Gram negativas se inician por la endotoxina, entre ellas las siguientes: activación del complemento, liberación de citocinas, leucocitosis, trombopenia, coagulación intravascular diseminada, fiebre, disminución de la circulación periférica, shock y muerte (Florencia *et al.*, 2006).

Cápsula: es especialmente útil para la bacteria como una fase protectora que hace más difícil la fagocitosis y con ello le da una mayor sobrevivencia a la bacteria. Sin embargo, el papel protector de la cápsula se reduce cuando el paciente desarrolla anticuerpos anticapsulares específicos.

Variación Antigénica: como su nombre lo indica, consiste en variar sus antígenos y con ello presentar una diferente presencia inmune para la identificación y respuesta del huésped; es decir, la expresión del antígeno capsular K y del antígeno flagelar H están bajo control genético del microorganismo; una característica que protege a las bacterias de la destrucción celular mediada por anticuerpos (Brooks *et al.*, 2008; Romero, 2007).

Exotoxinas: casi todas son productos que funcionan como enterotoxinas y pueden ser termolábiles o termoestables.

Enterotoxinas: algunas cepas producen enterotoxinas que actúan ya por acción tóxica directa sobre las células del epitelio intestinal o del endotelio vascular (enterotoxinas citotóxicas) o produciendo un estímulo funcional (Ryan *et al.*, 2005).

Bacteriocinas: son sustancias bactericidas contra cepas de la misma especie, pero no contra sí mismas; su denominación proviene de acuerdo a la bacteria que la produce, las principales son colicina, marcescinas, klebocinas, piocinas, etc. (Muños, 2008; Brooks *et al.*, 2008).

Factores de adherencia: las fimbrias colaboran de manera importante para la adherencia de la bacteria a la superficie mucosa del huésped. Otro factor importante en este fenómeno de adherencia bacteriana es la adhesina.

Localización intracelular: protege a la bacteria de los antibióticos y del sistema inmune al estar localizada en el interior de la célula huésped.

Resistencia Antimicrobiana: con la misma rapidez con la que se introducen nuevos antibióticos, los microorganismos desarrollan resistencia a estos. Esta resistencia puede estar codificada en plásmidos transferibles e intercambiarse entre especies, géneros e incluso familias de bacterias (Romero, 2007).

3.1.4 Clasificación

La familia de *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos se han reportado 31 géneros y 130 especies (Farmer, 2003). Estos géneros se han clasificado según sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica e hibridación y secuenciación de los ácidos nucleicos. A pesar de la complejidad de esta familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 95% de las infecciones (Murray

et al., 2005) por lo que se considera la siguiente clasificación (Tabla 1).

CLASIFICACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS	
ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS	Géneros
	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Yersinia</i>
ENTEROBACTERIAS OPORTUNISTAS (más importantes)	<i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Citrobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Providencia</i> <i>Morganella</i>

Tabla 1.1. Clasificación *Enterobacteriaceae*
Fuente: Murray et al., 2005

3.1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de infecciones causadas por enterobacterias se ha basado y se sigue basando en la taxonomía clásica y tradicional de sus caracteres fenotípicos como morfología, aspecto en los medios de cultivo, propiedades fisiológicas, propiedades bioquímicas, degradación de macromoléculas, tipos de enzimas respiratorias, necesidades nutricionales, características quimiotaxonómicas, inhibición por diversas sustancias y reacción frente a anticuerpos. Para su puesta en evidencia se utilizan técnicas sencillas como la microscopia en fresco o previa tinción, cultivos selectivos, no selectivos, pruebas bioquímicas, realización de antibiogramas y diferentes procedimientos más complejos, algunos de ellos automatizados (Rayan et al., 2005).

Pruebas de Laboratorio

Las muestras que llegan al laboratorio se examinan directamente en fresco o por medio de tinciones generales o específicas, luego las bacterias aisladas en los distintos cultivos se identifican por

diversos métodos para conocer género, especie y finalmente se hacen con ellas otras pruebas, como la de sensibilidad antibiótica (Gobernado *et al.*, 2003).

▪ **Medios Convencionales**

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial éste debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad, además de contener los nutrientes, factores de crecimiento necesarios y estar exento de todo microorganismo contaminante (O'Hara., 2005).

El agar es un elemento solidificante empleado para la preparación de medios de cultivo; se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añade numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras; el rojo fenol se usa como indicador ya que es rojo en pH básico y amarillo en pH ácido, la violeta de genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas (Bauman, 2005).

Se han descrito algunos tipos de medios de cultivo como son: no selectivos que contienen suficientes nutrientes como para soportar el crecimiento de gran variedad de microorganismos; selectivos que permiten el crecimiento de solo un tipo de microorganismos; enriquecidos que se le agrega sustancias como sangre, suero, albumina, etc., para microorganismos exigentes y medios de cultivo diferenciales que permiten establecer diferencias entre distintos tipos de microorganismos.

En los laboratorios clínicos se sigue empleando medios convencionales para en el aislamiento primario de bacterias, entre los más utilizados tenemos:

Agar sangre, medio enriquecido para propósitos generales ya que permite el crecimiento de una amplia gama de bacterias, con la adición de sangre, es útil tanto para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras clínicas; así también, como para la observación de reacciones de hemólisis.

El medio de cultivo constituido por infusión de músculo de corazón y peptona de caseína proporcionan la fuente de nitrógeno, carbono, aminoácidos y proteínas que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. El extracto de levadura provee vitaminas y aminoácidos esenciales, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es usado como agente solidificante (Bauman, 2005; Schauer, 2007).

Agar MacConkey, es un medio diferencial y selectivo, utilizado para aislar las bacterias Gram negativas de fácil desarrollo, aerobias y anaerobias facultativas, basándose en una reacción de cambio de color. Éste agar cuenta con inhibidores de

crecimiento para las bacterias Gram positivas y aditivos diferenciales que lo hacen idóneo para la selección y recuperación de enterobacterias.

Contiene peptonas que aportan con nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, lactosa que es el hidrato de carbono fermentable, 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. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia desarrollada y se produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), permitiendo observar a dicha colonia de color rosado, en comparación con las colonias que no fermentan la lactosa las cuales permanecen incoloras (Bauman, 2005; Schauer, 2007).

Agar Eosina Azul de Metileno (Levine ó EMB), medio selectivo y diferencial, adecuado para el crecimiento de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Compuesto por peptona, lactosa, sacarosa, fosfato dipotásico, eosina, azul de metileno y agar. La combinación utilizada de eosina y azul de metileno inhibe el desarrollo de microorganismos gram positivos, también permite diferenciar bacterias fermentadoras de lactosa que originan colonias de color azulado-negro, con brillo metálico de las no fermentadoras que producen colonias incoloras (Terragno *et al.*, 2007).

Estas reacciones requieren alrededor de 18 a 24 horas de incubación y una temperatura de 37°C (Bauman, 2005; Schauer, 2007).

▪ **Identificación Bioquímica**

Las pruebas bioquímicas son un conjunto de reacciones basadas en el metabolismo de los microorganismos, generalmente se realiza en sistemas convencionales y automáticos. Entre los aspectos, se analiza la acción de la bacteria sobre hidratos de carbono, la liberación de enzimas y metabolitos al medio de cultivo. A partir del conocimiento del metabolismo, las pruebas bioquímicas nos permiten determinar el género y la especie de la bacteria en estudio.

Esta identificación debe hacerse a partir de un cultivo puro y fresco (18-24 horas), además hay que tener en cuenta que las características metabólicas de los microorganismos pueden variar en función de distintos factores de manera que para efectuar una caracterización fiable es necesario realizar las pruebas en condiciones estandarizadas (en cuanto al inóculo, los reactivos, las condiciones de incubación y el tiempo de lectura) y utilizar más de una prueba en cada caso, la elección de las mismas se hará en base a la familia en estudio.

Las pruebas bioquímicas convencionales, son ensayos simples tradicionalmente utilizados que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica, entre las más utilizadas por su composición química están:

Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) medio nutricional y diferencial, universalmente empleado para la identificación de enterobacterias que permite detectar la capacidad que tiene algunas bacterias de producir: ácido, gas y H₂S, todas estas reacciones ocurren en el mismo medio.

Compuesto por extracto de carne y pluripectona, que aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico; la lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables que producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El sulfato ferroso detecta la producción de H₂S y puede observarse la producción de gas (H₂ y CO₂), ya sea como burbujas en el fondo del tubo, por ruptura del agar o desplazamiento del mismo hacia la superficie (Terragno *et al.*, 2007).

Agar Citrato de Simmons, medio utilizado para la diferenciación de bacterias gram negativas que determina si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y energía, usar compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando así una alcalinización del medio, que se visualiza mediante el indicador de pH; ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano.

Está constituido por sales de fosfato que forman un sistema buffer, por magnesio que actúa como cofactor enzimático, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira del color verde al color azul en medio alcalino.

Agar Urea es un medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica, es decir, para identificar bacterias que hidrolizan urea.

El medio de cultivo está formado por extracto de levadura que es la única fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y cofactores que aportan con nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfatos constituyen el sistema buffer, el rojo fenol es el indicador de pH y la urea es el sustrato de la enzima ureasa. Aquellas bacterias que poseen la enzima ureasa pueden utilizar el nitrógeno proveniente de la urea, la hidrolizan, liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, haciendo virar el indicador (rojo fenol) del color naranja pálido al color rosa intenso (Prats, 2006).

Agar Sulfuro Indol Motilidad (SIM), es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo, muy útil para diferenciar enterobacterias.

El medio de cultivo contiene triptófano, un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. 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 H₂S se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir de tiosulfato siempre que el medio mantenga un pH mayor a 7.2 (Murray *et al.*, 2008).

Para que ocurran estas reacciones en los medios antes mencionados se requiere una incubación aproximada de 18 a 24 horas y una temperatura de 37°C (Jordá *et al.*, 2005).

▪ **Antibiogramas**

El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la sensibilidad de una colonia bacteriana a un antibiótico o grupo de antibióticos que son sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos a concentraciones muy bajas; pueden ser de amplio espectro o de espectro reducido, estos últimos van a matar gérmenes más específicamente. Dependiendo del origen o localización de la infección, se va a utilizar uno u otro (Famiglietti *et al.*, 2005). Una vez realizado el antibiograma, da la siguiente información: grado de sensibilidad de la colonia bacteriana a un determinado antibiótico y diferencia de sensibilidad por parte de la colonia a diferentes antibióticos. Con esta información, se clasifica el efecto del antibiótico sobre esa determinada colonia en: Resistente (R), Intermedio (I) y Sensible (S) (Eiros *et al.*, 2006).

En el ámbito clínico, el estudio sobre la bacteria causante de la infección y sobre el antibiograma es entregado al médico responsable del paciente, quien se encarga de decidir el tipo de antibiótico adecuado, dependiendo de los resultados del antibiograma y de otros factores procedentes del paciente.

Las pruebas de susceptibilidad a un microorganismo se pueden realizar por diferentes métodos, como son los métodos de dilución y de difusión, éste último se emplean básicamente para realizar la prueba de disco-difusión o de Kirby-Bauer, que es la más practicada en los laboratorios de bacteriología por ser cómoda, barata, rápida y reproducible; tiene por finalidad correlacionar el diámetro del halo de inhibición con la sensibilidad del microorganismo a un antibiótico determinado en una infección clínica. Los microbiólogos la han utilizado por casi siete décadas, e incluso ha sido adoptada por redes de vigilancia nacionales e internacionales sobre la resistencia a los antimicrobianos (Riera *et al.*, 2008).

Los factores que influyen en la prueba de sensibilidad por disco a los antimicrobianos son: el tipo de agar empleado, la carga de los discos, el tiempo y la temperatura de incubación, el espesor y el

pH del agar, el inóculo bacteriano y el modo de lectura del halo de inhibición (Riera *et al.*, 2008).

Los laboratorios de microbiología realizan a diario estudios de sensibilidad a los antimicrobianos de los microorganismos con relevancia clínica obtenidos a partir de los cultivos microbiológicos. Para ello utilizan en forma rutinaria el agar **Mueller Hinton (MH)**, medio de cultivo que ha sido recomendado universalmente para esta prueba ya que presentan buena reproductibilidad, su contenido en inhibidores es bajo y la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente (Muñoz *et al.*, 2007).

La selección de los antimicrobianos a utilizar es una decisión conjunta del laboratorio de microbiología, equipo de infectología, comité de infecciones intrahospitalarias y farmacia; estos antimicrobianos deben estar aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), tener eficacia clínica demostrada para el microorganismo en estudio, ser factibles de evaluar *in vitro* y útiles para propósitos epidemiológicos. Los antimicrobianos sugeridos para enterobacterias por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) son los siguientes: ampicilina, amoxicilina con clavulanato, ticarcilina con clavulanato, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxone, gentamicina, ciprofloxacina, trimetoprim con sulfametoxazol, nitrofurantoína, fosfomicina, oxacilina, norfloxacina, cefalexina, claritromicina, ampicilina sulbactan y amikacina (CLSI, 2009).

3.2 Infecciones Nosocomiales (IN)

Las Infecciones Nosocomiales (IN) también llamadas infecciones hospitalarias, son infecciones que se desarrollan dentro de una unidad hospitalaria. Aparecen en los pacientes a las 48 a 72 horas luego de su ingreso a un hospital y que, a la vez, son provocadas por microorganismos multiresistentes adquiridos durante la hospitalización. La mayoría de las IN son clínicamente diagnosticadas mientras los pacientes se hallan todavía hospitalizados, sin embargo, el inicio de la enfermedad puede ocurrir luego de que el paciente haya sido dado de alta (OMS, 2002).

Según la OMS registra que los pacientes hospitalizados presentan un riesgo del 8.7% de adquirir una infección nosocomial durante su estancia; este tipo de infecciones ocurren en todo el mundo y afectan a países desarrollados carentes de recursos, en donde las IN están entre las principales causas de defunción y de aumento de la morbilidad en pacientes hospitalizados, también se las considera como un pesado gravamen a los costos de salud. (Albarado *et al.*, 2009). Dentro de los principales agentes causales de estas infecciones están las enterobacterias que representan según un estudio realizado en México el 44.4% del total de aislamientos nosocomiales, constituyendo la *Escherichia coli* (28.1%) como la cepa más frecuentemente aislada y representativa de este familia de bacterias (Barrios *et a.*, 2007), estos reportes indican una gram importancia para que los hospitales implementen programas adecuados de vigilancia epidemiológica y prevención de IN.

Las IN más frecuentes son las de heridas quirúrgicas, las vías urinarias y las vías respiratorias inferiores. En el estudio de la OMS y en otros se ha demostrado también que la máxima prevalencia de infecciones nosocomiales ocurre en unidades de cuidados intensivos y en pabellones quirúrgicos y ortopédicos de atención de enfermedades agudas. Las tasas de prevalencia de infección son mayores en pacientes con mayor vulnerabilidad por causa de edad avanzada, enfermedad subyacente o quimioterapia (Albarado *et al.*, 2009).

3.3 *Enterobacteriaceae* de Importancia Médica

3.3.1 *Escherichia coli*

Este género está formado por la especies: *Escherichia coli*, *Escherichia hermanni*, *Citrobacter freundii* y *Escherichia intermedium*, de las que *E. coli* es la más frecuente y la más relevante desde el punto de vista clínico mientras que los demás grupos de bacterias se encuentran muy pocas veces en infecciones humanas.

