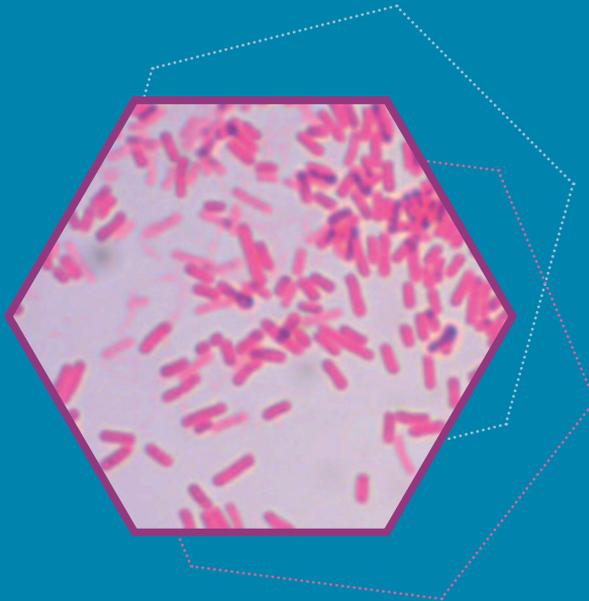


# Diagnóstico microbiológico de *Leclercia adecarboxylata*

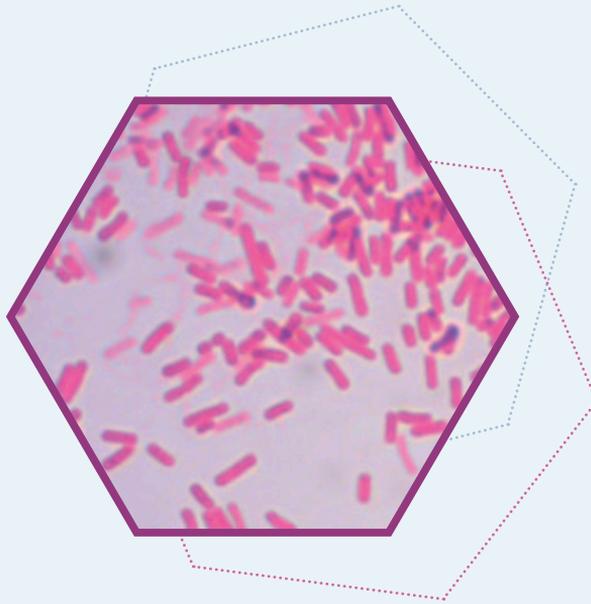


**Roberto Cruz González Meléndez**  
**Lucero Jareth Jaimes González**  
Autores



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

# Diagnóstico microbiológico de *Leclercia adecarboxylata*



**Roberto Cruz González Meléndez**  
**Lucero Jareth Jaimes González**  
Autores

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Dr. Vicente Jesús Hernández Abad  
**Director**

Dra. Mirna García Méndez  
**Secretaria General**

Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara  
**Secretario de Desarrollo Académico**

CD. Yolanda Lucina Gómez Gutiérrez  
**Secretaria de Desarrollo Estudiantil**

Mtro. Luis Alberto Huerta López  
**Secretario Administrativo**

Dra. María Susana González Velázquez  
**Jefa de la División de Planeación  
Institucional**

Dra. Rosalva Rangel Corona  
**Jefa de la División de Vinculación**

Dr. David Nahum Espinosa Organista  
**Jefe de la División de Estudios de  
Posgrado e Investigación**

Lic. Carlos Raziel Leaños Castillo  
**Jefe de la Coordinación de Comunicación  
Social y Gestión de Medios**

**Datos para catalogación bibliográfica**

Autores: Roberto Cruz González Meléndez, Lucero Jareth  
Jaimes González.

**Diagnóstico microbiológico de *Leclercia adecarboxylata*.**

UNAM, FES Zaragoza, octubre de 2023.

Peso: 3.7 MB.

ISBN: 978-607-30-8106-1.

Diseño de portada: Carlos Raziel Leaños Castillo.

Formación de interiores: Claudia Ahumada Ballesteros.

---

**DERECHOS RESERVADOS**

Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del texto o las ilustraciones de la presente obra bajo cualesquiera formas, electrónicas o mecánicas, incluyendo fotocopiado, almacenamiento en algún sistema de recuperación de información, dispositivo de memoria digital o grabado sin el consentimiento previo y por escrito del editor.

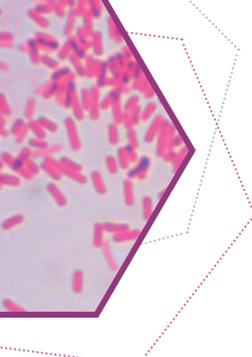
**Diagnóstico microbiológico de *Leclercia adecarboxylata*.**

**D.R. © Universidad Nacional Autónoma de México**

Av. Universidad # 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U.,  
Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

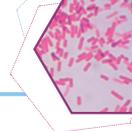
Av. Guelatao # 66, Col. Ejército de Oriente,  
Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México, México.



