



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

RESISTENCIA BACTERIANA *IN VITRO* A QUINOLONAS EN CEPAS DE
Escherichia coli AISLADAS DE PACIENTES DE LA COMUNIDAD CON
INFECCIONES URINARIAS, CUMANÁ, ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

RIGUEL JOSÉ MERCIETT RODRÍGUEZ

:

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2016

RESISTENCIA BACTERIANA *IN VITRO* A QUINOLONAS EN CEPAS DE
Escherichia coli AISLADAS DE PACIENTES DE LA COMUNIDAD CON
INFECCIONES URINARIAS, CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

Prof. José Betancourt
Asesor

Prof. Militza Guzmán
Jurado Principal

Prof. Elsa Salazar
Jurado Principal

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Muestra poblacional.....	8
Aspectos éticos.....	8
Recolección de la muestra de orina.....	8
Análisis de orina	9
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	14
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29
HOJAS DE METADATOS.....	40

DEDICATORIA

A

Mis padres, por el apoyo y amor brindado.

Mis tías, esposa e hijo, por estar a mi lado.

Mis hermanos.

Mi familia en general.

AGRADECIMIENTO

A

Mi asesor Prof. José Betancourt, por compartir sus conocimientos, permitiéndome optar por el título de Licenciado en Bioanálisis.

La Lcda. Patricia Cruces, por la colaboración brindada en el procesamiento de las muestras.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de frecuencia según edad y género en pacientes con infecciones urinarias agudas no complicadas provenientes de la comunidad que acudieron al "Laboratorio Fertilab Oriente" ubicado en la Clínica Santa Rosa, Cumaná, estado Sucre, durante un periodo comprendido entre enero-junio de 2014. 17

Tabla 2. Frecuencia de aislamientos de las enterobacterias causantes de infecciones urinarias agudas no complicadas en pacientes que acudieron al "Laboratorio Fertilab Oriente" ubicado en la Clínica Santa Rosa, Cumaná, estado Sucre, durante un periodo comprendido entre enero- junio de 2014. ... 17

Tabla 3. Fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana a quinolonas de diferentes generaciones y espectros de acción encontrados en *Escherichia coli*, aisladas de pacientes con infecciones de tracto urinario agudas no complicadas provenientes de la comunidad atendidos en el Laboratorio Clínico Fertilab Oriente. Cumaná, estado Sucre, durante el periodo enero-junio 2014. 19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de frecuencia de los cultivos de orina provenientes de pacientes con infecciones del tracto urinario agudas no complicadas provenientes de la comunidad que acudieron al "Laboratorio Fertilab Oriente" ubicado en la Clínica Santa Rosa, Cumaná, estado Sucre, durante un periodo comprendido entre enero-junio de 2014. 16

Figura 2. Distribución porcentual de la susceptibilidad antimicrobiana a las quinolonas por las cepas de *Escherichia coli* en pacientes comunitarios con infecciones urinarias agudas no complicadas, periodo enero-junio de 2014. ... 18

RESUMEN

Se analizó la resistencia a quinolonas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones urinarias agudas no complicadas, atendidos en el Laboratorio de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa, en el periodo comprendido entre enero- junio de 2014. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales, la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se determinó utilizando quinolonas (ácido nalidíxico, levofloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina) mediante el método de difusión en agar. Se analizaron 109 pacientes con infecciones urinarias causadas por enterobacterias, en los cuales, se aislaron 93 cepas de *Escherichia coli*, con una frecuencia de 85,32%, seguida de *Klebsiella pneumoniae*, con 5,50%. Con respecto a los porcentajes de resistencia a las quinolonas ensayadas, los mayores fueron para ácido nalidíxico (47,31%) y ofloxacina (46,24%). Por otro lado, al observar los resultados de los antibiogramas, se identificaron 6 fenotipos diferentes, siendo el fenotipo I (ANA^S, NOR^S, CIP^S, OFX^S, LEV^S) el más frecuente, con 51,60%, seguido del fenotipo II (ANA^R, NOR^R, CIP^R, OFX^R, LEV^R) con 40,86%. Estos resultados ponen en evidencia que más del 40,00% de *Escherichia coli* presentan resistencia *in vitro* a las quinolonas estudiadas.

INTRODUCCIÓN

El sistema urinario es el conjunto de órganos que tiene como función principal la producción y salida de la orina. Está constituido por dos riñones, dos uréteres, la vejiga y la uretra. La estructura a través de la cual emergen los uréteres, los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los nervios del riñón se llama hilio renal. Los riñones son órganos pares situados en el abdomen a ambos lados de la columna vertebral, aproximadamente, a nivel de las vértebras T12 y L3. El riñón derecho está en un plano inferior al izquierdo debido a la presencia del hígado. El tamaño típico es de 10 a 12 cm de largo, de 5 a 7 cm de ancho y 3 cm de espesor, en promedio pesa de 130 a 150 gramos (Fox, 2008).

Los riñones filtran la sangre del aparato circulatorio gracias a las nefronas (unidad básica constituyente del riñón) y eliminan los desechos (diversos residuos metabólicos del organismo, tales como, la urea, ácido úrico, creatinina, potasio y fósforo) mediante la orina, a través de un complejo sistema que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y excreción. Diariamente, los riñones procesan unos 200 litros de sangre para producir hasta 2 litros de orina. La orina desciende continuamente hacia la vejiga por unos conductos llamados uréteres y la vejiga almacena la orina hasta el momento de su expulsión (Drake *et al.*, 2007).

En circunstancias normales, el tracto urinario es un sitio estéril con un revestimiento impermeable. La esterilidad se debe a un mecanismo de vaciamiento completo y periódico de la vejiga, a la integridad de la unión ureterovesical y al esfínter uretral, la descamación constante del epitelio urinario, el flujo, las características de la orina, las barreras inmunitarias y la microbiota habitual de la uretra anterior. Las alteraciones de cualquiera de estos

mecanismos y la estasis de la orina son factores que predisponen a padecer de una infección del tracto urinario (ITU) (Martínez *et al.*, 1997).

La ITU es la manifestación clínica que con mayor frecuencia afecta al riñón y a las vías urinarias, con una tasa de ocurrencia que oscila entre 0,30 y 7,80% en los primeros días de vida; en la edad escolar se ubica entre 1,00 y 3,00%, para aumentar en los adolescentes con el inicio de las relaciones sexuales. La presencia de bacteriuria en edad preescolar y escolar origina mayor riesgo de presentar una ITU en la edad adulta. En los adultos no se tienen con exactitud datos de ocurrencia, debido al gran número de ITU asintomáticas, tanto en mujeres a cualquier edad como en hombres después de los 50 años, pero en hombres menores de 50 años son raras, con una incidencia menor a 0,50%. De 1,00 al 3,00% de las mujeres jóvenes pueden presentar, al menos, una ITU al año, en su mayoría no complicadas y en esta edad son 30 veces más frecuentes que en hombres (Rondón *et al.*, 2007).

Las ITU se pueden categorizar en complicadas y no complicadas. La ITU no complicada es cuando no existen factores que predisponen a la misma o a la falla del tratamiento. En la ITU complicada existen factores que predisponen a esta o influyen en su tratamiento tales como, embarazo, diabetes o anomalías fisiológicas. Esta diferenciación influye en la correcta evaluación inicial del paciente y por lo tanto en su tratamiento y duración (Levy y Lopardo, 2005; Guevara *et al.*, 2011). Si bien es cierto que las infecciones urinarias pueden ser causadas por diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, la mayoría de los casos ya sea de la comunidad o intrahospitalarios son producidos por *Escherichia coli* (Laupland *et al.*, 2007; Peleg y Hooper, 2010).

Los microorganismos pueden colonizar también el tracto urinario por vía hematogena o linfática; sin embargo, la vía más común es el ascenso de

microorganismo a través de la uretra. Esto explica por qué las ITU son más frecuentes en mujeres que en hombres, y también el aumento de la patología después de una cateterización o instrumentación (Alibadi *et al.*, 1989).