E. coli forma parte de la flora nativa intestinal; hay cepas que producen sustancias que son útiles al hospedero como las

colicinas, que tienen efecto inhibitorio sobre otras cepas potencialmente patógenas; no todas las cepas son igualmente virulentas. Las cepas patógenas de esta bacteria pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse (Romero, 2007).

Características morfológicas y metabólicas de *E. coli*

Es un bacilo gram negativo, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, con flagelos peritricos. La mayoría forma fimbrias y *pilis*, muchas cepas producen una pequeña microcápsula, y muy pocas elaboran macrocápsula, y no fabrican esporas. En las pruebas bioquímicas es positiva al indol, descarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa; además es lactosa positiva en el 90% de las cepas con citrato negativo. Tiene información genética en los plásmidos, que son responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos. El genoma de *E. coli* contiene un total de 5.000 genes (Romero, 2007).

Epidemiología

Cuatro síndromes clínicos pueden resultar de la infección por cepas patógenas: infección del aparato urinario (IAU), sepsis, meningitis y enfermedad diarreica.

Además se ha descrito que *E. coli* es la bacteria que produce también infecciones en heridas tanto en pacientes hospitalizados como ambulatorios; se aíslan con una frecuencia mayor en los pacientes con septicemia; es responsable de producir más del 70% de las IAU adquiridas en la comunidad, así como la mayoría de las infecciones nosocomiales y causa importante de gastroenteritis en los países en vías de desarrollo. La multitud de cepas capaces de producir enfermedades se encuentra reflejada en la diversidad antigénica de esta especie (Lazaso *et al.*, 2008).

Patogenia

E. coli posee algunos componentes claramente identificados como son las adhesinas, la cápsula, las endotoxinas y

enterotoxinas los cuales contribuyen para que se desarrolle la enfermedad.

- **Adhesinas:** comúnmente llamadas pili o fimbria, tienen la función de colonización y adherencia a receptores específicos y superficiales del hospedador.
- **Flagelos:** que dan movilidad a la bacteria, dirigida por estímulos quimiotácticos.
- **Cápsula:** protege a la bacteria de la fagocitosis, principal mecanismo de defensa que pone en juego el huésped ante la presencia de bacterias capsuladas; es una respuesta efectiva para defenderse de este tipo de bacterias implica la producción de anticuerpos que se unan específicamente a la cápsula facilitando la opsonización y la fagocitosis.
- **Pared celular:** actúa como endotoxina cuando hay septicemia.
- **Endotoxinas:** son componentes de la pared celular de las bacterias Gram negativas constituidas por lípidos y polisacáridos. Se libera de la bacteria estimulando varias respuestas de inmunidad innata, como la secreción de citocina, expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y activación de la capacidad microbicida del macrófago.
- **Exotoxinas o Enterotoxinas:** *E. coli* produce también un espectro variado de exotoxinas. Estas incluyen las toxinas Shiga (Stx-1, Stx-2), las toxinas termoestables (STa, STb) y las toxinas termolábiles (LT-I y LT-II). Por otra parte, las hemolisinas (HI y A) se consideran importantes en la patogenia de la enfermedad producida por *E. coli* uropatógena (Brooks *et al.*, 2005; Romero, 2007).

Diagnóstico

Las muestras que son sospechosas de contener bacilos gram negativos entéricos, como *E. coli*, se hacen crecer inicialmente en una placa de agar sangre y en un medio diferencial, como el agar EMB y el agar MacConkey. *E. coli*, dado que fermenta la lactosa, forma colonias rosas, en cambio, los microorganismos lactosa-negativa son incoloros. En agar EMB, las colonias de *E. coli* tienen un aspecto verde tornasolado característico. Algunas de las características importantes que ayudan a distinguir *E. coli* de otros bacilos gram negativos fermentadores de lactosa son las siguientes: 1) produce indol a partir de triptófano, 2) descarboxila la lisina, 3) utiliza el acetato como única fuente de carbono y 4) es móvil (Levinson, 2006).

Formas Clínicas de la Infección por *E. coli*

E. coli es el agente causal más común de las infecciones del aparato urinario y de las sepsis por bacilos gram negativos. Es una de las dos causas importantes de meningitis neonatal y el agente más frecuente asociado con la “diarrea del viajero”, una diarrea acuosa. Algunas cepas de *E. coli* son enterohemorrágicas y causan diarrea sanguinolenta (Levinson, 2006).

3.3.2 *Klebsiella*

Este género incluye las especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella terrigena*.

Características morfológicas y metabólicas de *Klebsiella*

Las bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* son bacilos no flagelados, y por lo tanto son inmóviles, poseen una cápsula prominente que les caracteriza, la cual les confiere un aspecto mucoso a las colonias aisladas, mayor virulencia de los microorganismos *in vivo* y por proporcionar resistencia a mecanismos de defensa; son aerobios y anaerobios facultativos, sólo suelen expresar 2 tipos de antígenos en su superficie

celular. El primero es un lipopolisacárido (antígeno O), y el otro es un polisacárido capsular (antígeno K), ambos antígenos contribuyen a la patogenicidad (Umeh, 2009).

Epidemiología

El género *Klebsiella*, en humanos son patógenos frecuentes que pueden colonizar la piel, la faringe o tracto gastrointestinal, también heridas estériles y la orina.

La gran mayoría de las infecciones por *Klebsiella* están asociadas con la hospitalización, aunque en los continentes asiático y africano persisten como importantes causantes de diversas enfermedades adquiridas en la comunidad (Marcal *et al.*, 2009). Como patógenos oportunistas que son, las especies del género *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos que se hallan hospitalizados y padecen severas enfermedades subyacentes. Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella* son causadas principalmente por *Klebsiella pneumoniae*, la especie más importante del género desde el punto de vista médico y están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. *Klebsiella pneumoniae* causa principalmente infecciones del tracto urinario y neumonías y es el segundo agente causal, tras *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram negativas (Umeh, 2009).

Patogenia

Los principales factores de virulencia asociados a *Klebsiella* son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas y el lipopolisacárido. Todos ellos tienen una gran importancia y la patogenicidad de la bacteria es resultado de la acción conjunta de varios de estos factores, que permitirán a la bacteria entrar y multiplicarse en el interior del hospedador, resistir su sistema inmune (o simplemente no estimularlo) y producirle un daño (Marcal *et al.*, 2009).

- **Polisacáridos capsulares (CPSs):** Una de las características principales de *Klebsiella* es que posee cápsula. Esta cápsula es una estructura superficial formada por exopolisacáridos complejos que han permitido clasificar a *Klebsiella* en 77 serotipos, ampliamente utilizados en investigaciones epidemiológicas, según el antígeno capsular (K) que presentan.
- **Pilis (Fimbrias):** La habilidad de la bacteria para adherirse y colonizar las superficies mucosas del organismo hospedador es una etapa crítica en el desarrollo de la infección. Las propiedades adhesivas en *Klebsiella*, y en la mayoría de las *Enterobacteriaceae*, son generalmente mediadas por diversos tipos de *pilis*. Estas estructuras filamentosas se extienden desde la superficie bacteriana y permiten la unión a las células eucariotas a través de receptores específicos.
- **Lipopolisacárido (LPS):** El serotipo O1 es el antígeno más comúnmente hallado en los aislados clínicos de *Klebsiella*. Su contribución a la virulencia se debe, por un lado, a la actividad endotóxica producida por la parte lipídica, el lípido A, que provoca la activación de los macrófagos, induce la respuesta inflamatoria y tiene un efecto pirógeno. Por otro lado, la presencia de las cadenas polisacarídicas del antígeno O facilitan el proceso inicial de adhesión y confieren resistencia a la bacteria contra la actividad bactericida del suero no inmune. Éste último aspecto del antígeno O es quizás el más importante (Marcal *et al.*, 2009; Clements *et al.*, 2008).

Diagnóstico

Los microorganismos de este grupo se pueden aislar de sangre, orina, líquido pleural, heridas, periférica o central de los puntos de acceso por vía intravenosa, sondas urinarias, equipo de apoyo respiratorio, son aerobias facultativas y por tanto, puede crecer

en presencia de oxígeno o en su ausencia. La mayoría de las especies puede utilizar citrato y glucosa como única fuente de carbono, por lo que crecen bien en medios comunes como agar MacConkey o agar EMB; fermentan la lactosa, son ureasa positivo, e indol-negativos, aunque *K. oxytoca* y algunas cepas de *K. pneumoniae* son excepciones no producen sulfuro de hidrógeno. Se diferencian usando pruebas bioquímicas (Levinson, 2006; Umeh, 2009).

Formas Clínicas de la Infección por *Klebsiella*

El género *Klebsiella* origina una variedad de síndromes clínicos, *Klebsiella pneumoniae* causa infecciones del tracto urinario, septicemia, e infecciones de tejidos blandos, *Klebsiella ozaenae* es responsable de la rinitis atrófica y *Klebsiella rhinoscleromatis* provoca infecciones en vías respiratorias, causando rinoescleroma o escleroma (Umeh, 2009).

3.3.3 *Proteus*

Es un género que pertenece a la tribu *Proteae* en la familia de las *Enterobacteriaceae*, contiene las siguientes especies: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus pennerii*, *Proteus hauseri* y *Proteus myxofaciens*; las tres primeras tienen importancia médica, la tercera ocasionalmente provoca enfermedad y la última no se identifica en el humano (Cantón *et al.*, 2006).

Características morfológicas y metabólicas de *Proteus*

Bacilos gram negativos, móviles, pleomórficos, no esporulados ni capsulados, aerobios y anaerobios facultativos con flagelos peritricos que se caracterizan por su capacidad para desaminar la fenilalanina, hidrolizar la tirosina y desdoblar en casi todos los casos la urea (ureasa positivos) con su respectivo olor amoniacal (Endimiani *et al.*, 2005). Las especies de *Proteus* por lo general son positivas para catalasa, citrato y H₂S, no fermentan la lactosa, producen gas, oxidasa negativos y licúan la gelatina (Ryan *et al.*, 2005).

Epidemiología

El género *Proteus* está ampliamente difundido en la naturaleza y se encuentra comúnmente en el tracto intestinal humano como parte de la flora normal (Brooks *et al.*, 2008). Las infecciones son asociadas a estos tres patógenos principalmente, *P. vulgaris*, *P. penneri* y *P. mirabilis*, sin embargo, el último de éstos es el patógeno más común; esto debido a su alta presencia (25%) en el intestino. Esta parte del cuerpo es el depósito mayor de estas bacterias en los humanos, y esto puede producir autoinfecciones o transmisión de las bacterias entre pacientes en los hospitales; considerándolas dentro de las enterobacterias estas especies son aisladas de muestras hospitalarias con una frecuencia solo superada por *E. coli* (Jacobsen *et al.*, 2008).

El *Proteus mirabilis* causa el 90% de las infecciones y puede considerarse como una infección adquirida en la comunidad, el *P. penneri* y *P. vulgaris* son fácilmente aislados de individuos que permanecen en instalaciones de cuidados a largo plazo, en los hospitales y en pacientes con enfermedades subyacentes o sistemas inmunes comprometidos (Struble, 2009).

Las infecciones urinarias son la manifestación clínica más común de las infecciones causadas por *Proteus* probablemente debido a su presencia en el colon, la colonización de la uretra y la movilidad. Revela una incidencia entre el 1% y 2% de las infecciones urinarias en mujeres sanas y el 5% de las infecciones urinarias adquiridas en el hospital. Las infecciones urinarias complicadas (por ejemplo, los relacionados con el cateterismo) tienen una prevalencia del 20% -45%. Además es un frecuente invasor secundario de quemaduras y heridas (Macleod, *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2006).

Patogenia

La patogenicidad se asocia a la presencia de fimbrias, flagelos, proteínas de membrana externa específicas, lipopolisacáridos (LPS), enzimas proteolíticas, incluyendo gelatinasas, proteasas, hemolisinas, algunas bacteriocinas y sobre todo a la producción de ureasa. Dependiendo del tipo de ataque al tejido, el género

Proteus moviliza factores de virulencia que son eficaces en la adhesión y penetración en lo particular sobre células epiteliales y en el desarrollo del síndrome de infección.

- **Fimbrias** contribuyen con la adherencia de la bacteria a tejidos, lo que le permite persistir sin ser eliminada eficazmente por los sistemas de defensa. Son diferentes para cada especie.
- **Flagelos** producen el fenómeno de swarming (característica dada por cambios en los procesos de elongación durante la división celular, formándose células alargadas no septadas y a la hiperexpresión de la síntesis de flagelina, la que determina un recubrimiento profuso de las células por flagelos). Además movilizan a la bacteria de forma ascendente desde el uréter al riñón (Belas *et al.*, 2005).
- **Ureasa** es una enzima capaz de desdoblar eficazmente la urea al igual que sus análogos y provocar alcalinización (en el caso de la orina) por producción de hidróxido amónico.
- **Proteasas** son predominantes en las secreciones mucosas, se han descrito dos tipos la IgA e IgG. Su función es proteger la membrana mucosa y el tejido subyacente de las bacterias y sus productos, además son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas de otros microorganismos examinados, contribuyendo con esto a la virulencia (Jacobsen *et al.*, 2008).
- **Invasividad** ayuda a la penetración e internalización de las bacterias en las células de huésped. Estudios han demostrado que esta propiedad de virulencia está estimulada por la urea (Cantón *et al.*, 2006).
- **Polisacárido capsular (CPS)** La estructura de la cápsula no es encargada solamente de proteger a los microorganismos contra los fagocitos, sino que también

favorece el crecimiento y formación de cálculos de estruvita, constituyéndose en una complicación frecuente en las infecciones urinarias (Jacobsen *et al.*, 2008).

- **Lipopolisacárido (LPS)** biológicamente son endotoxinas que pueden liberarse de la superficie de la bacteria durante su multiplicación, lisis y muerte. Este LPS libre es una molécula bioactiva que actúa en diversos tipos de células de las cuales los macrófagos y monocitos son los más importantes, intervienen en este proceso el antígeno O y H (Palusiak *et al.*, 2009).

Hay mucha evidencia de que todos los factores de virulencia de *Proteus* actúan en grupo y no de forma individual, esto podría explicar el hecho de que las infecciones por éste género son muy difíciles de tratar y requieren todavía más estudios.

Diagnóstico

El reconocimiento inicial en las placas de cultivo es sencillo, debido a que se caracterizan por su crecimiento en ondas en la superficie del agar, bien formado círculos concéntricos a partir de un botón de inoculación o con una película uniforme. Crecen en medios corrientes y moderadamente selectivos a una temperatura de 37°C. En agar sangre producen un sobrecrecimiento de dispersión que puede impedir la recuperación de otros microorganismos, en agar MacConkey y EMB producen colonias no fermentadoras de la lactosa (incoloras).

Los miembros de este grupo desaminan la fenilalanina, fermentan la xilosa, son positivos al medio urea y algunos al citrato. El *P. vulgaris* y *P. mirabilis*, cuando crecen en agar TSI producen H₂S, que oscurece el fondo del tubo, las especies de *Morganella morganii* y *P. rettgeri* no presentan esta característica. En agar SIM presentan movilidad positiva, algunas H₂S, además el *P. mirabilis* es indol negativo, mientras que las otras tres especies son indol positivas, una distinción que puede utilizarse clínicamente para la elección de los antibióticos (Levinson, 2006).

Formas Clínicas de la Infección por *Proteus*

Las especies de *Proteus* producen infecciones en humanos sólo cuando la bacteria abandona el intestino, se le encuentra en infecciones del aparato urinario, heridas, neumonías, otitis producen bacteriemia, neumonía e infecciones focales en pacientes debilitados o en quienes son tratados con infusiones intravenosas (Brooks *et al.*, 2008).

