

Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) en urocultivos y coprocultivos de pacientes Hospital Eduardo Eguía

Fátima Huanca

F. Huanca

Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Facultad de Ciencias Químico Farmacéuticas y Bioquímicas, Calle Dalence Nº 51 Sucre, Bolivia.
<http://usfx.info/farmacia/>

M. Ramos.J.Serrudo.(eds.) Ciencias de la Salud, Handbooks -©ECORFAN-Bolivia, Sucre, 2014.

Abstract

Beta-lactamases are enzymes produced by bacteria that inactivate beta-lactams by hydrolyzing the beta-lactam ring thereof. The present study aimed to explore the prevalence of Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases in urine and stool cultures of patients Eduardo Eguía Hospital 2007-2008. For that 187 cultures from urine and stool cultures of patients attending the hospital Eduardo Eguía were analyzed. The results showed a prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in urine cultures of Eduardo Eguía Hospital found is 33.3%; but in case of prevalence coprocultures ESBL-producing Enterobacteriaceae is far greater than that proposed in the hypothesis as it reached 73%.

20 Introducción

Las betalactamasas son enzimas producidas por bacterias que inactivan los betalactámicos al hidrolizar el anillo betalactámico de los mismos. La mayoría de betalactamasas inactivan a penicilinas o cefalosporinas pero algunas son capaces de inactivar a ambos tipos de antibióticos.

La mayoría de bacterias Grampositivas secretan sus betalactamasas de forma que los agentes antimicrobianos betalactámicos son inactivados extracelularmente, en el medio que las rodea.

En contraste, las Betalactamasas de las bacterias gramnegativas permanecen dentro de la célula e inactivan los betalactámicos en el espacio periplásmico, esto es, en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplásmica.

Razón que motiva a plantear el siguiente problema:

¿Cuál será la prevalencia de Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro ampliado en urocultivos y coprocultivos de pacientes del Hospital Eduardo Eguía el año 2007-2008?

Persiguiendo los siguientes objetivos:

- Determinar la prevalencia de Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) en urocultivos y coprocultivos de pacientes del Hospital Eduardo Eguía en los años 2007-2008.
- Determinar las especies de bacterias gramnegativas productoras de BLEA
- Determinar las Enterobacterias productoras de BLEA según el sexo de pacientes.
- Determinar la prevalencia de la especie de Enterobacterias productora de BLEA de mayor frecuencia.
- Comparar la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en ambas gestiones.

En respuesta al problema planteado surge la siguiente hipótesis:

La prevalencia de Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro ampliado en urocultivos y coprocultivos de pacientes del Hospital Eduardo Eguía de la ciudad de Tupiza alcanza a un 30%.

La investigación es de tipo retrospectivo, cuantitativo, descriptivo.

20.1 Marco contextual

Ciudad de Tupiza

Tupiza, capital de la provincia Sud Chichas del departamento de Potosí, está ubicada al sur de la República de Bolivia.

La ciudad de Tupiza se encuentra a la rivera del río del mismo nombre, rodeados por los cerros colorados de la cordillera de Chichas, con una temperatura anual promedio de 18 °C. Siendo valle de la región andina.

Respecto al origen del nombre de Tupiza, no tiene etimología alguna. Fue un vocablo de la cultura Chichas utilizado para identificar a la región; su primitiva pronunciación habría sido "Topecsa" o algo similar, la misma que con la llegada de los españoles sufrió alteraciones y se la transcribió al papel con la fonética de "Tupiza".

Tupiza "la joya bella de Bolivia", fue declarada a rango de ciudad por disposición de ley de la república del 25 de noviembre de 1895, en el gobierno de Mariano Baptista, como justo reconocimiento a una población creciente y pujante en el sud de la patria, en el Acre, Pacifico y el Chaco y sobretodo como centinela de la soberanía y dignidad de la Patria.

Tupiza limita al norte con la provincia de Nor Chichas, al sud con la provincia Modesto Omiste, al este con el Departamento de Chuquisaca, al oeste con la Provincia Sur Lípez.

Su importancia se debe a la cantidad de yacimientos mineros de plomo, oro, plata, zinc, cobre, estaño, antimonio y otros como las minas de Chillcobija que fueron las más grandes del mundo y que forma parte de la historia de Bolivia.

Hospital Eduardo Eguia

Institución

A principios de 1904, salieron de Roma 19 misioneras de la institución de Santa Ana, con destino a los colegios y hospitales de Bolivia. Religiosas que debían fundar la casa de Tupiza; y eran ellas Sor Ana Celia Vitale y Sor Ana Cayetana Brughini, superiores, y otras.

El 20 de agosto de 1904, llegaron a la pintoresca ciudad de Tupiza. Al poco tiempo de la llegada de las hermanas, las autoridades de Tupiza pensaron en la apertura de un hospital para el pueblo. Hechas las gestiones necesarias ante la madre provinciala Sor Ana Higinia Bellini, pronto arribaron a un acuerdo y el 8 de septiembre de 1904, se fundó el nuevo establecimiento llamado San Juan de Dios.

El nuevo establecimiento ocupaba una pequeña casa inadecuada y completamente desmantelada, que tenía solo cuatro habitaciones, donde se instalaron los ocho primeros enfermos de ambos sexos y los tres empleados.

No podía permitirse por más tiempo que hermanas y enfermos siguiesen teniendo sus camas en el suelo, expuestos a todo género de peligros. Mando, pues, arreglar unos veinte catres, unos de madera, otros de hierro y los más de ambos materiales, de los que cinco se destinaron para las religiosas.

Poco tiempo después se fundó la junta humanitaria de caballeros cuyo primer trabajo fue mandar a construir una amplia muralla para cerrar el establecimiento por la parte de atrás.

El trabajo del nuevo edificio duro dos años y el 6 de agosto de 1908 se hizo el estreno de una manera solemne y suntuosa.