Más del 95,00% de las ITU son monobacterianas y *Escherichia coli* (*E. coli*) es la responsable de la mayoría de los casos, especialmente, en pacientes ambulatorios con infección aguda. En pacientes con infección recurrente y en infecciones asociadas a la atención en salud, aumenta de forma significativa la frecuencia relativa de otros microorganismos, como: *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Enterococcus* spp y *Staphylococcus* spp. (Montiel *et al.*, 2011).

E. coli fue descrita por primera vez, en el año 1885, por el bacteriólogo alemán Theodore Von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente, la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera una bacteria de microbiota habitual, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos, diarreas e ITU (Feng *et al.*, 2002).

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, compuesta por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles, con flagelos peritricos, aunque también pueden ser inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar Mac Conkey, catalasa positiva, oxidasa negativa y reductores de nitratos a nitritos. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, las enterobacterias en patología humana pueden cuantificarse, debido a que, éstas constituyen, aproximadamente, 50,00% de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta 80,00% de todos los bacilos Gram negativos identificados (Narato y Kaper, 1998).

Dentro de los antibacterianos de elección para infecciones por *E. coli* en orina se encuentran las quinolonas, las cuales son administradas según el tipo de infección que presenta el paciente (complicadas o no complicadas). Éstas actúan inhibiendo dos enzimas del tipo topoisomerasas, implicadas en la replicación y transcripción del ADN, en concreto se trata de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV. Estas dos enzimas son tetrámeros formados por dos subunidades A y dos subunidades B, GyrA, GyrB para la ADN-girasa y ParC, ParE para la topoisomerasa IV. Estas dos enzimas presentan una gran homología entre ellas (Drlica, 2003).

La ADN-girasa cataliza un superenrollamiento negativo en la cadena de ADN, permitiendo una mejor separación de la doble hélice de ADN y, de esta forma, facilitar la formación de la horquilla de replicación. Por otro lado, la topoisomerasa IV es responsable de la separación de las dos cadenas hijas, permitiendo la segregación de los dos nuevos cromosomas bacterianos en dos nuevas células hijas. De modo general, se acepta que el mecanismo de acción de las quinolonas consiste en la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN, el cual bloquea la acción normal de la enzima, e inhibe la síntesis del ADN y provoca la muerte celular (Blondeau, 2004).

Las quinolonas se agrupan por generaciones, tomando en cuenta su época de aparición y su espectro antibacteriano (Azparren, 1997; Morejon y Salup, 2003). Actualmente existen cuatro generaciones de quinolonas usadas como agentes antimicrobianos, entre las que se encuentran: las de primera generación, representada principalmente por el ácido nalidíxico, aunque existen otras como: el ácido oxolónico, ácido pipemídico, ácido piromídico etc., dentro de las de segunda generación se encuentran: ciprofloxacina y norfloxacina como los más importantes, utilizados en el área de la salud, las cuales son activas frente a bacterias Gram negativas. Las de tercera generación están representadas por levofloxacina, esparfloxacina y tusofloxacina, con buena actividad frente a Gram negativos y micobacterias, y, por último, las de cuarta generación, donde se

encuentran la moxifloxacin, balofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, entre otras, con actividad ante bacterias anaerobias (Álvarez *et al.*, 2016).

La resistencia bacteriana es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antimicrobiano. La resistencia se produce naturalmente por selección natural a través de mutaciones producidas al azar, pero también puede inducirse mediante la aplicación de una presión selectiva a una población. Una vez que se genera la información genética, las bacterias pueden transmitir los genes adquiridos horizontalmente por intercambio de plásmidos; introducción de fagos, o por conversión lisogénica (Gérvás, 2000).

Normalmente, la resistencia adquirida en *E. coli* se origina por una acumulación de mutaciones en los genes que codifican las topoisomerasas, fundamentalmente *gyrA* y *parC*. Estas mutaciones se concentran en un sitio llamado región determinante de resistencia a las quinolonas (QRDR), que codifican aminoácidos próximos al sitio activo de ambas enzimas. Otros mecanismos de resistencias como la hiperexpresión de bombas de expulsión activa o las alteraciones de las porinas, causan bajo nivel de resistencia (Ruíz, 2003; Martínez *et al.*, 2008).

Los mecanismos cromosómicos de resistencia van apareciendo secuencialmente, y el uso de quinolonas es uno de los factores más importantes en la selección de aislados con resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (Navarro *et al.*, 2011).

Desde 1998 se empezaron a describir mecanismos de resistencia de origen plasmídico, como la protección de la diana por proteínas Qnr, la modificación de las quinolonas por la acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr, o las bombas de expulsión activa QepA y OqxAB. Aunque la resistencia a quinolonas mediada por genes plasmídicos presenta bajo nivel de expresión, se ha observado (tanto *in vitro* como *in vivo*) que facilitan la selección de mecanismos adicionales de

resistencia, que contribuirán a un mayor nivel de resistencia (Martínez *et al.*, 2008).

No existen marcadores fenotípicos que ayuden a reconocer los determinantes plasmídicos de resistencia, debido a que, éstos pueden estar presentes, tanto en aislados sensibles como resistentes, es por eso que su detección debe hacerse por métodos moleculares, los cuales no siempre son accesibles. Se ha observado que algunas enterobacterias presentan sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas siendo sensibles al ácido nalidíxico, situación que en muchos casos podría asociarse con la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas tales como: genes de resistencia a quinolonas determinantes de *qnr*, gen variante de la aminoglucósido acetiltransferasa (*AAC(6')-Ib-cr*) y genes codificadores de bombas de eflujo (*qepA* y *oqxAB*). Los resultados de sensibilidad al ácido nalidíxico y ciprofloxacina son suficientes para el estudio de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias (Navarro *et al.*, 2011).

Las quinolonas son un grupo de antibióticos que presentan gran biodisponibilidad, excelente penetración prostática y renal, alcanzan elevada concentración urinaria y tienen un significativo efecto postantibiótico. Por estas razones, las quinolonas han sido muy utilizadas para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario. Sin embargo, se ha observado un descenso de sensibilidad a las quinolonas frente a *E. coli* y se atribuye a su utilización masiva e incontrolada en la práctica clínica (Tena *et al.*, 2010). En Venezuela, existe muy poca información acerca de los fenotipos de resistencia desarrollados por las bacterias causantes de infecciones urinarias agudas no complicadas provenientes de la comunidad y, a pesar de que estos mecanismos de resistencia se dan con mayor frecuencia en cepas provenientes de infecciones asociadas a la atención en salud, en la actualidad se han encontrado en pacientes con infecciones agudas no complicadas provenientes de la

comunidad, es por ello, que el propósito de esta investigación fue evaluar la resistencia bacteriana a quinolonas en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes comunitarios con infecciones urinarias agudas no complicadas y de esta forma, facilitar el diagnóstico y posible tratamiento para los individuos.

METODOLOGÍA

Muestra poblacional

En el presente estudio se analizaron 392 muestras de orina, provenientes de pacientes de ambos sexos, que acudieron al Laboratorio Clínico Fertilab. Oriente, ubicado en la parroquia Valentín Valiente, Municipio Sucre, estado Sucre, en el período comprendido entre los meses de enero a junio del año 2014. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaron algún factor de riesgo como: tratamiento con algún antimicrobiano 15 días previos a la toma de muestra, así como los que habían estado hospitalizados en los últimos 3 meses, aquellos con infecciones recurrentes, diabéticos, embarazadas, pacientes con catéteres permanentes (renales, ureterales o uretrales), cateterismos intermitentes, alopatías obstructivas, cálculos, tumores, reflujo vesico-uretral, derivaciones urinarias, etc. (Anexo 1). La encuesta clínico epidemiológica se aplicó con el fin de obtener pacientes con infecciones urinarias agudas no complicadas provenientes de la comunidad.