3.3.4 *Enterobacter*

Este género posee 14 especies: *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *E. sakasaki*, *E. amnigenus*, *E. gergoviae*, *E. dissolvens*, *E. asburiae*, *E. tayloarea*, *E. intermedium*, *E. conerogonus*, *E. himipressurali*. Las dos primeras causan con mayor frecuencia infecciones oportunistas, el resto se aíslan con menos frecuencia de especímenes clínicos (Spicer *et al.*, 2009).

Características morfológicas y metabólicas de *Enterobacter*

Bacilos gram negativos que miden aproximadamente de 0,5 a 0,8 de ancho por 1,0 a 2,0 μm de largo, móviles, con cápsula, aerobios y anaerobios facultativos, fermentan la lactosa, sacarosa con la producción de ácido y gas (SOPs, 2007). La mayor parte de las especies de *Enterobacter* presentan licuefacción a la gelatina, además dan resultado positivo al citrato, catalasa, ornitina descarboxilasa, Voges Proskauer (VP), gluconato, urea y resultado negativo a oxidasa, indol, lisina (Brooks *et al.*, 2008).

Epidemiología

Las especies de *Enterobacter*, se aíslan con menor frecuencia que las *Klebsiella* y las *E. coli* y aunque son capaces de infectar cualquier tejido del organismo, a menudo se los asocia con infecciones de las vías urinarias. Casi todas las infecciones se producen sobre problemas subyacentes y muchas de éstas son nosocomiales, estas bacterias forman parte de la flora comensal

entérica y suelen estar presentes en el intestino del hospitalizado, debido a su poder de colonizar otras regiones corporales y causar infecciones graves, llegan a representar alrededor del 13,5% en los aislamientos clínicos (Fraiser, 2006).

Las infecciones están relacionadas con la hospitalización por los procedimientos invasivos; como cateterismo venoso, intubación respiratoria, manipulaciones del aparato urinario, cuyas infecciones se propagan a través de medios endógenos y exógenos como las manos del personal. Se ha reportado que aproximadamente el 11,1% de los aislamientos corresponden al tracto respiratorio, el 10,3% a heridas quirúrgicas, el 6,1% al tracto urinario y el 5,3% a la sangre (Schlesinger *et al.*, 2005).

Datos de vigilancia e informes sobre brotes en América del Norte y Sur, Europa y Asia, indican que estas bacterias representan un patógeno oportunista importante para los recién nacidos, representando cerca del 71% de los aislamientos clínicos y para pacientes de UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) se estima un 31%. Se asocia al *E. cloacae* con la mayor tasa de mortalidad de todas las infecciones causadas por *Enterobacter* (Nester *et al.*, 2008).

Patogenia

Estas bacterias tienen una membrana externa que contiene lipopolisacáridos donde los lípidos A desempeñan un papel importante en la sepsis. Este lípido también conocido como endotoxina, es el principal estímulo para la liberación de citoquinas, que son los mediadores de la inflamación sistémica y sus complicaciones. La cápsula permite a las enterobacterias protegerse de la fagocitosis interfiriendo en la unión de los anticuerpos a las bacterias. El hecho de presentar antígeno capsular K y H protege a las bacterias de la destrucción celular mediada por los anticuerpos (Jonas *et al.*, 2008).

Diagnóstico

La prueba más importante para identificar las especies de *Enterobacter* es el cultivo. En el laboratorio, el crecimiento de los

aislamientos de éste género se espera que sea detectable en 24 horas o menos. Las colonias producidas por los microorganismos de este género son grandes y mucosas a causa de la presencia del material capsular que poseen algunas cepas.

Los *Enterobacter* crecen rápidamente en medios selectivos como el MacConkey, EMB; donde forman colonias fermentadoras de la lactosa (con color) y no selectivos como el agar sangre, con el agar TSI provocan H₂S y gas, además son positivos para el agar citrato y con el agar SIM algunas son positivas al indol y movilidad pero no presentan H₂S (Levinson, 2006).

Formas Clínicas de la Infección por *Enterobacter*

Las infecciones por *Enterobacter* son cada vez más frecuentes en el ambiente hospitalario, de forma especial infecciones relacionadas con el uso de catéteres venosos, aunque también producen infecciones del tracto urinario (ITU), infecciones quirúrgicas, bacteriemia, infecciones respiratorias bajas, de la piel y de partes blandas, endocarditis, infecciones intra-abdominales, artritis séptica, meningitis neonatal, osteomielitis y las infecciones oftálmicas. Las especies de *Enterobacter* en pacientes ambulatorios también causa diversas infecciones ya previamente mencionadas, incluyendo ITU, de piel, partes blandas, heridas, entre otros (Romero, 2006).

3.3.5 *Shigella*

Se han descrito 4 especies con más de 45 serogrupos basados en el antígeno O: *S. dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*.

Características morfológicas y metabólicas de *Shigella*

Shigella es un bacilo gram negativo inmóvil que no tiene flagelos y por lo tanto carece de antígenos H. Se presenta sólo o en parejas, no poseen cápsula, no forman esporas y son aerobios-anaerobios facultativos. No producen ácido sulfhídrico, ni desdoblan la úrea, reducen los nitrato a nitritos, Voges-Proskauer

negativo, citrato negativo, lactosa negativo. Son fermentadores, de la glucosa con producción de ácido pero no de gas. Su actividad bioquímica es muy reducida (Levinson, 2006).

Epidemiología

Shigella es causa del 10 al 20% de la diarrea en general, del 30 al 50% de la diarrea con sangre y del 5 al 10% de diarrea secretora. Los porcentajes de infección por *Shigella* son similares en varios países en vías de desarrollo (Romero, 2007). En 2003 se describieron más de 22.500 casos de infecciones por *Shigella* en EE.UU.; sin embargo, se estima que cada año se producen casi 450.000 casos. Estos datos son insignificantes si se compara con los 150 millones de casos que se estiman que ocurren anualmente en todo el mundo. La shigelosis es sobre todo una enfermedad pediátrica: el 70% de las infecciones ocurre en niños menores de 15 años. Los brotes epidémicos de la enfermedad ocurren en las guarderías, los jardines de infancia y las prisiones. Se transmite por vía feco-oral, principalmente por personas con las manos contaminadas, y con menor frecuencia por el agua y los alimentos. *S. sonnei* y *S. flexneri* causan el 90% de los casos de shigelosis mientras que *S. dysenteriae* ha producido shigelosis epidémica (Kroser, 2008).

Patogenia

Las especies de *Shigella* causan daños por dos mecanismos: invasión del epitelio del colon, que depende de un factor de virulencia mediada por plásmidos, y producción de enterotoxina, que no es esencial para la colitis, pero facilita la virulencia.

El organismo se transmite por contacto fecal-oral, a través de alimentos infectados o agua, durante el viaje, o en centros de atención a largo plazo, centros de atención de día o residencias de ancianos (Kroser, 2008).

Diagnóstico

Para la identificación de estas bacterias se realizan cultivos de muestras sospechosas, como por ejemplo heces frescas, se

siembra en estrías sobre diferentes medios como agar MacConney, agar EMB y medios selectivos agar entérico Hektoen o agar Salmonella-Shigella, los cuales suprimen otras enterobacterias y microorganismos gram positivos. Las colonias incoloras (lactosa negativas) se someten a pruebas bioquímicas, en el agar hierro triple azúcar (TSI), no hay producción de gas ni de ácido sulfhídrico. No se observa movilidad (Levinson, 2006; Kroser, 2008).

Formas Clínicas de la Infección por *Shigella*

La shigelosis se caracteriza por la presencia de espasmos abdominales, diarrea, fiebre y heces sanguinolentas. Los signos y síntomas clínicos de la enfermedad aparecen entre 1 y 3 días tras la ingestión de los bacilos. Las shigelas colonizan inicialmente el intestino delgado y comienzan a multiplicarse en las primeras 12 horas. El primer signo de infección (una profusa diarrea acuosa sin indicios histológicos de invasión mucosa) se relaciona con la acción de una enterotoxina. Sin embargo, la característica fundamental de las shigelosis son los espasmos abdominales y el tenesmo, con abundante pus y sangre en las heces, en consecuencia de la invasión de la mucosa colónica por las bacterias. La infección puede resolverse de forma espontánea, aunque se recomienda el tratamiento antibiótico con el fin de reducir el riesgo de diseminación secundaria a los miembros de la familia y a otros contactos (Fauci., *et al* 2009).

3.3.6 *Salmonella*

El género *Salmonella* tiene una clasificación muy compleja debido a que los microorganismos representan una continuación más que una especie bien definida. Los estudios de hibridación han demostrado que existen siete grupos evolutivos y casi todos los serotipos que infectan humanos pertenecen al grupo I de hibridación DNA (Wiesner *et al.*, 2009). El nombre de especie *Salmonella enterica* ha sido aceptado ampliamente y los del grupo I son subespecies; existen más de 2500 serotipos de salmonellas que incluyen a más de 1400 serotipos clasificados dentro del grupo I. Dentro de los serotipos de importancia clínica

están: *Salmonella paratyphi* A (serogrupo A), *Salmonella paratyphi* B (serogrupo B), *Salmonella choleraesuis* (serogrupo C1) y *Salmonella typhi* (serogrupo D) (Brooks *et al.*, 2008).

Características morfológicas y metabólicas de Salmonella

Bacilos gram negativos, de 2 a 4 µm de longitud, tienen flagelos, fimbrias, son anaerobios facultativos, fermentan glucosa a partir de la cual generan gas. La mayor parte de las cepas son móviles y producen H₂S a partir de una fuente inorgánica de azufre, el tiosulfato. Utilizan el citrato, reducen nitratos a nitritos, son catalasas positivas, no desarrollan cápsula, esporas ni fermentan la lactosa y son negativas para indol, oxidasa, ureasa (Brooks *et al.*, 2008).

Epidemiología

Puede causar infecciones graves de alta letalidad, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, niños y ancianos; por lo general están relacionadas con la ingestión de alimentos y aguas contaminadas con desechos humanos y animales. La salmonelosis es una de las enfermedades más comunes ampliamente distribuida y transmitida por los alimentos, constituye un problema importante de salud pública representando un costo significativo para la sociedad en muchos países, ya que se estima que ocurren más de 1.4 millones de infecciones y 600 muertes cada año (Murray *et al.*, 2006). En nuestro país en el 2007 se reportaron 10.199 casos debido a intoxicación alimentaria por *Salmonella* (MSP, 2007).

Este grupo cuenta con *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* como los serotipos más importantes para este tipo de infección transmitida de animales a los seres humanos, con una incidencia aproximada del 14% y 19% respectivamente (Braden, 2006). La *S. typhimurium* está íntimamente relacionada con la *Salmonella typhi*, el agente causante de la fiebre tifoidea, que es responsable de cerca de 600.000 muertes por año en todo el mundo. A nivel mundial la incidencia de fiebre tifoidea está disminuyendo, sin embargo, la salmonelosis va en aumento (OMS, 2005; Adkins *et al.*, 2006).

Patogenia

Este género debe su patogenicidad a la capacidad para invadir tejidos y sobrevivir a los macrófagos; la expresión se inicia cuando la *Salmonella* entra en contacto con el tracto gastrointestinal del hospedero, donde encuentra condiciones como: la osmolaridad, la tensión de oxígeno y el pH; que actúan como señales para que inicie la transcripción de genes que codifican factores de virulencia, los cuales favorecen la interacción con la célula blanco durante la patogénesis. El papel de cada uno de estos factores varía para cada serotipo individual causante de la infección y para el huésped.

La *Salmonella* utiliza un sistema de secreción tipo III como un mecanismo básico de virulencia, este sistema es el encargado de translocar proteínas hacia el citosol, las cuales interfieren con las señales de transducción y otros procesos celulares. Sus flagelos, cápsulas y paredes celulares sirven como antígenos y determinan que se formen anticuerpos en la sangre que son específicos de cada una de las estructuras, éstas bacterias cuentan con antígenos somáticos (O), flagelares (H) y en algunas cepas el antígeno virulencia (Vi) (Alphons *et al.*, 2005).

- **Antígenos de Superficie:** el antígeno O sirven para fijarse a las células huéspedes receptores y para sobrevivir intracelularmente. Estos polisacáridos proporcionan la resistencia a la destrucción normal por el suero normal y protegen al microorganismo contra los efectos del complemento. El antígeno H compuesto por la proteína flagelina, termolábil, es la base de la clasificación de especies. El antígeno Vi es una cápsula que proporciona protección contra la fagocitosis y cuando los ingieren los macrófagos, estas bacterias inducen apoptosis (Ryan *et al.*, 2005).

Las **fimbrias** ayudan a la adherencia sobre las células huéspedes y su colonización, su presencia hace a las cepas ligeramente más virulentas que las que carecen de estas. Los **flagelos** basados en la movilidad pueden aumentar la capacidad de invasión y la **flagelina** ayuda a

evitar temporalmente la inmunidad celular (Wiesner *et al.*, 2009).

- **Invasividad:** a medida que las bacterias se aproxima al epitelio es más fácil su penetración, luego se multiplican y se diseminan a otros sitios del organismos, existen proteínas efectoras que inducen a los reacomodos necesarios para la invasión, también están implicadas en la supervivencia de la célula huésped, la replicación y la modulación de la respuesta inflamatoria.
- **Toxinas:** la activación de las propiedades quimiotácticas por las endotoxinas puede provocar la localización de los leucocitos en la lesión. La presencia de **enterotoxinas** hacen que invadan la pared intestinal con más eficacia y se las considera cepas más virulentas, produciendo hipersecreción de líquidos y electrolitos (Levinson, 2006).

Diagnóstico

El aislamiento del microorganismo constituye un diagnóstico de laboratorio positivo de salmonellas, la sangre es el mejor espécimen para la detección de la septicemia y de la fiebre entérica, la orina, heces y otras muestras como esputo o líquido cefalorraquídeo, constituyen muestras apropiadas para el diagnóstico de complicaciones en las infecciones.

En los cultivos crecen con facilidad en agar sangre formando colonias de 2 a 3 milímetros y en agar MacConkey o EMB forman colonias no fermentadoras de la lactosa (incoloras). En agar TSI se observa la superficie alcalina y el fondo ácido, frecuentemente con gas y H₂S, con el agar SIM dan positivo a movilidad y H₂S, en el agar citrato dan resultado negativo y además son ureasa negativas no cambian el color del medio, el cual es naranja pálido (Levinson, 2006; Brooks *et al.*, 2008).

