



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CAMPUS IV



**Evaluación de la sensibilidad bacteriana en muestras de exudado
faríngeo en pacientes ambulatorios mediante la implementación
de técnicas en base a SEIMC y CLSI.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

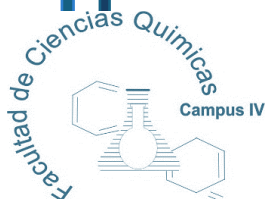
Presenta:

HERNÁN ALEJANDRO LÓPEZ PÓLA I131036

Director de Tesis:

MC. KENIA FRANCELLY RODRIGUEZ GÓMEZ

Tapachula de Córdova y Ordoñez, Chiapas; Noviembre del 2024





FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS, C. IV
DIRECCION



OFICIO No. FCQ/D/0422/2023
Tapachula, Chis., a
21 de septiembre del 2023

C. QFB. HERNÁN ALEJANDRO LÓPEZ POLA.
PASANTE DE LA MAESTRIA EN
CIENCIAS EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T E.-

DE ACUERDO A LA RESPUESTA QUE EMITIERON LOS SINODALES QUE REVISARON EL PROYECTO DE TESIS PROFESIONAL TITULADO: **“EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA EN MUESTRAS DE EXUDADO FARÍNGEO EN PACIENTES AMBULATORIOS MEDIANTE LA IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS EN BASE A SEIMC Y CLSI”**. ME ES GRATO INFORMARLE QUE SE LE AUTORIZA LA IMPRESIÓN DE LA MISMA.

ASIMISMO, ME PERMITO INFORMAR A USTED QUE DE ACUERDO AL ARTÍCULO 346 DEL ESTATUTO INTEGRAL DE ESTA UNIVERSIDAD EL JURADO ASIGNADO PARA SU EXAMEN PROFESIONAL QUEDA INTEGRADO DE LA SIGUIENTE MANERA:

DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ BALBOA
DRA. VELIA VELA ARÉVALO
M.C. KENIA FRANCELLY RODRÍGUEZ GÓMEZ.
M.C. DANIEL MARCOS MINA.
MTRA. IVONNE DEL ROSARIO HERNÁNDEZ RAMÍREZ.

PRESIDENTE
SECRETARIA
VOCAL
SUPLENTE
SUPLENTE

ATENTAMENTE
“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”


DR. LUIS MIGUEL CANSECO AVILA
DIRECTOR



c.c.p. Exp. alumno
LMCA/cmvm



Código: FO-113-05-05

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

La alumna (s) o él alumno (s) Hernán Alejandro López Pola autora (s) o autor (es) de la tesis bajo el título de Evaluación de la sensibilidad bacteriana en muestras de exudado faríngeo en pacientes ambulatorios mediante la implementación de técnicas en base a SEIMC y CLSI. presentada y aprobada en el año 2024 como requisito para obtener el título o grado de Maestro en Ciencias en Bioquímica Clínica, autorizo licencia a la Dirección de Desarrollo Bibliotecario de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), para que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para su consulta, reproducción parcial y/o total, citando la fuente, que contribuya a la divulgación del conocimiento humanístico, científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 20 días del mes de noviembre del año 2024.

HERNÁN ALEJANDRO LÓPEZ POLA

Nombre y firma del Tesista o Tesistas

Boulevard Belisario Domínguez Km 1081, Sin Número. Terán. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. C.P. 29050 Teléfono (961) 61555 04 y (961) 61513 21 Página web: www.biblioteca.unach.mx
Correo electrónico: arturo.sanchez@unach.mx

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Te agradezco por estar conmigo en cada paso de este proceso. Tu presencia me dio la confianza y la motivación para seguir adelante. “No te desmayes, porque yo soy tu Dios. Te fortaleceré y te ayudaré”. (Isaías 41:10)

A MI PADRE

Papá, aunque ya no estés conmigo, quiero agradecerte por ser mi inspiración y motivación para terminar mi tesis, te agradezco por enseñarme a perseverar y nunca rendirme, tu memoria me guio durante todo este proceso. Tu legado vive en mí.

A PAME

Eres la razón por la que pude terminar mi tesis, no puedo expresar cuánto te agradezco por tu apoyo incondicional durante todo el proceso. Me ayudaste en cada paso del camino y eso te lo reconozco desde el fondo de mi corazón. Gracias por ser mi amiga y compañera.

A MI MADRE

Recuerdo cuando me decías que podía hacerlo, que tenía la capacidad y la inteligencia para terminar mi tesis. Tu confianza en mí me dio la motivación para seguir adelante, eres mi modelo para seguir, me enseñaste a ser fuerte, perseverar y a nunca rendirme.

A MIS DIRECTORAS DE TESIS, MC. KENIA FRANCELLY RODRIGUEZ GÓMEZ & DRA. VELIA VELA ARÉVALO

Gracias por su infinita paciencia, su guía, apoyo y orientación durante todo el proceso de investigación y escritura de mi tesis; su experiencia y conocimiento fueron fundamentales para mi éxito.

A MIS SUEGROS

Quiero agradecerles por ser mi segunda familia, por ser mis modelos a seguir. Su apoyo y dedicación han sido un ejemplo para mí, y su influencia en mi vida ha sido profunda.

Cada vez que veo mi futuro oscurecer, pienso en las promesas que él ha dado para mí.

Como me enseñaste que en ti, puedo yo vencer...

Poderoso gigante

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Aparato respiratorio	5
2.1.1 Vías respiratorias altas	5
2.2 Identificación bacteriana con base a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).....	6
2.2.1 Diagnóstico microbiológico de acuerdo con la infección del tracto respiratorio con base a SEIMC.....	8
2.2.2 Muestras de exudado faríngeos. Fase pre-analítica: Recolección y transporte por SEIMC.....	12
2.3 Susceptibilidad bacteriana con base al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).....	14
2.3.1 Declaración de la misión del subcomité de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.	15
2.3.2 Selección de antibióticos para pruebas e informes de laboratorio	16
2.3.3 Definiciones de categorías interpretativas y punto quiebre de la sensibilidad antimicrobiana	20
2.4 Técnicas tradicionales para la identificación y sensibilidad bacteriana.....	24
2.4.1 Tinción de Gram: Alcances y limitaciones	24
2.4.2 Medios de cultivo.....	25
2.4.3 Pruebas de identificación fenotípica	27
2.4.4 Sensibilidad antimicrobiana	28
2.5 Antibióticos.....	33
2.5.1 Clasificación según el espectro de acción	33
2.5.2 Clasificación según por familia y clase	33
2.5.3 Clasificación según el mecanismo de acción.....	38
III. ANTECEDENTES	39
IV. HIPÓTESIS.....	41
V. OBJETIVOS.	41
5.1 General.....	41
5.2 Específicos	41
VI. METODOLOGÍA	42
6.1 Área de estudio	42
6.2 Tipo de estudio	42
6.3 Población de estudio	42

6.4 Tamaño de muestra y tipo de muestreo	42
6.5 Criterios de inclusión, exclusión.	42
6.6 Técnicas de laboratorio a utilizar	43
6.7 Variables de estudio	47
6.8 Análisis estadístico	47
6.9 Tratamiento de RPBIs.	47
VII. RESULTADOS	48
7.1 Desarrollo y Crecimiento de Microorganismos patógenos.....	48
7.2 Aislamiento e identificación de Microorganismos utilizando la normativa SEIMC y técnica tradicional.	50
7.3 Identificación de microorganismos aislados utilizando normativa SEIMC y técnica tradicional.	52
7.4 Sensibilidad bacteriana obtenida por la normativa CLSI y la técnica tradicional.	54
7.5 Sensibilidad antimicrobiana según la normativa CLSI y técnica tradicional.	56
VIII. DISCUSIÓN	61
IX. CONCLUSIONES	65
X. BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	70

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1985, definió que, para “el uso racional de medicamentos se requiere que los pacientes reciban las medicaciones apropiadas a sus necesidades clínicas, a una dosificación que satisfaga sus requerimientos individuales por un periodo adecuado de tiempo y al costo más bajo para ellos y su comunidad” (1)

Sin embargo; ha sido realmente un reto para la sociedad mantener el uso adecuado de los antibióticos, que se refleja en el aumento de la resistencia antimicrobiana en todo el mundo a niveles peligrosos. México no escapa a esta problemática. Día tras día están apareciendo y propagándose nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes (2).

Actualmente no existen nuevas clases de antibióticos, debido a la complejidad en su elaboración, ya que requiere la implementación de estrategias que involucran los ámbitos sanitarios, industriales, económicos, entre otros. Por lo que las compañías farmacéuticas, han optado por desarrollar derivados sintéticos de las clases ya conocidas (3,4). Se calcula que mundialmente, los antibióticos se prescriben, se dispensan y se consumen de manera irracional. Por lo que su uso incorrecto tiene importantes consecuencias adversas tanto para la salud como para la economía.

La sensibilidad antimicrobiana es un método de laboratorio para ayudar a los profesionales de la salud a controlar los procesos infecciosos que desarrollan los pacientes, ya que determina la susceptibilidad de un microorganismo frente a los medicamentos antimicrobianos, a partir de una exposición de una concentración estandarizada del microorganismo a estos fármacos (5). La pérdida de la sensibilidad antimicrobiana a los antibióticos constituye un importante desafío para el laboratorio.

En Chiapas, se han realizado estudios en hospitales de tercer nivel, dando como resultado que el tratamiento de las infecciones nosocomiales se dificulta por la tendencia al incremento de la resistencia a antimicrobiana. Ya que tanto, en el ámbito

extra como intrahospitalario las enfermedades infecciosas deben tratarse la mayoría de las veces de forma empírica por dificultad de acceso a los estudios microbiológicos o por la lentitud de estos; en estos casos el tratamiento debe de apoyarse en la etiología más probable del cuadro clínico y en la sensibilidad esperada de los patógenos más frecuentes.

Cada vez es más complicado seleccionar un antimicrobiano en pacientes con infecciones graves y recurrentes, conduciendo a peores resultados clínicos, por ello, se debe aplicar mejoras continuas en las técnicas tradicionales, resultando de estas mejoras los métodos normativos que coadyuvan a minimizar o eliminar errores tanto humanos como sistemáticos. De ahí la necesidad de identificar correctamente al microorganismo responsable del cuadro clínico, desde la selección del medio de cultivo, pasando por la elección de los antibióticos a los cuales se expondrá el microorganismo y determinando la sensibilidad que presenta ante dicha exposición, siguiendo la normativa indicada.

Existen métodos normativos, que coadyuvan a la identificación del agente patógeno como lo son los métodos normativos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y en la detección de la sensibilidad antimicrobiana como lo es el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

Ante tal evidencia de multirresistencia bacteriana, es primordial evaluar la eficiencia y eficacia de las técnicas usadas habitualmente y las técnicas en base a SEIMC y CLSI, desarrollando así todo el potencial con el que contamos, para coadyuvar a la elección y utilización de la metodología correcta garantizando una alta probabilidad de éxito que facilite, por lo tanto, la selección correcta del fármaco evitando su consumo innecesario y garantizando la disminución de la multirresistencia bacteriana.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Aparato respiratorio

El aparato respiratorio cumple una función vital para el ser humano: la oxigenación de la sangre: La interrelación entre su estructura y función son las que permiten que este objetivo se cumpla. Además, tiene otras funciones importantes no relacionadas con el intercambio gaseoso (6). El desarrollo y crecimiento del aparato respiratorio comienza en las primeras semanas de vida intrauterina y finaliza tardíamente en la adolescencia, época en la que alcanza un máximo y se mantiene un corto tiempo como meseta. La que continúa en el proceso de envejecimiento y declinación a largo plazo, propio de la adultez y luego la senectud (7).

El aparato respiratorio está diseñado para realizar importantes funciones como, ventilar la vía aérea desde la atmósfera hasta los alvéolos, permitir el intercambio gaseoso y transporte de gases hacia y desde los tejidos a través del sistema vascular. Además, cumple funciones metabólicas, de filtración o limpieza de material no deseado por el organismo y como reservorio de sangre (8).

La fisiología del aparato respiratorio se describe en múltiples publicaciones como un proceso altamente complejo, metódico y determinado genéticamente. Sin embargo, existen factores tanto maternos como ambientales que van a determinar la epigenética de un sin número de características anatomofuncionales del sistema o aparato respiratorio. Por lo tanto, es importante conocer las distintas etapas del desarrollo del sistema respiratorio, así como comprender, las diferencias que se presentan durante el desarrollo y organización de dicho sistema (6).

2.1.1 Vías respiratorias altas

La vía aérea se clasifica en alta y baja (o superior e inferior), considerando como hito anatómico el cartílago cricoides. Desde un punto de vista funcional, se puede considerar como alta la vía aérea extratorácica y baja la intratorácica (9).

- **VÍA AÉREA SUPERIOR.**

1) *Nariz y fosas nasales*: corresponden al inicio de la vía aérea, se comunica con el exterior a través de los orificios o ventanas nasales, con la nasofaringe a través de las coanas, glándulas lagrimales y senos para nasales a través de los cornetes nasales (pituitaria roja), un tabique nasal intermedio y con la lámina cribiforme del etmoides en su techo (pituitaria amarilla). La nariz está tapizada por la mucosa olfatoria, constituida en su tercio más externo por epitelio escamoso estratificado queratinizado rico en células productoras de moco y 2/3 siguientes por epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Conforman parte de las estructuras óseas correspondientes a los huesos nasales, maxilar superior región nasal del temporal y etmoides. Cumple funciones del olfato como filtración, y calentamiento aéreo (10).

2) *Cavidad oral*: Está conformada por un vestíbulo, una cavidad oral y el istmo de las fauces. También forma parte anatómica de esta estructura los pilares faríngeos (glosopalatinos y faringopalatinos), paladar blando y duro, y la primera parte del esófago. Forma parte de las estructuras óseas del maxilar superior e inferior (10).

3) *Lengua*: Estructura muscular sostenida por uniones con los huesos hioides, maxilar inferior y etmoides, así como del paladar blando y paredes de la faringe (10).

4) *Faringe*: Se define como una estructura tubular que abarca el espacio ubicado entre la base del cráneo hasta el borde inferior del cartílago cricoides. Dividiéndose entre regiones correspondientes a la nasofaringe (superior: coanas), orofaringe (media: istmo de las fauces) e hipofaringe (inferior: unión laringe con esófago a nivel de C4 - C6 y comunicación con laringe a través de la glotis) (10).

2.2 identificación bacteriana con base a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

La SEIMC es una sociedad científica sin ánimo de lucro que agrupa a profesionales que trabajan en el campo de la patología infecciosa, tanto desde el punto de vista clínico y del tratamiento como de diagnóstico microbiológico y la prevención.

Durante más de 35 años, la SEIMC ha estado colaborando con las Autoridades de Sanitarias para promover y desarrollar iniciativas de salud tales como el Plan Nacional para Combatir la Resistencia a los Antimicrobianos, el Plan Nacional del SIDA, Recomendaciones sobre la Gripe, Guías para el VHC, Guías para el Ébola y otros (11). Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre. Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica, y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, un pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica lo constituye la asignación de especie a un aislamiento microbiano. De manera rutinaria, el laboratorio de microbiología aplica técnicas fenotípicas que permiten lograr los objetivos expuestos. Estos métodos están consolidados en los laboratorios de microbiología y en la práctica rutinaria diaria muestran algunas limitaciones que se observan de manera específica y más evidente para algún tipo de microorganismos. Los métodos moleculares permiten soslayar algunas de estas limitaciones, si bien su implementación no es universal en todos los laboratorios. Este hecho se debe a un coste más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, por lo que los métodos moleculares suelen estar centralizados en laboratorios o centros de referencia. En un futuro cercano el abaratamiento de los costes permitir un uso más generalizado en los laboratorios de microbiología (12).

2.2.1 Diagnóstico microbiológico de acuerdo con la infección del tracto respiratorio con base a SEIMC.

Los procesos infecciosos de las vías respiratorias superiores constituyen seguramente la causa más frecuente de consulta en la práctica clínica diaria y las enfermedades que más ausencia escolar y laboral producen (Fig. 1). Sólo en Estados Unidos se calcula que se producen al año algo más de 13 episodios de resfriado común por habitante y año. En España se ha comprobado que casi el 30% de las consultas médicas relacionadas con la infección respiratoria son debidas a resfriado y el 20% a faringitis. En ocasiones es difícil separar la etiología y la clínica en muchos de estos procesos que finalmente acaban involucrando a ambas áreas comportándose en la práctica como un único cuadro microbiológico y clínico (13).

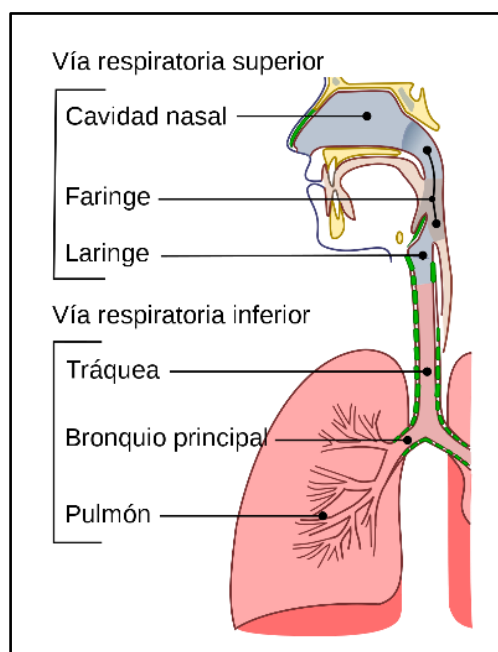


Figura 1. Vías respiratorias superiores (13).

Una cantidad importante y variada de microorganismos forman parte del microbiota normal de las vías respiratorias superiores. Este microbiota está influenciado por multitud de factores, como la edad, el estado inmunológico, la antibioterapia, la hospitalización, y últimamente la inmunización con las nuevas vacunas. El microbiota habitual incluye distintos microorganismos entre los que destacan los estreptococos, estafilococos, micrococos, neisserias, *Moraxella catarrhalis*, Corinebacterias, *Haemophilus spp*, etc. Bacterias potencialmente patógenas como los estreptococos se encuentran en no pocas ocasiones colonizando a las personas sanas. Los bacilos gram negativos también pueden a veces colonizar a individuos sanos, principalmente si estos han estado hospitalizados o han padecido alguna enfermedad respiratoria recientemente (13).

Faringitis (13)

Se define la faringitis como la inflamación y la infección de la faringe y área periamigdalas. Puede sin estar afectada tanto la orofaringe como la nasofaringe, adenoides y amígdalas. La faringitis aguda es uno de los motivos más frecuentes de consulta y prescripción de antibióticos en las consultas de atención primaria. El principal objetivo del diagnóstico de una faringitis aguda es detectar la faringitis estreptocócica, así como identificar las causas poco frecuentes pero frente a las cuales se dispone de tratamiento específico. En la mayoría de los pacientes los hallazgos clínicos son inespecíficos y no orientan hacia el diagnóstico etiológico correcto.

Se utiliza la placa con el medio de agar sangre la cual se incuba en estufa con 5% de dióxido de carbono a 35 °C durante 24 horas. En caso de negatividad se reincuba hasta 48 horas. Otra alternativa para el cultivo consiste en sembrar la muestra en anaerobiosis 48 horas a 35 °C o bien sembrarla en medio de agar sangre selectivo (como por ejemplo agar sangre con colistina y ácido nalidíxico, CNA). En caso de sospecha de infección por neisserias, los medios de cultivo utilizados para la siembra serán enriquecidos y selectivos: Thayer – Martin , GC. Estos medios tienen antibióticos (vancomicina, colistina, nistatina, trimetoprim) que inhiben el crecimiento de la microbiota normal. Debe inocularse también una placa de agar chocolate, dado que algunas cepas de neisserias pueden inhibirse por los antibióticos que contienen los medios selectivos. Se deben incubar las placas a 35 °C en atmósfera con 5% de dióxido de carbono durante 72 horas.

La faringitis infecciosa puede estar causada por diversos microorganismos, por ejemplo las bacterias causan el 5 a 40% de las faringitis agudas causadas por:

1) *S. pyogenes*: Es la bacteria más frecuente responsable del 20 a 40% de los episodios de faringitis aguda en la edad pediátrica y del 2 a 26% de los casos en adultos. Las colonias de estreptococos miden 0.5 mm de diámetro, son blancas o Grises y algunas tienen apariencia mucosa. Los bordes son enteros, están rodeadas por una zona relativamente amplia de beta hemólisis, que es mayor en zonas con baja tensión de oxígeno, y no producen catalasa. Las pruebas definitivas para la

identificación de *S. pyogenes* una vez confirmadas las características es la presencia de cualquier halo de inhibición con un disco con 0.04 unidades de bacitracina.

2) *Arcanobacterium haemolyticum*: Se ha aislado a partir de la piel y faringe de individuos sanos pero también se ha descrito como causa de infección especialmente faringitis en adolescentes y adultos jóvenes. Su detección no requiere un procesamiento especial de la muestra. Es un bacilo gram positivo aerobio y de lento crecimiento, por lo que se recomienda la incubación de los cultivos durante 72 horas, es inmóvil y no produce catalasa. Produce beta hemólisis en agar sangre, se han descrito 2 morfotipos de colonia y el tipo rugoso es el que se aísla con más frecuencia a partir de muestras respiratorias. Esta especie se distingue por ser positiva en la prueba del CAMP inverso, utilizando una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de beta hemolisina.

3) *Neisseria gonorrhoeae*: Puede producir faringitis de forma ocasional en pacientes que tienen contacto sexual orogenital. Para su aislamiento es fundamental el procedimiento rápido de la muestra; incluso en el mismo momento de su obtención. Si esto no fuera posible, se debe introducir el hisopo en un medio de transporte y mantener la muestra a temperatura ambiente. Dadas las consecuencias sociales que puede tener el diagnóstico de una infección de transmisión sexual (ITS) en una localización extra genital es importante confirmar su identificación a nivel de especie mediante 2 métodos independientes como la identificación bioquímica y mediante sondas de ADN.