# Índice

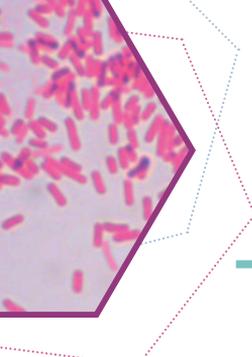
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1: TAXONOMÍA</b>	<b>9</b>
1.1 Historia taxonómica	10
<b>CAPÍTULO 2: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS GENERALES DE <i>Leclercia adecarboxylata</i></b>	<b>11</b>
2.1 Morfofisiología	12
2.2 Reservorios y fuentes de infección	13
2.3 Patogenicidad y virulencia de <i>Leclercia adecarboxylata</i> .	14
<b>CAPÍTULO 3: EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>15</b>
3.1 Población susceptible y factores de riesgo	16
3.2 <i>Leclercia adecarboxylata</i> en México	17
3.3 Infecciones por <i>Leclercia adecarboxylata</i>	20
3.3.1 Bacteriemias	21
3.3.2 Infecciones cardiovasculares y asociadas a dispositivos	21
Endocarditis infecciosa	21
Infección asociada a catéter	21
3.3.3 Tracto respiratorio	22
Neumonía	22
3.3.4 Infecciones intraabdominales	22
Peritonitis	22
Colecistitis	23
3.3.5 Tracto urinario	23

Infección urinaria	23
3.3.6 Piel y tejidos blancos	24
Celulitis	24
Úlceras pépticas	25
Heridas y quemaduras	25
3.3.7 Hueso y articulaciones	26
Artritis séptica	26
<b>CAPÍTULO 4: PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO PARA <i>Leclercia adecarboxylata</i></b>	<b>27</b>
4.1 Recolección, transporte y conservación de la muestra	28
4.1.1 Bacteriemias	29
4.1.2 Infecciones cardiovasculares	32
Endocarditis	32
Infección asociada a catéter	35
4.1.3 Tracto respiratorio	37
Espujo o espujo inducido	37
Aspirado traqueobronquial simple	38
Punción transtraqueal	38
Muestras obtenidas a través de fibrobroncoscopia	39
Muestras obtenidas por abordaje percutáneo	41
4.1.4 Tracto urinario	42
Urocultivos	42
4.1.5 Piel y tejido blando	45
Abscesos cerrado	45
Heridas abiertas	46
Pus	46
Tejidos obtenidos mediante curetaje y biopsias	46
Quemaduras	46
Celulitis	46
4.1.6 Líquidos biológicos	47
4.2 Examen microscópico	49
4.2.1 Tinción de Gram	49



4.3 Medios de cultivo	50
4.3.1 Agar sangre de carnero al 5% (SBA)	50
4.3.2 Agar chocolate	51
4.3.3 Agar MacConkey (MCA)	51
4.3.4 Agar lactosa azul de bromotimol (BTB)	52
4.4 Diagnóstico diferencial y caracterización bioquímica	52
4.5 Otros métodos de diagnóstico	56
4.5.1 Sistemas automatizados	56
4.5.2 Espectrometría de masas	58
4.5.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	59
<b>CAPÍTULO 5: TRATAMIENTO</b>	<b>61</b>
5.1 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria de adquisición comunitaria	62
5.2 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria asociada a los cuidados sanitarios	62
5.3 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria de adquisición nosocomial	64
5.4 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria en poblaciones especiales de pacientes por su enfermedad subyacente	64
5.5 Tratamiento antimicrobiano dirigido	66
<b>CAPÍTULO 6: SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS</b>	<b>67</b>
6.1 Resistencia a la fosfomicina	68
6.2 Causas de resistencia a antibióticos	68
<b>ANEXOS</b>	<b>71</b>
ANEXO 1. Tinciones	72
Tinción de Gram	72
ANEXO 2. Medios de cultivo	74
Agar sangre de cordero al 5%	74
Agar Mac Conkey	75
Agar chocolate	76

Agar lactosa con azul de bromotimol y cristal violeta	76
Medio cromogénico	78
<b>ANEXO 3. Principios e interpretación de pruebas bioquímicas</b>	<b>79</b>
Sistema IMViC	79
Indol	79
Rojo de metilo	80
Voges Proskauer	81
Citrato	81
Prueba LIA (lisina – hierro – agar)	82
Malonato	83
Crecimiento en caldo KCN	84
Pruebas de fermentación de hidratos de carbono	85
Prueba de ureasa	87
Pruebas de hidrólisis de bilis y esculina	89
 <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	 <b>90</b>



# Introducción

---

**L***eclercia adecarboxylata* ha tenido varios nombres, primero como *Escherichia adecarboxylata* debido a su parecido con *E. coli* en la prueba IMViC (indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato) y luego como *Enterobacter agglomerans* porque produce un pigmento amarillo y no utiliza lisina, ornitina o arginina. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) se refirieron a estas cepas como grupo entérico 41 hasta que Tamura y colegas (1986) basándose en técnicas de biología molecular del ADN bacteriano descubrieron que se trataba de una especie distinta y propusieron su transferencia a un nuevo género bajo el nombre de *Leclercia adecarboxylata*.<sup>1,2</sup>

*L. adecarboxylata* es un bacilo flagelado peritrico, gramnegativo, facultativo-anaeróbico, que se ha aislado de alimentos, agua y otras fuentes ambientales. Es un patógeno emergente asociado con ambientes acuáticos que, por lo general afecta a pacientes inmunosuprimidos, aunque también se presenta como parte de infecciones polimicrobianas en pacientes inmunocompetentes. Principalmente suele causar bacteriemias e infecciones de heridas.<sup>3</sup>