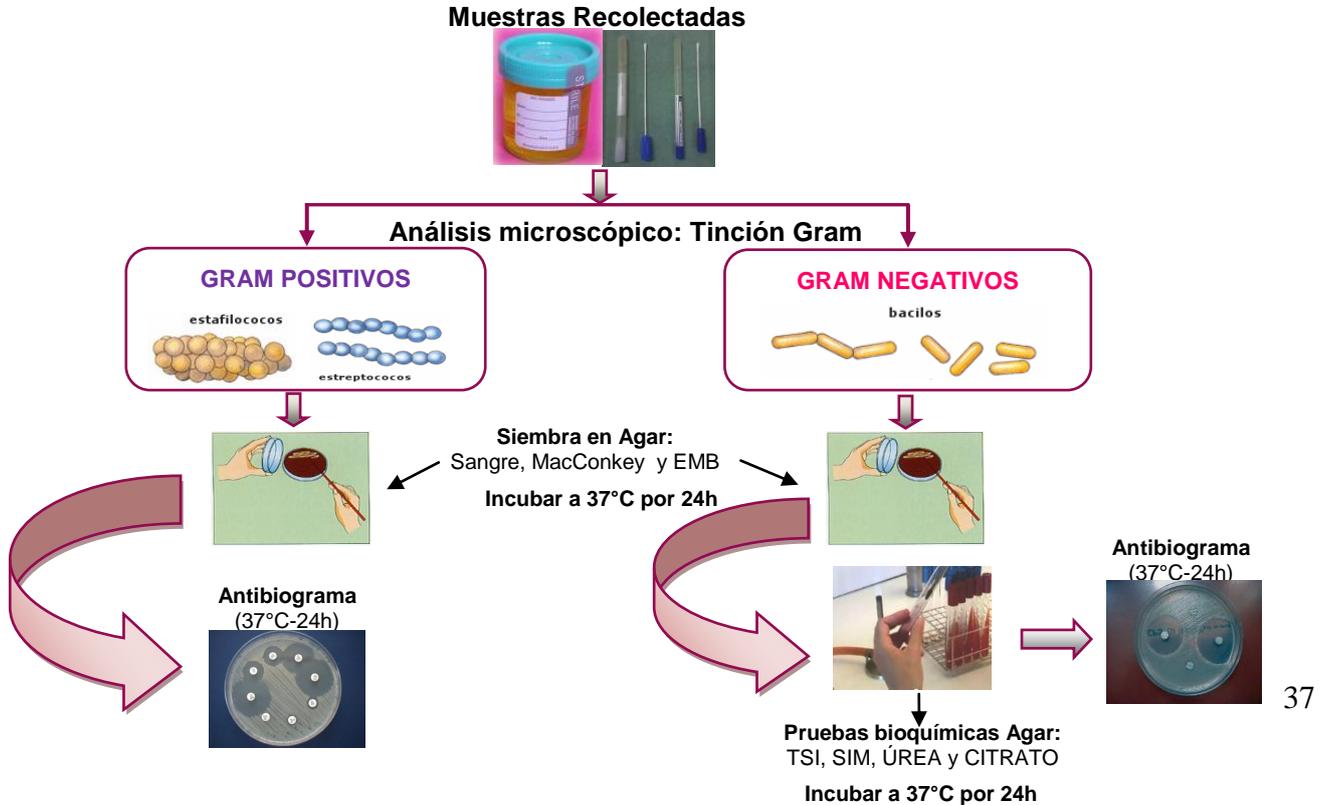
Formas Clínicas de la Infección por *Salmonella*

Las especies de *Salmonella* causan un amplio número de manifestaciones clínicas en los seres humanos, entre ellas se

distinguirse: gastroenteritis, bacteriemia y septicemia, fiebre entérica y un estado de portador (Romero, 2006).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4.1 Esquema de procedimientos para el aislamiento de Enterobacterias



4.1 Población de Estudio

Se recolectó todo fluido orgánico que fue remitido al área de Microbiología del Hospital Provincial General “Isidro Ayora” de Loja en el período Enero-Agosto del 2009; la población estuvo constituida por 934 pacientes de todas las edades y de ambos sexos que acudieron voluntariamente a la entidad de salud antes mencionada para confirmar el diagnóstico de una infección bacteriana, procediendo a realizar el respectivo análisis de dichas muestras, aislándolas en medios selectivos y diferenciales para su interpretación.

4.2 Técnicas microbiológicas

Las técnicas microbiológicas utilizadas en este estudio fueron: tinción Gram, técnica de estrías múltiples, método de Kass y la técnica de disco-difusión o de Kirby-Bauer (Koneman *et al.*, 2008) **Anexo 1, Anexo 2.**

4.3 Interpretación de resultados de Pruebas Bioquímicas

Las especies de enterobacterias fueron identificadas según los esquemas convencionales (Koneman *et al.*, 2008) **Anexo 3.**

4.4 Análisis Estadístico

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 18.0 (2009).

5. RESULTADOS

Población Estudiada

En el período estudiado se analizaron 934 muestras provenientes tanto de pacientes hospitalizados como de consulta externa de las cuales las bacterias Gram negativas obtuvieron una frecuencia de 649 (69.5%) mientras que las Gram positivas de 285 (30.5%) (Gráfico 5.1), predominando el género femenino en ambos grupos de bacterias con 450 (69.3%) y 144 (51.0%) casos frente al género masculino con 199 (50.5%) y 141(49.5%) casos respectivamente (Gráfico 5.2).

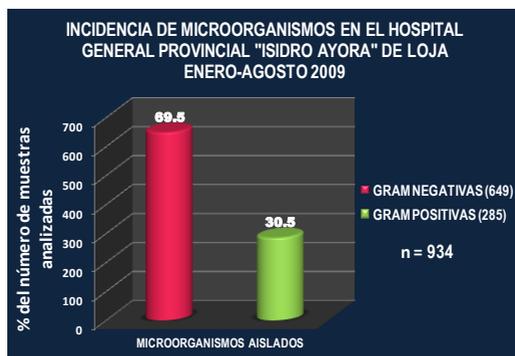


Gráfico 5.1: Incidencia de microorganismos Gram Negativos y Gram Positivos aislados en la población estudiada. $X^2= 49,95$; $p= 0,000$. **Fuente:** Autoras

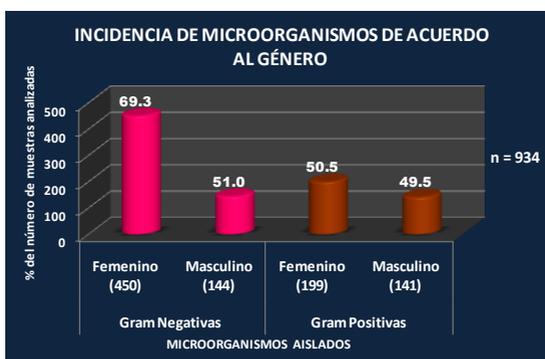


Gráfico 5.2: Incidencia de microorganismos Gram Negativos y Gram Positivos según el género. $X^2= 29,73$; $p= 0,000$. **Fuente:** Autoras

De los 649 bacilos Gram negativos, 508 (78.3%) fueron enterobacterias y 141 (21.7%) no fermentadores (Gráfico 5.3).

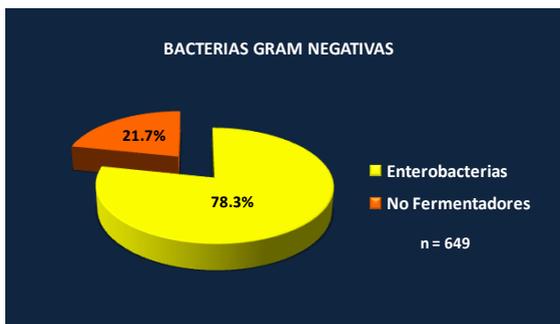


Gráfico 5.3. Frecuencia de bacterias Gram negativas, $\chi^2 = 338,22$; $p = 0,003$.

Enterobacterias: *Escherichia coli* (306), *Enterobacter aerogenes* (104) y otras (98) constituidas por: *Citrobacter freundii* (18), *Morganella morganii* (18), *Proteus vulgaris* (16), *Proteus mirabilis* (15), *Escherichia intermedium* (12), *Providencia rettgeri* (7), *Enterobacter cloacae* (6), *Klebsiella sp.* (3), *Salmonella paratyphi* (1), *Salmonella typhi* (1) y *Klebsiella pneumoniae* (1). **No Fermentadores:** *Moraxella catarrhalis* (74), *Pseudomonas aeruginosa* (40), *Alcaligenes faecalis* (23) y *Acinetobacter baumannii* (4). **Fuente:** Autoras.

De los 285 cocos gram positivos 113 (39.6%) fueron *Staphylococcus coagulasa negativo*, 109 (38.2%) *Staphylococcus aureus*, y 63 (22.1%) otras bacterias gram positivas, dentro de este grupo se encuentran: *Streptococcus viridans* (51), *Streptococcus beta hemolítico* (5), *Streptococcus pneumoniae* (4) y *Streptococcus spp.* (3) (Gráfico 5.4).

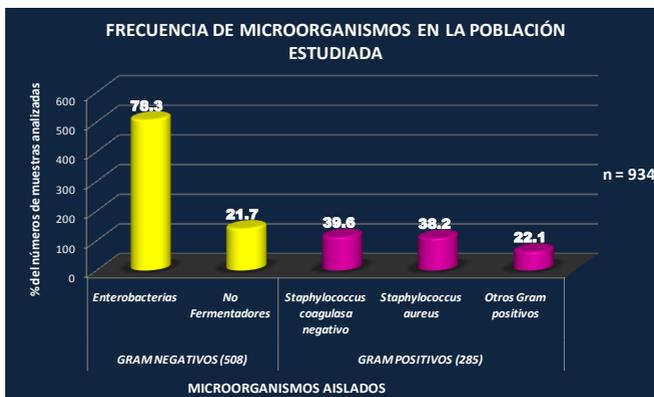


Gráfico 5.4: Incidencia de microorganismos Gram Negativos y Gram Positivos aislados con mayor frecuencia en la población estudiada. $\chi^2 = 773,5$; $p = 0,000$. **Fuente:** Autoras

Las bacterias Gram negativas (649) fueron aisladas de los siguientes tipos de muestras: orina 342, secreciones de tejidos blandos y piel 122, secreciones faríngeas 86, coprocultivo 45, dispositivos médicos 32, secreciones vaginales 18, oculares 3 y hemocultivo 1 (Gráfico 5.5); y en Gram positivas (285): orina 34, secreciones de tejidos blandos y piel 111, secreciones faríngeas 96, coprocultivo 1, dispositivos médicos 17, secreciones vaginales 14, oculares 7 y hemocultivo 5 (Gráfico 5.6).

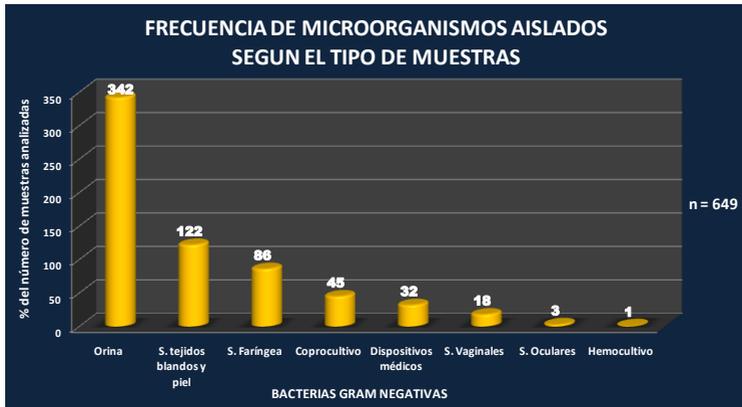


Gráfico 5.5: Microorganismos Gram negativos según el tipo de muestra analizada. $\chi^2 = 1109.1$; $p = 0,000$. **Fuente:** Autoras

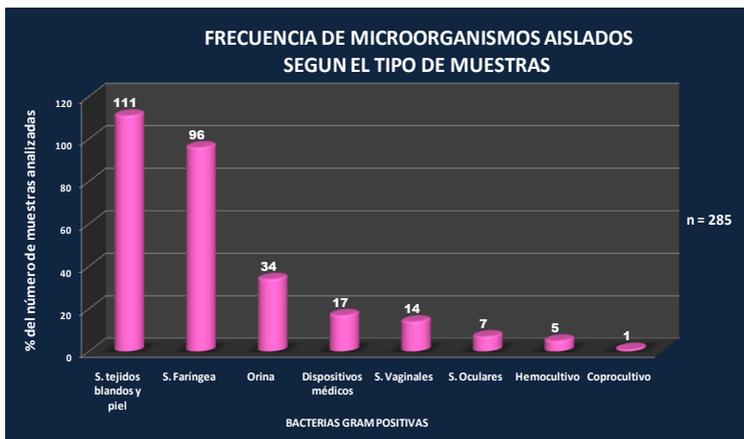


Gráfico 5.6: Microorganismos Gram positivos según el tipo de muestra analizada. $\chi^2 = 367,72$; $p = 0,000$. **Fuente:** Autoras

En pacientes hospitalizados las bacterias Gram negativas mayormente aisladas fueron: *Escherichia coli* 44.8% y *Enterobacter aerogenes* 19.2%, seguidas por otras enterobacterias 19.9% y no fermentadores 16.1%. En consulta externa fueron: *Escherichia coli* 49.4% y *Enterobacter aerogenes* 13%, seguidas por no fermentadores 27.1% y otras enterobacterias 10.5% (Gráfico 5.7).

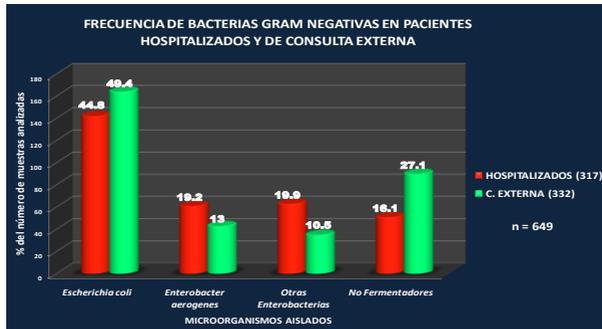


Gráfico 5.7: Bacterias Gram negativas aisladas en pacientes hospitalizados y de consulta externa. $X^2 = 14,80$; $p = 0,002$. Fuente: Autoras

En pacientes hospitalizados las bacterias Gram positivas mayormente encontradas fueron: *Staphylococcus coagulasa negativo* 52.1%, *Staphylococcus aureus* 41.1% y otras 6.8%. En consulta externa fueron: *Staphylococcus aureus* 33.8% *Staphylococcus coagulasa negativo* 26.6% y otras 39.6% (Gráfico 5.8).

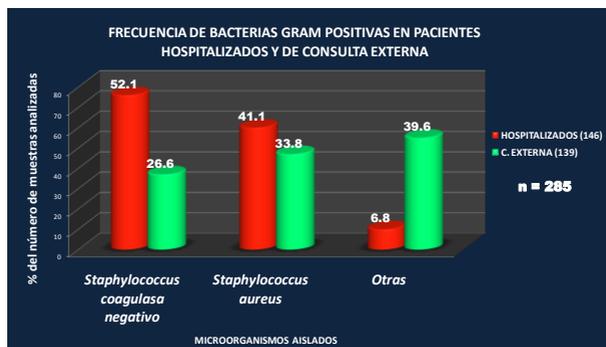


Gráfico 5.8: Bacterias Gram positivas aisladas en pacientes hospitalizados y de consulta externa. $X^2 = 100,28$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

Enterobacterias

Del total de pacientes estudiados (934) se determinó que 508 resultaron infectados por enterobacterias lo que corresponde a un porcentaje del 54.4%; el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *Escherichia coli* con 306 casos (60.2%), seguido del *Enterobacter aerogenes* con 104 casos (20.5%) y otras enterobacterias con 98 casos (19.3%), como se muestran en el Gráfico 5.9. Dentro de este último grupo se encuentran: *Citrobacter freundii* (18), *Morganella morganii* (18), *Proteus vulgaris* (16), *Proteus mirabilis* (15), *Escherichia intermedium* (12), *Providencia rettgeri* (7), *Enterobacter cloacae* (6), *Klebsiella sp.* (3), *Salmonella paratyphi* (1), *Salmonella typhi* (1) y *Klebsiella pneumoniae* (1) (Gráfico 5.10).