Aspectos éticos

A cada paciente seleccionado en esta investigación, se le informó sobre los alcances y beneficios de la investigación, también se pidió su consentimiento por escrito para el uso de la muestra en estudio. El estudio se llevó a cabo considerando las normas de ética establecidas por la OMS para trabajos de investigación en seres humanos en la declaración de Helsinki, ratificada por la 52ª asamblea general, Edimburgo, Escocia en el año 2000 (Anexos 2,3,4) (De Abajo, 2001).

Recolección de la muestra de orina

Para la recolección de la muestra, se instruyó previamente a los pacientes sobre el aseo adecuado de la región genital y el método a través del cual

debieron recolectar la muestra (técnica del chorro medio). La muestra de elección fue preferiblemente la primera de la mañana, ésta fue debidamente transportada en envases estériles, con refrigeración, al laboratorio clínico Fertilab. Oriente de la ciudad de Cumaná y fueron procesadas antes de las 2 horas.

Análisis de orina

Examen macroscópico:

Las muestras de orina fueron debidamente mezcladas en su recipiente, para luego ser trasvasadas a un tubo de ensayo previamente limpio y desgrasado con la finalidad de observar características macroscópicas como: apariencia, olor y color, la cual permitió orientar en el reconocimiento de una ITU (Zitelli y Davis, 2009).

Examen microscópico:

Las muestras de orina fueron centrifugadas a 3 000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante para la obtención del sedimento urinario, el cual se observó entre lámina y laminilla al microscopio con objetivo de 40X y se identificó la presencia de bacterias y leucocitos (Zitelli y Davis, 2009).

Tinción de Gram

El sedimento urinario obtenido mediante centrifugación, fue mezclado en su recipiente, se tomó la muestra utilizando un asa bacteriológica estéril, posteriormente, se colocó en una lámina portaobjeto previamente limpia y desgrasada, se dejó secar a temperatura ambiente, luego, se fijó por calor y se procedió a realizar la coloración empleando la técnica de Gram. Esta técnica permitió observar la presencia de células bacterianas, su morfología y afinidad tintorial (Hucker y Conn, 1923).

Cultivo de orina

El diagnóstico de ITU se realizó mediante el método de urocultivo, por la técnica de agotamiento por estría, utilizando el asa calibrada, el cual comprende las siguientes etapas:

Siembra y aislamiento

La siembra se realizó mediante la técnica de agotamiento por estría empleando un asa calibrada previamente esterilizada de 10 µl, equivalentes a 0,01 ml de orina; las muestras de orina se sembraron en agar sangre y agar McConkey. Las placas sembradas se colocaron en incubadora a 37°C por 24 horas, en microaerofilia y aerobiosis, respectivamente (Koneman *et al.*, 2008).

Valoración de cultivo

Se valoró cada cultivo bacteriano en agar McConkey y los microorganismos sospechosos para *E. coli* fueron resembrados en agar nutritivo y, posteriormente, se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes. Se observaron las características macroscópicas (redondas, lisas, elevadas o convexas, lactosa positiva, con bordes regulares o irregulares), en los diferentes medios. A dichas colonias, se les realizó la coloración de Gram para la identificación morfológica y tintorial del microorganismo de interés diagnóstico (Schwarcz *et al.*, 1990; González, 2004).

Contaje de las colonias

El recuento de las colonias aisladas, se realizó a partir de las colonias aisladas en agar McConkey, utilizando un contador de colonias marca Suntex. Dicho recuento fue significativo al observarse la presencia de una cantidad igual o mayor a 10^5 UFC(Unidades Formadoras de Colonias)/ml de orina no centrifugada, además, se tomó en cuenta aquellas muestras de orina cuyos pacientes tenían sintomatología clínica para infección urinaria, con aproximadamente 85 000 UFC/ml de una especie bacteriana dominante, y

negativa, al no haberse observado crecimiento o en tal caso, la presencia de una o más de dos especies bacterianas en cantidades no mayores de 10^4 UFC/ml de orina no centrifugada. Cifras menores fueron consideradas como contaminación (Schwarcz *et al.*, 1990; González, 2004)

Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias.

Para realizar la identificación de las enterobacterias se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas según técnicas descritas por Mac Faddin (2003) y Koneman *et al.*, (2008):

Prueba de la oxidasa

Para realizar esta prueba se empleó un papel filtro con unas gotas del reactivo tetrametilparafenilendiamina, donde se colocó una colonia del microorganismo en estudio procedente del agar nutritivo. Se esperó un tiempo de 10 segundos y al aparecer un color morado (en el sitio donde fue colocada la colonia) indicó un resultado positivo para la prueba. Esta prueba permitió poner en evidencia si la bacteria posee o no la enzima citocromo oxidasa, por lo que puede usar oxígeno en la producción de energía con una cadena de transporte de electrones. La negatividad de la prueba se evidenció con la ausencia del color morado al entrar en contacto la colonia con el reactivo.

Determinación de la motilidad, producción de indol y descarboxilación de la ornitina

En tubos que contenían el medio semisólido motilidad, indol, ornitina (MIO), Se procedió a inocular por punción, la colonia sospechosa con una aguja bacteriológica estéril y, posteriormente, fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, en condiciones de aerobiosis. Esta prueba se utilizó para determinar la motilidad, producción de indol y la síntesis de la enzima ornitina descarboxilasa por parte de la bacteria. La motilidad se evidenció mediante la turbidez del medio a partir de la línea de punción. La producción de indol se observó, con la

formación de un complejo de color rojo en la superficie del medio, cuando el triptófano es degradado por la enzima triptofanasa, obteniéndose indol, el cual reacciona con el aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído, producto químico activo del reactivo de Kovac. La producción de la enzima ornitina descarboxilasa es capaz de reaccionar con la porción carboxilo (COOH) de la ornitina para formar aminas de reacción alcalina que elevan el pH y hacen virar el indicador púrpura de bromocresol a púrpura intenso, lo cual se consideró positivo.

Descarboxilación de la lisina

Se procedió a inocular por punción y estrías una colonia sospechosa en el medio de lisina hierro agar (LIA), luego se incubó a 37°C durante 24 horas. Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar la capacidad de la bacteria de sintetizar la enzima lisina descarboxilasa, la cual, es capaz de atacar aminoácidos hasta la formación de aminas que elevan el pH del medio, haciendo virar el indicador púrpura de bromocresol a púrpura intenso, pudiendo así considerar la prueba positiva.

Descarboxilación de la arginina

En tubos que contenían caldos con arginina, se procedió a inocular una colonia sospechosa del microorganismo aislado, posteriormente, se incubó a 37°C durante 24 horas, en condiciones de aerobiosis. Esta prueba se utilizó para determinar la capacidad que tienen los microorganismos de hidrolizar el aminoácido arginina en el medio, en presencia de la enzima arginina dihidrolasa.

Hidrólisis de la urea

La colonia sospechosa fue inoculada en tubos que contenían agua peptonada, a los que se les agregaron de 3 a 4 gotas del reactivo de urea. Los tubos fueron incubados a 37°C por un tiempo de 24 horas. Esta prueba se utilizó con la

finalidad de determinar la capacidad de la bacteria para sintetizar la enzima ureasa capaz de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco más dióxido de carbono, las cuales en solución acuosa reaccionan para formar carbonato de amonio, que provocará la alcalinización del medio y por lo tanto, el viraje de color del indicador rojo de fenol a fucsia, considerando la prueba positiva.