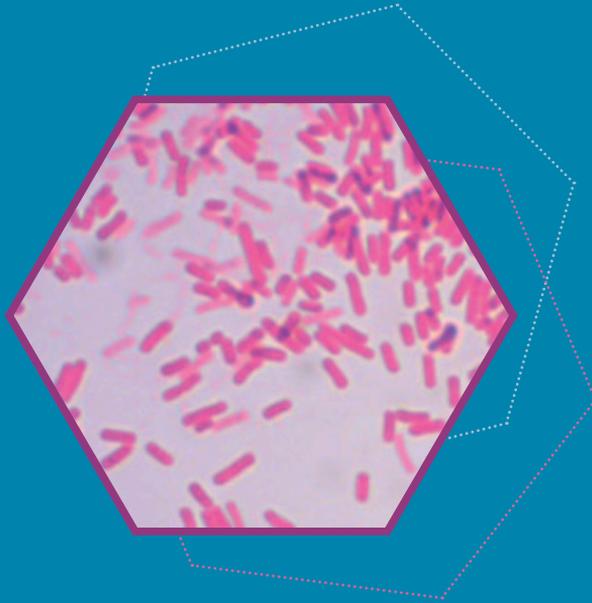
*L. adecarboxylata* suele presentar un excelente perfil de susceptibilidad, pero en los últimos años se han reportado cepas resistentes a múltiples antibióticos, y de ahí radica parte de su importancia clínica. Además, es probable que exista una subestimación de las infecciones por *Leclercia* debido a la identificación errónea de ésta como *Escherichia coli*, ya que como se mencionaba anteriormente, ambas especies comparten varias propiedades estructurales, microbiológicas y bioquímicas.<sup>3,4,5</sup>

Sumado a esto, a pesar de que podría decirse que *L. adecarboxylata* es un microorganismo infeccioso poco común, México no se ha librado de la presencia de esta bacteria y presentó un brote en el 2019 con más de 60 casos en la zona metropolitana de Guadalajara y de dichos casos, el Comité Estatal de Vigilancia Epidemiológica dictaminó una defunción derivada de la infección por *L. adecarboxylata*.<sup>6,7</sup>

Por todo lo anterior, el presente libro sobre “Diagnóstico microbiológico de *Leclercia adecarboxylata*” comprende los aspectos más importantes relacionados con éste patógeno, desde su taxonomía, morfofisiología, virulencia y epidemiología hasta los diferentes métodos de diagnóstico y su tratamiento.

# CAPÍTULO 1

# Taxonomía



## 1.1 HISTORIA TAXONÓMICA

*Leclercia adecarboxylata*, es un bacilo gramnegativo, del *Phylum Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, familia *Enterobacteriaceae* y género *Leclercia*.<sup>3</sup>

Fue aislada por primera vez de alimentos en 1962, por Lecler, un bacteriólogo francés, quien la denominó *Escherichia adecarboxylata* debido a su semejanza fenotípica con *E. coli*. También fue considerada por Ewing y Fife (1972) como *Enterobacter agglomerans* por producir un pigmento amarillo y no utilizar lisina, ornitina o arginina. (Tabla 1)<sup>2, 8, 9, 10, 11</sup>

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por las siglas de su nombre en inglés), se refirieron a estas cepas como grupo entérico 41 hasta que Tamura y colaboradores, en 1986, basándose en técnicas de biología molecular del ADN bacteriano descubrieron que *E. adecarboxylata* era una especie distinta y propusieron su transferencia a un nuevo género, *Leclercia*, del cual *L. adecarboxylata* es la única especie conocida. Pudieron refutar claramente cualquier asociación con *Enterobacter* o *Escherichia* debido a las diferencias electroforéticas de ácidos nucleicos y proteínas, mediante un estudio extenso de 86 cepas (acumuladas durante un período de 13 años), utilizando pruebas bioquímicas convencionales y una matriz de probabilidad asistida por computadora. La hibridación de ADN – ADN mostró que las cepas de *Leclercia* estaban relacionadas entre sí del 71 al 100% a 75 ° C, pero solo del 3,2 al 32% estaban relacionadas con otras Enterobacterias.<sup>2, 8, 10, 12</sup>

Por lo anterior, actualmente se encuentra registrada con el número 78-8356 en los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), de Atlanta en los Estados Unidos de Norteamérica, en la familia *Enterobacteriaceae*.<sup>8</sup>

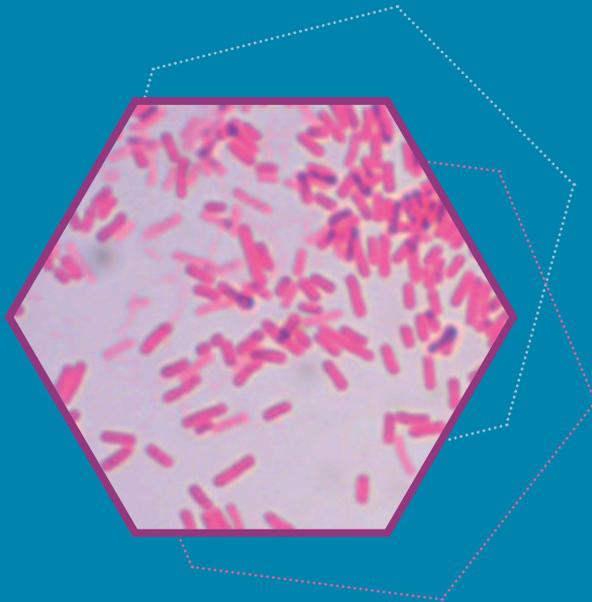
**TABLA 1.** Revisión taxonómica de *Leclercia adecarboxylata*.<sup>2,9</sup>

Taxonomía actual	Designación previa	Número ATCC*	Número de relación G + C (% en moles)	Aislada de			
				Humanos	Animales	Ambiente	Otros
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Enteric group 41, <i>Escherichia adecarboxylata</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> .	23216	52–55	Sí	Sí	Sí	Sí

\*American Type Culture Collection.