En la guerra del Chaco y postguerra se organizó en estas instalaciones el hospital militar, donde se reconocieron mediante exámenes médicos a los contingentes Chicheños que ingresaban al Chaco a defender su Patria; a su vez se atendieron a los enfermos y heridos evacuados. Después de la guerra por decreto supremo, todos los hospitales pasaron a depender del Ministerio de Higiene y Salubridad.

La patria se hallaba en peligro y había que colaborar en la medida de sus fuerzas. A raíz de ello el ejercito en campaña hizo una donación al hospital, que el rápidamente sirvió para instalar dos nuevos pabellones gemelos. Entre sus más notables Directores del Hospital San Juan de Dios destaca el Dr. Eduardo Eguia.

En homenaje a su notable desempeño profesional y humano del Dr. Eduardo Eguia en el hospital San Juan de Dios y como justo reconocimiento a su entrega y dedicación. La Junta Humanitaria del Hospital solicito a la junta Municipal, para que tramite el cambio de nombre del Nosocomio al Ministerio de Salubridad e Higiene, posiblemente en la década de 1940 a 1950. A partir de esa época el hospital lleva el nombre del connotado ciudadano tupiceño.

Después de un largo proceso de funcionamiento como hospital de servicio social dependiente en primera instancia de las Hijas de Santa Ana, con el apoyo de personas y la Municipalidad. Después de la guerra del Chaco paso a depender directamente del Ministerio de Salubridad e Higiene; por lo tanto se consolido como institución publica dependiente del gobierno.

El hospital Eduardo Eguia es parte integrante del sistema nacional de salud, su misión es “proporcionar a la población una asistencia medico sanitaria completa, tanto curativa, como preventiva de promoción y rehabilitación, cuyos servicios externos irradian al ámbito familiar. El hospital es también un centro de formación de recursos humanos de diferentes niveles académicos y de investigación biosocial”.

Estructura y organización

El Servicio de Salud en el Hospital Eduardo Eguía está organizado de la siguiente manera:

- Director del Hospital.
- Administración.
- Médicos Especialistas.
- Médicos Generales.
- Jefe de Enfermeras.
- Personal de Enfermería (Lic. y Aux.).
- Bioquímico.
- Farmacéuticas.
- Odontólogo.
- Internos de: Medicina, Bioquímica, Odontología, Enfermería, Farmacia.
- Personal de Limpieza y de apoyo.

El laboratorio cuenta con todos los servicios como hematología, química sanguínea, serología, inmunología, parasitología y bacteriología.

El hospital Eduardo Eguia recibe el apoyo de diferentes organizaciones internacionales y nacionales, especialmente en la dotación de equipamiento.

20.2 Marco teórico

Aparato urinario

El aparato urinario está formado por los Riñones, el uréter, vejiga y uretra. A menudo las infecciones urinarias se clasifican en superiores e inferiores, en mayor medida de acuerdo con la situación anatómica de la infección: el aparato urinario inferior abarca la vejiga y la uretra y el superior abarca los uréteres y los riñones.

La anatomía de la uretra femenina es de importancia particular para la patogenia de las infecciones urinarias, ya que esta es relativamente corta comparada con la masculina, y también se encuentra más próxima a la región perirrectal en la que abundan los microorganismos. Debido a la menor longitud de la uretra, en el huésped femenino las bacterias pueden alcanzar la vejiga con mayor facilidad. (2)

Flora saprofita

Son pocos los microorganismos que pueden considerarse como patógenos estrictos y muchos los microorganismos que forman la flora saprofita que pueden, si se les presenta la oportunidad, por disminución de las defensas del huésped debida a diferentes causas, dar lugar a una infección.

En el aparato genitourinario los órganos generalmente estériles son los riñones, próstata y vejiga. La flora comensal se encuentra en:

Genitales externos

Los genitales externos suelen tener el mismo tipo de flora saprofita que la piel: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, enterococos, corinebacterias, micobacterias, levaduras. También puede encontrarse diferentes especies de enterobacterias y microorganismos anaerobios como *Peptococcus* spp, *Bacteroides* spp, y *Fusobacterium*.

Uretra

En uretra anterior se encuentran en ambos sexos: *Staphylococcus coagulans* negativo, *Staphylococcus aureus*, enterococos, corinebacterias, levaduras, micoplasmas y *Ureaplasma urealyticum*, algunas micobacterias y diversas enterobacterias. En la mujer es normal la presencia de microorganismos vaginolabiales en la parte anterior de la uretra.

Vagina

En vagina la flora varía con la edad y con la fase del ciclo menstrual. El pH de la vagina humana es habitualmente ácido, mantenido por la presencia de lactobacilos que ejercen un control sobre la posible flora contaminante.

La flora normal de la vagina está formada predominantemente por microorganismos anaerobios: *Peptostreptococcus* spp, *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp y flora aerobia semejante a la que se encuentra en genitales externos, además de estreptococos del grupo 13, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Moraxella* spp. y *Acinetobacter* spp.(2)

Flora patógena

Escherichia coli es por lejos la causa más frecuente de infección urinaria complicadas adquiridas en la comunidad. En las infecciones urinarias más complicadas, en particular en las infecciones recurrentes, aumenta la frecuencia relativa de infecciones causadas por *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y especies de *Enterobacter*. (2)

Urocultivo

Es el cultivo de microorganismos a partir de muestras de orina, mediante técnicas que permitan la cuali-cuantificación de las bacterias, determinando así mismo si existe o no una patología en vías urinarias. (4)

La muestra debe ser obtenida previo aseo de los genitales y utilizando la técnica de chorro medio desechando el primer chorro y el último, debe llevarse a laboratorio en frasco estéril y a la brevedad posible.

Para la siembra se homogeniza la muestra mediante movimientos de rotación del frasco sobre el mesón, se toma la muestra con un asa de platino calibrada y se siembra sobre el medio de cultivo en toda su extensión y se incuba por un periodo de 24 horas a una temperatura de 37°C, si en este lapso no hay desarrollo se incuba por 24 horas más. (4)

Aparato gastrointestinal

La conexión del organismo humano con el ambiente externo se produce a través de nuestro aparato gastrointestinal.