Utilización de citrato

En tubos con el medio solidificado en bisel, se procedió a realizar la siembra por estría de la colonia sospechosa en la superficie del medio, y luego se incubó a 37°C durante 24 horas. Esta prueba se utilizó para determinar si la bacteria es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y las sales de amonio como única fuente de nitrógeno, provocando así la alcalinidad del medio, y por lo tanto, viraje del indicador de pH (azul de bromotimol) de verde a azul, considerándose de esta forma la prueba positiva. También, se consideró la prueba positiva al observar el crecimiento de bacterias en la superficie del agar sin cambio de color en el medio

Utilización de malonato

Se inoculó una colonia en caldo malonato y se incubó a 37°C por 24 horas, para determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono y el sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, produciendo un aumento de la alcalinidad o formación de hidróxido de sodio (NaOH). La aparición de un color azul indicó una prueba positiva.

Utilización de hidratos de carbono

En tubos con medio de cultivo agar Kligler (KIA), se procedió a realizar la siembra con aguja bacteriológica por punción y estrías de la colonia sospechosa, se incubó a 37°C por 18 a 24 horas, en condiciones de aerobiosis. Este medio permitió diferenciar entre los bacilos Gram negativos, tomando en

cuenta la capacidad de fermentar o no la glucosa y lactosa, así como la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) y gas.

Vía de utilización de la glucosa

Se procedió a inocular el caldo de rojo de metilo con una colonia sospechosa de un cultivo puro del microorganismo aislado. Se incubó el caldo a 37°C durante 24 horas a 37°C, finalizada la incubación, se le agregaron 3 gotas del reactivo rojo de metilo directamente al caldo. El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indicó la producción de ácido, produciendo una disminución en el pH (prueba positiva). Esta prueba proporcionó características útiles para la identificación de especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de la glucosa.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Una vez identificada la bacteria, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana mediante la realización de un antibiograma, empleando el método de difusión del disco en el agar (Bauer *et al.*, 1966) y siguiendo las pautas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI) 2015 y el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel para infecciones urinarias comunitarias. Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa en estudio en 4,5 ml de solución salina fisiológica estéril y se incubó a 37°C hasta observar una turbidez ajustada al patrón 0,5 de la escala de McFarland, correspondientes a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Posteriormente, se impregnó un hisopo estéril en la suspensión y se diseminó uniformemente sobre la superficie del agar Muller Hinton. Luego, se procedió a colocar los discos del antimicrobiano de elección: ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), ofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se midieron los diámetros de los Halos de inhibición presentados por cada antimicrobiano y se interpretaron como sensibles, resistente o resistencia intermedia según fue el caso (CLSI, 2015). Algunos antimicrobianos utilizados

en el presente estudio no son exclusivamente para infecciones urinarias agudas no complicadas, sin embargo, fueron utilizados con el fin de monitorear cepas con fenotipos de resistencia a quinolonas.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a estadística descriptiva y se representaron en tablas y figuras (Sánchez y García, 2007).

RESULTADOS

En el presente estudio, de un total de 392 muestras de orina de pacientes que acudieron al "Laboratorio Fertilab Oriente" ubicado en la Clínica Santa Rosa, Cumaná, estado Sucre, 146 (37,20%) fueron identificadas como infecciones del tracto urinario agudas no complicadas provenientes de la comunidad (ITUA_{nc}PC), y 246 (62,75%) fueron negativos. De las 146 muestras de orina identificadas como (ITUA_{nc}PC), 109 (74,66%) presentaron cultivos positivos para enterobacterias y 37 (25,34%) fueron cultivos positivos para otras especies bacterianas (figura 1).

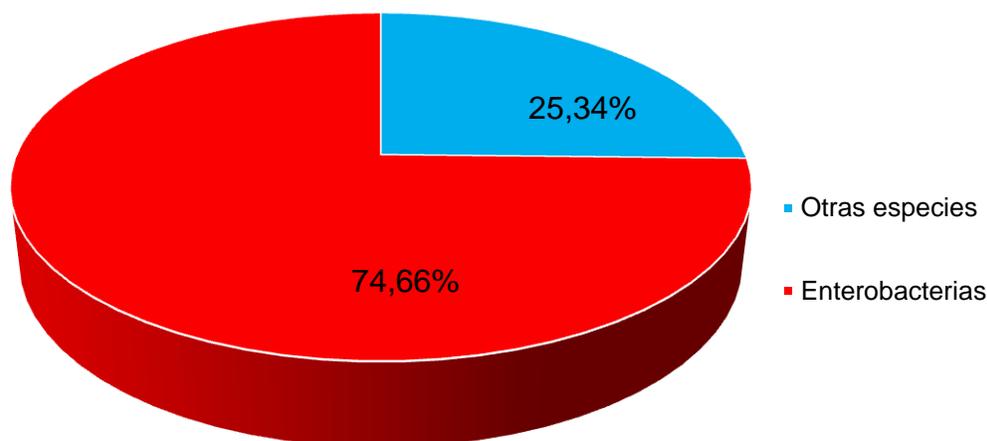


Figura 1. Distribución de frecuencia de los cultivos de orina provenientes de pacientes con infecciones del tracto urinario agudas no complicadas provenientes de la comunidad que acudieron al "Laboratorio Fertilab Oriente" ubicado en la Clínica Santa Rosa, Cumaná, estado Sucre, durante un periodo comprendido entre enero-junio de 2014.

En la presente investigación, se encontró que el género más propenso a infecciones urinarias agudas no complicadas fue el femenino, con un total de 103 casos, representando el 70,55%, mientras que, en el género masculino, se obtuvieron 43 (29,45%) casos. Por otra parte, los grupos etarios más frecuentes dentro del género femenino fueron los comprendidos de 25 a 36 años, y 37 a 48 años, con un 24,66% y 21,23%, respectivamente, en el caso del género

masculino los grupos etarios más comprometidos con ITU fueron de 46 a 60 años, y más de 61 años (tabla 1).

Tabla 1. Distribución de frecuencia según edad y género en pacientes con infecciones urinarias agudas no complicadas provenientes de la comunidad que acudieron al "Laboratorio Fertilab Oriente" ubicado en la Clínica Santa Rosa, Cumaná, estado Sucre, durante un periodo comprendido entre enero-junio de 2014.

EDAD (Años)	MASCULINO		FEMENINO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0-12	5	3,42	6	4,11	11	7,48
13-24	7	4,79	9	6,16	16	10,88
25-36	4	2,74	36	24,66	40	27,21
37-48	7	4,79	31	21,23	38	25,85
49-60	8	5,48	10	6,85	18	12,25
≥ 61	12	8,22	11	7,53	23	16,33
TOTAL	43	29,45	103	70,55	146	100

Nº: número; %: porcentaje

De los cultivos positivos para enterobacterias, se encontraron 93 cepas de *E. coli*, representando una frecuencia de 85,32%, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, con un 5,50% (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de aislamientos de las enterobacterias causantes de infecciones urinarias agudas no complicadas en pacientes que acudieron al "Laboratorio Fertilab Oriente" ubicado en la Clínica Santa Rosa, Cumaná, estado Sucre, durante un periodo comprendido entre enero- junio de 2014.

Nº: número; %: porcentaje

Bacterias	Nº de cepas	Frecuencia (%)
<i>Escherichia coli</i>	93	85,32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5,50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	4,59
<i>Proteus mirabilis</i>	4	3,66
<i>Providencia spp</i>	1	0,93
Total	109	100

La figura 2 señala la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de *E. coli*, mediante el método de difusión del disco en agar, ante los distintos antimicrobianos estudiados. En ella se observa que el mayor porcentaje de cepas resistente ante las quinolonas fue para ácido nalidíxico, con 47,31%, seguido de ofloxacina, con 46,24%.