# CAPÍTULO 2

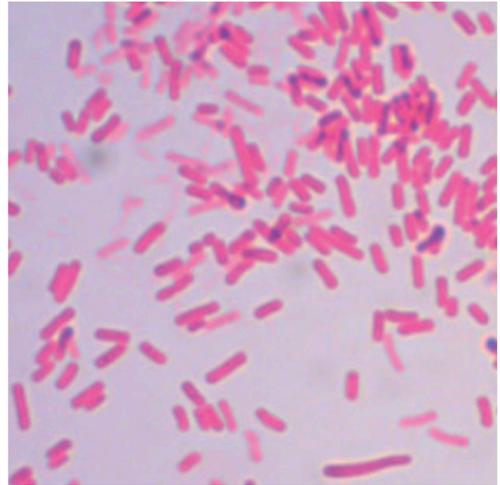
## Características microbiológicas generales de *Leclercia adecarboxylata*



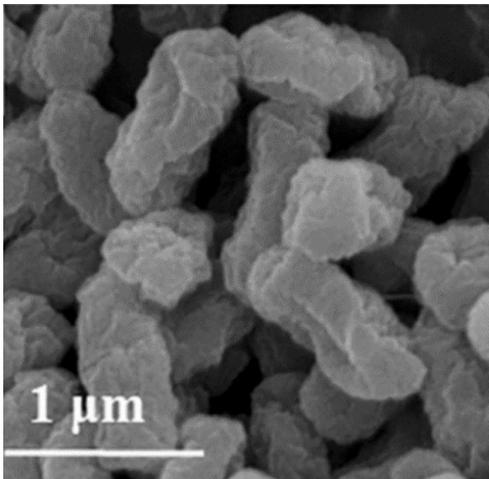
## 2.1 MORFOFISIOLOGÍA

*Leclercia adecarboxylata* es un bacilo gramnegativo (Figura 2.1), con un tamaño de aproximadamente 1 a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 2.2), anaerobio facultativo móvil con flagelos peritrórico de la familia *Enterobacteriaceae*.<sup>1, 9, 13</sup>

Su característica quizá más importante *in vitro* y que la distingue, es la presencia de un pigmento amarillento no difusible, cuyas principales propiedades bioquímicas son: oxidasa negativo, indol y rojo de metilo positivos, reducción de nitratos positivo, Voges-Proskauer negativo; no fermenta sorbitol y no posee descarboxilasa ni betaglucuronidasa.<sup>8</sup> Además no utiliza lisina, ornitina o arginina.<sup>2</sup>

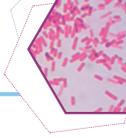


**FIGURA 2.1.** *Leclercia adecarboxylata*. La tinción de Gram, muestra bacilos gramnegativos.<sup>12</sup>



**FIGURA 2.2.** *Leclercia adecarboxylata* observada mediante espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).<sup>14</sup>

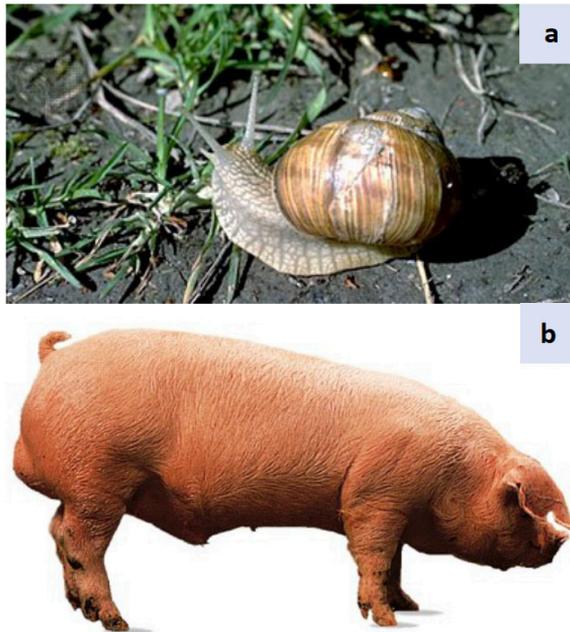
Es de suma relevancia mencionar que *L. adecarboxylata* puede identificarse erróneamente como *Escherichia coli* (*E. coli*) debido a sus propiedades bioquímicas similares, por consiguiente es muy importante identificar con precisión *L. adecarboxylata* en la muestra clínica para guiar el diagnóstico, el tratamiento y la información epidemiológica.<sup>1</sup>



## 2.2 RESERVORIOS Y FUENTES DE INFECCIÓN

*L. adecarboxylata* se ha aislado de una gran variedad de alimentos, de fuentes ambientales como suelo (tratado con estiércol de ganado) y agua. Esta última sirve como reservorio de numerosos microorganismos y es la fuente de infección más importante, ya que puede contaminar alimentos y medio ambiente. También puede encontrarse en caracoles (Figura 2.3 a) y babosas, así como en la flora intestinal de algunos insectos que originan plagas que afectan cultivos.<sup>8,2,15</sup>

Se ha informado en la literatura que los animales de granja: ganado, huevos de gallina, flora intestinal normal en cerdos (Figura 2.3 b) también pueden ser una posible fuente de infección.<sup>1</sup> Incluso se ha aislado de la cavidad bucal de tiburones.<sup>5</sup>



**FIGURA 2.3.** Organismos reservorios de *Leclercia adecarboxylata*.  
a. Caracol comestible. (*Helix pomatia*). b. Cerdo. (Landrace breed).<sup>16,17</sup>

Otra vía de contaminación es de persona a persona, ya que este organismo pertenece a la familia Enterobacteriaceae, de la cual muchos miembros se han asociado con la flora bacteriana natural de los seres humanos y áreas ambientales.<sup>8,5</sup>

En el caso de muestras clínicas humanas, este organismo puede ser aislado de heridas, varios fluidos corporales como sangre, heces, esputo, orina, fluido peritoneal y pus. Puede presentarse como un organismo aislado o como parte de una infección polimicrobiana.<sup>1,2</sup>

## 2.3 PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE *Leclercia adecarboxylata*

Existe un conocimiento limitado sobre la vía de transmisión y patogenicidad de *L. adecarboxylata*, sin embargo, se especula que el trauma de la piel y la posterior exposición al agua o la contaminación de la flora bacteriana de la piel facilitan su entrada y promueve el riesgo de infección.<sup>5</sup>