4) *Mycoplasma pneumoniae*: Produce principalmente traqueo bronquitis y neumonía, aunque también se ha asociado a casos de faringitis recurrentes. Su cultivo no se realiza en la mayoría de los laboratorios asistenciales ya que los medios necesarios para el aislamiento son caros y complejos, el procedimiento para cultivo es laborioso y el tiempo de incubación es prolongado. Por este motivo, el diagnóstico de la infección por este microorganismo sigue basándose en las técnicas serológicas.

5) *Corynebacterium diphtheriae*: Se utilizará los siguientes medios de cultivo agar sangre de cordero al 5%, en este medio se formarán colonias de tamaño medio de color gris pizarra. En el medio de cultivo agar sangre con cistina y telurito el

microorganismo forma colonias negro-grisáceas. Este microorganismo es catalasa positivo, ureasa negativa, reduce los nitratos, y fermenta la glucosa, la maltosa y la ribosa.

Laringitis aguda y laringotrequetis (13)

La laringitis es una manifestación frecuente de las infecciones del tracto respiratorio superior, caracterizada por rinorrea, tos y dolor de garganta, que normalmente afecta a niños mayores, adolescentes y adultos. La laringitis aguda es un síndrome clínico muy frecuente en las consultas de atención primaria. Las infecciones bacterianas también se han asociado en ocasiones a laringitis aguda, como son los casos de la faringitis estreptocócica aguda, de infecciones por *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, y de infecciones por *M. catarrhalis* o *H. influenzae* (19). En el caso de *Moraxella catarrhalis*: diplococos gram negativos, oxidasa, catalasa y tributirina positiva; no fermentación de carbohidratos; habitualmente betalactamasa positiva.

Debido a que el diagnóstico de laringitis es fundamentalmente clínico, y de etiología vírica, en la mayoría de los casos los cultivos para bacterias y hongos son solo necesarios cuando no hay otra causa aparente o cuando se realiza un diagnóstico diferencial de infecciones crónicas.

Epiglotitis (13)

La epiglotitis es un proceso infeccioso que produce inflamación y edema de las estructuras supraglóticas, lo que incluye la epiglotis, la úvula, la base de la lengua, aritenoides, las falsas cuerdas vocales y las paredes faríngeas adyacentes. La epiglotitis tiene una etiología primariamente bacteriana la mayoría de los casos en niños menores de 5 años causadas por *H. influenzae* tipo b, que son pequeños bacilos o coco bacilos gram negativos que crecen en agar chocolate incubado en 5% de dióxido de carbono, pero no en agar sangre; las especies pueden clasificarse por sus requerimientos de los factores X y V y por su comportamiento bioquímico en diferentes paneles.

Otitis (13)

La otitis es la inflamación del oído, cuya causa más frecuente es la infección bacteriana, representando una de las patologías más frecuentes en los niños, pero su diagnóstico puede ser difícil. La otitis puede tener varios agentes etiológicos como lo son estafilococos, estreptococos, pseudomonas, o inclusive especies de hongos. Se deben de utilizar medios de cultivo como lo son agar sangre, agar MacConkey y agar chocolate suplementado. En dado caso de sospecha de otitis fúngica, añadir agar Sabouraud. Cabe Mencionar que *Staphylococcus aureus* son cocos gram positivos, catalasa y coagulasa positiva, colonias de color amarillo en agar manitol. Por otra parte, *Pseudomona aeruginosa* se desarrolla en agar MacConkey, oxidasa y pruebas bioquímicas.

Sinusitis (13)

Los senos paranasales comprenden el seno frontal, el maxilar, el etmoidal y el esfenoidal. Cada uno de ellos está recubierto por un epitelio ciliado, cualquier obstrucción de estos conduce a la alteración de la fisiología normal y potencialmente puede producir sinusitis cuyas causas son una infección vírica bacteriana o micóticas. Los Agentes etiológicos involucrados en las sinusitis aguda o crónica son diversos, aunque predominan 2 especies como lo son los estreptococos y *H. influenzae*, re en menor frecuencia están los anaerobios como *M. catarrhalis*, estafilococos y los bacilos gram negativos.

2.2.2 Muestras de exudado faríngeos. Fase pre-analítica: Recolección y transporte por SEIMC.

Las muestras de exudado faríngeo constituyen uno de los estudios más solicitados, especialmente en niños, debido en gran medida a la facilidad de su obtención.

Sin embargo, la presencia de abundante flora microbiana junto con la presencia de diferentes patógenos colonizantes, complica la interpretación de los resultados microbiológicos (14).

El cultivo del exudado faríngeo está indicado fundamentalmente para el diagnóstico de las faringoamigdalitis causadas por el *Streptococcus B- hemolítico del grupo A* y su diferenciación de los casos de etiología vírica, que no requieren tratamiento antibiótico,

así como para identificar los casos ocasionales producidos por microorganismos menos frecuentes (otros estreptococos B- hemolíticos-no grupo A, *Arcanobacterium baemolyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*) y el diagnóstico de difteria y tos ferina. Además, está indicado en el diagnóstico de abscesos retro faríngeos, donde hay que tener en cuenta la presencia de microorganismos anaerobios, en infecciones por *Neisseria meningitidis* y microorganismos multi resistentes (14).

2.2.2.1 Recolección de muestras de exudados faríngeos.

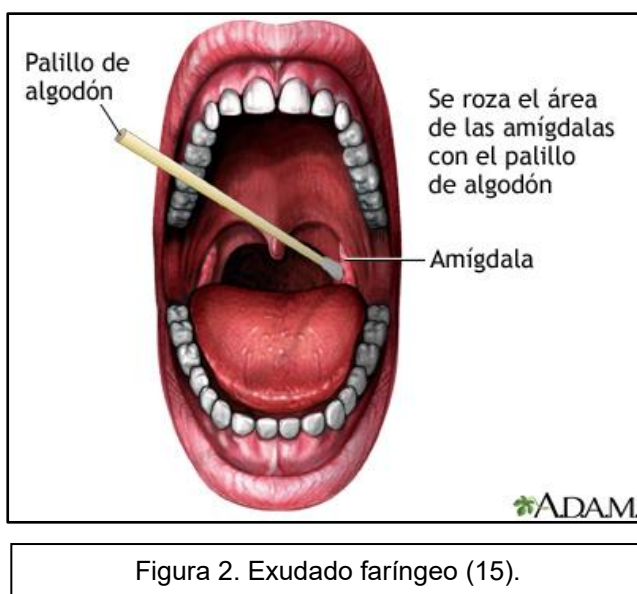


Figura 2. Exudado faríngeo (15).

La muestra debe obtenerse tan pronto como sea posible tras la aparición de los síntomas y antes de instaurar la terapia antibiótica. Para ello, se utilizarán hisopos, la toma se realizará del área amígdala y faringe posterior, así como de cualquier zona inflamada o ulcerada, ya evitando rozar la úvula, la mucosa bucal, los labios o la lengua (Fig. 2) (15).

2.2.2.2 Transporte y almacenamiento de muestras de exudado faríngeo.

El hisopo se introducirá en un tubo con medio de transporte Stuart, no demorando su envío al laboratorio. Utilizando el medio de transporte tipo Stuart la muestra obtenida permanece viable durante las primeras 48 a 72 horas. No requiere medidas especiales para su transporte y conservación ya que debe de permanecer a temperatura ambiente (16).

2.2.2.3 Criterios de aceptabilidad y rechazo.

Estos criterios son necesarios para aceptar o rechazar este tipo de muestra los cuales son (17):

- 1) Para que la muestra clínica sea viable debe de recolectarse del sitio donde se está llevando a cabo el proceso infeccioso, con el mínimo de contaminación de tejidos o secreciones adyacentes.
- 2) Se debe obtener una cantidad suficiente para asegurar un examen completo.
- 3) Se recomienda utilizar dispositivos estériles de tamaño y forma de acuerdo con el tipo de espécimen y técnica utilizada para su obtención.
- 4) Debe procesarse las muestras antes de iniciarse el tratamiento con un antibiótico.
- 5) No debe haberse lavado la boca o ingerido alimento, o agua; antes de la recolección de la muestra permitiendo así la posibilidad de recuperación de diferentes agentes causales de la infección.
- 6) Durante la conservación y transporte de la muestra deberá evitarse el derrame, contaminación y temperaturas nocivas para las bacterias a cultivar.
- 7) El espécimen obtenido debe enviarse rápidamente al laboratorio. Los microorganismos de difícil crecimiento no sobreviven a un almacenamiento prolongado o pueden ser superados por otros menos exigentes o de la flora normal, produciéndose aislamientos no esperados en los medios de cultivo.

2.3 Susceptibilidad bacteriana con base al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) es una organización internacional, voluntaria, sin fines de lucro, interdisciplinaria, de desarrollo de estándares y educativa acreditada por el Instituto Nacional Estadounidense de Estándares que desarrolla y promueve el uso de estándares y pautas desarrollados por consenso dentro de la comunidad de atención de la salud. Estos estándares y pautas de consenso se desarrollan en un foro abierto y de búsqueda de consenso para cubrir áreas críticas de pruebas de diagnóstico y atención médica del paciente (18).

CLSI está abierto a cualquier persona u organización que tenga interés en las pruebas de diagnóstico y la atención al paciente. El Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana del CLSI revisa los datos de una variedad de fuentes y estudios (p.

ej., *in vitro*, farmacocinética-farmacodinámica y estudios clínicos) para establecer métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana, puntos de corte y parámetros de control de calidad (18).

Con el tiempo, la susceptibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano puede disminuir, dando como resultado una falta de eficacia y/o seguridad clínica. Además, los métodos microbiológicos y los parámetros de control de calidad pueden refinarse para garantizar un rendimiento más preciso y mejor de los métodos de prueba de susceptibilidad. Debido a este tipo de cambios, CLSI monitorea y actualiza continuamente la información en sus documentos. Aunque las normas y directrices del CLSI se desarrollan utilizando la información más actualizada disponible en ese momento, el campo de la ciencia y la medicina siempre está cambiando; por lo tanto, los estándares y las pautas deben usarse junto con el juicio clínico, el conocimiento actual y los resultados de las pruebas de laboratorio clínicamente relevantes para guiar el tratamiento del paciente (18).

2.3.1 Declaración de la misión del subcomité de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.

El Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos está compuesto por representantes de las profesiones y la industria, incluidos laboratorios de microbiología, agencias gubernamentales, proveedores de atención médica y educadores, e industrias de microbiología de diagnóstico y farmacéutica. Usando el proceso de consenso voluntario de CLSI, el subcomité desarrolla estándares que promueven pruebas precisas de susceptibilidad a los antimicrobianos e informes apropiados. La misión del Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana es (18):

- Desarrollar métodos de referencia estándar para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos.
- Proporcionar parámetros de control de calidad para métodos de prueba estándar.

- Establecer puntos de corte y categorías interpretativas para los resultados de las pruebas estándar de susceptibilidad a los antimicrobianos y proporcionar valores de corte epidemiológicos cuando los puntos de corte no estén disponibles.
- Proporcionar sugerencias para pruebas y estrategias de informes que sean clínicamente relevantes y rentables.
- Refinar continuamente los estándares y optimizar la detección de mecanismos de resistencia emergentes a través del desarrollo de métodos, puntos de corte y parámetros de control de calidad nuevos o revisados.
- Educar a los usuarios a través de la comunicación multimedia de normas y directrices.
- Fomentar el diálogo con los usuarios de estos métodos y quienes los aplican.

El propósito final de la misión del subcomité es proporcionar información útil para permitir que los laboratorios ayuden al médico en la selección de la terapia antimicrobiana apropiada para el cuidado del paciente. Los estándares y lineamientos pretenden ser completos e incluir todos los agentes antimicrobianos para los cuales los datos cumplen con los lineamientos CLSI establecidos. Los valores que guían esta misión son la calidad, la precisión, la equidad, la oportunidad, el trabajo en equipo, el consenso y la confianza (18).

2.3.2 Selección de antibióticos para pruebas e informes de laboratorio

Antibióticos apropiados para las pruebas de rutina

Se selecciona los antibióticos más apropiados para probar e informar en un resultado de laboratorio. Las recomendaciones para cada grupo de microorganismos incluyen agentes de eficacia comprobada que muestran un rendimiento aceptable en las pruebas *in vitro*. Las consideraciones en la asignación de agentes a grupos específicos de prueba/informe incluyen eficacia clínica, prevalencia de resistencia, minimización de la aparición de resistencia, costo, indicaciones clínicas de uso de la FDA y recomendaciones de consenso actuales para medicamentos de primera elección y

alternativos. Las pruebas con agentes seleccionados pueden ser útiles para la prevención de infecciones (18).

Dentro de estos antibióticos, se contabilizan a los antibióticos equivalentes, los cuales presentan categorías de interpretación (sensible, intermedio, sensible dependiente de la dosis o resistente) y la eficacia clínica son similares. Por ejemplo, las *Enterobacterales* sensibles a la cefotaxima pueden considerarse sensibles a la ceftriaxona. Los resultados obtenidos de las pruebas de cefotaxima podrían informarse junto con un comentario de que el microorganismo aislado también es susceptible a la ceftriaxona. Para los medicamentos, los errores mayores y muy importantes combinados son inferiores al 3 %, y los errores menores son inferiores al 10 % (18).

Organización de jerarquía de antibióticos de acuerdo con los grupos de prueba

1) *Los agentes antimicrobianos del grupo A*, como se enumeran en las Tablas 1, se consideran apropiados para su inclusión en un panel de análisis primario de rutina, así como para la notificación rutinaria de resultados para los grupos de organismos específicos (18).

2) *El grupo B*, incluye agentes antimicrobianos que pueden justificar la realización de pruebas primarias, pero pueden notificarse solo de forma selectiva, como cuando el organismo es resistente a agentes de la misma clase antimicrobiana que en el grupo A. Otras indicaciones para informar el resultado pueden incluir una muestra seleccionada (p. ej., una cefalosporina de tercera generación para *Enterobacterias* del LCR o trimetoprim-sulfametoxazol para aislamientos del tracto urinario); una infección polimicrobiana; infecciones que involucran múltiples sitios; casos de alergia, intolerancia o falta de respuesta del paciente a un agente antimicrobiano del grupo A (18).

3) *El grupo C* incluye agentes antimicrobianos alternativos o complementarios que pueden requerir pruebas en aquellas instituciones que albergan cepas endémicas o epidémicas resistentes a varios de los medicamentos primarios (especialmente en la misma clase, por ejemplo, β -lactámicos); para el tratamiento de pacientes alérgicos a fármacos primarios; para el tratamiento de organismos inusuales (p. ej., cloranfenicol

para aislamientos extraintestinales de *Salmonella* spp.) o para informar a la prevención de infecciones como una ayuda epidemiológica (18).

4) *El grupo U ("orina")* incluye ciertos agentes antimicrobianos (p. ej., nitrofurantoína y ciertas quinolonas) que se usan única o principalmente para tratar las UTI. Estos agentes no deben informarse de forma rutinaria frente a patógenos recuperados de otros sitios de infección. Una excepción a esta regla es para *Enterobacterias* en la que la cefazolina se incluye como agente de prueba sustituto de las cefalosporinas orales. Otros agentes antimicrobianos con indicaciones más amplias pueden incluirse en el grupo U para patógenos urinarios específicos (p. ej., *Enterococcus* y ciprofloxacino) (18).

5) *El grupo O ("otros")* incluye agentes antimicrobianos que tienen una indicación clínica para el grupo de organismos pero que generalmente no son candidatos para las pruebas y los informes de rutina en los Estados Unidos (18).

6) *Inversión en grupo. ("en investigación")* incluye antibióticos que están en investigación para el grupo de organismos y aún no han sido aprobados por la FDA para su uso en los Estados Unidos (18).

Tabla 1. Jerarquía de elección de antibióticos para determinación de sensibilidad (18)

Tabla 1M. <i>Streptococcus</i> spp. Grupo B-hemolítico			
Nivel 1: Agentes antimicrobianos que son apropiados para pruebas e informes primarios de rutina	Nivel 2: Agentes antimicrobianos que son apropiados para pruebas primarias de rutina, pero que pueden informarse siguiendo las reglas de notificación en cascada establecidas en cada institución	Nivel 3: Agentes antimicrobianos que son apropiados para las pruebas primarias de rutina en instituciones que atienden a pacientes con alto riesgo de MDRO, pero que solo deben informarse siguiendo las reglas de notificación en cascada establecidas en cada institución.	Nivel 4: Agentes antimicrobianos que pueden justificar pruebas e informes a pedido del médico si los agentes antimicrobianos en otros niveles no son óptimos debido a varios factores
a,b Clindamicina			
a,b,c Eritromicina			
d Penicilina o ampicilina		Cefotaxima o ceftriaxona	cefepima ceftarolina
	e tetraciclina		
		vancomicina	
			Línezolida Tedizolida
			f,g,h Daptomicina
			levofloxacino
			h, i Dalbavancin
			h Oritavancina
			h Telavancina

Informe de laboratorio

Cada laboratorio debe decidir qué agentes en las tablas informar de forma rutinaria (grupo A) y cuáles podrían informarse solo de forma selectiva (del grupo B), en consulta con los médicos de enfermedades infecciosas y farmacéuticos, los comités de farmacia y terapéuticos y de prevención de infecciones de la salud. Institución de atención y el equipo de administración de antimicrobianos. Los informes selectivos deberían mejorar la relevancia clínica de los informes de las pruebas y ayudar a minimizar la selección de cepas multirresistentes asociadas a la atención médica por el uso excesivo de agentes antimicrobianos de amplio espectro. Los resultados de los agentes antimicrobianos del grupo B analizados, no se notifican de forma rutinaria, se

pueden informar para tipos de muestras seleccionados. La resistencia inesperada, cuando se confirme, debe informarse (p. ej., resistencia a un agente secundario pero susceptibilidad a un agente primario, *Aislamiento de P. aeruginosa* resistente a amikacina pero sensible a tobramicina; como tal, ambos medicamentos deben ser informados). Además, cada laboratorio debe desarrollar un protocolo para cubrir los aislamientos que se confirmen como resistentes a todos los agentes en sus paneles de prueba de rutina. Este protocolo debe incluir opciones para probar agentes adicionales internamente o enviar el aislado a un laboratorio de referencia (18).

2.3.3 Definiciones de categorías interpretativas y punto quiebre de la sensibilidad antimicrobiana

2.3.3.1 Definición de punto de quiebre

Concentración inhibitoria mínima (MIC) o valor de diámetro de zona utilizado para categorizar un organismo como susceptible, susceptible dependiente de la dosis, intermedio, resistente o no susceptible. Los valores de MIC o diámetro de zona generados por una prueba de susceptibilidad pueden interpretarse en función de los puntos de corte establecidos (Tabla 2). Debido a que los puntos de corte se basan en gran medida en conjuntos de datos farmacológicos y clínicos que utilizan datos *in vitro* e *in vivo*. (18)

2.3.3.2 Definición de categoría interpretativa

Categoría derivada de características microbiológicas, parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos y datos de resultados clínicos, cuando estén disponibles; los valores de MIC o diámetro de zona generados por una prueba de susceptibilidad pueden interpretarse en función de los puntos de corte establecidos (Tabla 3) (18).

TABLA 2. Puntos de quiebre de sensibilidad antimicrobiana (18)

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Categorías interpretativas y puntos de corte de diámetro de zona, mm entero más cercano			Categorías interpretativas y puntos de corte de CIM, µg/mL			Comentarios
		S	I	R	S	I	R	
PENICILINAS								
(7) Un organismo que es sensible a la penicilina se puede considerar sensible a los agentes antimicrobianos enumerados aquí cuando se usa para indicaciones aprobadas y no necesita ser probado contra esos agentes. Para los estreptococos β-hemolíticos de los grupos A, B, C y G, la penicilina se prueba como sustituto de ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, ampicilina-sulbactam, cefazolina, cefepima, ceftarolina, cefradina, cefalotina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima, imipenem, ertapenem y meropenem. Para los estreptococos β-hemolíticos del grupo A, la penicilina también es un sustituto de cefaclor, cefdinir, cefprozil, ceftibuten, cefuroxime y cefpodoxime.								
penicilina o ampicilina	10 unidades 10 mcg	≥ 24 ≥ 24	- -	- -	≤ 0,12 ≤ 0,25	- -	- -	Ver comentario general (5).

TABLA 3. Puntos de corte de Concentración Mínima Inhibitoria de antibióticos sugeridos (18)

Categoría interpretativa	puntos de ruptura	
	CIM, µg/mL	Diámetro de zona, mm
Susceptible	≤ 4	≥ 20
Sensible-dependiente de la dosis	8-16	15-19
Intermedio	8-16	15-19
Resistente	≥ 32	≤ 14
no susceptible	> 1	< 17

Los puntos de corte del valor de MIC o del diámetro de la zona y las categorías interpretativas se establecen según CLSI para las categorías de susceptible, intermedio y resistente (18).

1) *Susceptible (S)*: Una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una CIM igual o inferior o un diámetro de zona igual o superior al punto de corte susceptible son inhibidos por las concentraciones generalmente

alcanzables de agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada para tratar el sitio de infección, lo que resulta en una probable eficacia clínica (18).

2) *Susceptible-dependiente de la dosis (SDD)*: una categoría definida por un punto de corte que implica que la susceptibilidad de un microorganismo aislado depende del régimen de dosificación que se usa en el paciente. Para lograr niveles que probablemente sean clínicamente efectivos contra aislamientos para los cuales los resultados de las pruebas de susceptibilidad (ya sea CIM o diámetros de zona) están en la categoría SDD, es necesario usar un régimen de dosificación (es decir, dosis más altas, dosis más frecuentes o ambos) que resulta en una exposición al fármaco más alta que la alcanzada con la dosis que se usó para establecer el punto de corte susceptible. Se debe considerar el régimen de dosificación máximo respaldado por la literatura, porque una mayor exposición brinda la mayor probabilidad de cobertura adecuada de un aislado SDD. La categoría SDD puede asignarse cuando las dosis muy por encima de las utilizadas para calcular el punto de corte sensible están respaldadas por la literatura, ampliamente utilizadas clínicamente y/o aprobadas y para las cuales existen y han sido revisados datos suficientes para justificar la designación. Esta categoría también incluye una zona de amortiguamiento para la variabilidad inherente en los métodos de prueba, lo que debería evitar que factores técnicos pequeños e incontrolados causen discrepancias importantes en las interpretaciones, especialmente para medicamentos con márgenes de farmacotoxicidad estrechos (18).