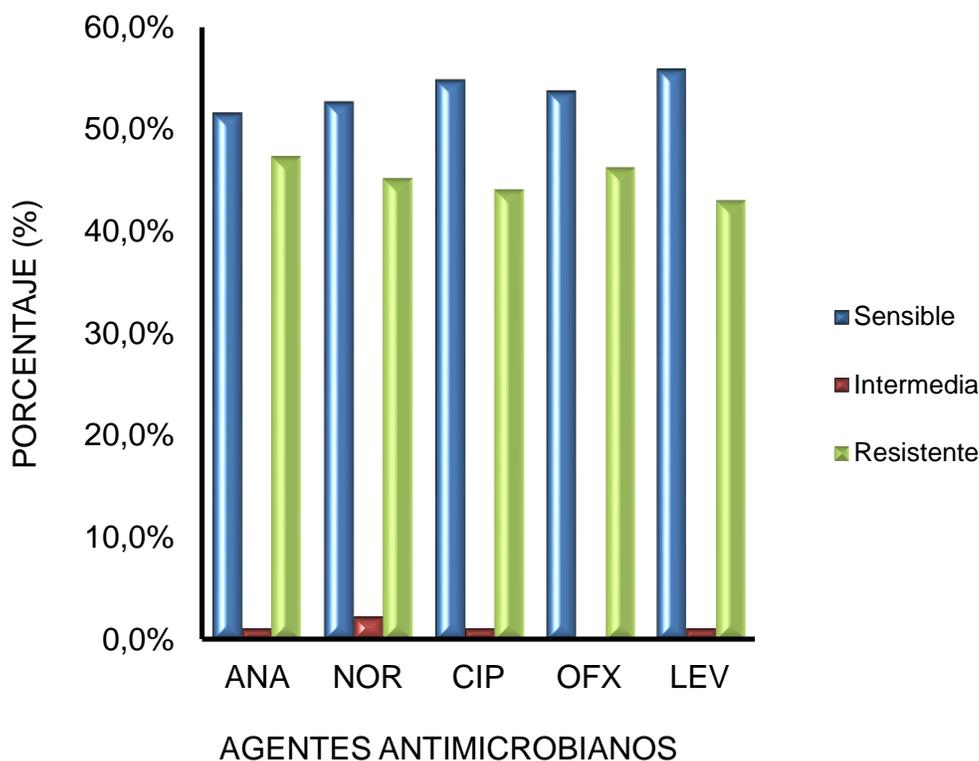


Figura 2. Distribución porcentual de la susceptibilidad antimicrobiana a las quinolonas por las cepas de *Escherichia coli* en pacientes comunitarios con infecciones urinarias agudas no complicadas, periodo enero-junio de 2014. ANA: ácido nalidíxico, NOR: norfloxacin, CIP: ciprofloxacina, OFX: ofloxacina, LEV: levofloxacina.

En la tabla 3, se observan los fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana encontrados en los aislados de *E. coli* ante quinolonas. Se establecieron seis (6) fenotipos diferentes, los cuales fueron asignados arbitrariamente con números romanos. Los fenotipos I (ANA^S, NOR^S, CIP^S, OFX^S, LEV^S) y II (ANA^R, NOR^R, CIP^R, OFX^R, LEV^R) fueron los más frecuentes, con 51,60% y 40,86%, respectivamente, seguido del fenotipo III (ANA^R, NOR^S, CIP^S, OFX^S, LEV^S), con

4,30% y, por último, los fenotipos IV (ANA^{RI}, NOR^S, CIP^S, OFX^S, LEV^S), V (ANA^R, NOR^{RI}, CIP^S, OFX^S, LEV^S), y VI (ANA^R, NOR^{RI}, CIP^{RI}, OFX^R, LEV^{RI}), con un 1,08% cada uno.

Tabla 3. Fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana a quinolonas de diferentes generaciones y espectros de acción encontrados en *Escherichia coli*, aisladas de pacientes con infecciones de tracto urinario agudas no complicadas provenientes de la comunidad atendidos en el Laboratorio Clínico Fertilab Oriente. Cumaná, estado Sucre, durante el periodo enero-junio 2014.

Fenotipo	Agentes antimicrobianos					N°CPS.	%
	ANA	NOR	CIP	OFX	LEV		
I	S	S	S	S	S	48	51,60
II	R	R	R	R	R	38	40,86
III	R	S	S	S	S	04	4,30
IV	RI	S	S	S	S	01	1,08
V	R	RI	S	S	S	01	1,08
VI	R	RI	RI	R	RI	01	1,08

ANA: ácido nalidíxico, NOR: norfloxacin, CIP: ciprofloxacina, OFX: ofloxacina, LEV: levofloxacina, N° CPS: número de cepas S: sensible, R: resistente, RI: resistencia intermedia.

DISCUSIÓN

La literatura señala que *E. coli* es la especie más frecuentemente aislada en ITU a cualquier edad, ya que, se ha hallado como responsable del 75,00 a 80,00% de los casos (Nicolle *et al.*, 2005). La frecuencia de infecciones urinarias tanto en hombres como en mujeres varía de acuerdo con la edad del individuo. En los primeros años de vida el riesgo es similar en ambos sexos. Entre los 15 y 35 años el riesgo es 40 veces mayor en las mujeres, mientras que, en el hombre aumenta a partir de los 60 años, principalmente por los trastornos obstructivos urinarios, según Sheffield y Cunnigham (2005). En la tercera edad el riesgo es semejante en ambos sexos, pero en el presente estudio, además de haber hallado mayor número de individuos masculinos con ITU por encima de los 49 años, en los grupos etarios de 25 a 36 y de 37 a 48, también se obtuvieron pacientes con dichas infecciones, este hecho podría estar relacionado a la actividad sexual durante ese lapso de edades. Al respecto, algunos estudios reportan que la edad promedio de los pacientes más afectados en las ITU es la de 65 años, mientras que otros señalan el rango de 35 a 40 (Páez *et al.*, 2011).

El sexo femenino es mucho más propenso a las infecciones urinarias, las bacterias encuentran un camino más breve para llegar al tracto urinario femenino que el masculino. La preponderancia de aislamientos de *E. coli* en urocultivos de pacientes del sexo femenino, sólo reafirma lo que continuamente se describe en la literatura médica acerca de la ocurrencia de las infecciones urinarias con mayor frecuencia en este sexo (Villarroel *et al.*, 2002).

Es importante señalar que, por lo general, las ITU no complicadas se presentan con mayor incidencia en mujeres menores de 50 años, debido a que este grupo representa a una población sexualmente activa (Foxman, 2003). Otro factor importante que justifica la mayor frecuencia de ITU en mujeres es la higiene,

relaciones sexuales, el uso de espermicidas entre otros, permiten el establecimiento de las infecciones, donde *E. coli* es el colonizador más frecuente (Calderón *et al.*, 2013).

En el presente estudio se logró aislar varios géneros de enterobacterias, entre las que se destaca *E. coli* como principal agente causal, con una frecuencia de 85,32%, seguido de *K. pneumoniae* con 5,50%. Estos resultados son similares a los encontrados por Roberts (1996), quien reportó una frecuencia para *E. coli* de 89,20%, seguido de *P. mirabilis* con 3,20% y *K. pneumoniae* 2,40%. Por su parte, Manrique (2009), en Bolívar, reportó frecuencias de aislamiento para *E. coli* (63,89%), *P. mirabilis* (6,94%) y *K. pneumoniae* (5,55%). Alós (2005), en un estudio realizado sobre la epidemiología y etiología de la infección comunitaria en el Hospital de Móstoles de España, señala una frecuencia de 80,00% para *E. coli*. Así mismo, Seija *et al.* (2010), en un estudio en pacientes mayores de 15 años, con ITU adquiridas en la comunidad, que consultaron en el Departamento de Emergencia del Hospital Pasteur de Uruguay, reportaron para *E. coli* una frecuencia de 80,00%.

La virulencia de un microorganismo condiciona en gran medida su potencial para establecer una infección. No todas las cepas de *E. coli* poseen la misma capacidad para infectar el aparato urinario. Solo las cepas con determinado grado de virulencia son capaces de producir una infección urinaria en pacientes con el aparato urinario intacto, mientras que, en pacientes con anomalías anatómicas o funcionales del mismo, las cepas sin determinantes de virulencia son capaces de causar una infección (Seija *et al.*, 2010).