Algunos autores describen otras tres hipótesis de contaminación:

- Translocación bacteriana a través de la barrera mucosa del tracto gastrointestinal,
- Entrada de catéteres o heridas para infectar al huésped y
- Translocación a través del tracto genitourinario.<sup>18</sup>

*L. adecarboxylata* tiende a causar infección monomicrobiana en pacientes inmunodeprimidos y requiere otras bacterias coinfectantes para establecer infección en sujetos inmunocompetentes. Sin embargo, se han descrito algunos casos de infección monomicrobiana en pacientes sin afecciones subyacentes.<sup>5</sup>

Análisis citológicos de la patogenicidad de *L. adecarboxylata* han mostrado un efecto citotóxico in vitro sobre las células epiteliales humanas HeP-2, pero la bacteria no es capaz de adherirse o invadir las células (Tabla 2), lo que respalda la suposición de que requiere coinfección con otros microorganismos para establecer infección.<sup>3,5</sup>

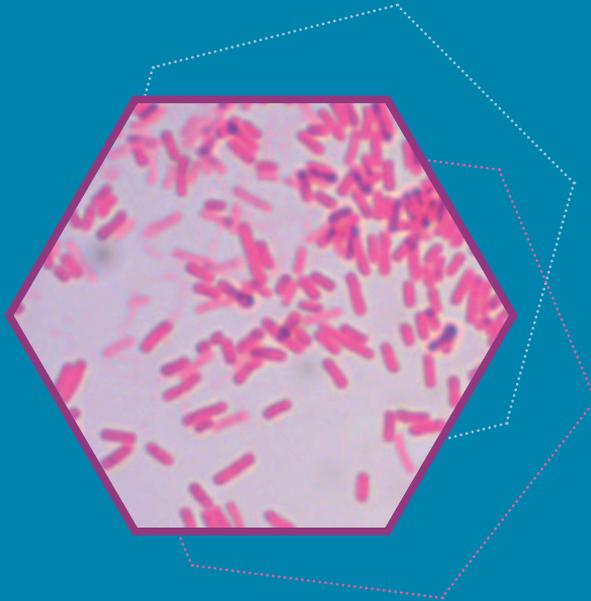
**TABLA 2.** Resultados de ensayos citológicos.<sup>3</sup>

Cepa	Especie	Tinción con azul de tripano *	Citotoxicidad	Adhesión	Invasividad	Prueba de FAS
Hp23	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa

\*Prueba realizada para determinar la cuantificación de la viabilidad celular.

# CAPÍTULO 3

# Epidemiología



### 3.1 POBLACIÓN SUSCEPTIBLE Y FACTORES DE RIESGO

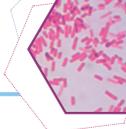
Hasta hace poco había escasa información de infecciones humanas asociadas con *Leclercia adecarboxylata*, en una investigación realizada por Roed y col. que abarca desde el año 1991 hasta el 2018 se reportan 74 casos clínicos de pacientes con *L. adecarboxylata*. La infección por *L. adecarboxylata* se notificó con mayor frecuencia en América del Norte (26 casos), Europa (22 casos) y Asia (21 casos), pero también se notificó en América del Sur (5 casos). La distribución por sexo fue predominante en hombres (44 hombres, 23 mujeres y 7 de sexo desconocido), y todos los grupos de edad estuvieron representados (0-83 años, mediana 48 años).<sup>5</sup>

Las infecciones por *Leclercia adecarboxylata* no suelen ser mortales debido a su baja virulencia y buena susceptibilidad a los antibióticos. El factor de riesgo de infección más identificable es la inmunosupresión, aproximadamente el 60% de los casos reportados ocurren en individuos inmunodeprimidos.<sup>20</sup>

En pacientes inmunodeprimidos, los factores predisponentes para el desarrollo de infecciones graves (sepsis, peritonitis, endocarditis o bacteriemia) son la utilización de dispositivos invasivos (cánulas de diálisis peritoneal, catéteres venosos centrales), extremos de la vida, neoplasias o patologías crónicas (diabetes, síndrome metabólico), en los cuales se describen infecciones monomicrobianas por *L. adecarboxylata*.<sup>21</sup>

Cuando *L. adecarboxylata* se ha identificado en infecciones polimicrobianas en pacientes inmunocompetentes suele ser en coinfecciones con *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter cloacae*, sin embargo, esto en raras ocasiones se ha informado que suceda y cuando ocurre por lo general se presentan en tejidos blandos y se asocian con ambientes acuáticos, como ejemplo: por exposición a piscinas, agua estancada y agua de mar. A pesar de esto, recientemente se ha implicado en varios casos de bacteriemia en el inmunocompetente, de manera puntual, en el 2007, Davenport y Land reportaron el aislamiento de *Leclercia adecarboxylata* de la donación de sangre de un individuo aparentemente sano y podría representar una bacteriemia asintomática transitoria o más probable contaminación por flora epidérmica.<sup>1, 10, 18, 19, 20</sup>

También es importante tener en cuenta que, según los datos disponibles, parece posible que las infecciones atribuidas a *L. adecarboxylata* estén subestimadas y no se hayan informado durante varias décadas, es por ello que los casos clínicos publicados son contados y la gran mayoría son de pacientes adultos inmunológicamente suprimidos o con enfermedades subyacentes.<sup>1, 4, 8</sup>



En gran parte de los casos reportados, se documentan infecciones polimicrobianas y se señala que coexiste sinergia bacteriana, lo que genera la hipótesis de que la transferencia de material genético entre bacterias facilita la virulencia de la *L. adecarboxylata*.<sup>8</sup>