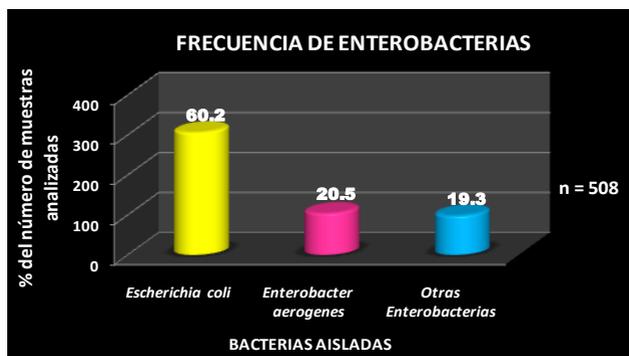


Gráfico 5.9: Incidencia de enterobacterias aisladas con mayor frecuencia, en la población estudiada. $\chi^2=165.56$; $p= 0,000$. Fuente: Autoras

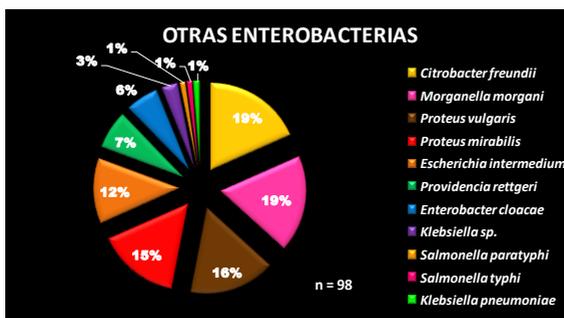


Gráfico 5.10: Otras enterobacterias: Incidencia de enterobacterias aisladas con menor frecuencia, en la población estudiada. $\chi^2= 55,78$; $p= 0,000$. Fuente: Autoras

De las 508 enterobacterias aisladas, 266 (52.4%) provinieron de pacientes hospitalizados y 242 (47.6%) de consulta externa observándose que en el género femenino predominó sobre el masculino, con 368 (72.4%) y 140 (27.6%) respectivamente (Gráfico 5.11).

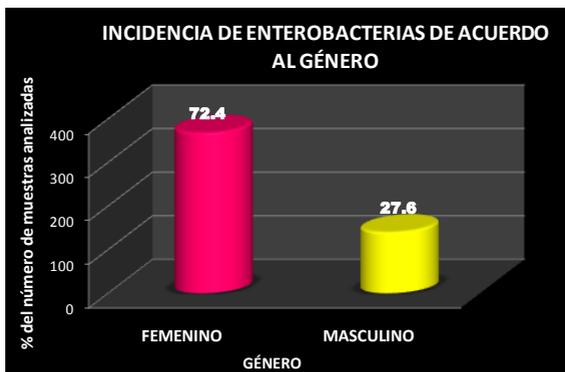


Gráfico 5.11: Incidencia de enterobacterias aisladas según el género. $\chi^2 = 102,33$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

Los tipos de muestra de las cuales se aislaron las enterobacterias fueron: urocultivo (61.4%), secreciones de tejidos blandos y piel (19.5%), coprocultivo (8.3%), dispositivos médicos (4.3%) y otro tipo de muestras (6.5%): secreción vaginal (17), secreción faríngea (12), secreción ocular (3) y hemocultivo (1) (Tabla 5.1).

Tipo de muestras de las cuales se aislaron las enterobacterias

Tipo de Muestra	Agente Patógeno			Total
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Otras Enterobacterias	
Urocultivo	221	48	43	312
S. tejidos blandos y piel	35	34	30	99
Coprocultivo	23	5	14	42
Otro tipo de muestras	18	8	7	33
Dispositivos médicos	9	9	4	22
Total	306	104	98	508

Tabla 5.1.- Incidencia de enterobacterias aisladas en los diferentes tipos de muestras provenientes de pacientes hospitalizados y de consulta externa. $\chi^2 = 65,15$; $p = 0,000$.

Fuente: Autoras

En los pacientes **Hospitalizados** se encontró que el urocultivo con el 39.5% y las secreciones de tejidos blandos y piel con el 35.3% fueron los tipos de muestra más frecuentes, seguidas por coprocultivos (15%), dispositivos médicos (8.3%), secreción vaginal (1.1%), secreción faríngea (0.4%) y hemocultivo (0.4%) (Gráfico 5.12).

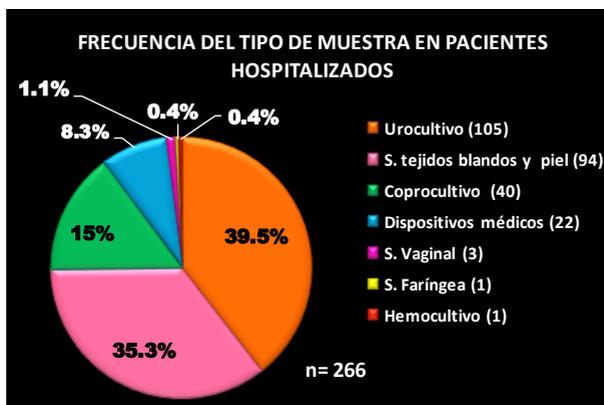


Gráfico 5.12: Incidencia de los diferentes tipos de muestras en pacientes hospitalizados. $\chi^2= 185,04$; $p= 0,000$. Fuente: Autoras

En pacientes hospitalizados, el microorganismo más frecuente en **urocultivos (105)** fue la *Escherichia coli* con el 71.4%, otras enterobacterias con el 16.2% y el *Enterobacter aerogenes* con el 12.4%. En las **secreciones de tejidos blandos y piel (94)**, la *Escherichia coli* tuvo 36.2%, *Enterobacter aerogenes* 32.9% y otras enterobacterias 30.9%. En el **coprocultivo (40)**, la *Escherichia coli* tuvo 55%, otras enterobacterias 32.5% y el *Enterobacter aerogenes* 12.5%. En los **dispositivos médicos (22)**, tanto la *Escherichia coli* como el *Enterobacter aerogenes* tuvieron el 41% y otras enterobacterias 18.1%. En las **secreciones vaginales (3)**, la *Escherichia coli* tuvo 67% y el *Enterobacter aerogenes* 33%. La **secreción faríngea** y **hemocultivo** tuvieron un aislamiento de *Enterobacter aerogenes* (Gráfico 5.13).

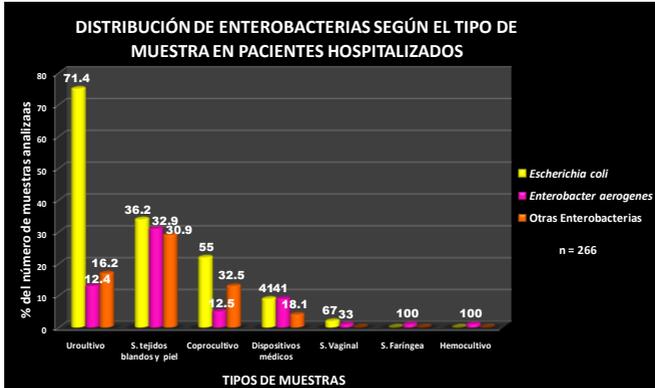


Gráfico 5.13: Incidencia de las enterobacterias en los diferentes tipos de muestras de pacientes hospitalizados. $\chi^2 = 23,41$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

En los pacientes de **Consulta Externa** el urocultivo fue el tipo de muestra más frecuente con 207 casos que representó el 86%, seguido de secreciones vaginales con 14 (5.8%) casos, secreción faríngea 11 (4.5%), secreciones de tejidos blandos 5 (2%), secreción ocular 3 (1.2%) y coprocultivo 2 (0.8%) (Gráfico 5.14).

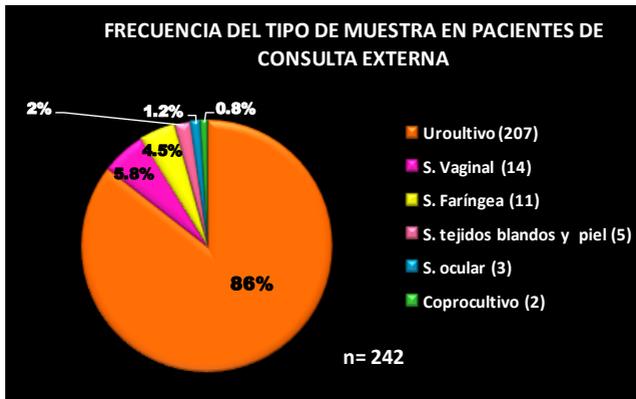


Gráfico 5.14: Incidencia de los diferentes tipos de muestras en pacientes de consulta externa. $\chi^2 = 185,04$; $p = 0,000$. Fuente: Las autoras

En pacientes de consulta externa, la bacteria más frecuente en **urocultivos (207)** fue: *Escherichia coli* con el 70.5%, seguida del *Enterobacter aerogenes* con el 16.9% y otras enterobacterias con

el 12.5%. En las **secreciones vaginales (14)**, la *Escherichia coli* tuvo el 78.5%, el *Enterobacter aerogenes* el 14.3% y otras enterobacterias el 7.1%. En la **secreción faríngea (11)** la *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* tuvieron el 27.3% y otras enterobacterias el 45.5%. En las **secreciones de tejidos blandos y piel (5)**, la *Escherichia coli* tuvo el 20%, *Enterobacter aerogenes* el 60% y otras enterobacterias el 20%. En la **secreción ocular (3)**, la *Escherichia coli* tuvo el 66.7% y otras enterobacterias el 33.3% y en los **coprocultivo (2)**, tanto la *Escherichia coli* como otras enterobacterias presentaron el 50% (Gráfico 5.15).

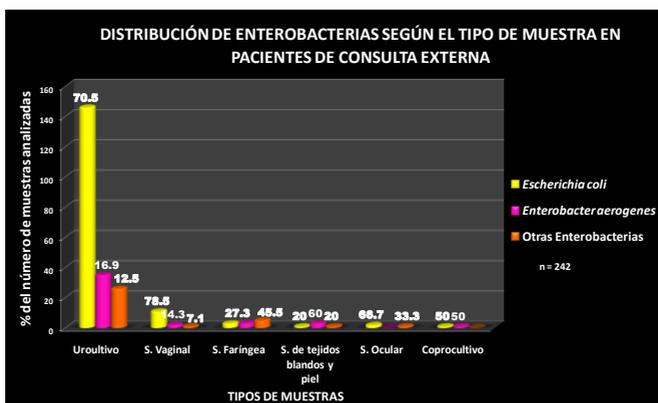


Gráfico 5.15: Incidencia de las enterobacterias en los diferentes tipos de muestras de pacientes de consulta externa. $X^2 = 23,41$; $p = 0,000$. **Fuente:** Autoras

En el grupo de edad de **0-12** años (141 casos), la cepa más frecuente fue la *Escherichia coli* 55.3%, seguido por *Enterobacter aerogenes* 24.8% y otras enterobacterias 19.9%; de **13-24** años (76 casos) *Escherichia coli* 68.4%, seguido por *Enterobacter aerogenes* y otras enterobacterias con 15.8%; de **25-36** años (84 casos) *Escherichia coli* 59.5%, seguido por otras enterobacterias con 22.6% y *Enterobacter aerogenes* 17.9% y de **37-48** años (76 casos) *Escherichia coli* 61.8%, seguido por *Enterobacter aerogenes* 19.7% y otras enterobacterias con 18.4% y de **48+** años *Escherichia coli* 60.3%, seguido por *Enterobacter aerogenes* 20.6% y otras enterobacterias con 19.1% (Gráfico 5.16).

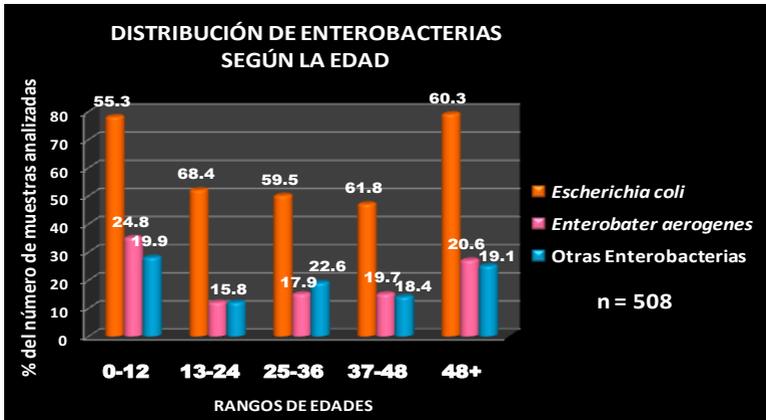


Gráfico 5.16: Distribución de enterobacterias en la población estudiada según rangos edad. $X^2 = 4,89$; $p = 0,770$. Fuente: Autoras

Infecciones Nosocomiales (IN) en enterobacterias

De los 266 pacientes hospitalizados se estimó que 116 (43.6%) desarrollaron una IN (Gráfico 5.17).

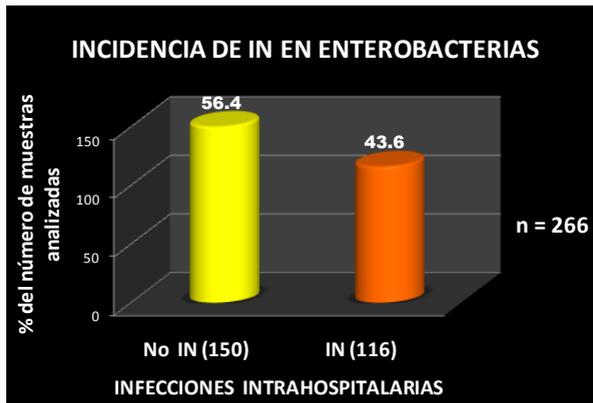


Gráfico 5.17: Prevalencia de las infecciones nosocomiales en pacientes intrahospitalarios. $X^2 = 41,34$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

El patógeno aislado con mayor frecuencia fue la *Escherichia coli* con un 44%, seguida del *Enterobacter aerogenes* con el 30.2% y otras enterobacterias con 25.9% (Gráfico 5.18).

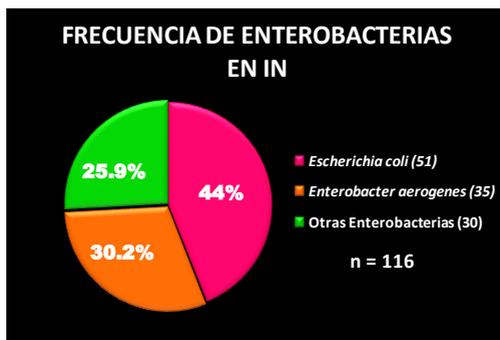


Gráfico 5.18: Incidencia de enterobacterias en pacientes con infección nosocomial. $X^2= 61,22$; $p= 0,000$. Fuente: Autoras

Fueron aisladas de los siguientes tipos de muestras: **secreciones de tejidos blandos y piel (65)**: otras enterobacterias 35.4%, *Escherichia coli* 33.8%, *Enterobacter aerogenes* 30.8%; **urocultivo (28)**: *Escherichia coli* 71.4% *Enterobacter aerogenes* 17.9% y otras enterobacterias 10.7%; **dispositivos médicos (21)**: *Escherichia coli* 42.9%, *Enterobacter aerogenes* 38.1% y otras enterobacterias 19%; **secreción faríngea (1)** y **hemocultivo (1)** *Enterobacter aerogenes* (Gráfico 5.19).