Existe una gran diversidad de factores de patogenicidad que facilitan el crecimiento bacteriano y la persistencia en las vías urinarias, entre ellos se pueden mencionar, la expresión de adhesinas tipo 1 y el *pilus P* que permiten a *E. coli* uropatógena (ECUP) unirse e invadir las células y los tejidos de acogida

en el tracto urinario, otro factor importante es la expresión de factores quelantes del hierro (sideróforos) que permiten captar hierro. El despliegue de una gran variedad de toxinas, incluyendo hemolisina y el factor necrotizante citotóxico 1, son determinantes presentes en ECUP capaces de infligir daño tisular extenso, provocar difusión bacteriana y desactivar las células efectoras inmunes. Estas toxinas también tienen la capacidad de modular las vías de señalización de acogida que afectan a miles de procesos, incluyendo las respuestas inflamatorias, la supervivencia de la célula hospedera y la dinámica del citoesqueleto (Cercenado y Cantón, 2010; Totsika *et al.*, 2012).

Con respecto a la susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli*, ante las quinolonas, el mayor porcentaje de resistencia se evidenció contra ácido nalidíxico y ofloxacina con 47,31% y 46,24%, respectivamente. Al respecto, Junquera *et al.* (2005), en España, en aislados de *E. coli* procedentes de pacientes comunitarios, en los cuales el porcentaje de resistencia es de 39,00% para ácido nalidíxico, 35,40% para ciprofloxacina; así mismo, Sader y Jones (2000), en un estudio realizado en Brasil, obtuvieron 40,00% de resistencia para ciprofloxacina y levofloxacina, pero difieren de los resultados reportados por Seija *et al.* (2010), en Uruguay, para ácido nalidíxico de 22,90% y para ciprofloxacina de 15,00%. De igual manera, Gómez *et al.* (2009), en Colombia, reportaron una resistencia para ciprofloxacina de 31,40%.

A pesar de que en esta investigación sólo se consideraron pacientes con ITU de origen comunitario, se hallaron moderados porcentajes de cepas resistentes por parte de *E. coli* ante las distintas quinolonas evaluadas. Esto puede estar asociado a un aumento en las cepas con la capacidad de producir alteraciones en los sitios dianas de las quinolonas, presencia de bombas de expulsión activa y la transferencia de genes plasmídicos de resistencia, siendo el mecanismo mayormente descrito el primero (Sierra y Vila 2009)

En el caso de alteraciones de la diana, en microorganismos Gram negativos, la ADN-girasa parece ser la primera diana para todas las quinolonas. Las alteraciones en la diana se concentran en una región de la enzima, denominada región determinante de resistencia a quinolonas, del inglés: *quinolone resistance-determining region* (QRDR). Las Alteraciones en las regiones, tanto de las dos subunidades de la ADN-girasa como de las dos subunidades de topoisomerasa IV, van asociadas a un incremento en la concentración inhibitoria mínima de todas las quinolonas; de hecho, la resistencia a las quinolonas parece ser producto de varios escalones en cada uno de los cuales se produce una nueva mutación. De este modo, la cepa tras una primera mutación en una QRDR, generalmente de *gyrA*, aparecerá resistente al ácido nalidíxico, pero sensible a las fluoroquinolonas (incrementando ligeramente sus concentraciones mínimas inhibitorias), y posteriormente mutaciones en éste u otro QRDR como *parC* harán que la cepa pase a ser resistente a fluoroquinolonas, aunque no a todas por igual (Navarro *et al.*, 2011).

Las bombas de expulsión activa se encuentran en la membrana externa de las células y expulsan hacia el exterior de la célula gran cantidad de moléculas, entre ellas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antimicrobianos. Para ello, utilizan hidrólisis de ATP o un mecanismo contra-transporte iónico como sustrato energético. El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancia tóxicas dentro de la célula. Este mecanismo por sí solo confiere bajo nivel de resistencia antimicrobiano (Tafur *et al.*, 2008).

Los mecanismos de resistencia adquiridos incluyen, tanto mutaciones en genes diana para determinados antimicrobianos, como adquisiciones de determinantes de resistencia vehiculados en bacteriófagos, plásmidos, transposones y otros elementos genéticos móviles. Las mutaciones alteran el

ADN pre-existente, pero no añaden nuevos genes completos. La segunda opción, la transferencia genética horizontal, amplía el genoma de la bacteria receptora a partir de otra portadora inicial, esta transferencia horizontal, se puede llevar a cabo mediante tres mecanismos: transformación, conjugación y transducción del material genético (Fernández, 2010).

En cuanto a los fenotipos hallados en este estudio, se observa que el fenotipo I fue el más frecuentemente encontrado entre las cepas de *E. coli*, caracterizado por presentar sensibilidad ante todos los antimicrobianos ensayados, mientras que el fenotipo II se caracterizó por presentar resistencia a todos los antimicrobianos probados.

Como se dijo anteriormente, no existen marcadores fenotípicos que ayuden a reconocer los determinantes plasmídicos de resistencia, debido a que, éstos pueden estar presentes, tanto en aislados sensibles (fenotipo I), como en aislados resistentes, observados en el fenotipo II. Sin embargo, al analizar resultados, los diferentes mecanismos de resistencia descritos para quinolonas que podrían estar presentes en el fenotipo II, entre ellos se sugiere la presencia de alteraciones en las dianas de las quinolonas, donde mediante una mutación puntual, se codifica otro aminoácido y de esta forma se modifica la enzima blanco, con lo que se logra una alta resistencia a el ácido nalidíxico. Por otra parte, la resistencia hacia fluoroquinolonas, tales como ofloxacina, se relaciona con más de una mutación a nivel de *gyrA*, o con mutaciones en genes como *parC*, a parte de los descritos anteriormente (Mosquito *et al.*, 2012).

Los aislados de *E. coli* que presentaron resistencia o resistencia intermedia a ácido nalidíxico y sensibilidad a las fluoroquinolonas (fenotipo III y IV) muy probablemente sea producto de una mutación a nivel de *gyrA*, que es uno de los mecanismos de resistencia a quinolonas más frecuentemente encontrado, factor que debe tomarse en cuenta a la hora de elegir un tratamiento, aunque

en casos de ITU parece poco probable el fracaso terapéutico, debido a que estos antibióticos alcanzan altas concentraciones en la orina, pero muchos autores opinan que se debe reportar como resistente aquellos aislados que también lo sean al ácido nalidíxico o, por lo menos, reportar como intermedio sobre todo en aquellas infecciones donde el antimicrobiano no accedan fácilmente (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Los aislados de *E. coli* que presentan resistencia a ácido nalidíxico y resistencia intermedia o resistencia a las fluoroquinolonas (fenotipo V), muy probablemente presentan mutaciones en *gyrA* o en *gyrA* + *parC*, lo que implica resistencia a todas las fluoroquinolonas, independientemente de su sensibilidad *in vitro* a algunos de ellos (Calvo *et al.*, 2011).

Fenotipos con sensibilidad disminuida a ácido nalidíxico y al resto de las quinolonas (fenotipo VI) sugiere alta probabilidad de la captación de genes de resistencia mediante plásmidos, como sucede con los genes *qnr* que codifican a la familia de proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD) los cuales se unen al ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*), disminuyendo la acción de las quinolonas. Esto también pudiera deberse a una disminución de la concentración del antimicrobiano en el espacio intracelular de la bacteria, por una disminución de la permeabilidad de la membrana externa o por una hiperactividad de las bombas de expulsión (Calvo *et al.*, 2011).

Aunque clásicamente, el rol de las bombas de expulsión ha sido considerado como accesorio y, en general, de baja relevancia, no obstante, se ha comprobado que, para algunas quinolonas, las bombas de expulsión si cumplen un papel importante en el nivel basal de la resistencia a este antimicrobiano. Un ejemplo de este tipo de mecanismo, descrito en *E. coli*, es el gen *QepA*, que codifica una bomba de expulsión para fluoroquinolonas hidrofílicas, tales como norfloxacin, ciprofloxacina (Cordeiro *et al.*, 2004; Saenz *et al.*, 2004).