### 3.2 *Leclercia adecarboxylata* EN MÉXICO

El primer brote de *Leclercia adecarboxylata* identificado en México se presentó en el 2019, el cual se describe a continuación. La Secretaría de Salud del Estado de Jalisco confirmó 69 casos de Infección en el Torrente Sanguíneo (ITS) originados a causa de la bacteria que afectaron a 15 hospitales; 13 de la Zona Metropolitana de Guadalajara y 2 en Tepatlán. De dichos casos se reportaron 2 defunciones, de las cuales sólo una fue asociada al brote de la bacteria por parte del Comité Estatal de Vigilancia Epidemiológica.<sup>6,7</sup>

La defunción ocurrió el 22 de mayo del mismo año en el Hospital Civil Juan I. Menchaca, en un recién nacido prematuro extremo. La causa básica de la muerte fue la infección por la bacteria.<sup>6</sup>

El total de afectados recibieron Nutrición Parenteral Total (NPT), por lo que se asoció a esta como posible causa del brote, y se confirmó mediante un estudio realizado por Garza – González y col.<sup>53</sup> en tres de los 15 hospitales afectados donde detectó la contaminación proveniente de las botellas de NPT sin abrir y la cepa de la nueva botella se identificó mediante métodos moleculares para coincidir con la cepa aislada de los pacientes.<sup>6,22</sup>

Los pacientes afectados por el brote sufrían de antemano padecimientos graves como apendicitis aguda con peritonitis generalizada, enfermedad de sistema digestivo no especificada, tumor maligno de páncreas y gastroenteritis por *C. difficile*, en el caso de los adultos.<sup>6</sup>

En tanto que los menores de un año de edad presentaban enfermedades de base como atresia y estenosis congénita de otras partes especificadas del intestino grueso, dificultad respiratoria, síndrome de Down, cardiopatía congénita, gastrosquisis, hijo de madre toxicómana, hipoxia neonatal, invaginación intestinal, hemorragia intraventricular, anemia del prematuro, sepsis temprana, miocarditis, persistencia conducto arterioso y sepsis abdominal.<sup>6</sup> Es decir, que en todos los casos *L. adecarboxylata* se presentó como un organismo oportunista.

En su momento las acciones que realizó el Sector Salud en su conjunto ante la presencia de la bacteria fueron: suspensión de la NPT en los hospitales, aislamiento de los casos, soporte hídrico,

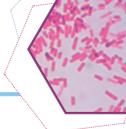
calórico y de electrolitos a los pacientes; cultivos de control para vigilancia de los patrones de sensibilidad y resistencia, tratamiento con un número importante de antibióticos entre los que se encontraban levofloxacina y amikacina, manejo integral con interconsulta diaria al servicio de infectología en cada caso y reporte diario de la evolución de los casos.<sup>6,7</sup>

Así mismo, Garza – González y col. refieren que todos los pacientes, la mayoría de los cuales eran niños (edad media, 78 meses o 6.4 años), se les había administrado NPT a través de la vía central. Un paciente falleció (Tabla 3). La población afectada incluye 23 niños y dos adultos de uno de los hospitales. La estancia media después de un cultivo positivo fue de 31.2 días, con un rango de 3 a 135 días. Antes de un cultivo positivo, un antibiótico inicial que se usa con más frecuencia incluye carbapenémicos, cefalosporinas y aminoglucósidos.

La finalización de la NPT y el uso de tigeciclina fue eficaz en 24/25 pacientes.<sup>22</sup>

**TABLA 3.** Características demográficas y clínicas de los pacientes afectados por el brote de NPT contaminado en el occidente de México.<sup>22</sup>

Característica	No. (% de pacientes) <sup>a</sup>			
	Total	HC –FAA	HP – CMNO	HGZ -21
No. de pacientes	25	11	1	13
Edad media, meses (rango)	78 (1–996)	152 (1–996)	4	21 (2–168)
Hombres	16 (64)	5 (45.5)	1 (100)	10 (76.9)
Sala de hospital				
UCI Neonatal	19 (76)	8 (72.7)	1 (100)	10 (76.9)
Cirugía pediátrica	4 (16)	1 (9.1)	0 (0)	3 (23.1)
Cirugía general	1 (4)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)
Medicina interna	1 (4)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)
Hospitalizaciones previas	8 (32)	2 (18.2)	0 (0)	6 (46.1)
TDE promedio (días)	53.8 (15 –252)	49.1 (15 –135)	32	59.4 (30 –252)
TDE promedio previo a cultivo positivo (días)	22.5 (1 –249)	10.4 (1 –22)	14	33.5 (1 –249)
TDE promedio después de cultivo positivo (días)	31.2 (3 –135)	39.6 (5 –135)	18	25.1 (3 –31)
Estancia en UCI	20 (80)	7 (63.6)	1 (100)	12 (92.3)



**TABLA 3.** Características demográficas y clínicas de los pacientes afectados por el brote de NPT contaminado en el occidente de México (*continuación*).<sup>22</sup>

Característica	No. (% de pacientes) <sup>a</sup>			
	Total	HC –FAA	HP – CMNO	HGZ -21
Cirugías previas	10 (40)	1 (9.1)	0 (0)	9 (69.2)
Número de antibióticos usados antes del cultivo positivo				
1 – 3	15 (60)	6 (54.5)	1 (100)	8 (61.5)
4 o más	10 (40)	5 (45.5)	0 (0)	5 (38.5)
Antibióticos usados después de cultivo positivo, n (%)				
Carbapenémicos	18 (72)	5 (45.5)	0 (0)	13 (100)
Cefalosporinas	15 (60)	11 (100)	1 (100)	3 (23.1)
Aminoglucósidos	13 (52)	8 (72.7)	1 (100)	4 (30.8)
Glucopéptidos	7 (28)	3 (27.3)	0 (0)	4 (30.8)
Fluoroquinas	6 (24)	0 (0)	0 (0)	6 (46.1)
Penicilina	5 (20)	4 (36.4)	0 (0)	1 (7.7)
Colistina	4 (16)	1 (9.1)	0 (0)	3 (23.1)
Metronidazol	3 (12)	2 (18.2)	0 (0)	1 (7.7)
Otros	7 (28)	1 (9.1)	0 (0)	6 (46.1)
Mortalidad	1 (4)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)

**Abreviaturas:** HC-FAA Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, HP-CMNO Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente, HGZ-21 Hospital General de Zona 21. UCI Unidad de Cuidados Intensivos, TDE Tiempo De Estancia, NPT Nutrición Parental Total.