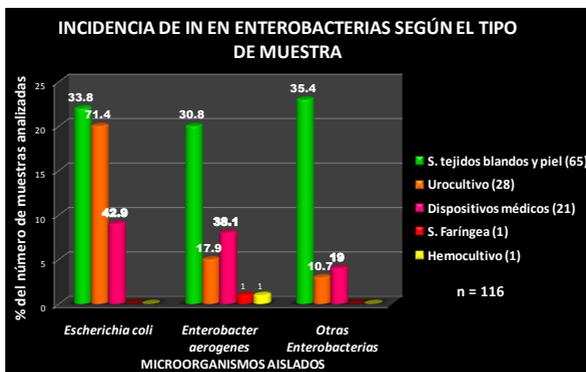


Gráfico 5.19: Incidencia de enterobacterias en los diferentes tipos de muestras analizadas, de pacientes con infección nosocomial. $X^2= 13,11$; $p= 0,000$. Fuente: Autoras

Las IN de enterobacterias aislados en la sala de **Cirugía** fueron: otras enterobacterias con un 42.9%, *Escherichia coli* 37.1%, y *Enterobacter aerogenes* 20%. En **Unidad de quemados (UQ)**: *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* con el 38.7%, otras enterobacterias 22.6%. En **Clínica**: *Escherichia coli* 61.9%, *Enterobacter aerogenes* 23.8% y otras enterobacterias 14.3%. En **Unidad de cuidados intensivos (UCI)**: *Escherichia coli* 53.3%, *Enterobacter aerogenes* 25% y otras enterobacterias 18.8%. En **Pediatría**: *Enterobacter aerogenes* 42.9%, *Escherichia coli* y otras enterobacterias con el 28.6%. En **Neonatología (NEO)**: *Enterobacter aerogenes* 66.7% y *Escherichia coli* 33.3%. (Gráfico 5.20).

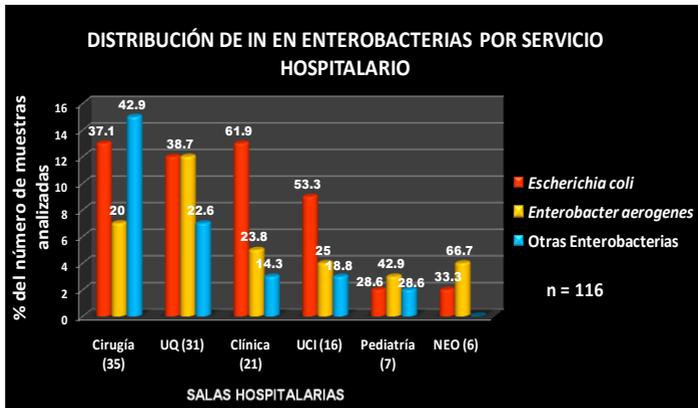


Gráfico 5.20: Distribución de enterobacterias por salas hospitalarias, provenientes de pacientes con infección nosocomial. $\chi^2 = 10,49$; $p = 0,003$. Fuente: Autoras

Perfiles de resistencia y sensibilidad de las bacterias a los antibióticos:

En cuanto a los patrones de susceptibilidad, los antibióticos estudiados fueron; del grupo de **betalactámicos**: ceftriaxona (**CRO**), cefotaxima (**CTX**), cefuroxima (**CXM**), ampicilina sulbactam (**SAM**), amoxicilina + ácido clavulánico (**AMC**), cefalexina (**CEP**); de los **aminoglucósidos**: amikacina (**AMK**), gentamicina (**GEN**); de las **fluoroquinolonas**: ciprofloxacina (**CIP**), norfloxacina (**NOR**) y **otros**: fosfomicina (**FOS**), nitrofurantoina (**NIT**), trimetropín sulfa (**SXT**).

- **PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS:**

En pacientes **hospitalarios** se observó mayor **resistencia a:** AMC 58.9%, SXT 57.8%, CXM 74.2%, GEN 71.3%, SAM 67%; y, en **ambulatorios a:** AMC 41.1%, SXT 42.2%, CXM 25.8%, GEN 28.7%, SAM 33% (Gráfico 5.21).

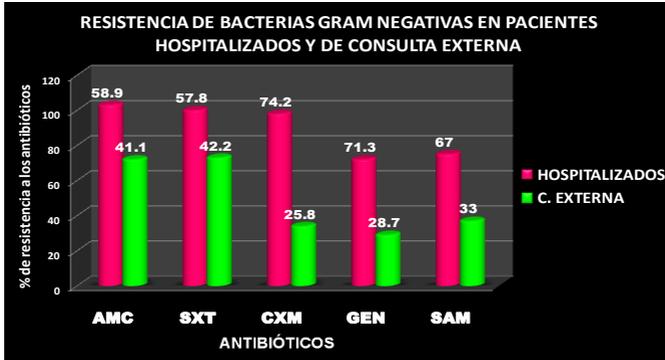


Gráfico 5.21: Resistencia de bacterias Gram negativas en la población estudiada. $X^2 = 65,57$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

La **sensibilidad**, en pacientes **hospitalizados** fue mayor para: GEN 46%, CMX 45%, AMC 30.9%, SAM 49%, SXT 34.4%; y, en **ambulatorios** para: GEN 54%, CMX 55%, AMC 69.1%, SAM 51%, SXT 65.6% (Gráfico 5.22).

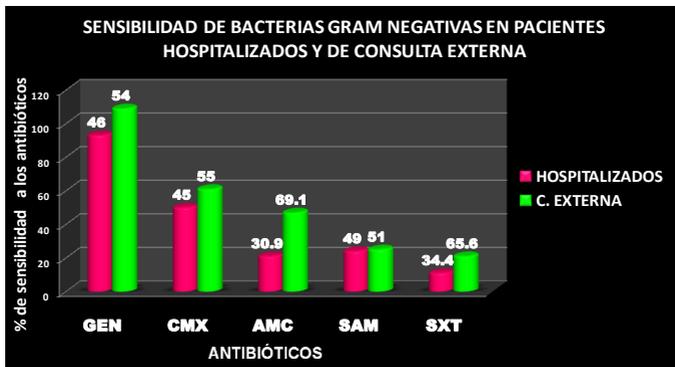


Gráfico 5.22: Sensibilidad de bacterias Gram negativas en la población estudiada. $X^2 = 18,70$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

- **PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS EN PACIENTES HOSPITALIZADOS Y AMBULATORIOS:**

Escherichia coli: La resistencia en hospitalizados fue mayor en: SXT 50.5%, AMC 54.3%, NOR 50%, CXM 57.1%, GEN 59.2%; y, en ambulatorios en: SXT 49.5%, AMC 45.7%, NOR 50%, CXM 42.8%, GEN 40.8% (Gráfico 5.23).

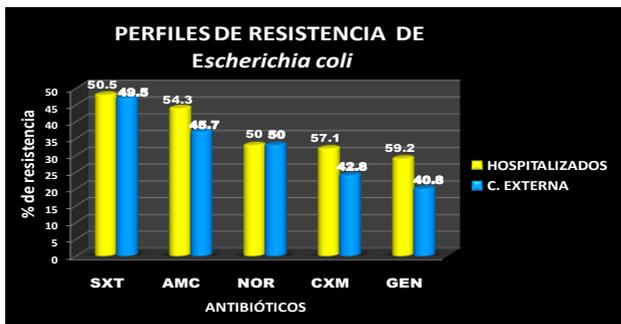


Gráfico 5.23: *E. coli* resistente a: trimetropín sulfa (SXT), amoxicilina + ácido clavulónico (AMC), norfloxacina (NOR), cefuroxima (CXM) y gentamicina (GEN).
 $\chi^2 = 16,19$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

La sensibilidad en hospitalizados fue mayor en a: GEN 41%, NOR 25.9%, CXM 42.2%, AMC 22.2%, SXT 36.8%; y, en ambulatorios a: GEN 59%, NOR 74%, CXM 57.8%, AMC 77.7%, SXT 63.2% (Gráfico 5.24).

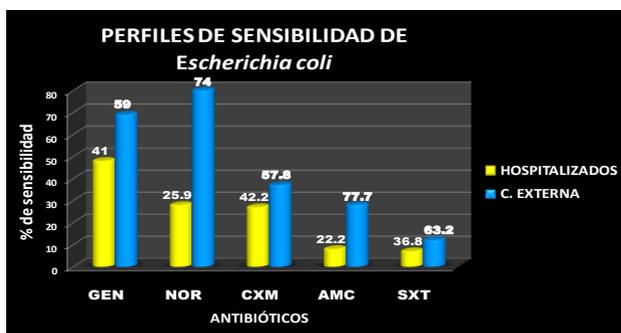


Gráfico 5.24: *E. coli* sensible a: gentamicina (GEN), norfloxacina (NOR), cefuroxima (CXM) amoxicilina + ácido clavulónico (AMC) y trimetropín sulfa (SXT).
 $\chi^2 = 98,63$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

Enterobacter aerogenes: La resistencia en hospitalizados fue mayor en: AMC 61.1%, SXT 60.7%, CXM 85.2%, GEN 79.2%, CIP 90%; y, en ambulatorios en: AMC 38.9%, SXT 39.3%, CXM 14.8%, GEN 20.8%, CIP 10% (Gráfico 5.25).

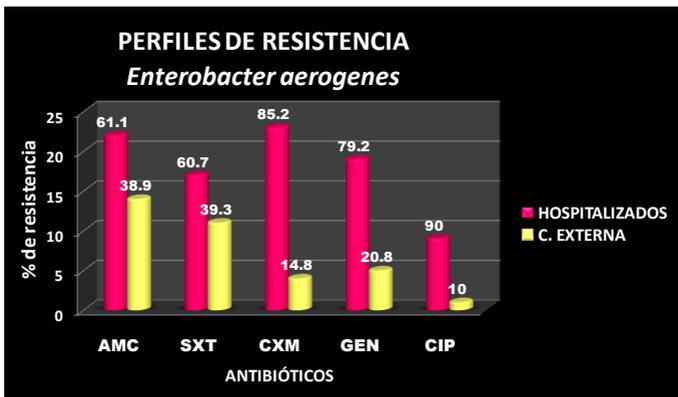


Gráfico 5.25: *Enterobacter aerogenes* resistente a: amoxicilina + ácido clavulónico (AMC), trimetropin sulfá (SXT), cefuroxima (CXM), gentamicina (GEN) y ciprofloxacina (CIP). $X^2 = 84,33; p = 0,000$. Fuente: Autoras

La sensibilidad en hospitalizados fue mayor en a: GEN 41.6%, CIP 36.4%, CXM 36.8%, AMC 35.7%, SXT 33.3%; y, en ambulatorios a: GEN 58.4%, CIP 63.6%, CXM 63.2%, AMC 64.3%, SXT 66.7% (Gráfico 5.26).

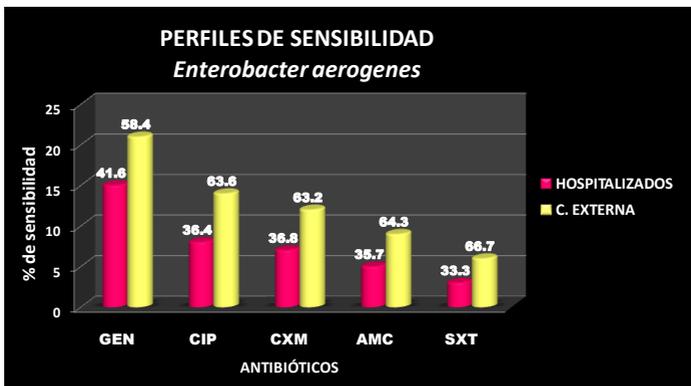


Gráfico 5.26: *Enterobacter aerogenes* sensible a: gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), cefuroxima (CXM), amoxicilina + ácido clavulónico (AMC) y trimetropin sulfá (SXT). $X^2 = 35,59; p = 0,000$. Fuente: Autoras

- **PERFILES DE SUCEPTIBILIDAD DE INFECCIONES NOSOCOMIALES EN ENTEROBACTERIAS:**

De todos los antibióticos utilizados, la *Escherichia coli* presentó una mayor resistencia a: SXT 12.2%, AMC, CTX y CXM con el 10.3% y sensibilidad a: AMK 26.2%, FOS 12.7%, CIP 10.3% (Gráfico 5.27).

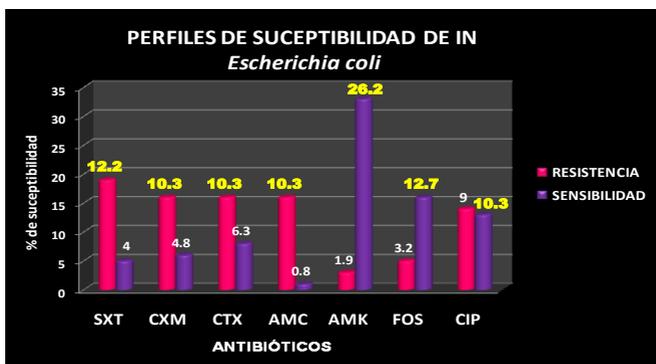


Gráfico 5.27: *E. coli* susceptible a: trimetropín sulfa (SXT), cefuroxima (CXM), cefotaxima (CTX), amoxicilina + ácido clavulónico (AMC), fosfomicina (FOS) y ciprofloxacina (CIP). $\chi^2 = 59,22$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

El *Enterobacter aerogenes* presentó una mayor resistente a: AMC 16%, CXM 15%, GEN 13% y sensibilidad a: GEN 29.4%, CIP 26.5% (Gráfico 5.28).

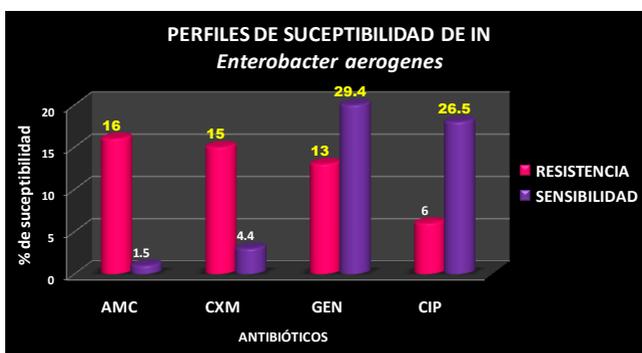


Gráfico 5.28: *Enterobacter aerogenes* susceptible a: amoxicilina + ácido clavulónico (AMC), cefuroxima (CXM), gentamicina (GEN) y ciprofloxacina (CIP). $\chi^2 = 28,23$; $p = 0,000$. Fuente: Autoras

6. DISCUSIÓN

Población Estudiada

En este estudio los bacilos gram negativos representaron el 69.5% de todos los aislamientos, el 30.5% correspondió a cocos gram positivos. Dentro de las Enterobacterias, la cepa encontrada con mayor frecuencia fue la *Escherichia coli* (47.1%), seguida del *Enterobacter aerogenes* (16%), aisladas principalmente en muestras de orina; de los No Fermentadores, fue la *Moraxella catarrhalis* (11.4%) en secreciones faríngeas y *Pseudomonas aeruginosa* (6.2%) en secreciones de tejidos blandos y piel. Nuestros resultados coinciden con un estudio realizado por Perozo *et al.*, 2009, en donde estas bacterias son las más frecuentes (*Escherichia coli* 45.4% y *Enterobacter aerogenes* 13,2%); un dato interesante en nuestro estudio es la alta incidencia de *Moraxella catarrhalis* en secreciones faríngeas, ya que superó a los patógenos gram positivos que frecuentemente son los más aislados en este tipo de muestra; sin embargo, estudios revelan que actualmente, esta cepa ha sido aceptada como el tercer patógeno más importante causante de infecciones en el tracto respiratorio superior de niños y ancianos, después de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (Esparcia *et al.*, 2005).