3) *Intermedio (I)*: Una categoría definida por un punto de corte que incluye aislamientos con MIC o diámetros de zona de inhibición dentro del rango intermedio que se acercan a los niveles sanguíneos y tisulares generalmente alcanzables y/o para los cuales las tasas de respuesta pueden ser más bajas que para los aislamientos susceptibles; El Intermediario es solo para uso informativo. Es mejor que cada laboratorio tome la decisión de informarlo, basándose en las pautas específicas de la institución y en consulta con el personal médico apropiado. La categoría I también incluye una zona de amortiguamiento para la variabilidad inherente en los métodos de prueba, lo que debería evitar que factores técnicos pequeños e incontrolados causen discrepancias

importantes en las interpretaciones, especialmente para medicamentos con márgenes de farmacotoxicidad estrechos (18).

4) *Resistente (R)*: una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una CIM igual o superior o un diámetro de zona igual o inferior al punto de corte resistente no son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del agente con programas de dosificación normales y/o que demuestren CIM o diámetros de zona que se encuentren en el rango en el que es probable que existan mecanismos de resistencia microbianos específicos, y la eficacia clínica del agente contra el aislado no se haya demostrado de manera confiable en los estudios de tratamiento (18).

5) *No susceptible (NS)*: Una categoría utilizada para aislamientos para los que solo se designa un punto de corte susceptible debido a la ausencia o la rara aparición de cepas resistentes. Los aislamientos para los cuales las CMI del agente antimicrobiano están por encima o los diámetros de zona están por debajo del valor indicado para el punto de corte susceptible deben informarse como no susceptibles. Un microorganismo aislado que se interpreta como no sensible no significa necesariamente que el microorganismo aislado tenga un mecanismo de resistencia. Es posible que los aislamientos con CIM por encima del punto de corte susceptible que carecen de mecanismos de resistencia puedan encontrarse dentro de la distribución de tipo salvaje después del momento en que se estableció el punto de corte solo susceptible; el término "no susceptible" no debe usarse cuando el texto describe una categoría de microorganismo/fármaco con categorías interpretativas intermedias y resistentes. Los microorganismos aislados que están en las categorías de "intermedio" o "resistente" podrían llamarse "no susceptibles" en lugar de "no susceptibles" (18).

2.4 Técnicas tradicionales para la identificación y sensibilidad bacteriana

Debido a que la orofaringe es un sitio expuesto, posee una flora abundante y compleja de microorganismos aerobios y anaerobios y en el laboratorio se debe distinguir a los patógenos de los comensales con ayuda de los datos clínicos y epidemiológicos del paciente, los cuales deben ser aportados por el médico que solicitó el examen. Los principales microorganismos de la flora normal de estas vías son los *Staphylococcus*, *Streptococcus alfa hemolíticos*, otros Gram-positivos anaerobios, bacilos difteroides, bacilos Gram-positivos y Gram-negativos anaerobios, *Neisseria*, incluyendo *Moraxella catharrhalis*, *Haemophilus spp*, diversas especies de espiroquetas, levaduras, etc. Los sujetos desnutridos, inmunodeficientes o que han recibido un tratamiento prolongado con antibióticos, pueden estar colonizados por enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, etc) o por Gram-negativos no fermentadores (*Pseudomonas sp*) (19).

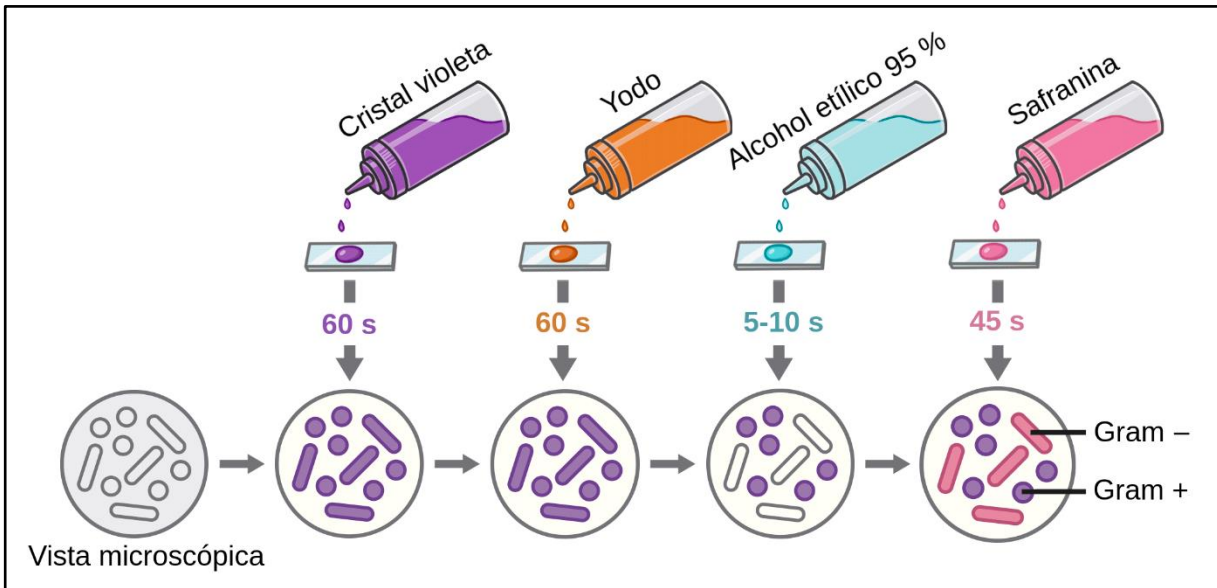
2.4.1 Tinción de Gram: Alcances y limitaciones

Los frotis de muestras clínicas teñidos con Gram, ponen en evidencia la presencia de estreptococos por cultivo, en general presentan cocos Gram positivos o Gram negativos dispuestos en pares y cadenas. Las cadenas, tanto en las muestras clínicas como en los cultivos en medios líquidos, tienden a aparecer como constituidas por la unión de pares de células y no por eslabones de células individuales.

La forma de las células aisladas varía entre un aspecto similar al de los diplococos y formas de coco bacilares. Esta morfología se observa con frecuencia en frotis de medios de cultivos líquidos y sólidos. Los *Streptococcus viridians*, en particular, tienden a presentar células más alargadas. *Streptococcus pneumoniae* se presenta con mayor frecuencia en forma de pares de células lanceoladas. En los frotis de muestras de cepas mucoides, con cápsulas densas, la cápsula puede aparecer como un halo

rosado o como una zona que no se colorea rodeando las células, que se destaca en relieve contra el fondo rosa que envuelve a los microorganismos (Fig. 3) (20).

Figura 3. Tinción de Gram (20).



2.4.2 Medios de cultivo

Las muestras en las que existe presencia de estreptococos deben de cultivarse en placas de un medio adecuado con sangre, que posea una base peptonada lo suficientemente rica para favorecer el desarrollo de estos microorganismos exigentes. La base del agar debe ser un medio de infusión de peptonas, sin el agregado de hidratos de carbono. Aunque en general las colonias serán más grandes en medios que contengan glucosa; después de 24 horas, el ácido producido por la utilización de la glucosa inactiva la estreptolisina S de los *Streptococcus del grupo a* y puede interferir con la determinación de las propiedades hemolíticas del microorganismo. Al medio basal se le agrega sangre de carnero al 5% como indicador de hemólisis. Las concentraciones de sangre menores producen reacciones hemolíticas difíciles de distinguir, en tanto que las mayores pueden ocultar totalmente la hemólisis. En agar sangre de carnero los estreptococos pertenecientes a los grupos A, B, C, F y G son beta hemolíticos, en tanto que la mayoría de las especies de *Enterococcus* y los estreptococos grupo D son alfa hemolíticos o no hemolíticos. El agar sangre de carnero

no soporta el desarrollo de *Haemophilus haemolyticus* o de *Haemophilus parahaemolyticum* como agente causal de faringitis puede hacer necesario un cambio de enfoque de laboratorio para los cultivos de exudados faríngeos, dado que este microorganismo es beta hemolítico y catalasa negativo, pero es un bacilo gram positivo (21)

Los medios sólidos selectivos también pueden incrementar la recuperación de este *Streptococcus del grupo a* de cultivos de exudados faríngeos. Las fórmulas utilizadas con mayor frecuencia y que se encuentran disponibles en el comercio emplean una base de agar trípticasa – soja con 5% de sangre carnero y sulfametoxazol – trimetoprima. La mayor parte de la flora normal de la orofaringe (es decir, los estreptococos viridans, micrococos, estafilococos y neisserias) Inhibida por este medio de cultivo. El uso de este medio selectivo aumenta la recuperación de estreptococos grupos A y B, y permite la visualización de la B- hemólisis sin el fondo del desarrollo de otros microorganismos. Los medios selectivos disponibles en el comercio son Streptococcus Selective Agar (21).

El medio de Pai, a base de huevo coagulado, se utiliza para buscar *Corynebacterium diphtheriae*. En este medio, la mayor capacidad de desarrollo del microorganismo es cuando su población aumente con respecto a la flora acompañante, si se incuba de 6 a 8 horas. En menores de 5 años es frecuente aislar *Haemophilus influenzae*, por lo cual las muestras deben sembrarse en agar chocolate con bacitracina o en agar Hemina bacitracina extracto de levaduras (GHBEL) (21).

Otro problema importante son los casos de tosferina donde el aislamiento de *Bordetella pertusis* es crucial para distinguir los cuadros causados por este agente, de los provocados por otras bordetelas o por virus. Para esto, la muestra se debe sembrar de inmediato en el medio de Bordet – Gengou. Mas que de importancia clínica, es de gran trascendencia epidemiológica determinar la presencia de portadores de *Neisseria meningitidis*, en particular en los contactos de un caso de meningitis donde se confirmó o se sospecha la presencia de esta bacteria. La búsqueda se debe hacerse en medio de Thayer Martin, qué es un agar chocolate enriquecido al que se hace selectivo por la adición de vancomicina, colicina y nistatina. En el anexo 1 se muestran los pasos a seguir para el procesamiento de muestras de las vías respiratorias altas.

2.4.3 Pruebas de identificación fenotípica

Staphylococcus aureus.

Las colonias son grandes, lisas y brillantes y por lo general están pigmentadas. Debido a que *S. aureus* produce hemolisina, en la placa de agar sangre las colonias se rodean por una zona variable de hemólisis beta. En el anexo 2 se presenta la secuencia para identificar estafilococos a partir de las colonias en agar sangre. Es importante hacer la distinción de *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativo cuando la muestra proviene de orina o de a un paciente con algún estado de inmunodeficiencia (20,21).

Streptococcus.

Las colonias de *Streptococcus pneumoniae* en agar sangre presentan un halo de hemólisis alfa cuando se incuban en condiciones aeróbicas o un halo de beta hemólisis si se incuban en anaerobiosis. Las colonias típicas tienen una apariencia mucosa y húmeda muy particular que las hace diferenciables de otras colonias alfa hemolíticas. En el anexo 3 se muestra los procedimientos para la identificación de este microorganismo y su diferenciación de estreptococos del grupo viridans. Las colonias de *Streptococcus pyogenes* en agar sangre presentan un halo de hemólisis beta cuando se incuban en condiciones aeróbicas. Las colonias típicas son catalasa negativos y serotificados del grupo A (20,21).

Corynebacterium diphtheriae toxigénico

El crecimiento en Pai o Loeffler se inocula en un medio con 0.3% de telurito de potasio y se incuba de 24 a 48 horas a 37 °C formando colonias Grises o negras y aunque no es la única bacteria con esta cualidad, el uso de esta sal también reduce el crecimiento de la flora acompañante (20,21). En el anexo 4 se muestra los procedimientos para la identificación de este microorganismo.

Haemophilus influenzae

La muestra se siembra en medio GHBEL (agar hemina bacitracina extracto de levaduras). Después de incubar a 37 °C durante 24 horas en atmósfera al 5 a 10% de bióxido de carbono, las colonias del microorganismo se desarrollan característicamente en forma satélite a los discos de papel Filtro. Se buscan las

colonias satélites que son pequeñas, translúcidas, no pigmentadas, lisas y con brillo azulado al ser vistas con la luz polarizada tangencial, que crecen alrededor de los discos con extracto de levadura (20,21). La identificación de este microorganismo se realiza de acuerdo con el anexo 5.

Bordetella pertusis

La muestra se siembra en el medio Bordet – Gengou, se incuba la placa a 37 °C durante cuatro días antes de descartar el cultivo, se observa la aparición de colonias puntiformes que pudieran ser de *Bordetella*. Observadas con Lupa, tienen un aspecto gris aperlado, brillante, convexo, con la apariencia de gotas de mercurio (20,21).

2.4.4 Sensibilidad antimicrobiana

La prueba de sensibilidad antimicrobiana es una de las tantas armas con las que contamos en el laboratorio para ayudar a los profesionales en medicina controlar los procesos infecciosos que se desarrolla en los pacientes. Pero para poder desarrollar todo el potencial con que se cuenta hay que cumplir con un requisito fundamental: es necesario lograr el aislamiento del agente productor del cuadro clínico mediante los cultivos correspondientes; hay un axioma que no pierde actualidad y sobre el que es indispensable insistir: primero cultivar y luego medicar (22).

La razón fundamental de una prueba de sensibilidad es la de realizar una predicción a través de una prueba in vitro, observar la respuesta del paciente a un determinado antibiótico, la evolución de la infección y detectar una resistencia relevante del organismo que está causando este proceso infeccioso (23).

2.4.4.1 Métodos para determinar la sensibilidad bacteriana

Contando ya con un agente etiológico aislado el laboratorio pueda ser uso de las diferentes técnicas que se han desarrollado para guiar de la mejor manera posible al médico, en la elección del antibiótico a emplear en el control del proceso infeccioso las cuales son: Difusión en agar (Técnica de Bauer y Kirby), dilución en agar y Macro y microdilución en caldo. Que para efectos de este trabajo solamente se explicará Difusión en Agar (Técnica de Bauer y Kirby) (Fig.4) (24).

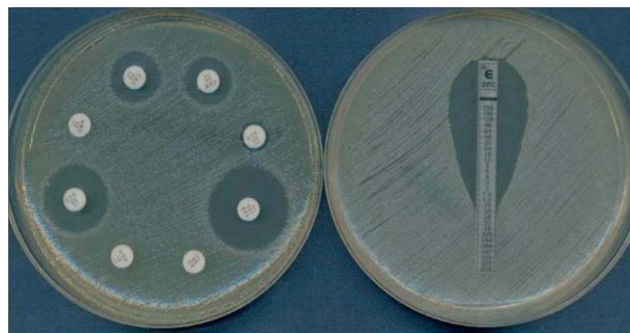


Figura 4. Métodos para determinar la sensibilidad bacteriana (52).

Independientemente del método a emplear, hay 3 facetas o pasos que se deben considerar: el medio de cultivo a emplear, el antibiótico a utilizar y la cepa bacteriana a probar. Cualquiera que sea el método hay que controlar cada una de estas 3 variables y cada una de ellas es importante a su manera (24).

1) *El medio de cultivo a emplear*: el más conocido es el Mueller- Hinton ya sea en agar o en caldo, el cual se emplea en los métodos de difusión y de dilución en agar; además, el reforzado con sangre de carnero al 5%, para la detección de la sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae* (25), todos estos medios de cultivo deben ser preparados de la mejor manera posible, ajustando el pH, y asegurándose de que la concentración del agar sea la correcta. En especial, para la técnica de la difusión en agar, estos parámetros deben ser aún más claramente controlados. Un agar muy suave, puede producir falsa sensibilidad y a su vez, un agar muy duro, puede producir una falsa resistencia, al incidir en un cambio en la velocidad y distancia de la difusión del antibiótico (26).

También cambios en el pH, pueden producir falsa resistencia o falsa sensibilidad al incidir en la polaridad de los antibióticos. A la hora de preparar el medio de cultivo, este pH, debe ser correctamente regulado. otro punto de gran importancia es la profundidad del agar, la cual debe ser exactamente de 4 mm. Un agar delgado, permite una mejor difusión de los antibióticos produciendo una falsa sensibilidad, pero también un agar

con más de 4 mm de profundidad puede producir una disminución en la migración del antibiótico con la consiguiente falsa resistencia. Además, los medios de cultivo deben ser lo más frescos posibles, con no más de 7 días de preparados y siempre deben ser guardados en bolsas plásticas selladas y a 4 °C. Cada vez que se va a preparar el medio de cultivo, hay que asegurarse que el polvo esté en buenas condiciones, sin cambios de color y de consistencia y por supuesto, que sea polvo (no hidratado) (25,26).

2) *En cuanto al antibiótico:* podemos tener cuatro tipos de posibilidades, discos de papel impregnados con una concentración conocida del antibiótico, pastillas con una concentración conocida del antibiótico, preparaciones farmacéuticas del antibiótico o tiras de plástico con una matriz propia y una gradiente decreciente del antibiótico determinado. Lo importante es que estas diferentes presentaciones del antibiótico estén en la mejor condición posible, que se respete la cadena de frío, que no se humedezcan, y que realmente contengan la concentración del antibiótico que dice tener (25,26).

3) *En cuanto a la cepa bacteriana:* es indispensable que sea fresca (un periodo de incubación no mayor de 24 horas) y que haya sido crecida en un medio de cultivo no inhibitorio. Siempre se debe ajustar la concentración del inóculo de la cepa a probar, esto significa que debemos estandarizar dicho inóculo, esta estandarización puede realizarse utilizando el estándar de Mcfarlane utilizando un nefelómetro. En ambos casos, realización se hace hasta el estándar 0.5 de Mcfarlane (25,26).

Sensibilidad bacteriológica por difusión en agar (Técnica de Bauer y Kirby)

La técnica de difusión en agar es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente. Esta técnica, el inóculo bacteriano llevado a una concentración igual a la del estándar 0.5 de Mcfarlane, se aplica sobre la superficie de una placa seca de agar Mueller – Hinton que tenga un pH entre 7.2 y 7.4, medido a temperatura ambiente y una vez solidificarlo el medio de cultivo. La sepa se debe estriar sobre la superficie del medio solidificado, una vez realizado esto, en un plazo no mayor de 15 minutos se procede a colocar los discos o las pastillas con el antibiótico. Si se emplean placas de petri de 100 mm de diámetro, el número máximo

de discos a colocar es de 5 (26). Luego, la placa se incubaba a 35° por un periodo no mayor de 18 horas. Cada placa es observada en una luz indirecta y cada halo de inhibición es medido utilizando una regla graduada en la forma adecuada. En el caso que no se presente un halo no se debe de reportar 0 mm, se debe reportar 6 mm, ya que ese es el diámetro del disco. Los diámetros alrededor de cada disco son medidos y su interpretación se basa en guías publicadas cada cierto tiempo por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y el organismo es reportado como sensible, intermedio o resistente al antibiótico testado. La técnica de difusión en agar, presenta varias ventajas como: fácil de efectuar y de gran reproducibilidad, bajo precio, no requiere equipo especial, sus resultados son fácilmente interpretados por los médicos, es muy flexible a la hora de escoger los antibióticos a probar. Dentro de sus desventajas está el hecho de que brinda sólo información cualitativa; Otra desventaja y la más importante, es que esta técnica debe ser modificada para poderla emplear en organismos fastidiosos o de crecimiento lento (26).

Multiresistencia a antibióticos

El surgimiento de bacterias resistentes son resultado de varios factores: el Uso incorrecto de antibióticos para tratar enfermedades que no son causadas por bacterias, interrumpir el tratamiento y no cumplir con la dosis y tiempo indicado, la automedicación, el almacenamiento incorrecto de los antibióticos que provocan disminución en su acción, son algunas de las causas de la selección de bacterias resistentes a antibióticos (27). Los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos incluyen: la inactivación de los antibióticos por hidrólisis, alteración del sitio blanco de acción del antibiótico, evitando que éste pueda acceder al sitio blanco haciendo que las células sean irreconocibles para el antibiótico y la expulsión del antibiótico desde interior de la célula a través de los transportadores de salida unidos a la membrana. Estos mecanismos de resistencia ocurren principalmente como resultado de mutaciones de genes endógenos y/o transferencia lateral de genes de resistencia de otros patógenos (28). Algunos investigadores predicen que para el año 2035 todas las bacterias serán multirresistentes. Lo que es un hecho es que se requieren nuevas estrategias para contender con este grave problema que nos acecha. Entre las estrategias que se proponen se encuentran las vacunas para

prevenir infecciones, los péptidos antimicrobianos o la terapia con fagos, diseñadas para matar bacterias utilizando sitios blancos que no serán susceptibles a la evolución genética, y el uso de anticuerpos o probióticos (29).

A pesar de que estos antibióticos eran verdaderas “drogas maravillosas” en el momento de su introducción, no pasó mucho tiempo antes de que emergieran cepas bacterianas resistentes. Las pruebas de sensibilidad se convirtieron en una necesidad práctica. El optimismo inicial respecto de que los antibióticos pondrían un punto final a las infecciones bacterianas dio paso a la aceptación renuente de que los recursos quimioterapéuticos deben ser manejados con prudencia para controlar la enfermedad. Unas pocas bacterias, han conservado su susceptibilidad predecible a la penicilina. esta sensibilidad persistente es, lamentablemente, la excepción más que la regla. Las bacterias fueron tan inventivas que se instalaron cepas que requieren la presencia de un antibiótico terapéutico para su crecimiento. la ingenuidad de los químicos en la industria farmacéutica también ha sido grande y se refleja en la gran cantidad de antibióticos disponibles (30).

Antes de medicar a un paciente, se debe de asegurar de que se hayan recolectado las muestras para realizar los cultivos que requiere un buen diagnóstico; esto asegurará hasta un máximo las posibilidades de aislar un agente etiológico. Siempre es conveniente revisar si realmente el paciente está ingiriendo el antibiótico como corresponde, si está siendo administrado en el plazo y en la concentración adecuada para este paciente, sin olvidar la idiosincrasia del mismo (30).