El aparato gastrointestinal está constituido por la boca, orofaringe, esófago, estomago, intestino delgado, intestino grueso, recto y canal anal. (2)

Flora saprofita

El aparato gastrointestinal contiene una flora normal abundante y diversa. Por lo general el intestino delgado superior contiene solo una flora escasa (bacterias sobre todo streptococcus, lactobacilos, y levaduras), pero en el íleon distal aumentan con predominio de la familia enterobacteriaceae y especies de Bacteroides.

La flora normal del intestino grueso del adulto se establece relativamente temprano en la vida y está formada sobre todo por especies anaerobias como Bacteroides, Clostridium, Peptostreptococcus, Bifidobacterium y Eubacterium. (2)

Flora patógena

Entre las bacterias que pueden ocasionar una infección gastrointestinal en el ser humano podemos mencionar a Shigella, Escherichia coli, Vibrión cholerae, Clostridium difficile los cuales pueden resistir la exposición a los ácidos gástricos y se requiere un inóculo mucho más pequeño que el de los microorganismos sensibles a los ácidos gástricos. (2)

Coprocultivo

Es la siembra de materia fecal en medios de cultivo selectivos. Se realiza para aislar agentes patógenos bacterianos causantes de infecciones gastrointestinales como Salmonella, Shigella, Vibrión cholerae, Campilobacter, etc.

Para realizarlo se recomienda obtener la muestra por hisopado rectal y siembra inmediata en los medios de cultivo.

Si se trata de heces deben llegar al laboratorio en envase de plástico o vidrio y ser sembradas antes de las 2 horas de haber sido emitidas.

Para la siembra se coloca con un asa una porción de la muestra sobre el medio de cultivo y se siembra por agotamiento y por cuadrantes en medios específicos como Mac Conkey y SS. (4)

Enterobacterias

Las enterobacterias son bacilos gran negativos que constituyen una gran familia que se componen por organismos de vida libre, patógenos y otras que constituyen parte de la flora normal del ser humano y resto de mamíferos.

Son un grupo de bacterias que se caracterizan por ser no exigentes nutricionalmente, son aerobios o facultativos, algunos géneros son móviles, otros inmóviles, no tienen capacidad de producir esporas, y otros son capsulados son activos metabólicamente por lo que se pueden agrupar en dos líneas a saber:

- Lactosa (+): Aquellas capaces de fermentar este carbohidrato tenemos a Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter aerógenes.
- Lactosa (-): Aquellas sin capacidad para fermentar este carbohidrato, aquí encontramos: Salmonella, Shigella, Proteus, Vibrión. (6)

Escherichia Coli

Es una bacteria Gram (-) pleomorfica, puede ser móvil o inmóvil, no forma esporas y puede o no poseer capsula, desarrolla a un pH de 7.2 a 7.5 y a una temperatura de 30°- 37°C.

Son anaerobias facultativas y se dividen por fisión binaria. Resisten en el medio ambiente por varias semanas y meses.

Su patogenia está dada por endotoxinas y presencia en tejidos. Entre las patologías que puede producir tenemos infecciones urinarias, gastroenteritis, meningitis, septicemias y otras. (7)

Cultivo

Desarrolla en casi todos los medios de cultivo, sin embargo en medio CLED tendremos colonias de bordes redondeados, superficie convexa, aspecto húmedo y brillante, consistencia cremosa y coloración amarillo verdusca. En medio Mac Conkey varía la coloración que va de rosado intenso a rojo. (7)

Pruebas Bioquímicas

- TSI: positivo con viraje de color de rojo hacia amarillo debido a la fermentación de glucosa y lactosa que producen
- KIA: positivo.
- LIA: Negativo por no producir descarboxilación pero si metilación el medio se mantiene color vino
- SIM: Positivo con producción de indol a partir de triptófano y motilidad positiva
- Citrato: negativo por no utilizarlo como fuente de carbono sin cambio de color manteniéndose verde.
- Urea: Negativo sin cambio de color por no producir la enzima ureasa. (4)

Proteus

Son bacilos muy pleomórficos Gram (-) que se sitúan en parejas o cadenas. Son móviles, no forman esporas, no son capsulados, desarrollan a pH de 6,9 a 7.2 y a 37°C, son anaerobios facultativos. Resisten 1 hora a 60°C.

Tenemos a: *Proteus vulgaris*, *mirabilis*, *morganii* y *retgeri*. Entre las patologías están infecciones urinarias como Cistitis, Pielitis, Gastroenteritis Meningitis y otras.

Cultivo

En el medio Mac Conkey da colonias translucidas y en el SS da colonias transparentes con el centro de color negro intenso. Las colonias aisladas son de bordes redondeados, superficie convexa, aspecto húmedo y brillante, consistencia cremosa. (7)

Pruebas Bioquímicas

Tabla 20

Prueba	p.vulgaris	p. Mirabilis	p.morganii	p.retgeri
tsi	+	+	+	+
lia	+	+	+	+
sim	+ / - / +	+ / - / +	- / + / -	- / + / -
citrato	+	+	-	+
urea	+	+	+	+

Citrobacter

Por lo general las bacterias que constituyen este género son confundidas con las que constituyen el género *Salmonella* por la semejanza existente en las reacciones bioquímicas.