Los patógeno gram positivos más frecuentes fueron *Staphylococcus coagulasa negativo* (51.9%) y *Staphylococcus aureus* (38.2%), aislados mayormente en secreciones de tejidos blandos y piel. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Burillo *et al.*, 2006 donde obtuvieron que el *Staphylococcus coagulasa negativo* y *Staphylococcus aureus* son responsables del 43 al 46% de todas las infecciones de tejidos blandos y piel.

La mayoría de infecciones aparecieron en mujeres (63.6%), en donde el germen más frecuentemente aislado fue *Escherichia coli* en muestras de orina; 66.7% extrahospitalarias y 33,3% intrahospitalarias. Lo cual se asemeja con resultados de bibliografía consultada, en donde esta bacteria tiene una prevalencia del 62.7%, por lo que sigue siendo el principal agente

causal de las Infecciones del tracto urinario (Chiavassa *et al.*, 2008).

Enterobacterias:

De las 508 cepas aisladas, la *E. coli* (60.2%) y el *Enterobacter aerogenes* (20.5%) fueron las especies más frecuentemente encontradas, tanto en infecciones hospitalarias como ambulatorias. Según estudios de vigilancia médica, las enterobacterias se han convertido en una de las causas más importantes para el desarrollo de las infecciones adquiridas por la comunidad y nosocomiales, representando del 80 al 95% de los aislamientos bacterianos (SOPs, 2007).

Al relacionar la prevalencia de acuerdo al sexo, tanto a nivel ambulatorio como hospitalario, *E. coli* fue el agente etiológico más frecuente en ambos casos, con un predominio mayor en mujeres (72.4%). De todas las muestras procesadas (508), el 61.4% pertenecieron a urocultivos, esto demuestra la gran prevalencia de este patógeno en el tracto urinario, sobre todo en el sexo femenino, probablemente por las características anatómicas y fisiológicas de la mujer que la predispondría a desarrollar esta enfermedad (Kasmera 2009).

Los valores antes descritos los podemos relacionar con reportes de trabajos realizados por Ramis *et al.*, 2007, en Hospitales de la Habana donde la *E. coli* es la especie bacteriana más aislada con un 91% y el sitio donde más frecuentemente se aísla es en el tracto urinario.

En cuanto a la edad de los pacientes, se pudo observar una mayor frecuencia de infecciones por *E. coli* y el *Enterobacter aerogenes* en todos los grupos etarios; sobre todo en las edades más vulnerables como son: 0-12 años y mayor a 48 años. Según la literatura médica estos grupos son considerados como extremos por lo que son más susceptibles a contraer infecciones bacterianas (Guerrero *et al.*, 2007).

En el periodo estudiado, las infecciones nosocomiales por enterobacterias registraron una incidencia del 43.6% del total de

la población (266 hospitalizados), considerando que este porcentaje no está sobre el total de egresos hospitalarios al mes; como lo hacen en otros estudios donde reportan: IN en base a 100 egresos por mes. Esta sería una razón de que en la bibliografía consultada haya una incidencia de IN que va del 7.7% al 15% (Barrios *et al.*, 2007; Carra a *et al.*, 2005; OMS 2005). Tal discrepancia también puede tener su explicación en que, el comité de vigilancia que es el responsable de identificar, investigar, prevenir, controlar y llevar a cabo la vigilancia epidemiológica de las IN, deberían ajustarse más a sus lineamientos, de acuerdo con los instrumentos específicos disponibles, para abatir y mantener al mínimo posible la tasa por esta patología (González *et al.*, 2006).

Es importante recordar que la diseminación de cepas resistentes se produce sobre todo a través de las manos del personal de la salud y que el 30-40% de las infecciones intrahospitalarias se deben a esta causa; por lo tanto, resulta imprescindible tomar medidas de control, no sólo en cuanto al uso indiscriminado de antibacterianos, sino también en la concientización del personal acerca de la importancia del lavado de manos para poder prevenir y controlar las infecciones en estos pacientes (Chegurián *et al.*, 2008).

En las IN la cepa mayormente aislada fue la *E. coli* con una prevalencia del 44%, lo cual concuerda con otros trabajos realizados en centros hospitalarios de diferentes regiones en el mundo variando la frecuencia de *E. coli* del 37% al 49% (Barrios *et al.*, 2007; Carranza *et al.*, 2005).

Con respecto a la localización de las IN, la más frecuente en nuestra institución fue en secreciones de tejidos blandos y piel con el 56%, este resultado es similar a la literatura consultada, donde se plantea que las infecciones del sitio quirúrgico son un factor predisponente de morbilidad y mortalidad, y que por sí solas llegan a ser responsables de más del 67% de las infecciones nosocomiales en muchos países; según Asensio *et al.*, 2005. Estos aislamientos provinieron principalmente de la sala de Cirugía (30.2%) y Unidad de Quemados (26.7%); que relacionados con un estudio realizado en un Hospital de Bogotá

donde evidencia que estas dos áreas ocupan los primeros lugares en frecuencia de presentación de IN en instituciones de salud con el 38% y 22.8%; respectivamente, generando un alto costo no solo económico sino de vidas (Fajardo et al., 2005; Pérez et al., 2009).

En lo que respecta a los patrones de susceptibilidad, fue notoria la resistencia de los patógenos Gram negativos y Gram positivos de pacientes hospitalizados frente a los ambulatorios.

Las bacterias Gram negativas presentaron una mayor resistencia al grupo de betalactámicos (cefuroxima, ampicilina sulbactan, amoxicilina + ácido clavulónico), aminoglucósidos (gentamicina) y al trimetropín sulfá; en las bacterias Gram positivas al igual que las Gram negativas hubo más resistencia a los betalactámicos (penicilina, oxacilina, amoxicilina + ácido clavulónico, cefuroxima) y al trimetropín sulfá. En un estudio realizado en México por Benavides et al., 2005 registraron que estos grupos de antibióticos tuvieron el mayor número de cepas resistentes.

Al analizar la resistencia de las cepas de *E. coli* y *Enterobacter aerogenes* por antibiótico, se determinó que fueron cinco los responsables de la resistencia observada, la cual fue mayor en el sector hospitalario que la registrada en el sector ambulatorio para la mayoría de los antimicrobianos.

La *Escherichia coli* presentó resistencias superiores al 20% para gentamicina (59.2%), cefuroxima (57.1%), amoxicilina + ácido clavulánico (54.3%), trimetropín sulfá (50.5%) y norfloxacin (50%) concordando con la mayoría de estudios (Caicedo et al., 2009; Cabrera et al., 2007; Famiglietti et al., 2005; Perozo et al., 2009) lo que indica que ciertos antibióticos no estarían indicados para el tratamiento empírico de estas patologías. Amikacina (4%) ceftriaxona (19.4%) y nitrofurantoina (9.1%) fueron los fármacos que presentaron las resistencias más bajas para este microorganismo. En cuanto al *Enterobacter aerogenes* es alarmante el perfil de resistencia bastante superior al 20% encontrado para fluoroquinolonas (ciprofloxacina 90%), betalactámicos (amoxicilina + ácido clavulánico 61.1%, cefuroxima 85.2%), aminoglucósidos (gentamicina 79.2%) y

trimetropín sulfa 60.7%, esto concuerda en cierta medida con otros estudios donde también se presentó un patrón similar; pero llama la atención que esta institución obtuvo los más altos porcentajes de resistencia que se haya reportado en investigaciones previas (Bertona et al., 2005; Benavides *et al.*, 2005); nitrofurantoina (10%) y fosfomicina (5.2%) estarían recomendados para el tratamiento empírico en caso de alguna infección provocada por dicho agente etiológico.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las enterobacterias fueron las principales causantes de infecciones bacterianas representando el 54.4% del total de la población estudiada.

Tanto en la población hospitalaria como ambulatoria, los microorganismos mayormente aislados fueron la *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, obtenidos principalmente de muestras de orina y de secreciones de tejidos blandos y piel, predominando el género femenino sobre el masculino.

Considerando que para prescribir un tratamiento empírico es necesario que las tasas de resistencia sean inferiores al 20%, medicamentos utilizados en el manejo de infecciones bacterianas como: Amoxicilina + ácido clavulánico, Trimetropín sulfa, Ampicilina sulbactam y Norfloxacin no estarían indicados para manejo empírico en esta institución. El alto margen de seguridad de Amikacina, Ceftriaxona y Nitrofurantoina hace de estos medicamentos una buena opción terapéutica siempre y cuando se tenga en cuenta el costo-beneficio en esta comunidad.

Un tratamiento empírico se justifica cuando no se dispone del diagnóstico del agente causal o la urgencia del caso así lo requiera. El diagnóstico presuntivo de una infección se basa en datos clínicos y epidemiológicos, donde la selección del antimicrobiano para el tratamiento dependerá tanto de la información que posea el personal de salud, el estado general del huésped, el sitio de la infección y los datos epidemiológicos como de las características del antimicrobiano que se use y del agente causal potencial (OPS, 2009).

Contar con estudios de resistencia es una necesidad porque permiten obtener una información institucional y nacional respecto a la incidencia de patógenos, lo que ayudara en la toma de decisiones para el diagnóstico y tratamiento, haciendo un uso racional de los antibióticos.

La venta de antibióticos sin receta en farmacias constituye un acto grave, desde el punto de vista social y sanitario,

contribuyendo al uso injustificado de antibióticos y con ello a la aparición de cepas bacterianas resistentes.

Recomendamos implementar y estandarizar metodologías que ayuden a mejorar la calidad diagnóstica en los laboratorios de microbiología, para normalizar los procedimientos de identificación, valoración de la sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos bacterianos; así como el registro y la difusión de resultados, con la finalidad de poder hacer estudios comparativos.

Realizar estudios dirigidos hacia un solo patógeno (ej. *E. coli*) para relacionar la resistencia antimicrobiana entre las diferentes salas hospitalarias.

Realizar estudios comparativos entre entidades de salud privadas y del sector público, con el fin de obtener conocimientos del estado de salud de la población, para establecer medidas de prevención y control.

Dentro de las infecciones hospitalarias, los resultados obtenidos son de gran importancia para que el hospital implemente programas adecuados de vigilancia epidemiológica y prevención de IN; lo que permitirá intervenir de manera eficiente disminuyendo los factores de riesgo; con esto se podrá establecer líneas de acción a nivel de los diferentes servicios hospitalarios haciendo énfasis en los diferentes problemas identificados.

Esperamos que los resultados de este estudio sean de utilidad para la entidad de salud, Laboratorio de Microbiología y comunidad médica, para que contribuyan a modificar conductas de riesgo que facilitan la inducción de infecciones bacterianas y adecuar pautas de tratamiento como el abuso en la prescripción de antimicrobianos y hospitalizaciones innecesarias.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adkins J, Mottaz H, Norbeck A, Gustin J, Rue J, Clauss T, Purvine S, Rodland K, Heffron F, Smith R, 2006. **Analysis of the *Salmonella typhimurium* Proteome through Environmental Response toward Infectious Conditions.** Molecular & Cellular Proteomics, 5:1450-1461.
2. Álvarez L, 2007. **Infecciones de vías urinarias en el Hospital Universidad del Norte.** Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 2007; 23 (1): 9-18.
3. Bauman R, 2005. **Microbiology.** Pearson Benjamin Cummings.
4. Belas R, Suvanasuthi R, 2005. **The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein.** Journal of Bacteriology, 19 (187): 6789-6803.
5. Bell Raj Eapen, 2005. **Antibiotic sensitivity profile of common bacterial pathogens in Dubai – A study of 107 cases.** MEJFM, 4 (3 1): 28-32.
6. Braden C, 2006. **Salmonella enteric Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States.** Clinical Infectious Disease, 43:512–517.
7. Brooks G, Butel J, Morse S, 2008. **Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.** 19 Edición. Vol: 1. Editorial: Manual Moderno, México.
8. Caicedo P, Martínez M, Meneses D, Joaqui G, Imbachí I, Mahe P, Ramirez E, 2009. **Etiología y resistencia bacteriana en infección de vías urinarias en el hospital universitario San José de Popayán, Colombia entre Enero y Diciembre de 2008.** urol.colomb. Vol. XVIII, No. 3: pp 45-52.
9. Cantón R, Sánchez M, Morosini M, 2006. ***Proteus penneri*.** Enferm Infecc Microbiol Clin, 24(1): 8-13.
10. Coque T, Baquero F, Cantón R, 2008. **Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe.** Eurosurveillance, 13, (47): 1-11.
11. Clements A, Gaboriaud F, Duval J, Farn J, Jenney A, Lithgow T, Wijburg O, Hartland E, Strugnell R, 2008. **The**

- Major Surface-Associated Saccharides of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to Host Cell Association.** PLoS ONE 3 (11): e3817.
12. Crocker J, Burnett D, 2005. **La ciencia del diagnóstico de laboratorio.** 2da. Edición. España: Mc Graw Hill.
 13. Chegurián M, Carvajal L, Ledesma E, Enrico M, Reale A, Culasso C, Bertoni L, 2008. Prevalencia de microorganismos causantes de bacteriemias y fungemias en pacientes oncológicos pediátricos. Patrones de sensibilidad a los antimicrobianos. Rev. argent. microbiol. v.40 n.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
 14. Díaz R, Gamazo C, López I, 2005. **Manual práctico de microbiología.** 3ra. Edición. Editorial MASSON, S.A. España.
 15. Eiros J, Valdéz L, Bachiller M, 2006. **Contribución de la farmacodinamia en la elección del antimicrobiano para las exacerbaciones de la EPOC.** Rev Esp Quimioterapia, 3 (19): 220-230.
 16. Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, Perilli M, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini G, Toniolo A, 2005. ***Proteus mirabilis* Bloodstream Infections: Risk Factors and Treatment Outcome Related to the Expression of Extended-Spectrum β -Lactamases.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7 (49): 2598-2605.
 17. Famiglietti A, Quinteros M, Vázquez M, Marín M, Nicola F, Radice M, Galas M, Pasterán F, Bantar C, Casellas J, Kovensky J, Couto E, Goldberg M, Lopardo H, Gutkind G, Soloaga R, 2005. **Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*.** Revista Argentina de Microbiología, 37: 57-66.
 18. Farmer, JJ, III. 2003. ***Enterobacteriaceae: introduction and identification.*** In PR Murray, EJ Baron, MA Pfaller, JH Jorgensen, and RH Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 19. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J, 2009. **Harrison Principios de Medicina Interna,** 17^a edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.

20. Florencia M, Garda H, Bakás L, 2006. **Avances en el desarrollo de terapias neutralizantes en la sepsis.** Medicina (B. Aires), 3 (66): 263-273.
21. Fraiser S, 2006. **“Enterobacter Infections.”** On-line. Internet. <http://www.emedicine.com/med/topic678.htm>.
22. Gerald L. Mandell, Bennett J, Dolin R, 2006. **Enfermedades infecciosas, principios y prácticas.** 6ta. Edición.
23. Gobernado M, López-Hontanga JL, 2003. **Identificación bacteriana. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 21(2):54-60.**
24. González I, Miranda G, 2006. **La importancia del comité de Prevención y control de Infecciones nosocomiales.** ENF INF MICROBIOL 26 (3): 82-85.
25. Guerrero A, Tomás S, 2007. **Ingresos hospitalarios por enfermedades infecciosas: incidencia desde 1999 hasta 2003 en un área sanitaria de la Comunidad Valenciana.** Rev. Esp. Salud Pública, 4 (81): 411-420.
26. Holst O, 2007. **The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides ^ an update.** FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol, 273: 3–11. Jacobsen M, Stickler J, Mobley H, Shirliff M, 2008. **Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to Escherichia coli and Proteus mirabilis.** Clin. Microbiol Rev, 21: 26-59.
27. Jones J, Shaffer S, Ernst R, Goodlett D, Tureček F, 2008. **Determination of pyrophosphorylated forms of lipid A in Gram-negative bacteria using a multivariate mass spectrometric approach.** PNAS, 105(35):12742-1247.
28. Jordá L, Villa A, Lanza A, Bonvehi P, Nazar J, Mikietuk A, Labat R, Smayevsky J, 2005. **Utilidad del sistema vitek en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana.** Acta bioquim. clín. Latinoam, 1 (39): 19-25.
29. Julák J, 2005. **Chromatographic Analysis in Bacteriologic Diagnostics of Blood Cultures, Exudates, and Bronchoalveolar Lavages.** Prague Medical Report, 2 (106): 175–194.