Cabe recordar que muchas veces, lo que se observa in vitro no corresponde a lo observado in vivo, razón por la cual, los médicos deben poner especial atención en el seguimiento clínico de su paciente. La no concordancia entre los hallazgos en el laboratorio y la respuesta del paciente a la terapia antimicrobiana, tiene diferentes explicaciones, algunas de las cuales tienen relación con el comportamiento de los microorganismos y otras con el comportamiento individual de cada paciente (31).

2.5 Antibióticos

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferentes comportamientos farmacocinética y farmacodinámicos, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para



Figura 5. Presentaciones de antibióticos (32).

las células de nuestro organismo (Fig.5). El objetivo de los antibióticos es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos (32). De modo que, el Uso indebido de estos antibióticos causaría la resistencia bacteriana, provocando que se utilicen antibióticos mucho más fuertes que pueden producir una toxicidad mucho más elevada de lo esperado en el organismo, produciendo un daño mucho mayor que el mismo microorganismo pueda efectuar.

2.5.1 Clasificación según el espectro de acción

Amplio: aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes.

Reducido: antibióticos sólo activos sobre un grupo reducido de especies (33).

2.5.2 Clasificación según por familia y clase

Cada clase de antibiótico es metabolizado en forma diferente por nuestro organismo, no es lo mismo un betalactámico con escasa penetración celular, que un macrólido que se concentra a nivel intracelular. Esto es lo que llamamos farmacocinética: absorción, distribución, eliminación. Por otro lado está la farmacodinamia que intenta comprender las relaciones entre las drogas y sus efectos, tanto deseables (muerte bacteriana en nuestro caso) como indeseables. Los antibióticos pueden clasificarse de

acuerdo a la forma en que producen la muerte o inhibición bacteriana, en antibióticos tiempo dependientes y concentración dependientes (34).

Betalactámicos

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semi sintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gram negativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su empírico y eficacia en determinadas situaciones. Se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (32,33).

1) *Penicilinas*: Son un grupo de antibióticos de origen natural y semi sintético que contiene el núcleo de ácido 6- aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tioazolidínico. De acuerdo a su origen y espectro de acción se pueden clasificar en: penicilinas naturales (G y V), penicilinas resistentes a las penicilinasas bueno estafilocócicas (oxacilina, metcilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbencilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina).

2) *Cefalosporinas*: Son productos de origen natural derivados de productos de la fermentación del *Cephalosporium acremonium*. Contienen sí un núcleo constituido por el ácido 7 – aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazino. Se definen cuatro generaciones de cefalosporinas. Las de primera generación (cefadroxil, cefazolina, cedalexina, cefradina), las de segunda generación (cefuroxime), las de tercera generación (cefotaxime, ceftriaxona, ceftazidime, cefeperazona) y las de cuarta generación (cefepime, cefpirome). Las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a los cocos gram positivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esa actividad, en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos gram negativos, con algunas excepciones.

Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, bueno estafilococos resistentes a la meticilina.

3) *Monobactámicos*: Aztreonam, el único monobactámico disponible para uso clínico, posee una excelente actividad sobre bacterias gram negativas aerobias y facultativas, por el contrario, carece de actividad frente a gram positivos y bacterias anaerobias.

4) *Carbapenemes*: Son una clase única de betalactámico que presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. Imipenem es el primer carbapenem desarrollado para uso clínico. Es un derivado semi sintético producido por *Streptomyces spp*. Otros compuestos más modernos son meropenem y ertapenem. Su actividad bactericida se extiende a cocos gram positivos incluyendo estafilococos sensibles a meticilina, enterococcus resistentes a betalactámicos, algunas especies de pseudomonas.

El mecanismo de acción de los betalactámicos es inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano.

Glucopéptidos

Se trata de antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana. Actualmente hay 2 fármacos de uso clínico: vancomicina y teicoplanina. La vancomicina es un antibiótico bactericida de espectro reducido (solo actúan sobre bacterias gram positivas), que se obtienen de *Streptomyces orientales*. La teicoplanina tiene una estructura similar a la vancomicina y un perfil de actividad también similar. Los glicopéptidos son activos además sobre estreptococos, corinebacterias, *Bacillus spp*, bueno algunos actinomycetales y *Clostridium spp*. Los glicopéptidos inhiben la síntesis y el ensamblado de la segunda etapa del peptidoglicano de la pared celular mediante la formación de un complejo con la porción D- alanina pentapéptido precursor. Además los protoplastos alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y altera la síntesis de ARN (32,34).

Aminoglucósidos

Son antibióticos que se caracterizan por la presencia de 2 o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo ciclotol. Según los aminoazúcares con clasifican en familias; en nuestro país los aminoglucósidos disponibles son: gentamicina, amikacina y estreptomina para uso parental. La tobramicina se encuentra disponible en presentación para uso oftalmológico. La espectromicina no tiene aminoazúcares, y a pesar de ser considerada muchas veces en el grupo, no es un verdadero aminoglucósido. Son altamente polares, policationes solubles en agua y generalmente estables al calor y cambios de pH entre 5 y 8. Los aminoglucósidos generalmente son activos frente a los estafilococos, y bien *Staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa negativo resistentes a la metilina también lo suelen ser a los aminoglucósidos. Los aminoglucósidos se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria la incorporación de estos antibióticos en el interior de la bacteria, especialmente en los cocos gram positivos, es mayor al administrarse con antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana, como son los betalactámicos y glicopéptidos (32,33).

Macrólidos

Los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina), las lincosaminas (lincomicina, clindamicina), los cetólidos y las estreptograminas son antibióticos que comparten un mecanismo de acción similar pero tienen una estructura diferente; Los macrólidos se clasifican de acuerdo al número de carbonos: 14 carbonos (eritromicina y claritromicina), 15 carbonos (azitromicina) y 16 carbonos (espiramicina). Su mecanismo de acción es unirse a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpiración y traslocación (32,33)

Quinolonas

Se trata de un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1.

Diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Al igual que las cefalosporinas, las quinolonas se clasifican en generaciones. Si se leen diferentes libros o artículos se encuentran clasificaciones diferentes. Las quinolonas de primera generación (ácido nalidíxico y ácido pipemídico) tienen actividad sobre enterobacterias y son inactivas sobre gram positivos y anaerobios. Alcanzan concentraciones muy bajas en suero, su distribución sistémica es baja y solo se usan para casos de infecciones urinarias bajas por su buena concentración urinaria. Las de segunda generación (norfloxacin y ciprofloxacina) son llamadas fluoradas, ya que incorporan un átomo de flúor y presentan mucho mayor actividad sobre gram negativos. La ciprofloxacina es la quinolona con mejor actividad sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Tienen una moderada actividad sobre gram positivos, son activas sobre gérmenes atípicos y no presentan actividad sobre anaerobios. En el caso de norfloxacina, las concentraciones en suero y tejidos son bajas, por lo que no se usa en infecciones sistémicas, siendo una buena opción en el caso de infecciones urinarias no complicadas.

Las de tercera generación (levofloxacina, gatifloxacina) retienen la actividad sobre gram negativos y mejoran la actividad sobre gram positivos. Es importante su actividad sobre estreptococos y especialmente sobre *S. pneumoniae*. Además tienen una muy buena actividad sobre gérmenes atípicos. Las de cuarta generación (moxifloxacina, trovafloxacina) retienen actividad sobre gram negativos y aumentan la actividad sobre gram positivos, especialmente *S. aureus* y *Enterococcus*. Además agregan actividad sobre microorganismos anaerobios. Las quinolonas interactúan con 2 sitios diferentes pero relacionados, dentro de las células bacterianas: la ADN girasa y la topoisomerasa IV. La primera es más sensible a la acción de las quinonas en caso de gérmenes gram negativos, mientras en gram positivos la más sensible es la topoisomerasa IV. Las quinolonas inhiben la síntesis de ADN y a concentraciones altas también la de ARN. Cuando interacciona la ADN girasa, la inhibición ocurre rápidamente, mientras que cuando interacciona con la topoisomerasa IV la inhibición ocurre más lentamente. Este

efecto es debido a la habilidad de las quinolonas de estabilizar los complejos de ADN y topoisomerasas II (32,34).

2.5.3 Clasificación según el mecanismo de acción

Los mecanismos por los cuales un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en: inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de la membrana citoplasmática, inhibidores de vías metabólicas (32).

III. ANTECEDENTES

López – Galvan (2013), en México comparó la relación existente en el cuadro básico de medicamentos y las tarjetas de prueba del equipo Vitek 2, con respecto a la sensibilidad antibiótica de diversos microorganismos aislados de distintas muestras biológicas en el Hospital General Regional No. 25 Zaragoza, Cd de México; los resultados demuestran que la frecuencia de bacterias gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*, presentan actividad microbiana e infectan a pacientes inmunocomprometidos por procesos de cateterización, procedimientos quirúrgicos y/o arrastre de contaminantes por parte del personal médico y paramédico que atienden a los derechohabientes, usando mal los esquemas de antibióticos, tratamientos truncados y no adecuados tratamientos empíricos sin tener de base un cultivo previo (35).

En Estados Unidos de América, Bidell MR et al. (2016), realizaron un estudio titulado “Efecto de la recepción previa de antibióticos en la distribución de patógenos y el perfil de resistencia a antibióticos de patógenos gramnegativos en pacientes con infecciones del tracto urinario de inicio hospitalario” encontraron que en 5574 cultivos el 49.5% fueron positivos para *Escherichia coli*, 17.1 % *Klebsiella pneumoniae* y 8.2% *Pseudomona aeruginosa*. Se aisló *Pseudomona aeruginosa* principalmente en pacientes con ≥ 2 exposiciones previas a antibióticos (12.6%), se asociaron con incidencias más altas de resistencia a fluoroquinolonas y resistencia a múltiples fármacos con presencia de β -lactamasas (36).

Rincón-León et al (2016), de 2009 a 2012 en la Unidad de Medicina Familiar No. 11, Delegación Estatal en Chiapas, IMSS, realizaron un estudio retrospectivo en donde el objetivo fue evaluar las tendencias en la resistencia de las bacterias aisladas de infección nosocomial; predominando los gérmenes Gram negativos mostrando tendencias al incremento en la resistencia antimicrobiana, 62.3 % bacterias Gram negativas, 22.8 % Gram positivas y 14.9 % levaduras; *Pseudomonas aeruginosa* pasó

del 47.1 al 60.5 % de resistencia a imipenem; *Escherichia coli* mostró un aumento en la resistencia a aztreonam, cefepime y ceftazidima, *Klebsiella pneumoniae* disminuyó su resistencia a amikacina y piperacilina/tazobactam; la resistencia a vancomicina fue del 3.6 al 25.5%. Concluyendo que es fundamental contar con programas y planes para el uso racional y basado en evidencia de los antimicrobianos, así como la difusión y apego a las guías de práctica clínica y la implementación de programas innovadores de prevención y control de infecciones nosocomiales, técnicas de aislamiento y cuidados generales (37).

Duarte-Raya Fidencia y Granados Ramírez Martha (2017) en México, evaluaron la resistencia antimicrobiana en cultivos clínicos de bacterias Gram positivas y negativas en un hospital de tercer nivel usando las normas CLSI como fundamento teórico; analizaron 2622 (51.2 %) cultivos con bacterias grampositivas y 2495 (48.8 %) con gramnegativas. En las grampositivas se observó tendencia creciente de la resistencia a ciprofloxacina, clindamicina, cloramfenicol, eritromicina, estreptomicina, penicilina, piperacilina/tazobactam, levofloxacino y en las gramnegativas, a amoxicilina/ ácido clavulánico, aztreonam, cefazolina, cefepime, gatifloxacina, imipenem, piperacilina, tetraciclina, ticarcilina/ácido clavulánico, trimetoprima/sulfametoxazol, meropenem, levofloxacino; concluyendo que el incremento acelerado de resistencia antimicrobiana obliga al control en administración de antibióticos (38).

Rodríguez Valdez (2017), realizó un estudio en donde el objetivo fue aislar e identificar bacterias (bajos las normas del CLSI) con actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de ambientes marinos extremos en Baja California Sur, México. Para esto aislaron bacterias de un ambiente marino hipersalino en la salina marina de Guerrero Negro y de un ambiente marino termal en una ventila marina hidrotermal somera adyacente a Playa Santispac en Bahía Concepción, presentando así actividad antimicrobiana de espectro variable contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* multi-drogo resistentes (39).

IV. HIPÓTESIS

Los métodos normativos de SEIMC y CLSI son más sensibles para la identificación de bacterias patógenas y su sensibilidad antimicrobiana en comparación de las técnicas tradicionales.

V. OBJETIVOS.

5.1 General

- Evaluar la sensibilidad bacteriana en cepas aisladas de muestras de exudado faríngeo de pacientes ambulatorios que acuden a un laboratorio clínico particular al implementar las técnicas con base a SEIMC 23/2006 y CLSI-M100-ED32:2022 contra la técnica tradicional usada habitualmente.

5.2 Específicos

- Identificar bacterias patógenas aisladas de muestras de exudado faríngeo de pacientes ambulatorios que acuden al laboratorio clínico particular, mediante la normativa de la SEIMC y la técnica tradicional habitual.
- Comparar la metodología normativa del SEIMC con la metodología tradicional, en la identificación de bacterias patógenas de muestras de exudado faríngeo de pacientes ambulatorios en la población en estudio.
- Contrastar la identificación de la sensibilidad bacteriana obtenida por la metodología normativa de las CLSI con la metodología habitual de las muestras de exudado faríngeo en pacientes ambulatorios en la población en estudio.
- Valorar la frecuencia de antibiogramas innecesarios de acuerdo con la metodología de CLSI en la población en estudio.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en los siguientes laboratorios microbiológicos y clínicos en la ciudad de Tapachula, Chiapas:

Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, Campus IV

Laboratorio Bienestar Análisis Clínicos y Microbiológicos

Laboratorio Clínico Particular

6.2 Tipo de estudio

Prospectivo, transversal, descriptivo y observacional

6.3 Población de estudio

Pacientes ambulatorios con alguna infección bacteriana en vías respiratorias altas que acudieron a los laboratorios clínicos particulares.

6.4 Tamaño de muestra y tipo de muestreo

Se recolectaron un total de 55 muestras de exudados faríngeos por muestreo intencionado.

6.5 Criterios de inclusión, exclusión.

Criterios de inclusión

- Pacientes de 5 años a 60 años
- Pacientes sin previa ingesta de antibióticos.
- Pacientes que deseen participar en el estudio

Criterios de exclusión

- Pacientes inmunosuprimidos (Mujeres embarazadas, con diálisis o con algún tipo de cáncer)
- Pacientes menores de 5 años o mayores de 60 años
- Pacientes con previa ingesta de antibióticos menor a 5 días
- Pacientes con ingesta de tratamiento herbolario.
- Pacientes con aseo bucal

6.6 Técnicas de laboratorio a utilizar

- Sembrado por cuadrantes

Los estudios de cultivos microbianos a menudo requieren la identificación de los organismos presentes en un cultivo. Cuando una pequeña porción de este cultivo se inserta en un medio nutriente que contiene agar, es posible obtener bacterias aisladas en unidades que forman colonias. Para ello se realiza los siguientes pasos:

1. Se divide la parte inferior de la caja Petri en cuatro partes iguales con un marcador.
2. Se esteriliza el asa y se estría el 1er cuadrante con un movimiento en forma de S.
3. Se trabaja en el sentido de las agujas del reloj, estriando cuadrante por cuadrante, esterilizando el asa antes de seguir a otro.

- Sembrado masivo

Este método es muy utilizado para obtener un gran número de microorganismos (incremento del inóculo), en la superficie de un agar. Para lograrlo, se realizan los siguientes pasos:

1. Se calienta el asa de inoculación hasta que quede color rojo intenso para eliminar cualquier microorganismo.
2. Dejar que el asa se enfríe durante 3-5 segundos.
3. Recoger una muestra del cultivo bacteriano a partir de un caldo o una placa Petri.
4. Levantar la tapa de la placa Petri que se va a sembrar en un ángulo de 45°.

5. Colocar el asa en la parte de atrás de la caja, tocar con el asa el medio y pasarlo a través de la superficie de la placa con un movimiento en forma de S en distintas direcciones por toda la placa.

- Microdifusión en disco-placa (Técnica de Kirby – Bauer)

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Comité for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

El antibiograma disco-placa consiste en:

1. Depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos.
2. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar.
3. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.
4. Se mide el diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco. Cada combinación de microorganismo-antibiótico tiene diámetros diferentes que implican que es Sensible, Intermedio o Resistente.

- Metodología SEIMC

La metodología que brinda SEIMC se divide en tracto respiratorio superior y tracto respiratorio inferior, siendo los pasos por seguir los siguientes:

Nota: tracto respiratorio superior abarca la zona *faringo-amigdalino*.

Material

Depresor sublingual

Hisopo sin medio de transporte

Tubo con medio de transporte

Técnica

Bajo visión directa, con la ayuda de un depresor lingual, se tocará con el hisopo en todas las partes con exudado, membranas o inflamación. Se deben frotar las criptas tonsilares y la faringe posterior. No tocar nunca la mucosa oral, lengua o úvula.

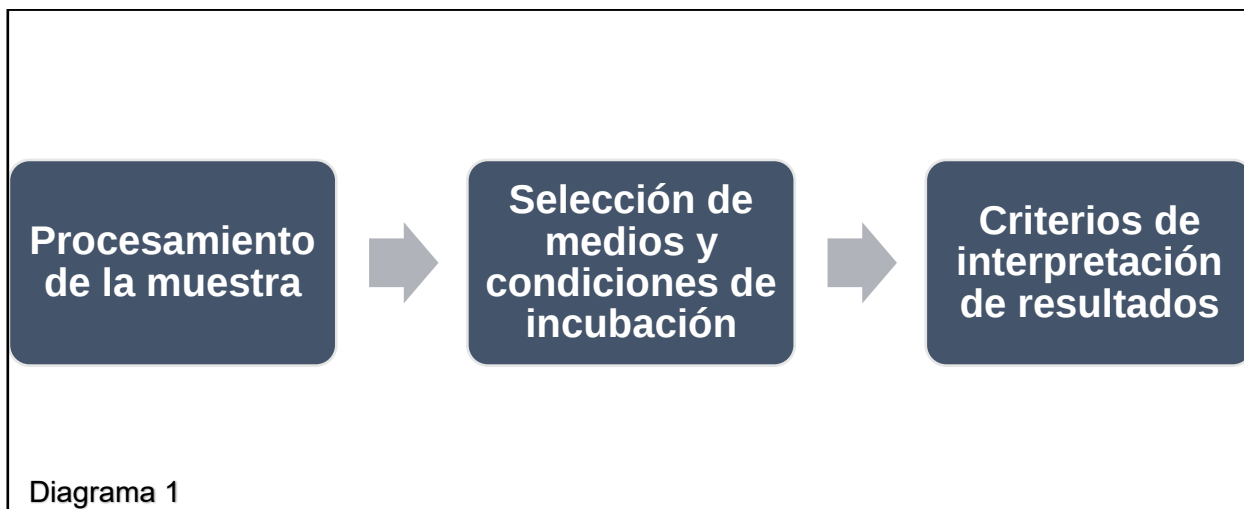
Número de muestras y/o volumen

Basta con lo obtenido con un solo hisopo

Transporte y conservación

Deben enviarse inmediatamente al laboratorio utilizar un medio de transporte.

Lo anterior se maneja de forma resumida en el diagrama 1, ampliando la explicación de la metodología en el anexo 9.



- Metodología tradicional

La metodología tradicional maneja que las muestras se deberán tomar al inicio del cuadro clínico, antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano.

Técnica

1. Se inclina la cabeza del paciente hacia atrás y se ilumina bien la cavidad orofaríngea.
2. Se empuja la lengua hacia debajo de modo que pueda observarse la parte posterior de la faringe.

3. Se introduce un hisopo hasta donde se encuentran las amígdalas y se frota contra la parte posterior de la mucosa faríngea de un lado al otro hasta la otra amígdala o contra cualquier mancha blanca o ulceración que se encuentre en la zona de las amígdalas.
4. Hay que evitar tocar la lengua, la zona periodontal o la mucosa de los carrillos.

Transporte de la muestra

1. Si la muestra no puede procesarse de inmediato en el laboratorio o no se puede trabajar dentro de las primeras 4 horas, deberá depositarse en un medio de transporte (Amies o Stuart).
2. Es necesario conocer los requerimientos de las bacterias que con mayor probabilidad se encuentran en la muestra, para evitar someterlas a condiciones que las deterioren y afecten el resultado. Algunos son sensibles a las bajas temperaturas y no se debe refrigerar la muestra, otros lo son a la desecación y algunos no resisten más de un día, aunque se mantengan en medios de transporte.

En los anexos 1,2 y 3 se describen pasos detallados a seguir para el procesamiento de muestras de las vías respiratorias altas.

Nota: El uso de agar sangre de carnero al 5% es prácticamente de uso obligatorio, debido a sus características que permiten la búsqueda de colonias hemolíticas, para poder apreciar este fenómeno se aconseja sembrar la muestra a una profundidad de 4 a 6 mm; sin embargo, se requiere emplear otros medios adicionales, que se basan en la sospecha clínica del agente que puede estar interviniendo.

Consideramos aceptable:

Realizar 2 corridas de cada muestra, para utilizarlas en ambas metodologías, técnica tradicional y técnicas basada en SEIMC y CLSI.

6.7 Variables de estudio

Variable dependiente: Antibióticos usados

Variable dependiente: Antibiógramas

Variable independiente: Cepas obtenidas de pacientes ambulatorios

6.8 Análisis estadístico

Se elaboró una matriz de datos en una hoja de cálculo de Excel, realizando un análisis descriptivo y comparativo, usando tablas y gráficos para representar los resultados obtenidos mediante la distribución t Student.