Son patógenos circunstanciales, o también considerados oportunistas. Las cepas de mayor importancia son *freundii*, *koseri* y *amalonaticus*, la participación de este género en procesos nosocomiales se da en pacientes de la tercera edad preferentemente e inmunocomprometidos así también los neonatos son afectados. Puede producir neumonías, infecciones del tracto intestinal superior, otitis, bacteriemia de recién nacidos, meningitis y endocarditis. (5)

Cultivo

Crecen en medios selectivos como Mac Conkey y EMB y las colonias son muy características. (4)

Pruebas Bioquímicas

Tabla 20.1

Prueba	c. <i>Freundii</i>	c. <i>Koseri</i>	c. <i>Amalonaticus</i>
Tsi	+	+	+
Lia	-	-	-
Sim	+ / - / +	- / + / -	- / + / +
Citrato	+	+	+
Urea	variable	variable	variable

Enterobacter

Los microorganismos que constituyen este género son fermentadores acelerados de lactosa, producen colonias similares a *Klebsiella*, sin embargo no son tan mucoides o elásticas y presentan motilidad. Son bacterias oportunistas o patógenos circunstanciales. La especie tipo de este género es el *Enterobacter aerógenes*, esta especie es pleomórficos y frecuentemente encapsulado. Puede ser móvil o inmóvil, no forma esporas, desarrolla a pH de 7.2 a 7.5 y a 37°C.

Producen infecciones de vías urinarias, neumonías, bacteriemias nosocomiales, meningitis y endocarditis. (5)

Cultivo

Se desarrolla en medios selectivos como Mac Conkey y EMB con una coloración amarillo brillante, superficie convexa, bordes redondeados y aspecto húmedo y brillante. (7)

Pruebas Bioquímicas

Tabla 20.3

Prueba	E. Cloacae	E. Aerógenes	E. Gergoviae	E.cancerogenus
Tsi	+	+	+	+
Lia	-	+	-	-
Sim	- / + / -	- / + / -	- / + / -	- / + / -
Citrato	+	+	+	+
Urea	variable	-	+	-

Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema amplio, que puede ser considerado desde distintos ángulos. Queremos resaltar tres perspectivas fundamentales, pues debe saberse en todo momento a que nos estamos refiriendo en cada uno de ellos, para darle la interpretación correcta a la información que habitualmente le llega a las manos, ya sea a través de las comunicaciones científicas, como de los informes del laboratorio. De este modo podemos referirnos a mecanismos de resistencia individuales, resistencia poblacional y resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección. (2)

Resistencia individual

Se refiere a la interacción molecular entre una célula bacteriana con todo su arsenal genético y metabólico y un antibiótico determinado. Se estudian aquí las distintas herramientas con que cuenta una bacteria para evitar la acción del antibiótico en cuestión. Al referirnos a arsenal genético y metabólico queremos señalar que no siempre es suficiente con que el microorganismo posea un gen que codifica un

Mecanismo de resistencia en particular. Ese gen o esos genes deben ser expresados en cantidad y calidad suficiente, y muchas veces deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la sobrevida bacteriana.

Resistencia poblacional

Representa el comportamiento in vitro de un inóculo bacteriano preestablecido (una población bacteriana) enfrentado a determinada concentración de un antibiótico, por un período de tiempo determinado. Estos son los tipos de estudios que en general se realizan en el laboratorio clínico. Los resultados finales de estos estudios darán un informe de sensibilidad o resistencia, que son muy importantes para la orientación terapéutica del paciente, pero que no siempre coinciden con el éxito terapéutico.

Resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección

En este caso hablamos de eficacia terapéutica y juegan otros factores, como el sitio de infección, las propiedades farmacocinéticas del antibiótico (donde se encuentran incluidas la dosis y el fraccionamiento diario del mismo), el estado inmunológico del paciente, el tamaño del inóculo bacteriano, etc. La recuperación del estado de salud del paciente, es el parámetro que determina la efectividad del tratamiento.(2)

Dado que los antibióticos van a actuar directamente sobre el microorganismo productor de la infección (y por defecto también contra la flora normal), se debe entender las bases de la interacción antibiótico-microorganismo.

Precisamente la interacción antibiótico-bacteria se refiere al juego entre los mecanismos de acción de los antibióticos y los mecanismos de resistencia bacterianos.

Tipos de resistencia

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes gramnegativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la meticilina. Esta resistencia adquirida es la que estudiamos en el laboratorio e informamos al clínico. La resistencia adquirida es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección. (2)

Mecanismos de la resistencia

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias.

Los mecanismos implicados son los siguientes

Alteraciones de la permeabilidad

La presencia de membrana externa en los bacilos gramnegativos dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas, como los betalactámicos, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para tal fin. La resistencia es secundaria a alteraciones en dichas porinas.

Modificación de las dianas

Los betalactámicos deben unirse a las PBP para ejercer su efecto bactericida. Cambios a nivel de las PBP implican una pérdida de afinidad de los betalactámicos por ellas, con la consiguiente disminución de su actividad. Este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos grampositivos.

Producción de enzimas

Actualmente constituye el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos, sobre todo en las bacterias gramnegativas. Las betalactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos o transposones. Actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBP. El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes betalactámicos y propiedades hidrolíticas.

La producción de betalactamasas puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducible (sólo en presencia de un betalactámico). En este sentido no todos los betalactámicos tienen el mismo poder de inducción, pudiendo ser desde poco a altamente inductores. En los microorganismos gramnegativos, las betalactamasas plasmídicas son constitutivas y su grado de producción está en relación con el número de copias del plásmido, mientras que en los estafilococos suelen ser inducibles. Las betalactamasas cromosómicas, que son producidas fundamentalmente por bacterias gramnegativas, pueden ser constitutivas o inducibles. (2)

Betalactamasas

Las beta-lactamasas son enzimas producidas por bacterias que inactivan los betalactámicos al hidrolizar el anillo betalactámico de los mismos. La mayoría de beta-lactamasas inactivan ya sea penicilinas o cefalosporinas pero algunas son capaces de inactivar ambos tipos de antibióticos.

La mayoría de bacterias grampositivas secretan sus betalactamasas de forma que los agentes antimicrobianos betalactámicos son inactivados extracelularmente, en el medio que las rodea. (6)

En contraste, las betalactamasas de las bacterias gramnegativas permanecen dentro de la célula e inactivan los betalactámicos en el espacio periplásmico, esto es en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplásmica.