Como ya se ha mencionado y según lo comentado por el Dr. Jaime Andrade Villanueva (ex rector del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara), el brote se convirtió en un problema grave debido a que no se conocía el comportamiento epidemiológico que pudiera tener esta bacteria ni otras características en especial, solamente algunos casos aislados que se habían reportado en la literatura; después de 57 años de ser descrita por primera vez.<sup>7</sup>

### 3.3 Infecciones por *Leclercia adecarboxylata*

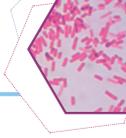
Como ya se ha descrito anteriormente, los casos clínicos por *L. adecarboxylata* publicados son contados; en la gran mayoría se documentan infecciones polimicrobianas en pacientes adultos inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes.<sup>8,12</sup>

*L. adecarboxylata* puede causar bacteriemia, infección de heridas, colecistitis y endocarditis, especialmente en pacientes con enfermedades primarias como cáncer, leucemia, insuficiencia renal y cirrosis. Los informes en padecimientos clínicos generalmente son sobre adultos con úlceras infectadas, infección de vías urinarias y afecciones asociadas con la disfunción de la barrera cutánea, que incluyen traumatismos, quemaduras, diálisis peritoneal y celulitis.<sup>1,8,12</sup>

En el estudio realizado por Tamura et al. los casos en los que se aisló *Leclercia* en cultivo puro, generalmente de sangre, incluyen pacientes con gastrosquisis y atresia intestinal, leucemia no linfocítica aguda después de un trasplante de médula ósea, cirrosis alcohólica, enfermedad renal en etapa terminal con peritonitis relacionada con el catéter (aislada solo del líquido peritoneal) y leucemia mieloide aguda.<sup>2</sup>

La mayoría de las infecciones polimicrobianas se produjeron en pacientes inmunodeprimidos. Estas incluyeron un paciente con una vesícula biliar crónicamente inflamada de tejido mezclado con *Enterococcus spp.*, y un paciente con enfermedad de Still que desarrolló neumonía y sepsis después de una cirugía de hernia; el aislado de esputo se mezcló con *E. coli*, *K. oxytoca* y *Haemophilus influenzae*. Ocurrieron otras infecciones mixtas en un paciente con leiomiomas (de una muestra de sangre y de la punta del catéter se aisló el microorganismo mezclado con *Escherichia hermannii*), un paciente de bypass coronario (muestra de sangre, mezclado con *Enterococcus faecalis* y *E. hermannii*) y un paciente con leucemia linfoblástica aguda (muestra de sangre, mezclado con *Staphylococcus aureus*). Finalmente, tres individuos sanos tenían infecciones polimicrobianas de heridas en las extremidades inferiores.<sup>2</sup>

A continuación se describen los padecimientos que más frecuentemente se reportan asociados a *Leclercia adecarboxylata*:



### 3.3.1 Bacteriemias

Se define bacteriemia como la invasión del torrente circulatorio por microorganismos, diagnosticándose mediante la realización de hemocultivos.<sup>23</sup>

En el caso específico de *Leclercia adecarboxylata*, las bacteriemias son relevantes debido a que, junto con las infecciones de heridas, son el tipo de infecciones que más frecuentemente se reportan.<sup>13</sup> La mayoría (> 67 %) de los casos de bacteriemia por *Leclercia adecarboxylata* ocurre en pacientes inmunodeprimidos.<sup>24</sup>

### 3.3.2 Infecciones cardiovasculares y asociadas a dispositivos

#### Endocarditis infecciosa

La endocarditis infecciosa se define, como lo dice su nombre, por la infección de una válvula cardíaca, de la superficie endocárdica o de un dispositivo cardíaco permanente, se caracteriza por presentar una lesión conocida como vegetación, compuesta por una colección de plaquetas, fibrina, microorganismos y células inflamatorias.<sup>25, 26</sup>

Las causas y la epidemiología de la enfermedad han evolucionado en las últimas décadas con una duplicación de la edad promedio de los pacientes y una mayor prevalencia en pacientes con dispositivos cardíacos permanentes.<sup>26</sup>

Actualmente, en la literatura solo han reportado tres informes de endocarditis por *L. adecarboxylata*, de los casos mencionados, sólo uno se presentó en válvula nativa.<sup>18, 27</sup>

#### Infección asociada a catéter

Como se ha descrito anteriormente no está claro el mecanismo por el que *L. adecarboxylata* alcanza el torrente sanguíneo,<sup>18</sup> sin embargo merecen especial atención aquellos casos de bacteriemias secundarias a infecciones por catéteres, tanto aquellos utilizados para hemodiálisis, así como también para accesos vasculares centrales empleados para el pasaje de nutrición parenteral y quimioterapia, ya que una de las hipótesis es la entrada del microorganismo a través de las zonas por donde se introducen dichos dispositivos.<sup>21</sup>

### 3.3.3 Tracto respiratorio

#### Neumonía

La neumonía es una infección respiratoria aguda común que afecta los alvéolos y el árbol bronquial distal de los pulmones. La enfermedad se divide en términos generales en neumonía adquirida en la comunidad (NAC) o neumonía adquirida en el hospital (NAH), que incluye la neumonía asociada a la ventilación (NAVM).