6.9 Tratamiento de RPBI.

Se trató las Cepas y Cultivos como RPBI, según establece la NOM 087-SEMARNAT-SSA1-2002, y se dispusieron en bolsas rojas calibre 200 hasta un 80% de su capacidad, siguiendo la ruta de recolección interna establecida, se trasladó y depositó en los contenedores rojos ubicados en el almacén temporal, una vez pesados y registrados en la bitácora, para resguardar los residuos como generador nivel 1 por 30 días hasta la entrega a la empresa especializada, para su tratamiento y su disposición final.

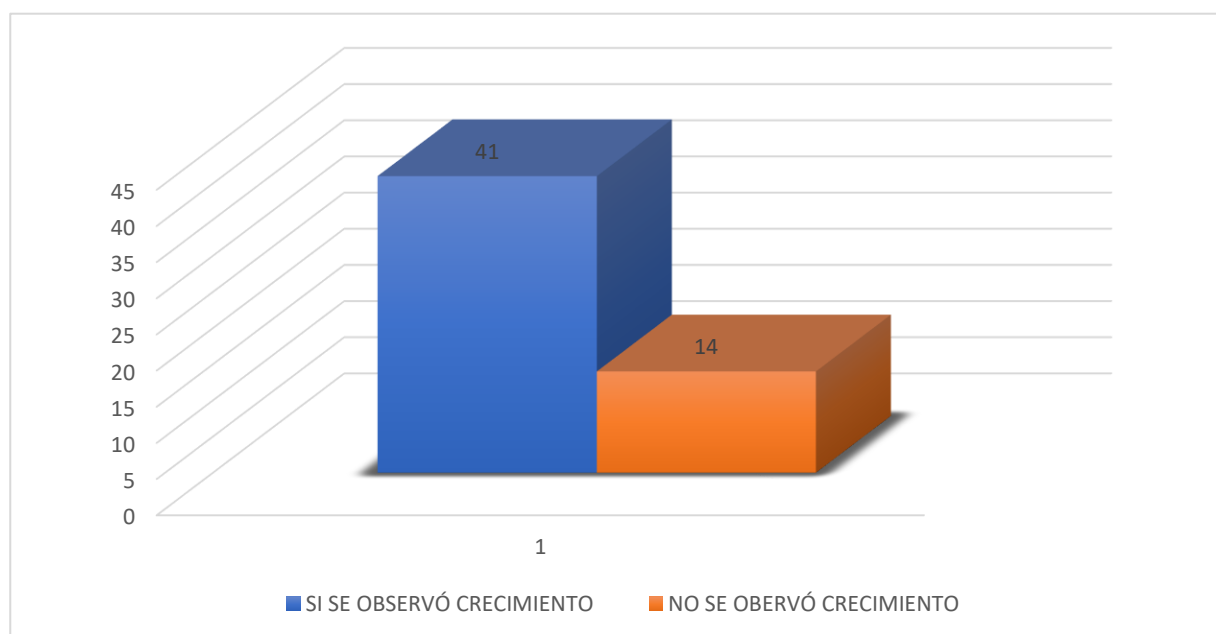
VII. RESULTADOS

El presente trabajo de investigación se realizó para evaluar la sensibilidad bacteriana en muestras de exudados faríngeos de 55 pacientes ambulatorios, aplicando dos técnicas: SEIMC y CLSI en relación con la técnica tradicional principalmente empleada en los laboratorios clínicos. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

7.1 Desarrollo y Crecimiento de Microorganismos patógenos

Para evaluar la técnica de identificación SEIMC se sembraron 55 muestras de exudado faríngeo y se observó crecimiento microbiano a las 48 hrs en algunas de ellas, encontrándose los siguientes resultados representados en el gráfico 1.

Gráfico 1. Crecimiento de microorganismos en muestras de exudados faríngeos.



En el Gráfico 1 se observa que 41 de las 55 muestras procesadas presentaron crecimiento microbiano, no obstante, en 14 muestras procesadas no se observó crecimiento de microorganismos.

Para realizar el método tradicional para la identificación de microorganismos se emplearon las 55 muestras de exudado faríngeo, encontrándose los siguientes resultados presentados en el gráfico 2.

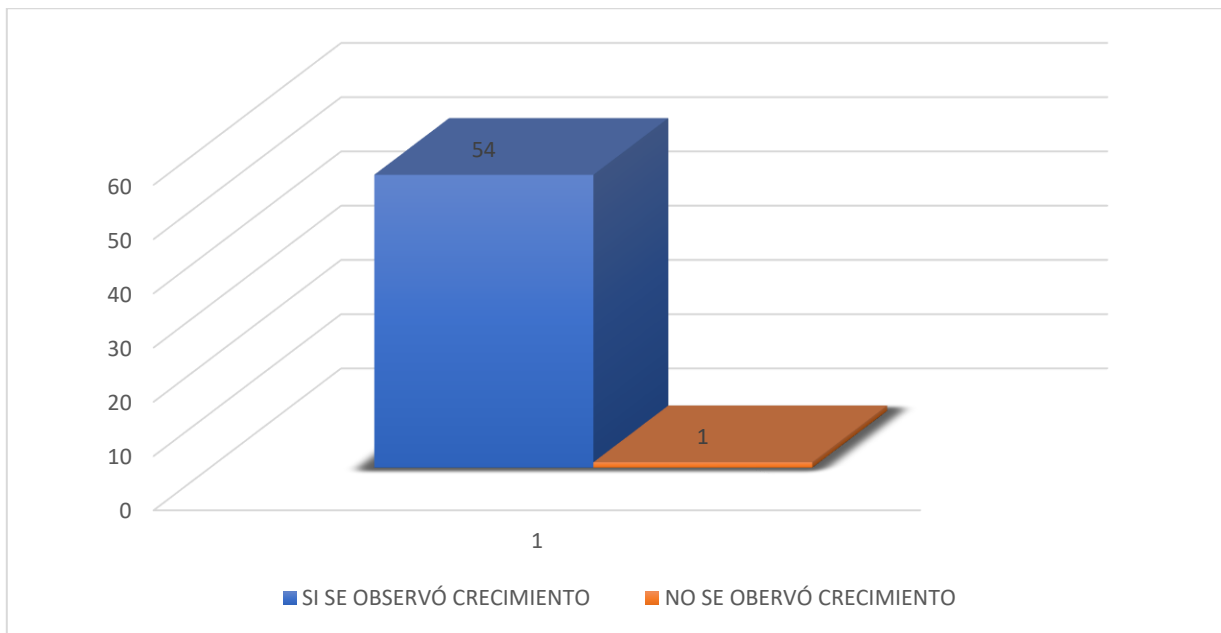


Gráfico 2. Crecimiento de microorganismos en muestras de exudados faríngeos.

En el Gráfico 2 se observa de las 55 muestras procesadas únicamente en 1 no se observó crecimiento microbiano.

7.2 Aislamiento e identificación de Microorganismos utilizando la normativa SEIMC y técnica tradicional.

Aplicando la normativa de SEIMC se aislaron 57 microorganismos presentes en las 55 muestras de exudados faríngeos, mismos que se muestran en el gráfico 3

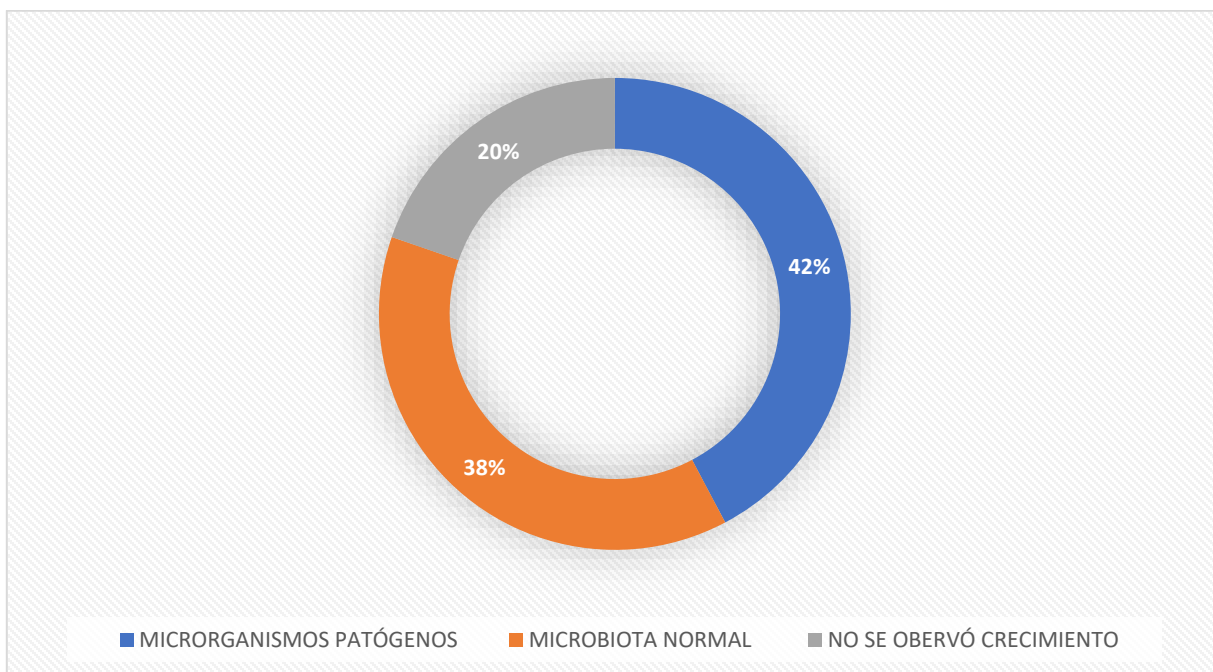


Gráfico 3. Aislamiento de microorganismos en los pacientes ambulatorios utilizando la normativa SEIMC.

En el Gráfico 3 los resultados analizados se basan en lo referido a la normativa SEIMC considerando entonces los siguiente, se observa que el 42% (30/57 microorganismos aislados) son considerados patógenos, el 38% (27/57 microorganismos aislados) son considerados microbiota normal no patógena; mientras 20% (14/55) de las muestras procesadas no se observó desarrollo de microorganismos.

Continuando el trabajo experimental, se aplicó la técnica de identificación tradicional, se aislaron 53 microorganismos aislados, mismos que se presentan en el gráfico 4.

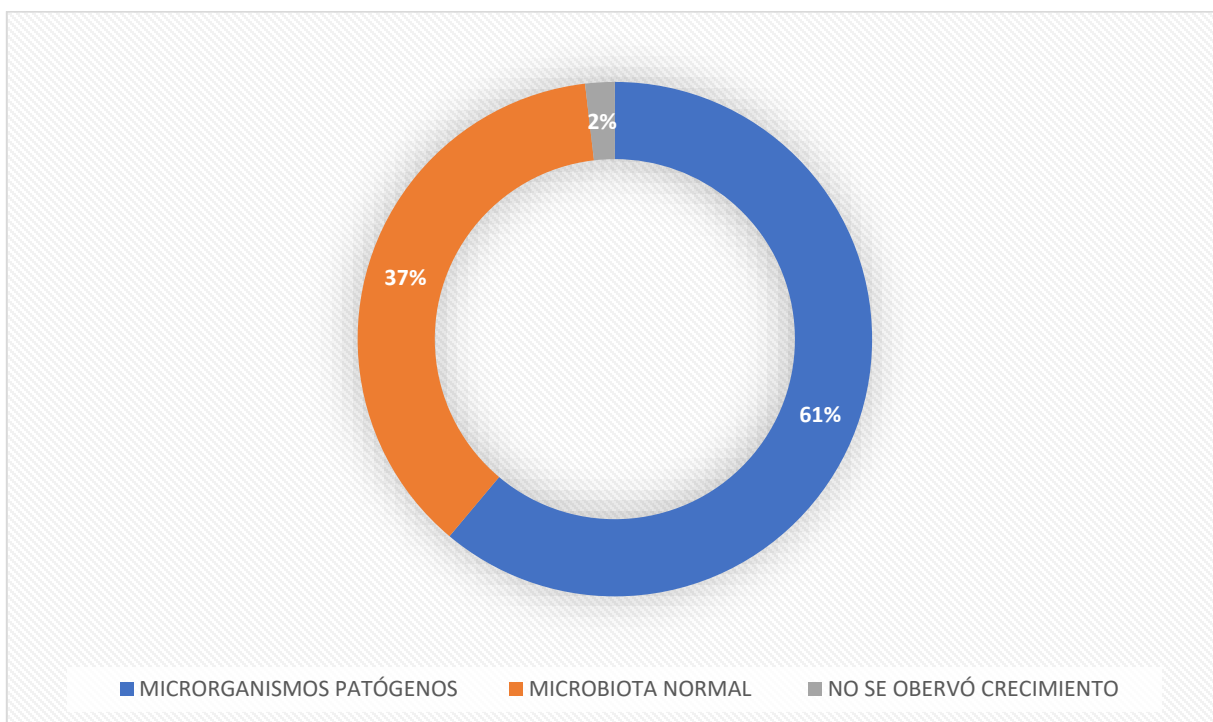


Gráfico 4. Aislamiento de microorganismos en los pacientes ambulatorios utilizando la Técnica Tradicional.

En el Gráfico 4 se observa que el 61% (33/53 microorganismos aislados) son considerados patógenos, en tanto 37% (20/53 microorganismos aislados) son considerados microbiota normal no patógena; en el 2% (1/55) de las muestras procesadas no se observó desarrollo de microorganismos.

7.3 Identificación de microorganismos aislados utilizando normativa SEIMC y técnica tradicional.

De los 57 microorganismos aislados siguiendo la normativa SEIMC se procedió a realizar la identificación bacteriana, la información capturada se presenta a continuación en el gráfico 5

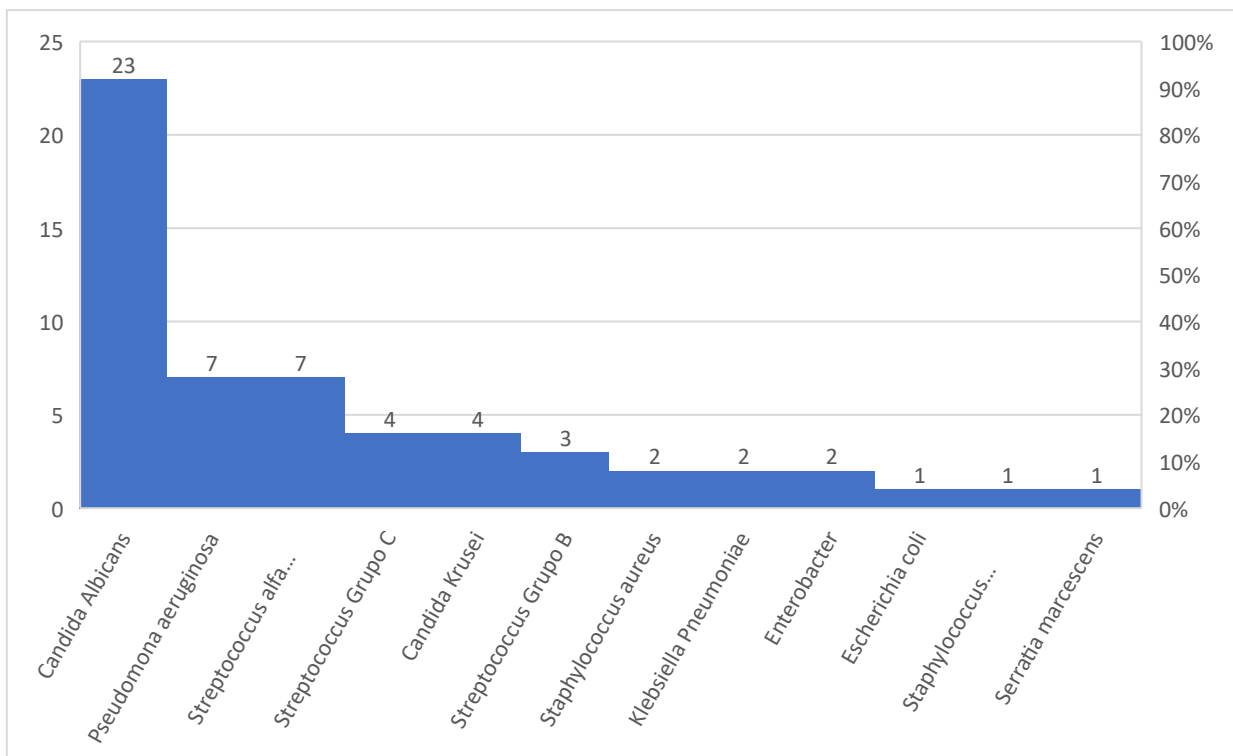


Gráfico 5. Identificación de microorganismos utilizando SEIMC.

En el Gráfico 5 se observa que los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *Candida albicans*, seguido de la presencia de *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus alfa hemolítico*, los microorganismos identificados con menor frecuencia son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Serratia marcescens*.

Prosiguiendo con la parte experimental, se continúa con la técnica de identificación tradicional reportándose 53 microorganismos identificados, mismo que se presentan en el gráfico 6.

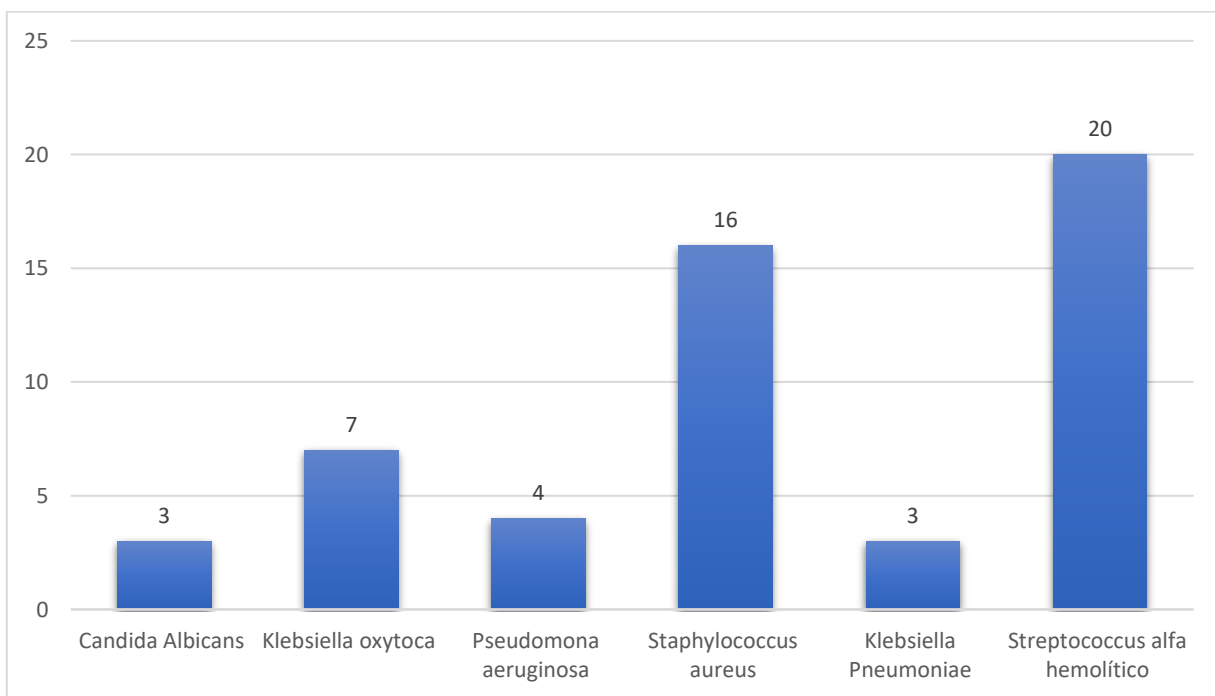


Gráfico 6. Identificación de microorganismos utilizando la Técnica Tradicional.

En el Gráfico 6 se observa que los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *Streptococcus alfa hemolítico*, seguido de la presencia de *Staphylococcus aureus*, los microorganismos identificados con menor frecuencia son *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*.

7.4 Sensibilidad bacteriana obtenida por la normativa CLSI y la técnica tradicional.

De los 57 microorganismos identificados se procedió a clasificarlos en patógenos y no patógenos, siendo los de mayor relevancia aquellos considerados patógenos por lo tanto siguiendo la normativa CLSI se les realizaron antibiogramas para evaluar la sensibilidad bacteriana, los resultados obtenidos se presentan en el gráfico 7.

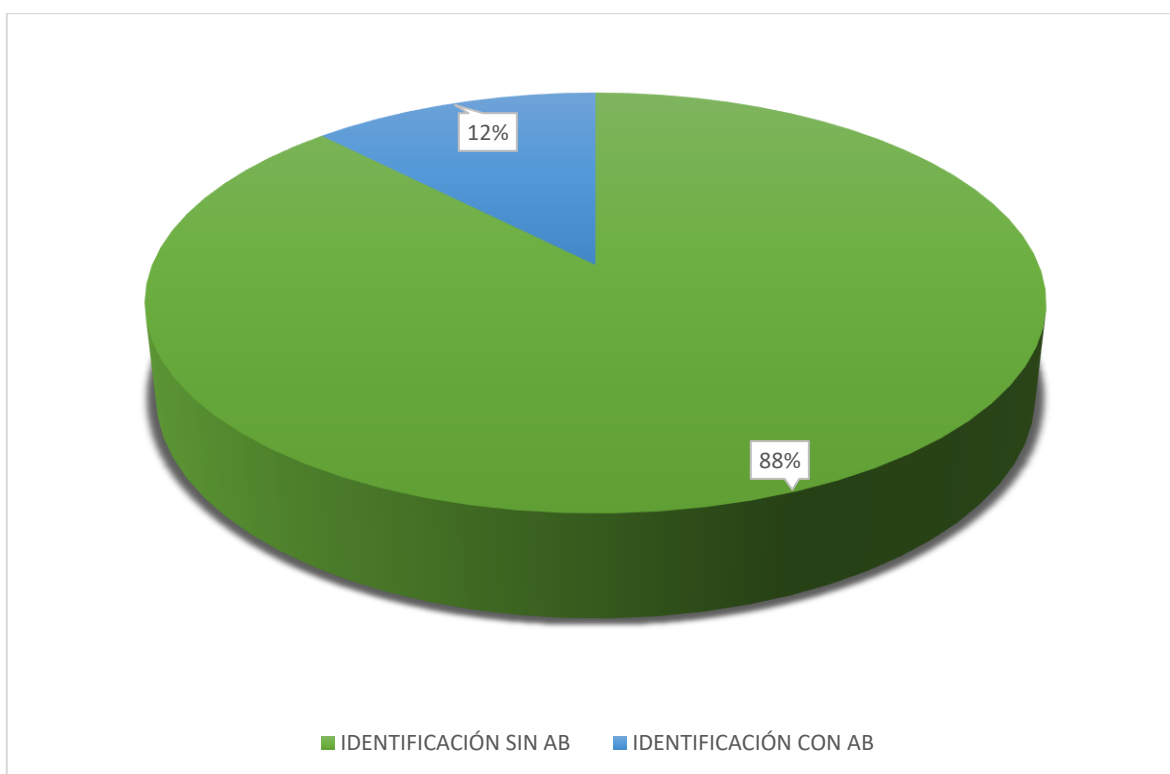


Gráfico 7. Aplicación de antibiogramas utilizando la normativa CLSI.