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública, por lo tanto, hay que mantener estudios constantes, debido al aumento progresivo que viene presentando *E. coli* a las quinolonas, es necesario buscar opciones terapéuticas diferentes, especialmente en pacientes con infecciones complicadas, además de hacer un uso más racional de estos antimicrobianos. Por otra parte, resulta necesario implementar un monitoreo constante de la susceptibilidad de los antimicrobianos de uso común en el tratamiento de las ITU, implementando métodos cuantitativos como la concentración mínima inhibitoria o cualitativos como la difusión en agar.

CONCLUSIONES

El 63,70% de las infecciones de (ITUA_{nc}PC) fueron ocasionadas por *E. coli*, representando el 85,32% de aislamiento entre las enterobacterias.

Los pacientes del sexo femenino en edad sexualmente activa fueron los más afectados con ITUA_{nc}PC.

Un porcentaje moderado de las cepas de *E. coli* productoras de ITUA_{nc}PC resultaron resistentes ante las quinolonas.

RECOMENDACIONES

Promover el uso adecuado de las quinolonas a la hora de indicarlos como tratamiento contra ITU.

Realizar estudios moleculares que permitan la confirmación de los posibles mecanismos de resistencia presentes en las cepas de *E. coli*.

BIBLIOGRAFÍA

Alibadi, H.; González, R. y Quie, P. 1989. Urinary tract disorders in patients with chronic granulomatous disease. *Revista Médica Herediana*, 321(85):706-738.

Alós, J. 2005. Patogenia de infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2(34):10-21.

Álvarez, D.; Garza, G.; Vázquez, R. 2016. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista Chilena Infectología*, 32 (5):499-504.

Azparren, A. 1997. Fluoroquinolonas. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 5(5):234-246.

Bauer, A.; Kirbi, W.; Sherris, J. y Turk, M. 1966. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por método estandarizado. *American Journal and Clinical Phathology*, 45(1):493-496.

Blondeau, J. 2004. Mechanism of action, classification and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, 49(2):6-10.

Calderón, U.; Doren, A.; Cruz, M.; Cerda, J. y Abarzúa, F. 2013. Pielonefritis aguda en el embarazo y susceptibilidad antimicrobiana de uropatógenos. Comparación de dos décadas. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 74(2): 88-93.

Calvo, J.; Cantón, R.; Fernández, F.; Mireles, B. y Navarro, F. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 6(52):25-55.

Cercenado, E.; Cantón, R. 2010. Diagnostico microbiológico de las infecciones urinarias. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 14(1):11-40.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentythird Informational Supplement. *Document M100-S23*. Wayne, Pensylvania, 33(1):50-53.

Cordeiro, N.; Robino, L.; Medina, J.; Seija, V.; Bado, I. y García, V. 2004. Ciprofloxacin- resistant enterobacter harboring The aac (6')-ib-cr variant isolated

from feces of in patients in intensive care unit in Uruguay. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52(1):7-78.

De Abajo, F. 2001. La declaración de Helsinki VI. *Revista Española Salud Pública*, 75:407-420.

Drake, R.; Vogl, W. y Mitchell, A. 2007. Gray: Anatomía para estudiantes. Sexta edición. Elsevier. España.

Derlica, K. 2003. Mechanism of flouoroquinolone action. [Current Opinion in Microbiology](#), 8:504-508.

Feng, P.; Weagant, S. y Grant, M. 2002. Enumeración de *Escherichia coli* y las bacterias coliformes. *Manual Analítico Bacteriológico*, 2(35):85-94.

Fernández, M. 2010. *Entorno Genético de β -lactamasas de Espectro Extendido en Enterobacterias*. Universidad de Salamanca.

Fox, S. 2008. *Fisiología Humana*. Décima edición. Editorial McGrawHill. Madrid, España.

Foxman, B. 2003. Epidemiology of urinary Tract infections: incidence, morbidity and economic costs. *Disease Month*, 49: 53-64

Gérvas, J. 2000. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Atención Primaria*, 25(8):589-96.

González, J. 2004. *Técnicas y métodos de laboratorio clínico*. Segunda Edición. Masson S, A. España.

Hucker, G. y Conn, H. 1923. Methods of Gram staining. Tech. Bull. N.Y.ST. *Agriculture Express*, 93(5):1-7.

Junquera, S.; Loza, E. y Baquero, F. 2005. Evolución del patrón de sensibilidad de aislados de *Escherichia coli* en urocultivos procedentes del medio hospitalario y extrahospitalario. *Revista Médica Herediana*, 23(1):60-85

Koneman, E.; Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Procop, G.; Schreckerenberger, P. y Woods, G. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Uruguay.

Mac Faddin, J. 2003. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.

- Manrique, E. 2009. Caracterización de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Complejo hospitalario "Ruíz y Páez". Universidad de oriente. Venezuela.
- Martínez, C.; Cambronero, J. y Senovilla, J. 1997. Fisiopatología de la infección urinaria. *Clínicas Urológicas de la Complutense*, 5(51):64-65.
- Martínez, L.; Cano, M.; Rodríguez, J.; Calvo, J. y Pascual, A. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Review Anti Infective Therapy*, 6(9):685-711.
- Montiel, R.; Marcano, N.; Mack, S. y Canónico, F. 2011. *Epidemiología de las infecciones urinarias*. Cuarta edición. Editorial Ateproca. Venezuela.
- Morejón, M.; Salup, R. 2003. Actualización en quinolonas. *Revista electrónica de biomedicina*, 1(3):170-178.
- Mosquito, S.; Pons, M.; Ochoa, T.; Vargas, M.; Molina, M.; Luque, A. y Lanata, L. 2012. Niveles de resistencia a antimicrobianos, en especial a quinolonas, en cepas de *Escherichia coli* en niños de la zona periurbana de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(1):82-86.
- Narato, J. y Kaper, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(11):142-201.
- Navarro, F.; Miró, E. y Mirelis, B. 2011. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9):638-645.
- Nicolle, E.; Bradley, S. y Colgan, R. 2005. For the Infectious Diseases Society of America, American Society of Nephrology, American Geriatrics Society. Infectious Diseases Society of America Guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clinical Infectious Diseases*, 1(40):643-654.
- Páez, J.; Guaiquirian, L. y Nicolo, D. 2011. Primer Consenso Venezolano de Infección Urinaria. Caracas: Editorial Ateproca.
- Requena, I.; De Pace, C.; Torres, P. y Padrón, A. 2007. Resistencia antibiótica de bacterias causantes de infección del tracto urinario. *Saber*, 1(19):1-3.
- Roberts, J. (1996). Factors predisposing to urinary tract infections on children. *International Pediatric Nephrology Association*, 10(1):517-522.
- Rondón, M.; Orence, O. y Rondón, A. 2007. Infección del tracto urinario. Publicaciones Vicerrectorado Académico CODEPRE, Universidad de los Andes, 21(2):55-65.

Ruíz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Antimicrobial Chemotherapy*, 9(51):11-17.

Sader, H. y Jones, R. 2000. Resistencia a los antimicrobianos de los agentes patógenos causante de infecciones nosocomiales y comunitarias en América Latina. *Resistencia Antimicrobiana en las Américas Magnitud del Problema y su Contención*, 1(23):54-73

Sáenz, Y.; Ruíz, J.; Zarazaga, M.; Teixido, M.; Torres, M. y Vila, J. 2004. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1):54-64.

Sánchez, J. y García, C. 2007. *Estadística para biología y ciencias de la salud*. Tercera edición. Mcgraw-Hill. España.

Seija, V.; Frantchez, V.; Pintos, M.; Bataglino, N.; Torales, M.; Díaz, A. y Dufrechou, C. 2010. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. *Revista Médica Uruguaya*, 26(1):14-24.