Los genes que codifican a las betalactamasas pueden ubicarse en el cromosoma bacteriano, en los plásmidos o en los elementos de transposición. Por ejemplo:

El gene de betalactamasa que media en la resistencia del *Staphylococcus aureus* a la penicilina está típicamente ubicado en un plásmido.

El gen de betalactamasa que media en la resistencia del *Klebsiella pneumoniae* a la ampicilina y ticarcilina está ubicado en un cromosoma.

Los plásmidos y elementos de transposición refuerzan la diseminación de genes de betalactamasa entre una variedad de especies bacterianas. (6)

Clasificación de las beta-lactamasas

a) Betalactamasas Inducible.- La producción de Betalactamasas inducible se inicia o induce cuando las bacterias que poseen un gene de Betalactamasas se exponen a un agente betalactámico. La acción de los agentes antimicrobianos en la pared celular activa un mecanismo genético en cascada que inicia la producción de Betalactamasas. La producción de Betalactamasas cesa ante la ausencia de los agentes antimicrobianos en la pared celular o alrededor de ella. (6)

Las enterobacterias tiene la propiedad de inactivar a los betalactámicos por varios mecanismos. El más frecuente es la producción de betalactamasas de espectro ampliado, cuya prevalencia es creciente.

Ciertos bacilos gramnegativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* constituyen el paradigma de la multirresistencia. *P. aeruginosa*, uno de los principales patógenos nosocomiales (infecciones adquiridas en unidades de cuidados intensivos e infecciones urinarias) y emergente en las respiratorias de la comunidad, presenta resistencias naturales a la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas, incluso a muchas de 3ª generación, tetraciclinas, cloranfenicol, etc. Pero además desarrolla resistencias adquiridas con gran facilidad. La multirresistencia se debe al cúmulo sucesivo de mutaciones en sus genes que conduce a la aparición de todos y cada uno de los mecanismos de resistencia conocidos, entre los que destacan las betalactamasas, sobre todo cromosómicas inducibles. (6)

b) Betalactamasas Constitutiva.- Betalactamasas constitutivas son aquellas que la bacteria produce en forma continua.

Un ejemplo de producción de Betalactamasas constitutiva es la enzima cromosómica SHV-1 de *K. pneumoniae* que interviene en la resistencia a la ampicilina y ticarcilina. (6)

Betalactamasas de amplio espectro

Las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), son enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, fundamentalmente enterobacterias especialmente frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros. Son capaces de inactivar, además de a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam.

El primer aislamiento de BLEA documentado tuvo lugar en Alemania en 1983, a partir de una cepa de *Klebsiella ozaenae*, y recibió el nombre de SHV-2 [1]. (4)

Las BLEA son sintetizadas especialmente por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y en menor medida por otras como *Enterobacter spp*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella entérica*, etc.

Las BLEA hacen resistente a estas bacterias a los betalactámicos con excepción de las cefamicinas y carbapenemas. Pero con frecuencia también lo son a otras clases de antibióticos como aminoglicósidos, tetraciclinas, cotrimoxazol e incluso a quinolonas, debido fundamentalmente a que los plásmidos que las codifican llevan otros genes de resistencia. (6).

20.3 Marco operativo

La presente monografía se realizó en el Laboratorio del Hospital Eduardo Eguía, de la ciudad de Tupiza perteneciente al Departamento de Potosí, en los años 2007-2008.

En esta investigación participo una Interna de la Carrera de Bioquímica que cumple su Servicio Rural obligatorio en Tupiza, con la colaboración del Dr. Luis Herman Rodríguez Jefe de Laboratorio del Hospital Eduardo Eguía y la Dra. Jenny Durán Pérez Ph.D. docente de la materia de Metodología de Investigación I y II de la facultad de Ciencias Químico-farmacéuticas y Bioquímicas.

Se analizaron 187 cultivos entre urocultivos y coprocultivos de pacientes que acuden al hospital Eduardo Eguía.

Se procedió a la obtención de datos mediante registros y cuadernos diarios del laboratorio del hospital.

El estudio comprendió las siguientes etapas

- Preparación del material
- Toma de muestra
- Técnicas de Cultivo
- Pruebas de Identificación
- Lectura e interpretación
- Reporte de resultados
- Análisis de resultados y conclusiones.

Toma de muestra

Inicialmente se procedió a indicar a la paciente de las condiciones previas al análisis, tomando en cuenta lo siguiente:

La paciente debe hacerse un aseo previo de los genitales para el urocultivo dotar de frascos estériles y envase desechable limpio y estéril para los coprocultivos.

Preparación

Muestra

Orina y Heces previamente cultivadas en medios selectivos e identificadas mediante la batería de pruebas bioquímicas para determinar la especie de bacteria Gram (-).

Metodología

Para la determinación de betalactamasas de amplio espectro en bacterias Gram(-) se realizó el método del antibiograma por difusión de Bauer- Kirby.

Método de difusión de bauer- kirby

Fundamento

El método se basa en el uso de una cantidad constante de antimicrobiano impregnado en un reservorio de papel filtro, el cual al ser aplicado sobre la superficie del agar en el que se ha sembrado el microorganismo en cuestión, formara por difusión un gradiente de concentración del antimicrobiano, cuya sensibilidad se indicara por el tamaño del halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco.

Material

- Regla o calibre.
- Pinza anatómica.
- Placas Petri conteniendo medio de Mueller Hinton de 4 mm de grosor.
- Hisopos de algodón.
- Tubos estériles.
- Gradillas.
- Estufa de incubación.
- Asa bacteriológica.