Se considera al 12% de los microorganismos identificados como patógenos por SEIMC, por lo tanto, se procede a realizarles antibiogramas, el 88% restante corresponde a Hongos o Bacterias clasificadas como microbiota normal no patógena.

Aplicando la técnica tradicional, se clasificaron los microorganismos identificados con anterioridad en patógenos y no patógenos, de los caracterizados como patógenos se les realizó antibiogramas, mismos que se presentan en el gráfico 8.



Gráfico 8. Aplicación de antibiogramas utilizando la Técnica Tradicional.

En el Gráfico 8, se consideran 57% de los microorganismos identificados como patógenos, por lo tanto, se procedió a realizarles antibiograma, por el contrario el 43% de los microorganismos restantes se consideraron microbiota normal.

7.5 Sensibilidad antimicrobiana según la normativa CLSI y técnica tradicional.

En el proceso realizado bajo la normativa SEIMC, de los 57 microorganismos aislados, se identificaron siete bacterias patógenas, pertenecientes al grupo β -hemolítico de *Streptococcus spp.*, se les realizaron respectivos antibiogramas para determinar su sensibilidad antimicrobiana, siguiendo la normativa CLSI, los resultados obtenidos se presentan en el gráfico.

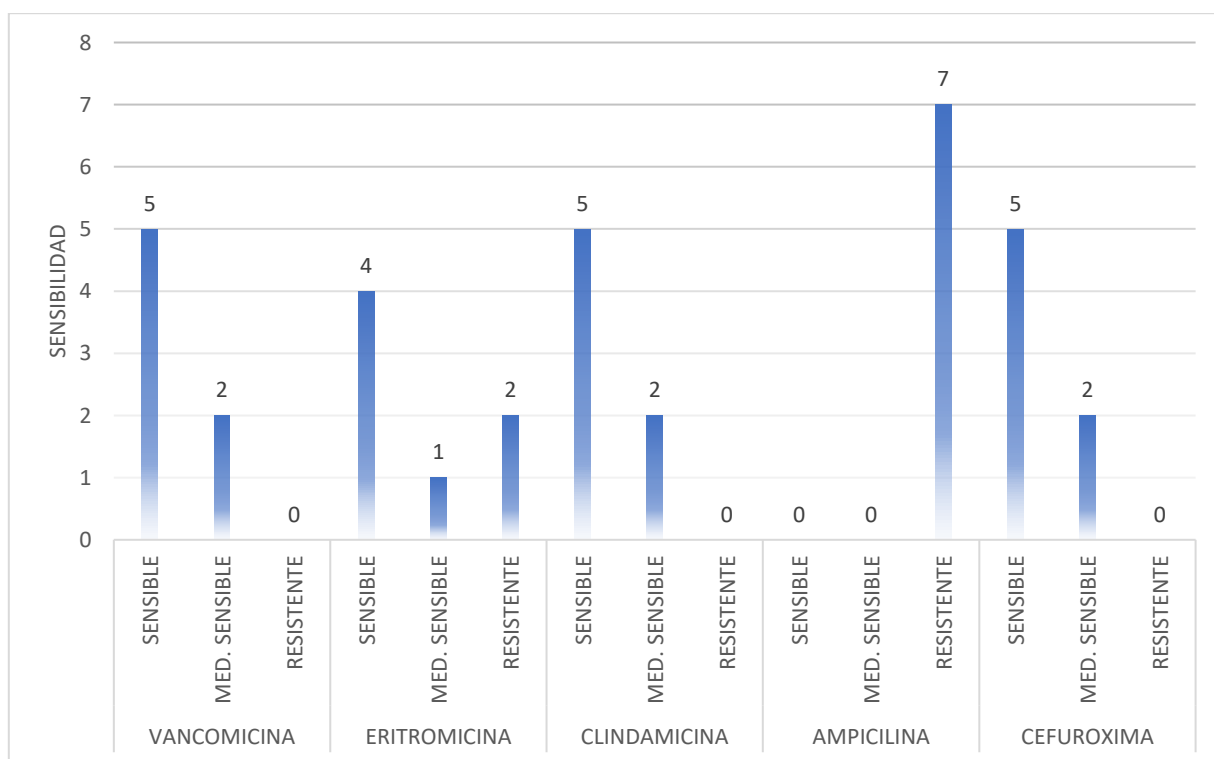


Gráfico 9. Sensibilidad antimicrobiana por CLSI.

El gráfico 9, presenta los niveles de sensibilidad que poseen los *Streptococcus* provenientes de las muestras obtenidas.

CLSI indica en los “Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos” en la tabla 1M (véase anexo 8), el uso de 5 antibióticos específicos para *Streptococcus* del grupo β -hemolítico, siendo estos vancomicina, clindamicina, cefuroxima, eritromicina y ampicilina. Se observa que las bacterias presentaron mayor sensibilidad a vancomicina, clindamicina, cefuroxima y eritromicina, por el contrario, todas las bacterias presentaron resistencia a ampicilina.

Sin embargo, con la técnica tradicional se identificaron 30 bacterias consideradas patógenas, a las que de igual forma se determinó su sensibilidad antimicrobiana, los resultados obtenidos se presentan en el gráfico 10.

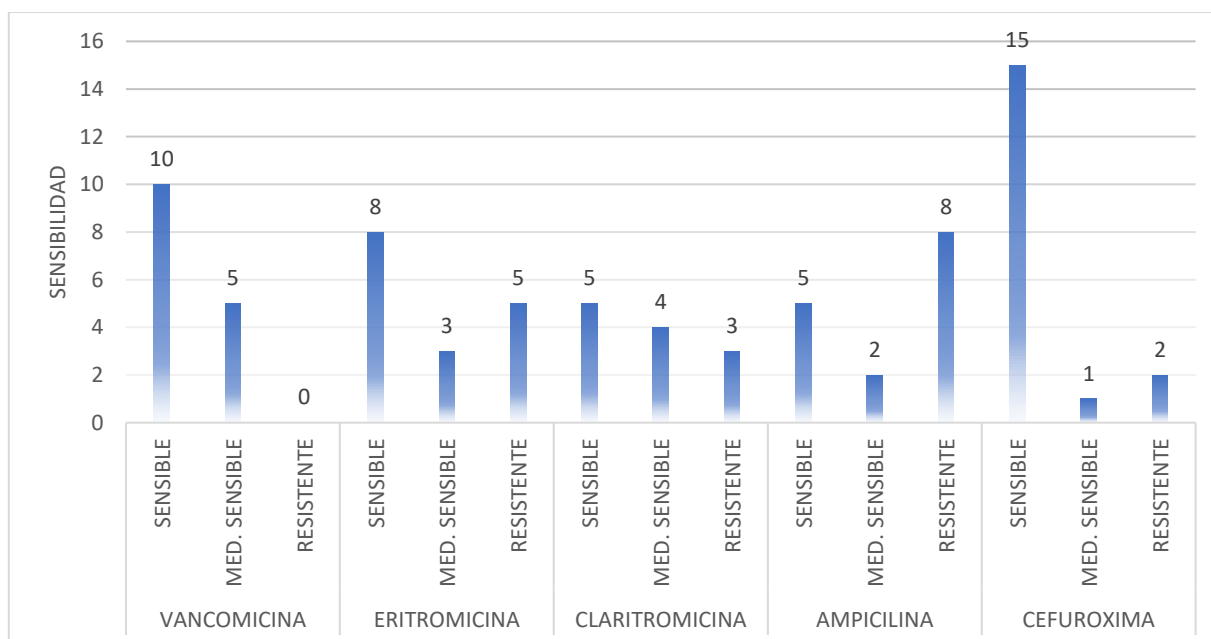


Gráfico 10. Sensibilidad a los antibióticos usando la técnica tradicional.

En el gráfico 10 se decidió emplear los mismos 5 antibióticos indicados por CLSI, para comparar los resultados reportados de ambos métodos, haciendo una excepción en el uso de claritromicina; reportándose que las bacterias presentaron mayor sensibilidad a vancomicina, eritromicina y cefuroxima. Cabe señalar que, las bacterias presentaron resistencia a ampicilina en 8 de los 15 antibiogramas realizados.

Es importante aclarar que en el montaje de la técnica tradicional, se contemplan 12 antibióticos ya sea para Gram positivos o Gram negativos, por lo tanto en conjunto se contabilizan 21 antibióticos en total, incluyendo los 5 anteriores, en los gráficos 11 a y 11 b se detalla el conjunto de estos antibióticos.

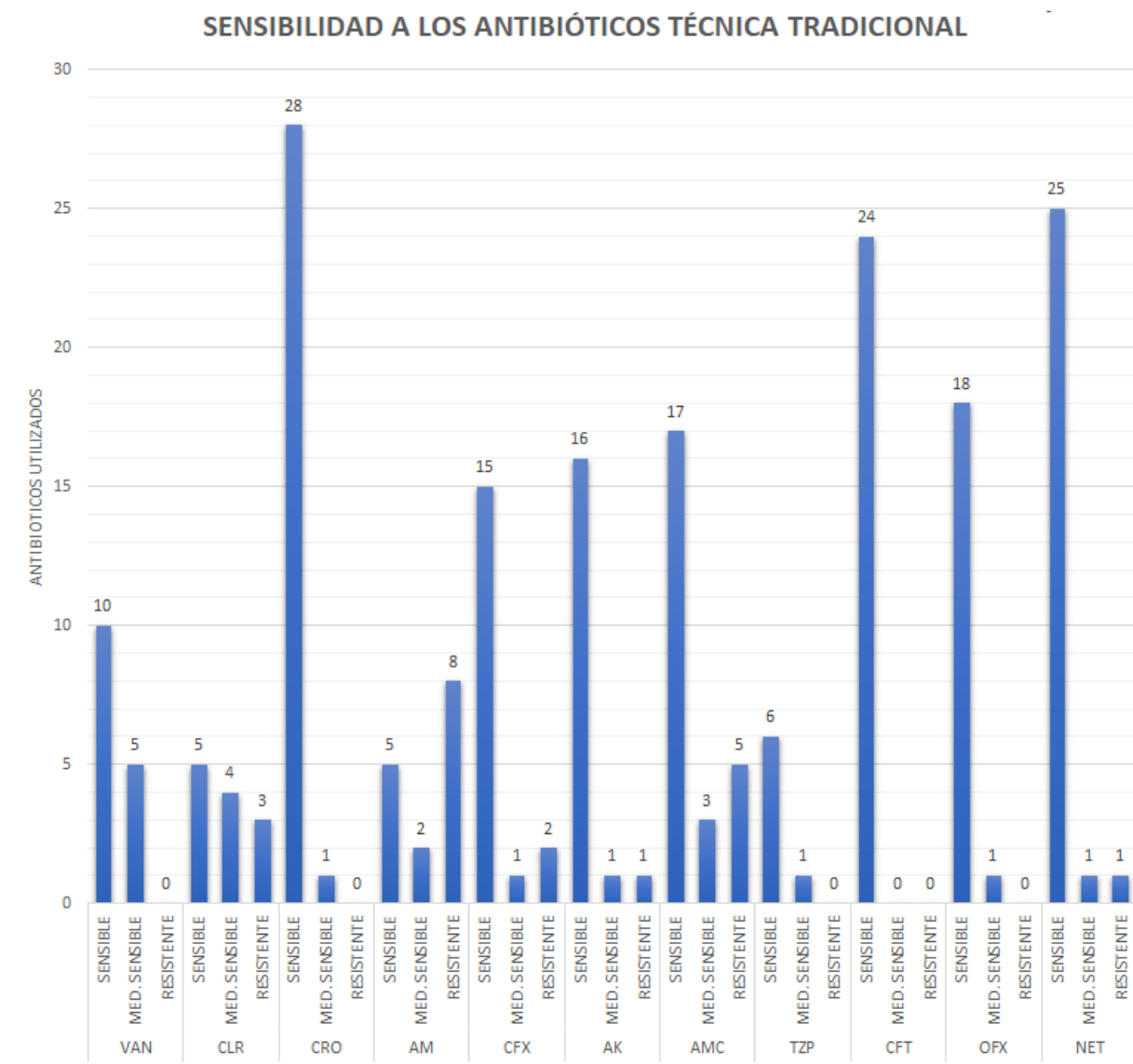


Gráfico 11a. Sensibilidad a antibióticos usando la técnica tradicional.

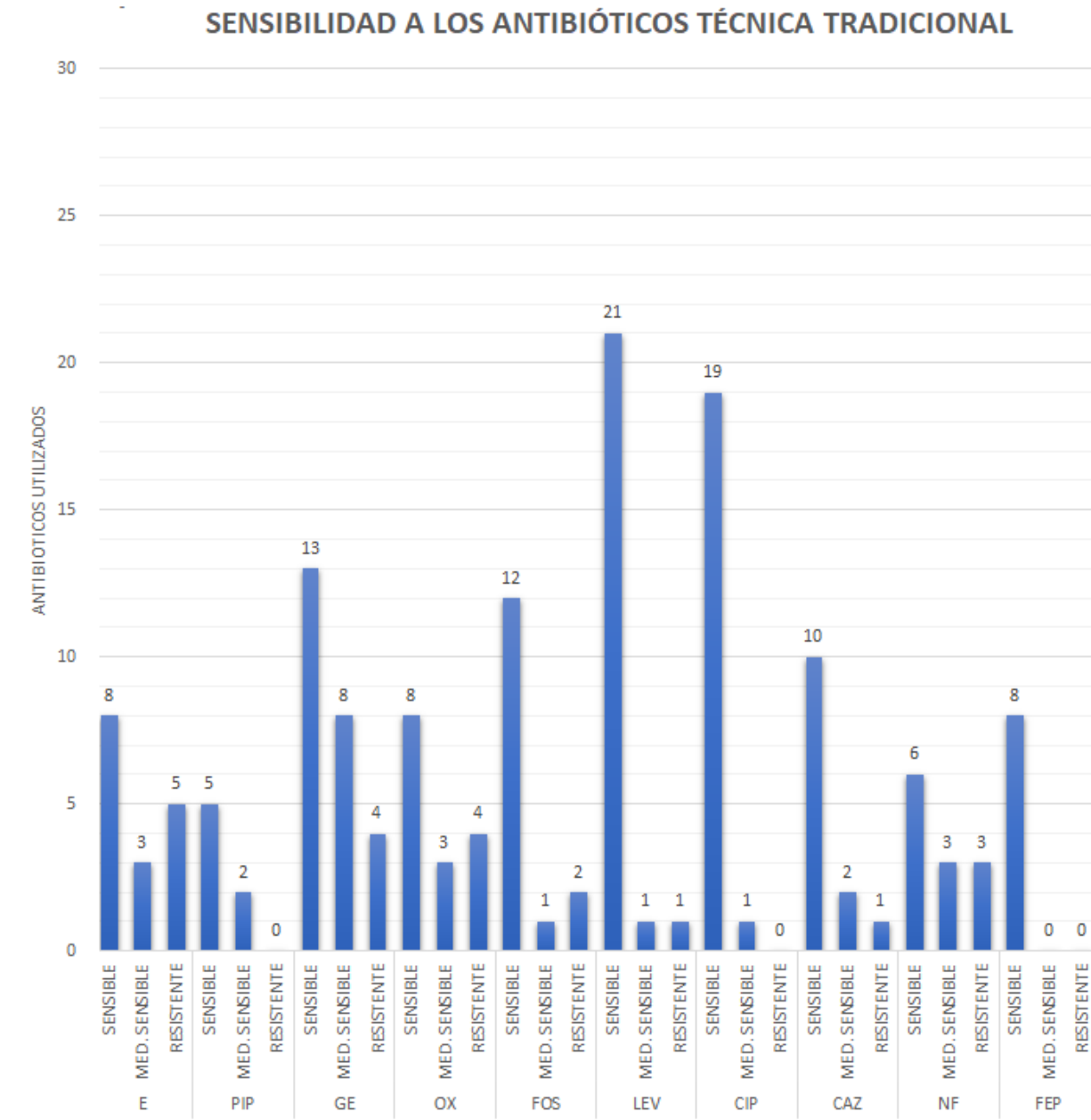


Gráfico 11b. Sensibilidad a los antibióticos usando la técnica tradicional.

En los Gráficos 11a y 11b se observa que, en los antibiogramas realizados, las bacterias presentaron sensibilidad bacteriana a ceftriaxona, netilmicina y cefotaxima, en 28 antibiogramas, en cambio, las bacterias presentaron resistencia a ampicilina, claritromicina, eritromicina y amoxicilina con ácido clavulánico en 8 antibiogramas montados.

Al realizar ambos métodos, se observó una diferencia significativa en la selección de las bacterias identificadas como patógenas que requerían la realización de antibiogramas, para la evaluación de la sensibilidad bacteriana.

Esta diferencia se presenta en el gráfico 12.

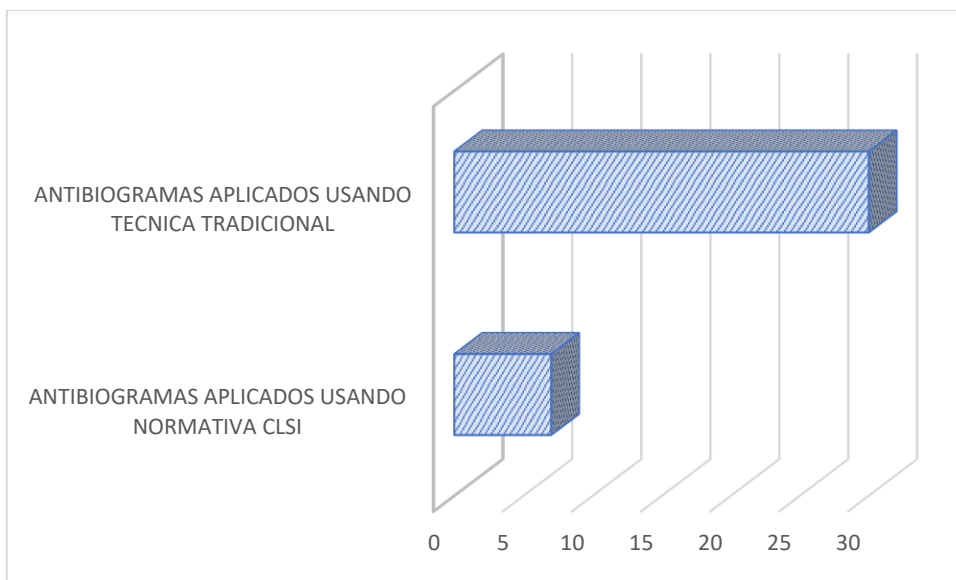


Gráfico 12. Diferencia de antibiogramas realizados

Se considera que el total de antibiogramas realizados usando la técnica CLSI fueron 7, en cambio, los antibiogramas hechos por medio de la técnica tradicional fueron de 30, habiendo una diferencia del 76.66% (23 antibiogramas)

VIII. DISCUSIÓN

Al procesar 55 muestras de exudados faríngeos, se analizó lo siguiente: comparando el desarrollo de microorganismos en los diferentes medios de cultivos, se obtuvo un mayor desarrollo microbiano previo a la realización de la técnica tradicional que la técnica de SEIMC, probablemente a que las muestras fueron tomadas y procesadas inmediatamente en el laboratorio donde se realiza la técnica tradicional.

En las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (**SEIMC**), se menciona que la idoneidad de las muestras enviadas depende del cumplimiento de una serie de medidas o reglas referentes a: procedimiento de obtención, cantidad enviada y transporte rápido y adecuado al laboratorio (40); sin embargo, la clasificación e identificación de los microorganismos se basa en el comportamiento y en su constitución, para ello se establecen comportamientos de individuos típicos de grupo, por lo que individuos no típicos, que se comporten de una manera diferente o cambios de cualquier tipo que afecten a su comportamiento (células estresadas) puede afectar al resultado final, como lo son cambios de temperatura, estrés de incubación, calidad de los componentes de los sustratos, la microbiota acompañante (41), entre otros, daría como resultado que se hubiese afectado la muestra impidiendo el desarrollo correcto de los microorganismos.

Usando la técnica descrita por SEIMC se logró identificar 57 microorganismos, con la técnica tradicional se identificaron 53, es importante recalcar que los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas, en el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial, en función de la fiabilidad de estas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de estas (42). SEIMC nos abre un mayor panorama para identificar algún microorganismo que anteriormente con la técnica tradicional no se incluía, aumentando la cantidad de pruebas bioquímicas recomendadas para la

correcta identificación, manejo de más medios de cultivo para un correcto desarrollo y el empleo de genotipificación bacteriana (43). En relación a los microorganismos de interés clínico, se observó que siguiendo los protocolos clínicos SEIMC referentes al artículo III el cual corresponde a Infecciones de las vías respiratorias superiores (44), 30 microorganismos de los 57 identificados son patógenos (42%), con la técnica tradicional 32 de los 53 microorganismos identificados, son patógenos; esto es producto de que en la técnica tradicional menciona que “Al microorganismo aislado en medio de cultivo se le considerará patógeno, a menos que pertenezca al grupo de la Microbiota normal no patógena” es decir, microorganismos como *Staphylococcus spp*, *Klebsiella spp* se consideran patógenos, independientemente de que sea de paciente ambulatorio sin ningún síntoma que lo aqueje, en cambio, bajo la normativa de SEIMC menciona que dependiendo de la edad y sintomatología del paciente se consideraran a los microorganismos como patógenos o como microbiota normal no patógena.