30. Kasper A, 2009. **Etiología de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Un estudio de 9 años.** revistas.luz.edu.ve.
31. Koneman E, Allen S, 2008. Diagnóstico Microbiológico. 6ta. Edición. Editorial Médica Panamericana.
32. Kroser J, 2008. **Shigelosis.** Clinical Associate Professor of Medicine, Gastroenterology, and Hepatology, Drexel University College of Medicine.
33. Levinson W, 2006. **Review of Medical Microbiology and Immunology.** Ninth Edition. Editorial Mc Gram Hill Medical.
34. Lizaso D, Aguilera K, Correa M, Yantorno M, Cuitiño M, Pérez L, Lares M, Parra G, Esposto A, 2008. **Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad de las bacteriemias intrahospitalarias por bacilos gram negativos.** Rev Chil Infect; 25 (5): 368-373.
35. Lozano J, Carrasco J, 2008. **Panorama epidemiológico de la mortalidad de las neumonías en niños menores de cinco años en México en el período 2000-2007.** Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría.
36. Macleod S, Stickler D, 2007. **Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters.** Journal of Medical Microbiology, 56, 1549–1557.
37. Marçal D, Toste A, Carrondo M, Enguita F, 2009. **1,3-Propanediol Dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*: Decameric Quaternary Structure and Possible Subunit Cooperativity.** J Bacteriol, 191(4): 1143–1151.
38. Ministerio de Salud Pública, 2007. **Número de Casos Notificados y Tasas de Incidencia Anual de Intoxicación Alimentaria.**
39. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, 2006. **Microbiología Médica.** 5ta. Edición. Editorial Elsevier, España.
40. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, 2008. **Medical Microbiology.** 6ta. Edición. Editorial Elsevier, Canadá.
41. Nester E, Anderson D, Roberts E, Nester M, 2007. **Microbiología Humana.** 5ta. Edición. Editorial Manual Moderno, México.

42. Núñez B, Realpe G, 2003. **El control de la infección hospitalaria: un camino hacia la excelencia en la prestación sanitaria.** CAMBIOS Órgano Oficial de Difusión Científica H.C.A.M, 4, (2); 210-214.
43. Ocaña A, Rocchi M, Gasparotto A, Conrero I, Navarro M, Factorovich S, Albrecht C, Monterisi A, 2007. **Bacteriemia por enterobacterias en adultos en un hospital universitario: análisis de cinco años.** Rev. Argent. Microbiol, 1, (39): 38-43.
44. O'Hara C, 2005. **Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli.** Clin Microbiol Rev, 18 (1): 147-162.
45. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2005. **Agentes Etiológicos de Enfermedades Entéricas de Interés para la Salud Pública *Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella*, *Vibrio cholerae*.**
46. Palusiak A, Sidorczyk Z, 2009. **Serological characterization of the core region of lipopolysaccharides of rough *Proteus* sp. strains.** Biomedical and Life Sciences, 4 (57): 303-310.
47. Pérez J, 2006. **Manual de Patología General.** 6ta. Edición. Editorial MASSON, España.
48. Prats G, 2006. **Microbiología Clínica.** 1ra Edición. Editorial MÉDICA PANAMERICANA. España.
49. Ramis R, Bayarre H; Barrios M; López D; Bobadilla C, Chinea M., 2007. **Incidencia de infección en heridas quirúrgicas en servicios de cirugía general seleccionados.** Rev. cub. salud pública vol.33 no.1 La Habana.
50. Ramón P, Fernández A, 2008. **Magnitud y tendencia de la resistencia a los antibióticos de gérmenes gram negativos hospitalarios en America Latina.** Rev Panam Infectol, 10 (4): 38-46.
51. Riera E, Chamorro G, Zárata M, Falcón M, Franco R, 2008. **Efecto del espesor y del pH del agar Mueller-Hinton en el antibiograma.** Rev Panam Infectol, 10 (4):64-69.
52. Romero R, 2007. **Bases Etiológicas de las Enfermedades infecciosas y Parasitarias**

- Microbiología y Parasitología Humana.** 3ra. Edición. Editorial Panamericana.
53. Ruiz I, Diemond J, Andrade S, Sader H, Jones R. **Necesidad de guías de tratamiento locales para infecciones urinarias adquiridas de la comunidad.** Memorias do instituto Oswaldo Cruz 101 (7), 741-748.
 54. Ryan K, Ray G, 2005. **MICROBIOLOGÍA MÉDICA Una introducción a las enfermedades infecciosas.** 4ta. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
 55. Salas M, Gil-Setas A, Mazón A, 2006. **Etiología y sensibilidad antibiótica de las infecciones extrahospitalarias más frecuentes.** An. Sist. Sanit. Navar, (1): 27-36.
 56. Schauer C, 2007. **Manual de Laboratorio de Microbiología de la Ciencias de la Salud,** Kalamazoo Valley Community College.
 57. Schlesinger J, Navon S, Chmelnitsky I, Hammer O, Leavitt A, Gold H, Schwaber M, Carmeli Y, 2005. **Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacter* Isolates Obtained in Tel Aviv, Israel.** Antimicrob Agents Chemother, 49(3): 1150–1156.
 58. Snyder J, Munier G, Johnson C, 2008. **Direct Comparison of the BD Phoenix System with the MicroScan WalkAway System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterobacteriaceae and Nonfermentative Gram-Negative Organisms.** J Clin Microbiol, 46 (7): 2327-2333.
 59. Spicer J, 2009. **Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas.** 2da. Edición. Editorial Elseiver, España.
 60. Struble K, 2009. **“Proteus Infections”.** On-line. Internet. <http://emedicine.medscape.com/article/226434-overview>.
 61. Terragno R, Caffer M, Binsztein N, 2007. **Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Shigella* spp.** Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán” Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.

62. Umeh O, 2009. **Infecciones por *Klebsiella***. Center for AIDS Research and Education, David Geffen School of Medicine at UCLA.
63. Van Asten A, van Dijk J, 2005. **Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp.** FEMS Immunol. med. Microbiol, 44 (3):251-259.
64. Wiesner M, Zaidi M, Calva E, Fernández M, Calva J, Silva C, 2009. **Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains.** Microbiol, 9 (131): 1-15.

9. ANEXOS

Anexo 1

Tinción Gram

Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana (Murray *et al.*, 2008).

La tinción Gram consta de los siguientes pasos: primero en una placa portaobjetos se hace un extendido en espiral de la muestra en estudio dejando secar a temperatura ambiente, luego se fija la muestra al calor (flameado 3 veces aprox.). Se agrega azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana), se espera 1 minuto y se enjuaga con agua. Adicionamos lugol, esperamos 1 minuto y se enjuaga con agua. Después se agrega alcohol acetona, esperamos entre 20 y 30 segundos, enjuagamos con agua. Finalmente se añade safranina o fucsina básica, se espera 1-2 minutos y se enjuaga con agua (Figura 9.1).

Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión.

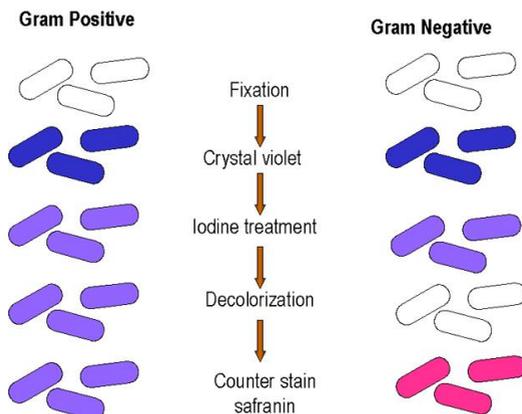


Figura 9.1. Procedimiento de la tinción de Gram

Fuente: Murray *et al.*, 2008

Anexo 2

La siembra

La técnica para el aislamiento comienza preparando un inóculo de siembra, que es la deposición de una pequeña porción de la muestra en el medio o en los medios de cultivo adecuados, en función de las especies microbianas que se espera encontrar.

Técnica de estrías múltiples: Con un asa de siembra, previamente esterilizada, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre un área pequeña de la superficie de la placa con agar, en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría. Se lleva la placa a incubar, a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida (Lozano *et al.*, 2008) (Figura 9.2).

Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de gérmenes.

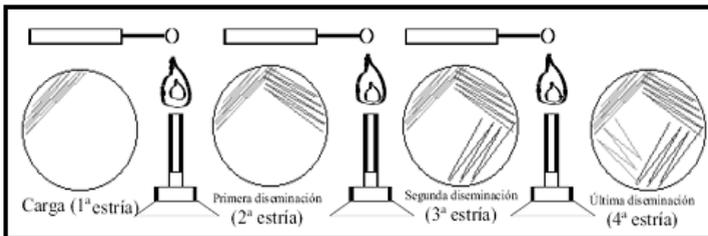


Figura 9.2. Técnica de estrías múltiples

Fuente: Lozano *et al.*, 2008

Técnica de Kass: esta técnica es utilizada específicamente para cultivos de orina; se toma un asa calibrada y esterilizada, se inocula el medio depositando la cantidad de muestra tomada con el asa en el centro del agar y a partir de ahí se trazó una línea recta de extremo a extremo de la caja. Con la misma asa, y sin

tomar más muestra ni esterilizarla, se realiza una estriación en zig-zag de manera que intercepte la línea central de lado a lado (Figura 9.3) (Bautista *et. al.*, 2009).

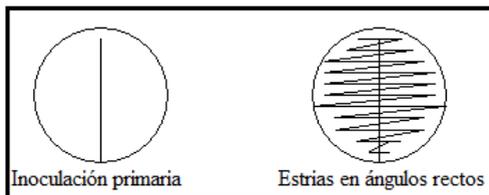


Figura 9.3. Técnica de Kass
Fuente: Bautista *et. al.*, 2009

Técnica de de disco-difusión o de Kirby-Bauer: consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos que se ponen en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde por el agar formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. Dicho halo es más grande cuanto mayor es el grado de sensibilidad de la cepa al antimicrobiano (Figura 9.4) (Maguiña *et al.*, 2006; NCCLS-2009).

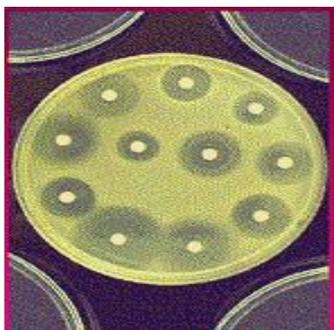


Figura 9.4 Técnica de Kirby-Bauer
Fuente: Maguiña *et al.*, 2006

Anexo 3

Pruebas bioquímicas

AGAR TSI: siembre el agar TSI haciendo una punción central hasta el fondo del tubo y estría en superficie.

Fundamento: en este medio se leen las siguientes reacciones bioquímicas:

- Fermentación de la glucosa (K/A).
- Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa (A/A).
- No fermentación de los carbohidratos (K/K), la bacteria no utiliza los hidratos de carbono, produciendo aminos que alcalinizan el fondo y la superficie del medio.
- Producción de gas: ruptura del medio.
- Producción de H₂S: ennegrecimiento del medio (Koneman *et al.*, 2008) (Figura 9.5).



Figura 9.5 Lecturas AGAR TSI

Fuente: Koneman *et al.*, 2008

AGAR CITRATO DE SIMMONS: sembrar con asa recta, solamente en superficie.

Fundamento: Las sales de amonio se desdoblán en amoníaco (NH₃) con la consiguiente alcalinidad del medio.

El indicador de pH es el AZUL DE BROMOTIMOL el cual en presencia de alcalinidad vira al color azul indicando que la prueba es POSITIVA. Cuando no hay cambio de color ni crecimiento se dice que la prueba es NEGATIVA (Koneman *et al.*, 2008) (Figura 9.6).

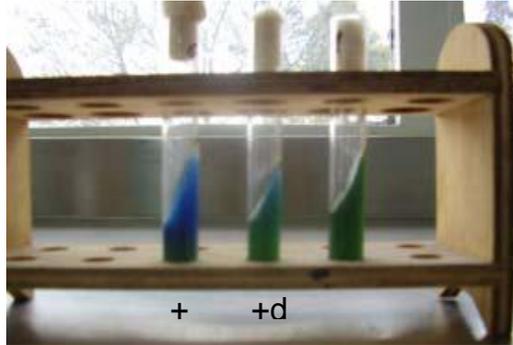


Figura 9.6 Lecturas AGAR CITRATO
Fuente: Koneman *et al.*, 2008

AGAR UREA: Sembrar con asa recta, solamente en superficie.

Fundamento: El indicador de pH es rojo de fenol, el cual en alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba POSITIVA. Si el color es amarillo indica una prueba NEGATIVA (Koneman *et al.*, 2008) (Figura 9.7).

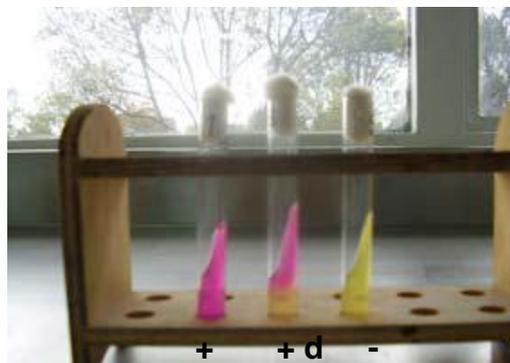


Figura 9.7 Lecturas AGAR ÚREA
Fuente: Koneman *et al.*, 2008

AGAR SIM: sembrar con asa recta, por picadura central hasta la mitad del tubo.

Fundamento: El indol se puede detectar en un medio adecuado observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Erlich o de Kovacs indicando una prueba POSITIVA. Si el color es amarillo indica una prueba NEGATIVA. EL SIM es un medio semisólido sin hidratos de carbono que inhiban la producción de H₂S y tiene tiosulfato de sodio fuente de azufre y hierro peptonado como indicador de H₂S, lo que lo hace más sensible en la detección de H₂S por producción de un precipitado negro de sulfuro ferroso.

La movilidad bacteriana se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación (Koneman *et al.*, 2008) (Figura 9.8).

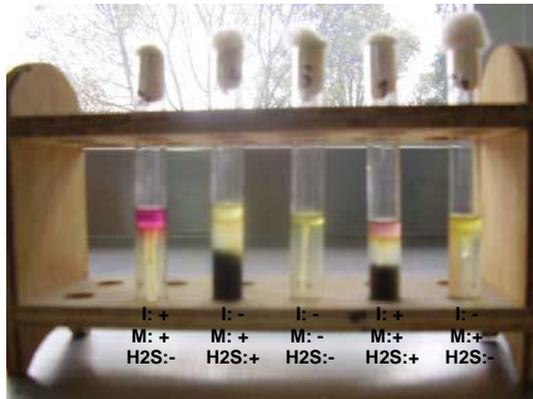


Figura 9.8. Lecturas AGAR SIM

Fuente: Koneman *et al.*, 2008