Procedimiento

El procedimiento sigue la siguiente secuencia:

- Preparación del inóculo.
 - Estandarización del inóculo.
 - Inoculación en las placas de agar.
 - Colocación de los discos de antibióticos.
 - Incubación.
- 1) Selección a partir del cultivo puro e identificado 3 a 5 colonias de la misma morfología con un asa bacteriológica y suspenderlas en un tubo de ensayo que contenga 5 ml de solución fisiológica.
 - 2) Estandarizar el inóculo por comparación con el tubo de la escala 0,5 de Mc Farland ($1^a \ 2 \times 10^8$ UFC / ml) utilizando una tarjeta blanca en la que se hacen líneas negras de diferente grosor (Tarjeta de Vickerham) que sirve de contraste para la comparación simultánea del patrón de turbidez y el inóculo preparado.
 - 3) Para confirmar la densidad se utiliza un espectrofotómetro en el que la lectura de absorbancia a 625nm debe ser igual a 0,8 a 1,0

- 4) Con un hisopo estéril, previamente humedecido en el inóculo y presionando el mismo contra las paredes del tubo para desechar el exceso de muestra, proceder a sembrar sobre toda la superficie del medio de cultivo “barriendo” en tres direcciones e intentando no volver a pasar por donde ya se sembró (hacer girar la caja 60° en cada siembra), dejar reposar las cajas 5 a 15 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Proceder a colocar los discos de amoxicilina, amoxicilina-acido clavulánico y una cefalosporina de tercera generación(cefotaxima o ceftazidima) , utilizando una pinza anatómica flameada brevemente al mechero, considerando que entre disco y disco debe existir una distancia mínima de 2,5cm.
- 6) Incubar las cajas de agar en estufa por 18 horas a 35°C.

Lectura

Después de las 18 horas de incubación se procede a medir los halos de inhibición con la ayuda de una regla o calibre.

No formadora de Betalactamasas de espectro ampliado formación de halos en los tres discos de antibióticos.

Formadora de betalactamasas de espectro ampliado

Formación de halo solo en la cefalosporina de 3^{ra} Generación y resistencia con ausencia de halo en los discos de amoxicilina y amoxicilina-ácido clavulánico.

Interpretación

BLEA

Resistencia generalmente expresada a ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas de 1^a y 2^a generación. Se muestra resistencia expresada a amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y sensibilidad a ceftazidima u otras cefalosporinas de 3^{ra} Generación.

No BLEA

Sensibilidad expresada a ampicilina, amoxicilina y todas las cefalosporinas. Se muestra sensibilidad expresada a ampicilina, amoxicilina –ácido clavulánico y ceftazidima u otra cefalosporina de 3^a generación.

Procesamiento y análisis de la información

Se procedió al registro de datos para luego elaborar el informe y entregar los resultados a las pacientes.

Revisada toda la información, se procedió a la elaboración de cuadros y gráficos tomando en cuenta las variables de estudio, el recuento se realizó en forma manual. Se recogieron todos los datos de urocultivos y coprocultivos de registros y cuadernos diarios del laboratorio.

20.4 Resultados

Prevalencia de Enterobacterias productoras de (BLEA) en urocultivos Hospital Eduardo Eguia 2007-2008.

En un universo de 138 urocultivos analizados que corresponden al total de urocultivos realizados en el hospital en ambos años, se observó que la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA es de un 33.33% que corresponden a 46 urocultivos, y la prevalencia de Enterobacterias no productoras de BLEA fue de un 66.7% correspondientes a 92 urocultivos analizados.

Prevalencia de Enterobacterias productoras de (BLEA) en coprocultivos Hospital Eduardo Eguia 2007-2008.

De un universo de 49 coprocultivos analizados que corresponden al total de coprocultivos realizados en ambos años, se observó que la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA fue de un 73% correspondiente a 36 coprocultivos, y la prevalencia de Enterobacterias no productoras de BLEA fue del 27% correspondiente a 13 coprocultivos.

Urocultivos según sexo Hospital Eduardo Eguia 2007 2008. Después del análisis de los datos y su clasificación según sexo se observó que existe una mayor prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en urocultivos de pacientes del sexo femenino con un porcentaje del 85,4% que corresponde a 38 mujeres y una menor prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en urocultivos de pacientes del sexo masculino con un 14,6 % que corresponde a 8 varones.

Coprocultivos según sexo Hospital Eduardo Eguia 2007-2008 Después de la clasificación de los datos según sexo de los pacientes y su posterior análisis se observó que existe una mayor prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en Varones que se realizaron coprocultivos con un porcentaje de 75% que corresponde a 27 varones y una menor prevalencia de Enterobacterias productores de BLEA en mujeres con un 25 % que corresponden a 9 mujeres.

Especies aisladas en urocultivos según producción de BLEA. De los 46 urocultivos que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, se observó la presencia de *Escherichia coli* productora de BLEA en el 93,4% que corresponde a 43 urocultivos.

De los 46 Urocultivo que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, se observó la presencia de *Citrobacter sp.* Productor de BLEA en el 4,3% que corresponde a 2 urocultivos.

De los 46 Urocultivo que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, Del se obtuvo la presencia de *Proteus sp.* Productor de BLEA en el 2,3% que corresponden a 1 urocultivos.

Enterobacterias productoras de BLEA según especie aislada e identificada en coprocultivos. De los 36 coprocultivos que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, en el 86,1% que corresponden a 31 coprocultivos se aisló *Escherichia coli* productora de BLEA

De los 36 coprocultivos que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, en el 2,7% que corresponden a 1 coprocultivo se aisló *Citrobacter sp.* Productor de BLEA.

De los 36 coprocultivos que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, en el 2,7% que corresponden a 1 coprocultivo se aisló *Proteus* sp. Productor de BLEA.

De los 36 coprocultivos que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, en el 8,5% que corresponden a 3 coprocultivos, se aisló *Enterobacter* sp. Productora de BLEA.

Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de urocultivos de los años 2007-2008. Una vez terminado el análisis y comparación por año del total de urocultivos en los que se encontró la presencia de Enterobacterias productoras de BLEA, se observó que existe una mayor prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en el año 2008 con un porcentaje de 60.9% que corresponde a 28 urocultivos, frente a una prevalencia del 39,1% en el año 2007 que corresponden a 18 urocultivos.

Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de coprocultivos de los años 2007-2008.

Una vez terminado el análisis y comparación por año del total de coprocultivos en los que se encontró la presencia de Enterobacterias productoras de BLEA, se observó que existe una igual prevalencia de las mismas tanto en el año 2007 como 2008 con un porcentaje del 50% en cada año que corresponden a 36 coprocultivos.

Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de urocultivos de los años 2007-2008 según la especie de mayor frecuencia.

Siendo *Escherichia coli* la Enterobacteria aislada con mayor frecuencia en los urocultivos analizados y una vez realizada la comparación entre ambos años, se observó que existe una mayor prevalencia de *Escherichia coli* productora de BLEA en el año 2007 con un porcentaje de 53.4% que corresponde a 23 urocultivos frente a un 46,6% en el año 2008 que corresponden a 20 urocultivos.

Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de coprocultivos de las gestiones 2007-2008 según la especie de mayor frecuencia.

Siendo de la misma forma *Escherichia coli* la Enterobacteria productora de BLEA aislada con mayor frecuencia en los coprocultivos analizados y una vez realizada la comparación entre ambos años, se observó que existe una mayor prevalencia de *Escherichia coli* productora de BLEA en el año 2008 con un porcentaje del 48,4% que corresponden a 15 coprocultivos frente aún 51,6% en el año 2007 que corresponden a 16 coprocultivos.

Tabla 20 Prevalencia de enterobacterias productoras de blea en urocultivos Hospital Eduardo Eguía 2007-2008

Bacterias	Nº de Urocultivos	%
BLEA	46	33,3
No BLEA	92	66,7
Total	138	100

Tabla 20.1 Prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en coprocultivos Hospital Eduardo Eguia 2007-2008

Bacterias	N° de coprocultivos	%
BLEA	36	73
No BLEA	13	27
Total	49	100

Tabla 20.2 Urocultivos según sexo Hospital Eduardo Eguia 2007- 2008

Sexo	N° BLEAS	%
Masculino	8	17,4
Femenino	38	82,6
Total	46	100

Tabla 20.3 Coprocultivos según sexo hospital Eduardo eguia 2007- 2008

Sexo	N° BLEAS	%
Masculino	27	75
Femenino	9	25
Total	36	100

Tabla 20.4 Especies aisladas en Urocultivos según producción de BLEA

Especie	BLEA	
	N°	%
E. coli	43	93,4
Citrobacter sp.	2	4,3
Proteus sp.	1	2,3
<u>total</u>	46	100

Tabla 20.5 Especies aisladas en Coprocultivos según producción de BLEA

Especie	BLEA	
	N°	%
E. coli	31	86,1
Citrobacter pp.	1	2,7
Proteus sp.	1	2,7
Enterobacter sp	3	8,5
Total	36	100

Tabla 20.6 Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de urocultivos de los años 2007-2008

Años	BLEAS	%
2007	18	39,1
2008	28	60,9
total	46	100

Tabla 20.7 Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de coprocultivos de los años 2007-2008

Gestión	BLEAS	%
2007	18	50
2008	18	50
Total	36	100

Tabla 20.8 Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de urocultivos de los años 2007-2008 según la especie de mayor frecuencia

Gestión	E. coli BLEA	%
2007	23	53,4
2008	20	46,6
Total	43	100

Tabla 20.9 Comparación de la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA de coprocultivos de los años 2007-2008 según la especie de mayor frecuencia.

Gestión	E. coli BLEA	%
2007	15	48,4
2008	16	51,6
Total	31	100

Comentario

Concluido el estudio en el total de urocultivos y coprocultivos de pacientes del Hospital Eduardo Eguia en la ciudad de Tupiza en ambos años, se observó la existencia de una prevalencia del 33,3% de Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro ampliado en urocultivos, frente a un 77% de Enterobacterias que no demostraron la producción de BLEA, datos que nos dicen que no hay una gran resistencia de enterobacterias al tratamiento en el caso de infecciones urinarias. Así mismo se observó una prevalencia del 73% de Enterobacterias productoras de BLEA frente a un 27% de Enterobacterias no productoras de BLEA en coprocultivos realizados en el hospital Eduardo Eguia, demostrándose en este caso que hay una mayor prevalencia de resistencia de las Enterobacterias al tratamiento en caso de infecciones intestinales, que pueden ser resultado de un mal manejo de pautas y dosis del tratamiento o incumplimiento de los mismo por el paciente.

Otro de los resultados obtenidos a través del presente trabajo es que existen cuatro bacterias aisladas con mayor frecuencia tanto en urocultivos como en coprocultivos como son: *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Citrobacter sp.* Y *Enterobacter sp.*, presentando cada una de ellas producción de BLEA en distinto porcentaje siendo *Escherichia coli* la enterobacteria que presenta mayor producción de BLEA tanto en urocultivos como en coprocultivos en ambos años; de lo que podemos decir que esta enterobacteria es la causante de la mayoría de las infecciones urinarias y gastrointestinales en nuestro medio y así mismo es la que ha llegado a presentar mayor resistencia al tratamiento.

Se demostró también que en cuanto a los urocultivos es el sexo femenino el que muestran una mayor prevalencia de enterobacterias productoras de BLEA tanto en el 2007 como en el 2008. En contraste a ello es el sexo masculino en el caso de los coprocultivos quienes muestran una mayor prevalencia de enterobacterias productoras de BLEA en ambos años. Con lo que podríamos comentar que existe una mayor prevalencia de enfermedades urinarias en las mujeres y gastrointestinales en los hombres, así mismo una mayor resistencia al tratamiento en cada caso.