Con la técnica SEIMC se logró identificar 12 tipos diferentes de microorganismos, no obstante con la técnica tradicional únicamente se identificaron 6 tipos diferentes de microorganismos, ya que gracias a la actualización constante en la identificación de microorganismos se contempla mayor número de pruebas bioquímicas que ayudan a la diferenciación de microorganismos que anteriormente se catalogaban en una misma especie, dando como resultado mayor número de identificación y aislamiento microbiano. El mayor número de microorganismos identificados mediante SEIMC fue *Candida albicans*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus alfa hemolítico*; sin embargo, mediante la técnica tradicional *Streptococcus alfa hemolítico* fue el más identificado, seguido de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella oxytoca*.

De los microorganismos identificados mediante SEIMC, 7 bacterias fueron patógenas; con la técnica tradicional, las bacterias patógenas fueron 30; esta diferencia se debe a que SEIMC considera la edad, sexo y sintomatología del paciente para caracterizar a una bacteria como patógena, mientras que la técnica tradicional no contempla estas variables, por el contrario, si existe crecimiento bacteriano en el medio de cultivo se clasifica como patógena y se realiza antibiograma.

Desde el año 2012, Rodríguez-Baño,J; et. al, mencionan que desde la introducción de los antibióticos se ha comprobado cómo los microorganismos pierden con el tiempo su sensibilidad natural a estos agentes a través de la selección y transmisión de diversos mecanismos de resistencia (45), causando un gran problema a nivel mundial, ya que sin las medidas de control apropiadas es muy probable que el microorganismo que se haya aislado e identificado no sea el responsable de la enfermedad, dándole al paciente tratamiento que no necesita favoreciendo la multiresistencia bacteriana.

Así como existen medidas o estatutos para caracterizar como patógena o no a una bacteria, la normativa CLSI contempla medidas para obtener lo más cercano a una real sensibilidad bacteriana, que va desde el medio de cultivo de enriquecimiento y medidas de elaboración, hasta los tipos de antibióticos a usar dependiendo de la bacteria, ya que a diferencia de la técnica tradicional, el antibiograma debe de llevar únicamente 4 – 6 antibióticos para evitar el efecto pro- zona, sin embargo, en la técnica tradicional se llega a montar hasta 12 antibióticos, provocando el efecto pro- zona, lo cual genera gastos económicos innecesarios.

La Clindamicina, eritromicina, ampicilina, vancomicina, cefuroxima son antibióticos de nivel 1 de acuerdo con CLSI ya que son considerados antibióticos de espectro pequeño, lo cual significa que si la bacteria presenta sensibilidad no habría la necesidad de enfrentarlo con algún antibiótico más fuerte. La mayoría de las bacterias patógenas aisladas presentaron sensibilidad a estos antibióticos a excepción de la ampicilina, en la cual las bacterias presentaron resistencia bacteriana. Gagetti,P; et. al, documenta que el aumento a la resistencia de ampicilina comenzó a emerger en los hospitales de Estados Unidos, durante la década de 1970 y 1980; sin embargo, derivado al uso descontrolado, y por consecuencia desarrollo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos (46) actualmente refleja que ya no es un antibiótico propicio para tratar infecciones bacterianas.

Al aplicar la técnica tradicional se usaron los 5 antibióticos indicados por CLSI, con excepción de clindamicina que se sustituye por claritromicina, arrojando resultados similares.

Las bacterias presentaron sensibilidad bacteriana a ceftriaxona, cefotaxima, netilmicina y resistencia bacteriana a ampicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, eritromicina y claritromicina. Esto demuestra que la gamma de antibióticos betalactámicos está perdiendo su efecto ante las bacterias, Lepe,J;et. al, menciona que el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en *Enterobacterales* es la producción de betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico impidiendo su actividad antibacteriana, considerándose entonces como uno de los principales problemas de salud a nivel global, en especial cuando se consideran los microorganismos multirresistentes (47).

Al realizar un análisis de la frecuencia de antibiogramas efectuados se informa que aproximadamente el 76.66% son realizados innecesariamente, esto se determina debido a las continuas actualizaciones por las que pasa SEIMC, en las cuales se toma en cuenta los cambios morfológicos y genéticos de la bacteria con relación a la sintomatología, edad y sexo de la persona; la diferencia con la técnica tradicional que en su momento sirvió de guía, para dar paso a todas las demás, radica en la falta de visualización de la posibilidad de que en un futuro las bacterias podrían evolucionar.

El conocimiento de los mecanismos de resistencia bacteriana permitirá una mejor terapia antimicrobiana y ayudar al diseño de nuevos fármacos. La resistencia no solo es intrínseca, si no también adaptativa, lo cual debemos tener en cuenta para establecer regímenes adecuados de tratamiento (48), por lo tanto, se recomienda, que el laboratorio clínico aplique de manera correcta las normas SEIMC y CLSI, ya que, mantener y recuperar la salud del paciente será todo un desafío que pronto no se podrá completar y hacerles frente a las bacterias sería una tarea casi imposible.

IX. CONCLUSIONES

Al evaluar la sensibilidad bacteriana en muestras de exudado faríngeo comparando técnicas con base a SEIMC y CLSI contra la técnica tradicional podemos concluir:

1. Referente a la identificación de bacterias patógenas aisladas de muestras de exudado faríngeo se logró percatar, que es más factible usando la normativa SEIMC que la técnica tradicional, ya que SEIMC contempla los cambios morfológicos y genéticos de la bacteria, con relación a la sintomatología, edad y sexo de la persona.
2. Al contrastar la identificación de la sensibilidad bacteriana se determina que la aplicación de normas establecidas por CLSI regulan el orden y uso de antibióticos en función de la bacteria patógena, reduciendo así la multirresistencia bacteriana
3. En relación con la valoración de la frecuencia de antibiogramas se distingue que la elevada frecuencia de antibiogramas innecesarios no es más que un indicador de que el método tradicional pudo ser una razón para la existencia en el aumento en la multirresistencia antibiótica, en relación con la aplicación de la norma CLSI.

X. BIBLIOGRAFÍA

- 1.Sánchez T, Concha I. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DEL SISTEMA RESPIRATORIO. Neumología Pediátrica. 2018 Enero; XIII(3).
- 2.Giono-Cerezo S, Santos-Preciado J, Morfín-Otero M, Torres-López F, Álcantar-Curiel M. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por conetenerla. Gaceta médica de México. 2021 Mayo; 156(2).
- 3.Calderón-Rojas G, Aguilar-Ulate L. Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica. 2016 Septiembre; LXXIII(621).
- 4.Agra Y, Terol E. La seguridad del paciente:una estrategia del Sistema Nacional de Salud. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2006 Diciembre; XXIX(3).
- 5.Pertejo M. MANUAL MSD. [Online].; 2020 [cited 2023 Junio 15. Available from: HYPERLINK "<https://www.msdmanual.com>" <https://www.msdmanual.com> .
- 6.Asenjo C, Pinto R. Características anátomo-funcional del aparato respiratorio durante la infancia. Revista Médica Clínica Las Condes. 2017 Febrero; 28(1).
- 7.Melo A. ResearchGate. [Online].; 2011 [cited 2022 Noviembre 14. Available from: HYPERLINK "https://www.researchgate.net/publication/215510168_Introduccion_al_aparato_respiratorio" https://www.researchgate.net/publication/215510168_Introduccion_al_aparato_respiratorio .
- 8.Lange. Pulmonary Physiology. Novena ed. Levitzky M, editor.: McGraw Hill; 2017.
- 9.Taussig L, Landau I. Applied clinical respiratory physiology. In: Pediatric respiratory medicine. Segunda ed. Mosby , editor. Philadelphia: Elsevier; 2008.
- 10.Saladin. Anatomía y Fisiología. La unidad entre forma y función. Novena ed. México: McGraw Hill; 2021.
- 11.Clínica SEdElyM. SEIMC. [Online].; 2018 [cited 2022 Noviembre 10. Available from: HYPERLINK "<https://seimc.org/>" <https://seimc.org/> .
- 12.Fernández A, García C, Saéz J, Valdezate S. SEIMC. [Online].; 2010 [cited 2022 Noviembre 11. Available from: HYPERLINK "<https://www.seimc.org/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>" <https://www.seimc.org/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> .
- 13.Batista N, Bordes A, Díez G, Leucona M, Lara M. Diagnóstico microbiológico de infecciones del tracto superior. In Norma 23 de SEIMC; 2006; España.
- 14.Braun S. Estudio microbiológico del tracto respiratorio superior. Revista de Chile de Infectología. 2003 Julio; XX(3).
- 15.ADAM. Alliant Health Plans. [Online].; 2022 [cited 2022 Noviembre 14. Available from: HYPERLINK

"<https://ssl.adam.com/content.aspx?productid=83&pid=5&gid=003746&site=alliantplans.adam.com&login=ALLI5730>"

<https://ssl.adam.com/content.aspx?productid=83&pid=5&gid=003746&site=alliantplans.adam.com&login=ALLI5730> .

16.Chávez M, Fernández A, Arellano J. UNAM FES ZARAGOZA. [Online].; 2013 [cited 2022 Octubre 25. Available from: HYPERLINK "https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/medico/programasacademicos/2/MANUAL_MICROBIOLOGIA_2013.pdf" https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/medico/programasacademicos/2/MANUAL_MICROBIOLOGIA_2013.pdf .

17.Chávez M, Fernández A, Arellano J. UNAM FES ZARAGOZA. [Online].; 2013 [cited 2022 Octubre 25. Available from: HYPERLINK "<https://www.zaragoza.unam.mx>" <https://www.zaragoza.unam.mx> .

18.Lewis J, Weinstein M, Bobenchik A, Campeau S, Cullen S. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023. CLSI M100-ED33:2023.

19.Caldas L, Montero J. Muestras microbiológicas y su adecuada recolección. Revista Facultad de Ciencias de la Salud Universidad CAUCA. 2000 Diciembre; II(4).

20.Koneman. Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color. Sexta ed. Washington W, Allen S, Janda W, editors.: Editorial Médica Panamericana; 2010.

21.Barrero L. Microbiología Clínica. Primera ed. Madrid: Síntesis; 2016.

22.Jorgensen J, Sahm D. Antimicrobial Susceptibility Testing: General Consideration. 6th ed. Murray P, Baron E, Pfaller M, editors. Washington: American Society of Microbiology; 1995.

23.Ciprian G, Fuentes M, Jiménez B, Miguel A, López M, Sabanza M. Neumonía.Revisión bibliográfica. Revista Sanitaria de Investigación. 2021 Septiembre; II(9).

24.García J, Cantón R, García E, Gómez L. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2000. Norma 11 de SEIMC.

25.Cercenado E, Saavedra-Lozano J. El antibiograma.Interpretación del antibiograma:conceptos generales (I). Desde el laboratorio hasta la clínica. 2009 Agosto; VII(4).

26.Tovar M. bioMerieux España S.A. [Online].; 2022 [cited 2022 Octubre 31. Available from: HYPERLINK "<https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-para-la-realizacion-de-pruebas-de-sensibilidad-los>" <https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-para-la-realizacion-de-pruebas-de-sensibilidad-los> .

27.Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2015 Diciembre; XXXIII(10).

28.Mantilla Y. Microorganismos multirresistentes a antibióticos: mecanismos y alternativas al tratamiento convencional. 2020. Tesis de la Universidad de Cantabria,España.

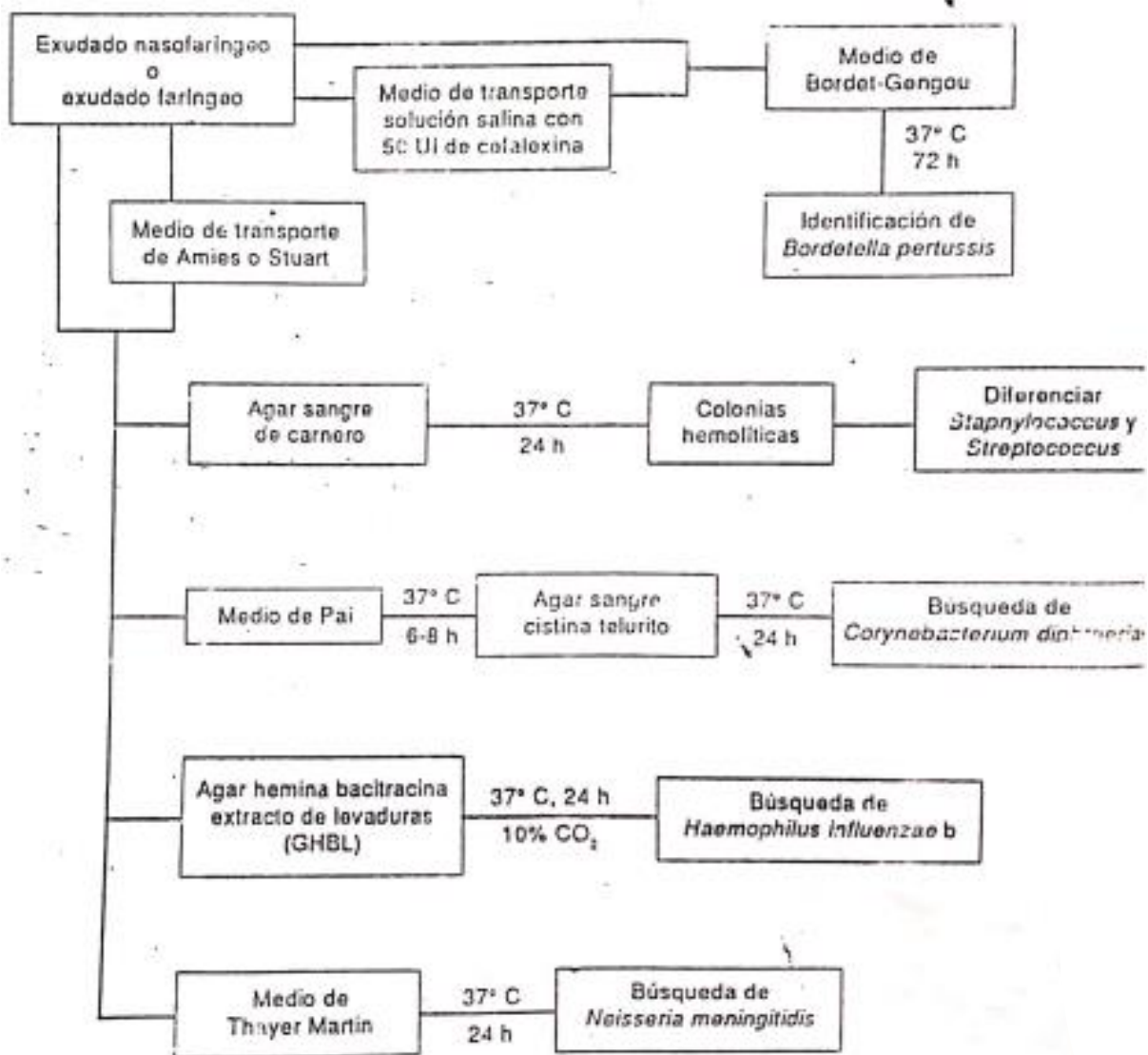
29. Escolá L, Los-Arcos I, Almirante B. Nuevos antibióticos para el tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes. Medicina Clínica. 2020 Mayo; CLIV(9).
30. Armiñanzas C, Fernández M, Gutiérrez M, González C, Arnaiz F, Arnaiz A, et al. Uso racional de los antibióticos y multirresistencia. Nuevos antimicrobianos. Revista Médica Valdecilla. 2016; I(1).
31. González J, Maguiña C, González F. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. Acta médica peruana. 2019 Abril-Junio; XXXVI(2).
32. Rang H. Farmacología. Octava ed. Ritter J, Flower R, editors. Barcelona: Elsevier España; 2016.
33. Treviño Natalia MNB. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. In Material de cátedra correspondiente a la clase: Generalidades de Bacteriología; 2022; Estado de México. p. 1-9.
34. Werth B. Manual MSD. [Online].; 2022 [cited 2022 Noviembre 12. Available from: HYPERLINK "https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/antibi%C3%B3ticos/introducci%C3%B3n-a-los-antibi%C3%B3ticos" <https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/antibi%C3%B3ticos/introducci%C3%B3n-a-los-antibi%C3%B3ticos> .
35. López-Galván, María. Frecuencia de bacterias patógenas su patrón de sensibilidad antibiótica en el HGR No. 25 en relación con el cuadro básico de medicamentos. 2013. Tesis de la Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
36. Bidell M, Palchak M, Yoon M, Mohr J, Lodise T. Effect of prior receipt of antibiotics on the pathogen distribution and antibiotic resistance profile of key Gram-negative pathogens among patients with hospital-onset urinary tract infections. BMC Infectious diseases. 2017 Diciembre; XVII(1).
37. Rincón-León HNF. Tendencias de resistencia antimicrobiana en patógenos aislados de infecciones nosocomiales. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2016 Septiembre; LIV(1).
38. Duarte-Raya F, Granados-Ramírez M. Resistencia antimicrobiana de bacterias en un hospital de tercer nivel. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2012; L(III).
39. Rodríguez-Valdez G. Actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur. 2017. Tesis de Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
40. Guerrero C, Sánchez C. SEIMC. [Online].; 2003 [cited 2023 Junio 11. Available from: HYPERLINK "https://seimc.org/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf" <https://seimc.org/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf> .

41. Camaró M, Catalá V, Gimeno C, Martínez R, Olmos P. SEIMC. [Online].; 2013 [cited 2023 Junio 11. Available from: HYPERLINK "https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf" <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf> .
42. Fernández A, Bou G, García C, Saez JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Elsevier DOYMA. 2011 Junio; XXIX(8).
43. Fernández A, García C, Saez JA, Valdezate S. SEIMC. [Online].; 2010 [cited 2023 Junio 13. Available from: HYPERLINK "https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf" <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> .
44. Rodrigo C, Del Castillo F, García F, Moreno D, Ruiz J. SEIMC. [Online].; 2017 [cited 2023 Junio 14. Available from: HYPERLINK "https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosclinicos/seimc-procedimientoclinicoiii.pdf" <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosclinicos/seimc-procedimientoclinicoiii.pdf> .
45. Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo J, Alvarez-Rocha L, Asencio Á, Calbo E, Cercenado E, et al. Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2012 Enero: p. 22.e1-22.123.
46. Gaggioli P, Bonofiglio L, García-Gabarrot G, Kaufman S, Mollerach M, Vigliarolo L, et al. Resistencia a los B-lactámicos en enterococos. Revista Argentina de microbiología. 2019 Septiembre: p. 179-183.
47. Lepe J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. Medicina Intensiva. 2022 Julio: p. 392-402.
48. García-Balda H, Palacios M. Resistencia antimicrobiana en el contexto actual. Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS. 2022 Julio-Diciembre; IV(3).
49. Asenjo C, Pinto R. Características anatómo-funcional del aparato respiratorio durante la infancia. Revista Médica Clínica Las Condes. 2017 Enero; XXVIII(1).
50. Netter F. ATLAS DE ANATOMÍA HUMANA. Segunda ed. Barcelona: Elsevier; 2019.
51. Braun S. Estudio microbiológico del tracto respiratorio superior. Revista de Chile de Infectología. 2003 Julio; XX(3).
52. Treviño N. Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. In Material de Cátedra correspondiente a: Generalidades de Bacteriología; 2022; Estado de México. p. 1-9.