Schwarcz, R.; Belitzky, R.; Fescina, R. y Díaz, A. 1990. Bacteriuria asintomática en el embarazo. *Revista Medica del Uruguay*, 6(1):88-89.

Sheffield, J. y Cunnigham, F. 2005. Urinary tract infection in women. *Obstetric Gynecology*, 106:1085-1092.

Sierra J. y Vila J. 2009. Mecanismos de acción y resistencia a antimicrobianos en bacterias Gram positivas. *Clinica Hospitalaria*, 8(2):33-45.

Strahilevitz, J.; Jacoby, G.; Hooper, D. y Robicsek, A. 2009. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. *Clinical Microbiology Review*, 22:89-120.

Tafur, J.; Torres, J. y Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Centro Internacional de Investigaciones Médicas*, 12(3):217-226.

Tena D.; González, A.; González J.; Heredero E.; Ilescas S.; Sáinz C.; De Baranda, G. 2010. Evolución del patrón de sensibilidad de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario diagnosticadas en la comunidad durante el periodo 2003-2007. Estudio multicéntrico en Castilla la Mancha. *Revista Española de quimioterapia*, 23(1):36-42.

Totsika, M.; Moriel, D.; Idris, A.; Rogers, B.; Wurpel, D.; Phan, M.; Paterson, D. y Schembri, M. 2012. Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. *Current Drug Targets*, 13(11):1386-1399.

Villarroel, E.; Navarro, P.; Ramos, R.; Andrade, E.; Bolivar, A. y Marcano, J. 2002. *Escherichia coli* identificadas en pacientes con infecciones urinarias: sensibilidad antimicrobiana. *Revista Sociedad Venezolana Microbiología*, 22(1): 18-21.

Zitelli, B. y Davis, H. 2009. *Atlas de Diagnóstico Mediante Exploración Física en Pediatría*. Quinta edición. Elsevier España S, L. Barcelona.

ANEXO 1

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

Encuesta clínico epidemiológica

DATOS PERSONALES:

Apellidos y Nombres: _____

Fecha y lugar de nacimiento:

Edad: _____ Sexo: _____

Dirección:

Teléfono: _____

Signos y síntomas:

Poliuria_____

Vómitos_____

Tenesmo vesical_____

Hematuria macroscópica_____

Disuria_____

Polaquiuria_____

Prurito_____

Fiebre_____

Secreción uretral_____

Escalofríos_____

Dispaurenia_____

Nauseas_____

Dolor Abdominal_____

Dolor lumbar_____

FACTORES PREDISPONENTES

Cistocele _____
Incontinencia Urinaria _____
Diabetes Mellitus _____
Insuficiencia Renal _____
Neoplasia _____
VIH/SIDA _____
Prostatitis _____
Embarazo _____ Semanas _____
Sonda urinaria _____
Otros _____
Infección urinaria previa _____
¿Fue tratada? _____ ¿Cómo? _____

Calculo renal _____
Hipertrofia prostática _____
Vejiga Neurogénica _____
Estenosis Uretral _____
LES. Y otras enfer. del colágeno _____
Hipertrofia Prostática _____
Menopausia _____
Uso de espermaticidas _____
Uso de diafragma _____

HOSPITALIZACIÓN

Duración de la hospitalización: Desde _____ Hasta _____
Motivo de la Hospitalización _____
Antibiótico admin. en los últimos 15 días _____ ¿Cuál? _____

RESULTADO DEL UROCULTIVO

Fecha de realización _____ N° _____
Microorganismo aislado _____
Contaje _____

ANEXO 2

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

CONSENTIMIENTO VÁLIDO

Bajo la coordinación del Lcdo. José Betancourt, profesor de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, se realizará el proyecto de investigación intitulado: **RESISTENCIA BACTERIANA *IN VITRO* A QUINOLONAS EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE PACIENTES COMUNITARIOS CON INFECCIONES URINARIAS, CUMANÁ, ESTADO SUCRE.**

Yo: _____

C.I.: _____ Nacionalidad: V () E (). Estado Civil: S () C () D () V ()

Domiciliado en: _____

Siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio indicado, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado(a) de manera clara y sencilla por parte del grupo de Investigadores de este Proyecto, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: **RESISTENCIA BACTERIANA *IN VITRO* A QUINOLONAS EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE PACIENTES COMUNITARIOS CON INFECCIONES URINARIAS, CUMANÁ, ESTADO SUCRE.**
2. Tener conocimiento claro de que el objetivo del trabajo antes señalado.

3. La duración del estudio será de aproximadamente 6 (seis) meses.
4. Conocer bien el Protocolo Experimental expuesto por el investigador, en el cual, se establece que mi participación y la de 99 pacientes más consiste en:

Donar de manera voluntaria una muestra de orina, la cual será obtenida mediante la técnica del chorro del medio, previa asepsia y antisepsia.

1. Que la muestra de orina que acepto donar será utilizada única y exclusivamente para determinar los parámetros antes mencionados.
2. Que el equipo de personas que realiza esta investigación me han garantizado confidencialidad, relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tengan acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
3. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.
4. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud.
5. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido Proyecto de Investigación.
6. Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo de investigación.

ANEXO 3

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas mis interrogantes con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto a mi participación en este estudio es totalmente voluntaria, acuerdo:

1. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en la muestra de orina que acepto donar para los fines indicados anteriormente.
2. Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del voluntario: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I.: _____

Lugar: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

Firma del testigo: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I.: _____

Lugar: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

ANEXO 4

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Por el Proyecto **“RESISTENCIA BACTERIANA *IN VITRO* A QUINOLONAS EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE PACIENTES DE LA COMUNIDAD CON INFECCIONES URINARIAS, CUMANÁ, ESTADO SUCRE”**

Nombre y Apellido: _____

Lugar: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	RESISTENCIA BACTERIANA <i>IN VITRO</i> A QUINOLONAS EN CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> AISLADAS DE PACIENTES DE LA COMUNIDAD CON INFECCIONES URINARIAS, CUMANÁ, ESTADO SUCRE
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Riguel José Merciett Rodriguez	CVLAC	18.210.529
	e-mail	riguel08@gmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Resistencia, <i>Escherichia coli</i>, Quinolonas, Pacientes comunitarios.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se analizó la resistencia a quinolonas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones urinarias agudas no complicadas, atendidos en el Laboratorio de la Unidad de Fertilidad de la Clínica Santa Rosa, en el periodo comprendido entre enero- junio de 2014. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales, la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se determinó utilizando quinolonas (ácido nalidíxico, levofloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina) mediante el método de difusión en agar. Se analizaron 109 pacientes con infecciones urinarias causadas por enterobacterias, en los cuales, se aislaron 93 cepas de *Escherichia coli*, con una frecuencia de 85,32%, seguida de *Klebsiella pneumoniae*, con 5,50%. Con respecto a los porcentajes de resistencia a las quinolonas ensayadas, los mayores fueron para ácido nalidíxico (47,31%) y ofloxacina (46,24%). Por otro lado, al observar los resultados de los antibiogramas, se identificaron 6 fenotipos diferentes, siendo el fenotipo I (ANA^S, NOR^S, CIP^S, OFX^S, LEV^S) el más frecuente, con 51,60%, seguido del fenotipo II (ANA^R, NOR^R, CIP^R, OFX^R, LEV^R) con 40,86%. Estos resultados ponen en evidencia que más del 40,00% de *Escherichia coli* presentan resistencia *in vitro* a las quinolonas estudiadas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Betancourt José Gregorio	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.649.514
	e-mail	jbetanvi@gmail.com
	e-mail	
Salazar Elsa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Guzmán Militza	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2017	08	02
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: **SPA**

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-merciett.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado(a) en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado(a)

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNPELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Riguel Merciett
Autor



Prof. José Betancourt
Asesor