Por ultimo y de acuerdo a una comparación realizada entre la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en cada año se observó un mayor incremento de Enterobacterias productoras de BLEA en el año 2008 en relación a las que se presentaron en el año 2007, lo que nos lleva a pensar en un incremento del fracaso terapéutico en el tratamiento adecuado de las mismas sobre todo si este tratamiento se realiza sin la ayuda de un antibiograma necesario para tratar específicamente a la bacteria causante de la enfermedad, ausencia que nos lleva a un mal manejo de la enfermedad del paciente.

20.5 Conclusiones

Una vez finalizado el estudio, se llegó a las siguientes conclusiones:

La hipótesis planteada en la investigación fue confirmada desde el punto de vista que la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en urocultivos del Hospital Eduardo Eguía es de 33,3% ; pero en el caso de los coprocultivos la prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA es mucho mayor que el propuesto en la hipótesis ya que alcanzó un 73%.

El objetivo de la investigación fue plenamente alcanzado, habiendo logrado determinar la prevalencia de Enterobacterias productoras de Betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) en urocultivos y coprocultivos del Hospital Eduardo Eguía de los años 2007-2008.

Así mismo se logró determinar las diferentes variables propuestas teniendo como conclusiones las siguientes:

El 33.33% de Enterobacterias mostraron producción de betalactamasas de espectro ampliado en los urocultivos de los años 2007-2008.

El 73% de Enterobacterias mostraron producción de betalactamasas de espectro ampliado en los coprocultivos de los años 2007-2008.

La prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en urocultivos de pacientes del sexo femenino es mayor con el 85,4% que corresponde a 38 mujeres frente a una menor prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en urocultivos de pacientes del sexo masculino con un 14,6 % que corresponde a 8 varones.

La prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en coprocultivos de pacientes del sexo femenino es mayor con el 75% que corresponde a 27 varones frente a una menor prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en coprocultivos de pacientes del sexo masculino con un 25 % que corresponde a 9 varones.

Según las Especies de enterobacterias productoras de BLEA aisladas en urocultivos tenemos: *Escherichia coli* productora de BLEA en el 93,4% que corresponde a 43 urocultivos; *Citrobacter sp.* Productor de BLEA en el 4,3% que corresponde a 2 urocultivos y *Proteus sp.* Productor de BLEA en el 2,3% que corresponden a 1 urocultivos.

De los 36 coprocultivos que mostraron prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA, tenemos: en el 86,1% que corresponden a 31 coprocultivos *Escherichia coli* productora de BLEA, en el 2,7% que corresponden a 1 coprocultivo *Citrobacter sp.* Productor de BLEA, en el 2,7% que corresponden a 1 coprocultivo *Proteus sp.* Productor de BLEA y en el 8,5% que corresponden a 3 coprocultivos, se aisló Enterobacterias sp. Productor de BLEA.

En relación a la comparación entre ambos años tenemos una prevalencia de Enterobacterias productoras de BLEA en el año 2008 con un porcentaje de 60.9% que corresponde a 28 urocultivos, frente a una prevalencia del 39,1% en el año 2007 que corresponden a 18 urocultivos.

En cuanto a los coprocultivos se concluyó que existe una igual prevalencia de Enterobacteria productoras de BLEA tanto en el año 2007 como 2008 con un porcentaje del 50% en cada año que corresponden a 36 coprocultivos.

La Enterobacterias productora de BLEA aislada de mayor frecuencia en urocultivos es *Escherichia coli* que muestra una mayor prevalencia en el año 2007 con un porcentaje de 53.4% que corresponde a 23 urocultivos frente a un 46,6% en el año 2008 que corresponden a 20 urocultivos.

La Enterobacterias productora de BLEA aislada de mayor frecuencia en coprocultivos es *Escherichia coli* que muestra una mayor prevalencia en el año 2008 con un porcentaje del 48,4% que corresponden a 15 coprocultivos frente a un 51,6% en el año 2007 que corresponden a 16 coprocultivos.

20.6 Recomendaciones

De acuerdo a los resultados y a las conclusiones obtenidas en el presente trabajo y en vista de la creciente resistencia que han mostrado las Enterobacterias a los antibióticos en el presente trabajo es podemos recomendar lo siguiente:

La realización siempre de exámenes laboratoriales para determinar el microorganismo causante de enfermedad antes de iniciar cualquier tratamiento. La Determinación y el posterior informe por parte del laboratorio de la producción de betalactamasas de espectro ampliado o cualquier otro tipo de resistencia a los antibióticos que pueda mostrar la bacteria.

Que el personal de Salud tenga pleno conocimiento de los riesgos que puede tener un inadecuado manejo de antibióticos y que tomen muy en cuenta los resultados de los antibiogramas para el éxito terapéutico ya que estos pueden ser la causa de una resistencia bacteriana..

20.7 Referencias

Archivo documental de los registros del laboratorio, Hospital Eduardo Eguía, Tupiza, 2007-2008.

Flores Jesús, Farmacología Humana, Tercera edición, Masson, Barcelona, 1997.

Bailey & Scout, Diagnostico Microbiológico, Undécima Edición, editorial Panamericana, Philadelphia ,2004.

Dr. Trigo Agudo Christian, Dra. Damiani Moisés Esther, Guía de Laboratorio para el aislamiento e identificación de Bacterias Gram negativas, 1º Edición, Editorial Panamericana, INLASA, La Paz -Bolivia.

Koneman W. Elmer, Diagnostico Microbiológico, Editorial Panamericana, Denver Colorado, 1983.

Autores Asociados, Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica, 2006.

Dr. Trigo Agudo Cristian y Colaboradores, Bacteriología Básica, Editorial panamericana, Universidad Mayor de San Andrés La Paz 1992.

<http://www.resistenciaantimicrobian.com/mod-htm/pages-display-pid-896.html>.

<http://www.medicina21.com/doc.php?apartat=Farmacia&id=1410>

<http://www.esmas.com/salud/enfermedades/infecciosas/346826.html>.

http://www.gmhc.org/espanol/paginas/vagth_esp.html