ANEXOS

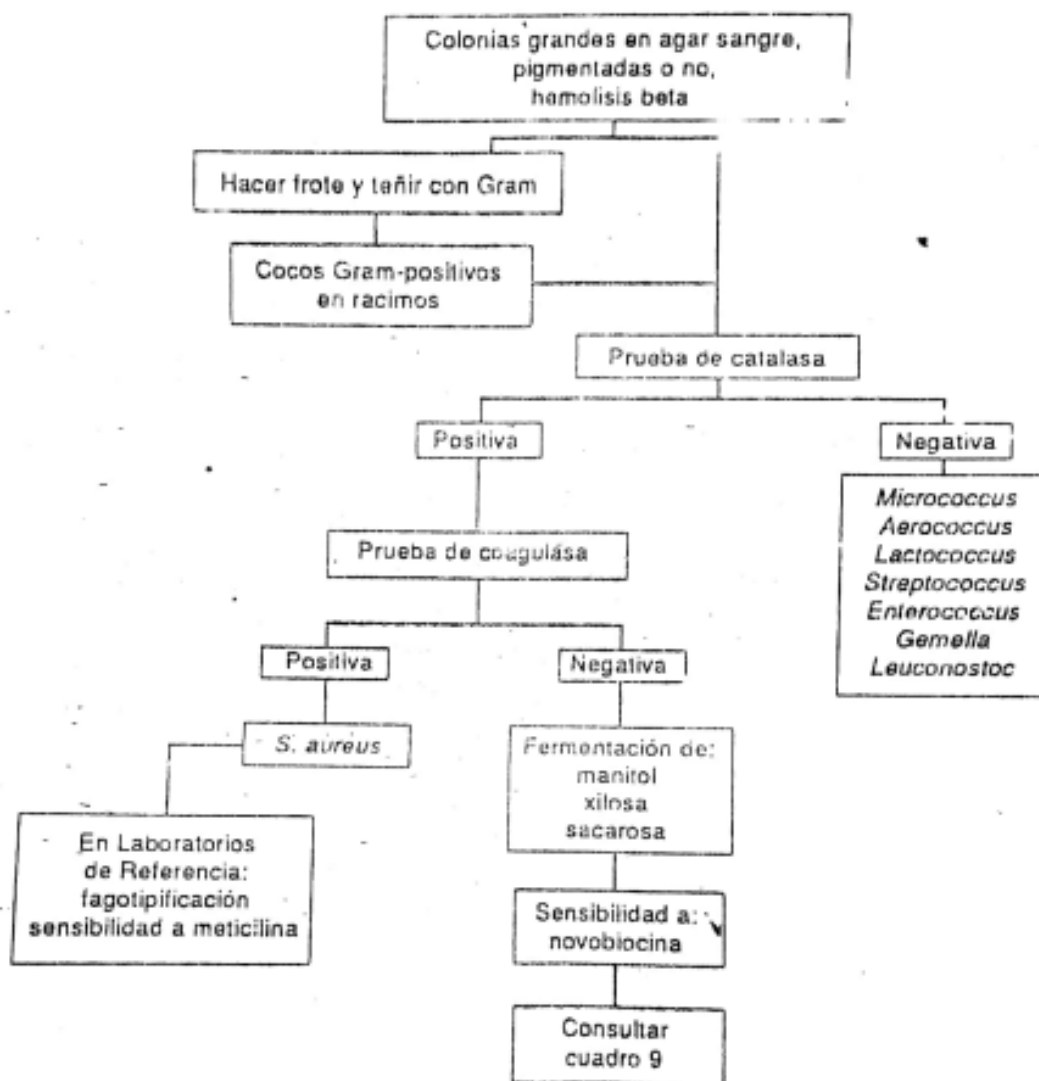
Anexo 1

Diagrama 5
Procesamiento de muestras de vías respiratorias superiores



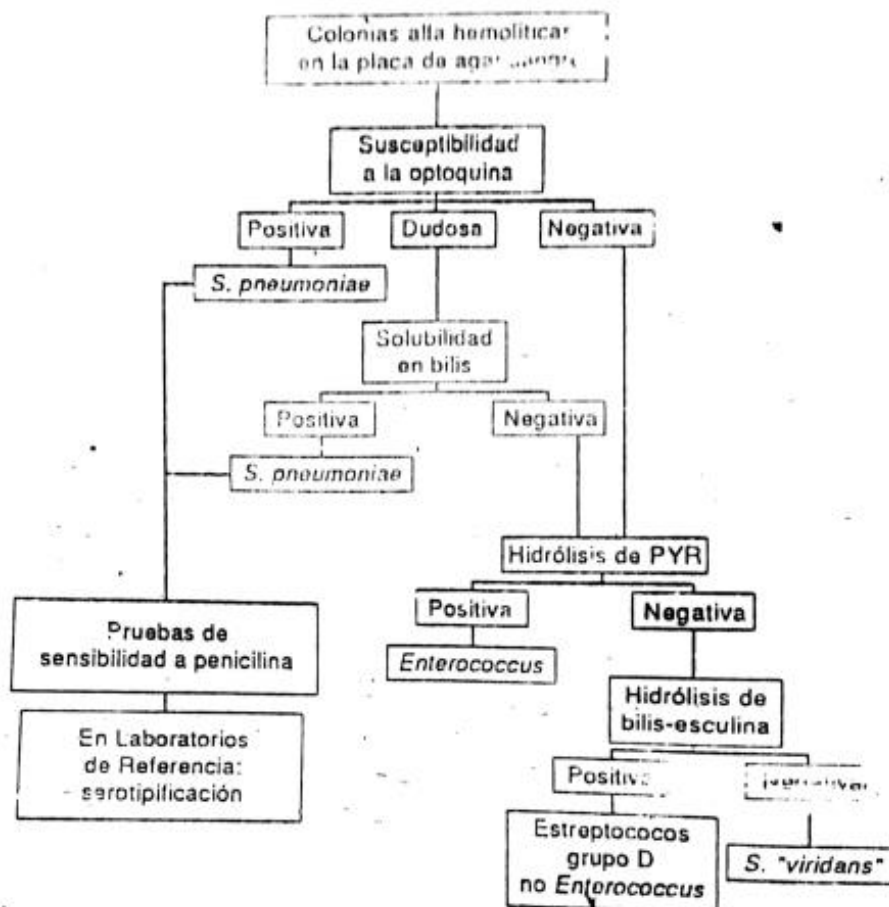
Anexo 2

Diagrama 6
Identificación de Staphylococcus



Anexo 3

Diagrama 7
Identificación de estreptococos alta hemolíticos



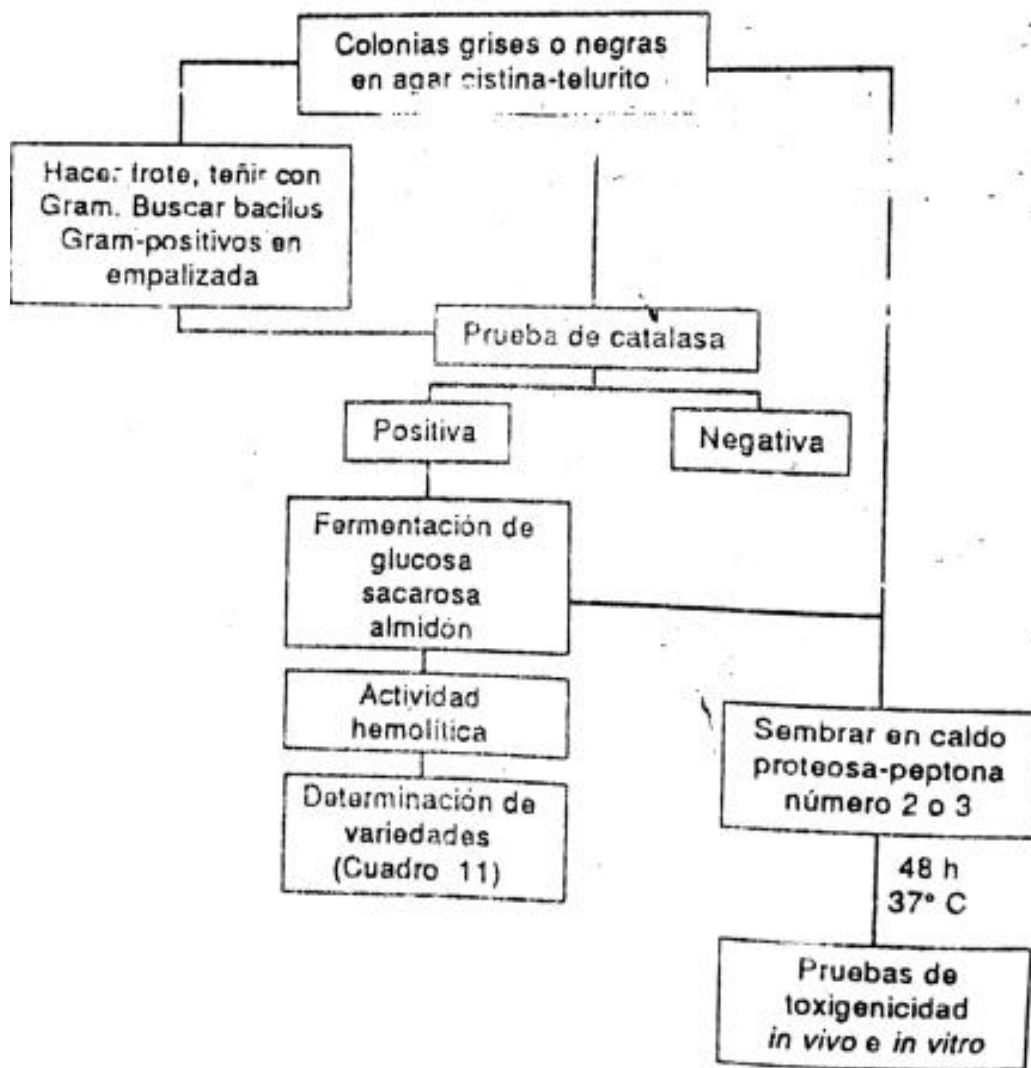
Cuadro 10
Identificación de estreptococos clínicamente importantes

Organismo	Susceptibilidad a:		Hidrólisis de:			Solub. en bilis	CAMP
	Bacitracina	Optoquina	PYR*	Lactato	Bilis-esculina		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	R	S	-	-	-	+	-
<i>Streptococcus "viridans"</i>	R**	R	-	-	**	-	-
Estreptococos beta hemolíticos							
Grupo A	S	R	+	-	-	-	-
Grupo B	R**	R	+	+	-	-	+
Grupo D							
<i>Enterococcus</i>	R	R	+	**	+	+	-
No enterococos	R	R	-	-	+	-	-
<i>Estreptococos nutricionalmente variantes (NVS)</i>	R	R	+	-	-	-	-

* L-pirrolidina B-naltílamida

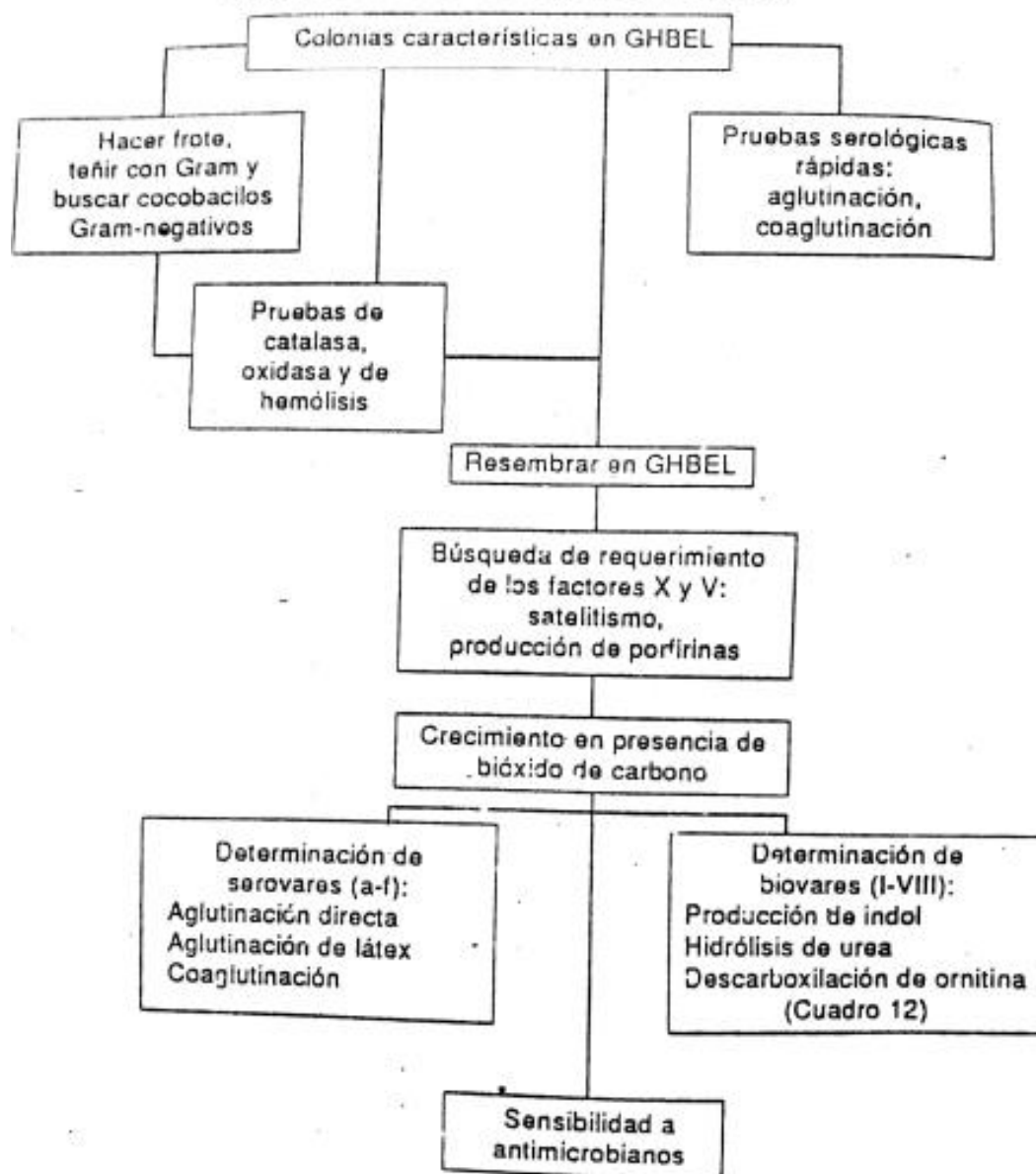
** Puede haber variaciones

Diagrama 9
Identificación de *Corynebacterium diphtheriae* toxigénico



Anexo 5

Diagrama 10
Identificación de *Haemophilus influenzae*



Anexo 6 Hoja de Solicitud de estudios

LABORATORIO BIENESTAR, ANALISIS CLINICOS Y DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

SOLICITUD DE ESTUDIOS MICROBIOLOGICOS

NOMBRE DEL PACIENTE: _____ EDAD: _____ SEXO: _____
FECHA Y HORA DE TOMA: _____ EMBARAZO: ☐ SÍ ☐ NO

DIAGNOSTICO: _____

EL PACIENTE ES:

☐ AMBULATORIO ☐ HOSPITALIZADO

PACIENTE DE QUIMIOTERAPIA: ☐ SÍ ☐ NO

DIABETICO: ☐ SÍ ☐ NO

HIPERTENSO: ☐ SÍ ☐ NO

PRESENTA FIEBRE: ☐ SÍ ☐ NO

ANTIBIOTICOS (A/b):

ULTIMA HORA DE A/b:

ALERGIAS:

OTROS DATOS CLÍNICOS (ESPECIFICAR):

OBSERVACIONES DEL CULTIVO:

FECHA DE SIEMBRA:

Obs. 24 HORAS:

Obs. 48 HORAS:

Obs. 72 HORAS:

ESTUDIOS ADICIONALES:

CÓDIGO: FOR-SEMIC-001 VERSION 001

Anexo 7 Carta de Consentimiento Informado

Tapachula de Córdova y Ordoñez, Chiapas; a ____ de ____ de 20 ____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la Investigación: **Evaluación de la sensibilidad bacteriana en exudados faríngeos en pacientes ambulatorios mediante técnicas en base a SEIMC y CLSI.**

Nombre de los investigadores: **Q.F.B. HERNÁN ALEJANDRO LÓPEZ POLA**

Nombre de la persona que participará en la Investigación:

A través de este documento que forma parte del proceso para la obtención del consentimiento informado, me gustaría invitarlo a participar en la investigación titulada: **Evaluación de la sensibilidad bacteriana en exudados faríngeos en pacientes ambulatorios mediante técnicas en base a SEIMC y CLSI.** Antes de decidir, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite, para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

1.- ¿Cuál es el objetivo de esta investigación?

Evaluar la sensibilidad bacteriana en muestras de exudado faríngeo de pacientes ambulatorios que acuden a un laboratorio clínico particular al implementar las técnicas en base a SEIMC y CLSI contra la técnica tradicional usada habitualmente.

2.- ¿Estoy obligado a participar?

Su participación **es voluntaria, anónima y confidencial**; no tiene que participar forzosamente, No habrá impacto negativo alguno si decide no participar en la investigación.

3.- ¿En qué consistirá mi participación y cuánto durará? Sera elegido para ser parte de esta investigación si cumple con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Pacientes de 5 años a 60 años
- Pacientes sin previa ingesta de antibióticos.

Criterios de exclusión

- Pacientes inmunosuprimidos (Mujeres embarazadas, con diálisis o con algún tipo de cáncer)
- Pacientes menores de 5 años o mayores de 60 años

Criterios de eliminación

- Pacientes con previa ingesta de antibióticos menor a 5 días
- Pacientes con ingesta de tratamiento herbolario.
- Pacientes con aseo bucal

4.- ¿Tendrá algún costo para mi participar en esta Investigación?

Se le informa que los gastos relacionados con esta investigación que se originen a partir del momento en que, voluntariamente, acepta participar en la misma, no serán pagados por Usted. En el caso de que existan gastos adicionales originados por el desarrollo de esta investigación, serán cubiertos por el presupuesto de la misma. Los datos a analizar en las pruebas microbiológicas por la presente investigación son la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

5.- Una vez que acepte participar ¿Es posible retirarme de la Investigación?

Se le informa que usted tiene el derecho, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación de dejar de participar en la presente investigación, sin que esto disminuya la atención y calidad o se creen prejuicios para continuar con sus tratamientos y la atención que como paciente le otorga. Por consiguiente, se le reitera que en cualquier momento en que usted desee es posible abandonar la experimentación ya sea por acciones realizadas u algún otro impedimento personal que se le presente a lo largo del desarrollo de la investigación.

FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Yo _____ manifiesto que fui informado (a) del propósito, procedimientos y tiempo de participación y en pleno uso de mis facultades, es mi voluntad participar en esta investigación titulada.

Evaluación de la sensibilidad bacteriana en exudados faríngeos en pacientes ambulatorios mediante técnicas en base a SEIMC y CLSI.

No omito manifestar que he sido informado(a) clara, precisa y ampliamente, respecto de los procedimientos que implica esta investigación así como de los riesgos a los que estaré expuesto ya que dicho procedimiento es considerado de bajo riesgo.

He leído y comprendido la información anterior, y todas mis preguntas han sido respondidas de manera clara y a mi entera satisfacción, por parte de

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE

NOMBRE Y FIRMA DE INVESTIGADORES

Anexo 8

Tabla 1M. *Streptococcus* spp. Grupo B-hemolítico

Nivel 1: Agentes antimicrobianos que son apropiados para pruebas e informes primarios de rutina	Nivel 2: Agentes antimicrobianos que son apropiados para pruebas primarias de rutina, pero que pueden informarse siguiendo las reglas de notificación en cascada establecidas en cada institución	Nivel 3: Agentes antimicrobianos que son apropiados para las pruebas primarias de rutina en instituciones que atienden a pacientes con alto riesgo de MDRO, pero que solo deben informarse siguiendo las reglas de notificación en cascada establecidas en cada institución.	Nivel 4: Agentes antimicrobianos que pueden justificar pruebas e informes a pedido del médico si los agentes antimicrobianos en otros niveles no son óptimos debido a varios factores
Clindamicina ^{a,b}			
Eritromicina ^{a,b,c}			
Penicilina ^d o ampicilina ^d		Cefotaxima o ceftriaxona	cefepima ceftarolina
	tetraciclina ^e		
		vancomicina	
			Linezolid ^f Tedizolida
			Daptomicina ^{f,g,h}
			levofloxacino
			Dalbavancin ^{h, i}
			Oritavancina ^h
			Telavancina ^h

Anexo 9

1. Procesamiento de la muestra

Se debe inocular una placa de agar sangre (preferentemente de carnero al 5%) con la torunda. Hay que asegurarse de rotar la torunda de modo que toda su superficie quede en contacto sobre el primer cuadrante de inoculación en la placa. A continuación, se extiende la muestra con un asa estéril por los tres cuadrantes restantes de la placa, con el fin de obtener colonias bien aisladas. Finalmente se harán varias incisiones en el medio con la misma asa de siembra, para favorecer la visualización de la beta- hemólisis que sugiere la presencia de *S. pyogenes*.

2. Selección de medios y condiciones de incubación

La placa con el medio de agar-sangre se incuba en estufa con 5% de CO₂ a 35°C durante 24 h. En caso de negatividad se reincubará hasta 48 h. Otra alternativa para el cultivo consiste en sembrar la muestra de la forma anteriormente descrita en una placa de agar sangre e incubarla en anaerobiosis 48h a 35°C o bien sembrarla en medio de agar sangre selectivo (como por ejemplo agar sangre con colistinay ácido nalidíxico, CNA). En caso de sospecha de infección por neisserias, los medios de cultivo utilizados para la siembra serán enriquecidos y selectivos: Thayer-Martin, Martin-Lewis, New York City o GC. Todos estos medios tienen antibióticos (vancomicina, colistina, nistatina, trimetoprim) que inhiben el crecimiento de la microbiota normal. Debe inocularse también una placa de agar chocolate, dado que algunas cepas de *N. gonorrhoeae* pueden inhibirse por los antibióticos que contienen los mediosselectivos. Se deben incubar las placas a 35°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 72 h.

3. Criterios de interpretación de resultados

Streptococos beta-hemolíticos. Las colonias de *S. pyogenes* miden >0,5 mm de diámetro, son blancas o grises y algunas tienen apariencia mucosa. Los bordes son enteros, están rodeadas por una zona relativamente amplia de beta-hemólisis, que es mayor en zonas con baja tensión de oxígeno, y no producen catalasa. Las pruebas definitivas para la identificación de *S. pyogenes* una vez confirmadas las

características ya descritas son: la presencia de cualquier halo de inhibición con un disco con 0,04 unidades de bacitracina, la detección de pirrolidonilarilamidasa (PYR) y la detección del antígeno A de Lancefield mediante la utilización de sistemas comercializados. La identificación de los estreptococos del grupo C y G relacionados con faringitis aguda se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Identificación de estreptococos beta-hemolíticos con significado clínico en pacientes con faringitis aguda

Especie	Antígeno de Lancefield	Bacitracina	PY R	Sorbitol	Trehalosa
<i>S. pyogenes</i>	A	Sensible	+	-	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	C	Resistente	-	-	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	G	Resistente	-	-	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	Resistente	-	+	-

En la infección estreptocócica hay que tener en cuenta que existen cepas de *S. pyogenes* y *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* denominadas variantes hemolisina-deficientes que no producen hemólisis o producen alfa-hemólisis en agar sangre. Para potenciar su actividad hemolítica se recomiendan medios selectivos y diferenciales con colistina, ácido nalidíxico y pH 7,5 ajustado con tampón PIPES (CNA-P). Su contribución en la faringitis estreptocócica está aún por dilucidar, ya que estas cepas en muchos casos están infravaloradas si se emplean medios de agar sangre convencionales.

La detección de anticuerpos antiestreptocócicos mediante técnicas serológicas no es útil para el diagnóstico de faringitis por *S. pyogenes* pues la presencia de anticuerpos específicos refleja contacto previo con el antígeno y no necesariamente infección activa. Sólo sería útil la detección de dichos anticuerpos para documentar la infección estreptocócica previa en pacientes con sospecha de fiebre reumática aguda o glomerulonefritis postestreptocócica.