La primera vez que *Leclercia adecarboxylata* fue aislada de un caso de neumonía fue en 1996 por Temesgen et al., se aisló *Leclercia adecarboxylata* junto *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Haemophilus influenzae* de un cultivo de esputo. La neumonía se clasificó como nosocomial, debido a que se presentó mientras el paciente se encontraba en el hospital después de la reparación de una hernia inguinal.<sup>29</sup> Otro caso de neumonía por *L. adecarboxylata* multirresistente fue descrito por Eiland et al. en el 2013.<sup>30</sup>

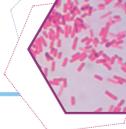
Finalmente, el reporte más reciente que se tiene es una serie de casos, que incluye huéspedes inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Según la definición del Centro para el control y la prevención de enfermedades (CDC), la neumonía contraída por un paciente en un hospital entre 48 y 72 horas después de la admisión se considera neumonía nosocomial. Los tres casos cumplían los criterios. Los pacientes habían recibido ventilación mecánica y los organismos se aislaron de muestras recolectadas varios días después de la admisión, lo que sugiere que se trataba de infecciones nosocomiales.<sup>31</sup>

### 3.3.4 Infecciones intraabdominales

#### Peritonitis

La *Leclercia adecarboxylata* causante de peritonitis ha sido descrita en la literatura, sin embargo, los casos reportados han sido escasos, entre ellos pacientes sometidos a hemodiálisis con catéter tunelizado, lo que destaca la prevalencia de bacterias en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. También se sabe que infecta catéteres temporales en pacientes inmunodeprimidos.<sup>1</sup>

El caso más reciente del que se tiene informe es del año 2019, una mujer de 48 años de edad con antecedentes de enfermedad renal en etapa terminal, secundaria a nefropatía diabética, y que



había estado en diálisis peritoneal automatizada durante 2 años. Se cree que la probable fuente de infección fue por contacto con animales ya que la paciente convive con ganado. Se le trató con Cefazolina durante 3 semanas, obteniendo resultados favorables.<sup>1</sup>

### Colecistitis

La inflamación de las vías biliares supone una de las principales causas de ingreso hospitalario. Se diferencian dos formas clínicas: la colecistitis, relacionada con la inflamación de la vesícula biliar, y la colangitis, que afecta a los conductos biliares.<sup>32</sup>

La colecistitis aguda aparece, en el 90-95% de los casos, tras la obstrucción completa y prolongada del cuello de la vesícula o del conducto cístico por cálculos (*colecistitis*), pero también tras isquemia, trastornos de la motilidad, infecciones o colagenopatías.<sup>32</sup>

Desde 1991 se han informado al menos 3 casos de pacientes con colecistitis por *Leclercia adecarboxylata*; un caso crónico y dos agudos. De estos casos destaca el reportado por Merza y col. en el 2019, que resulta singular por causar shock séptico en un paciente inmunocompetente. Llama la atención, puesto que, como ya se ha recapitulado, los casos de *L. adecarboxylata* en pacientes inmunocompetentes están asociados con infecciones de heridas expuestas y contacto con ambientes acuáticos, mientras que el paciente de dicho caso no tenía ninguna herida abierta y vivía en un área seca y plana sin fuentes de agua abiertas.<sup>33</sup>

## 3.3.5 Tracto urinario

### Infección urinaria

En un estudio realizado por Stock et al. se investigaron 101 cepas de *Leclercia* aisladas predominantemente de especímenes clínicos en el sur de Alemania, curiosamente, de estos, diecinueve eran de pacientes que sufrían infecciones del tracto urinario.<sup>4</sup>

Aunque no hay información sobre la importancia clínica de estas cepas, el aislamiento frecuente de las muestras de orina indica una asociación con la infección del tracto urinario para al menos algunas cepas, aunque el tracto urinario no se cita en la literatura como un sitio de infección por *Leclercia*.<sup>4</sup>

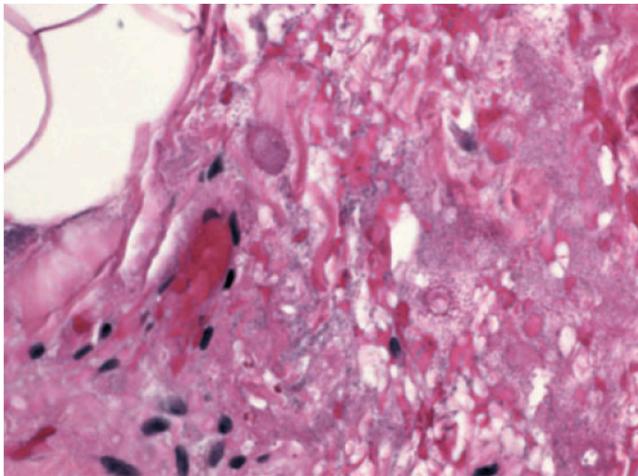
En 1989, Richard revisó el origen de *Leclercia* y describió aislados de orina de esta especie, pero sin anotaciones sobre su importancia clínica.<sup>4</sup>

Finalmente, en el 2021 se informó una Infección del Tracto Urinario (ITU) por *Leclercia adecarboxylata*, sin embargo, el paciente tenía una sonda de Foley permanente, que probablemente contribuyó a la ITU. Como parte de la familia Enterobacteriaceae de la flora intestinal, se teoriza que el riesgo de ITU es secundario a la proximidad y la higiene (hisopos vaginales, absceso glúteo),<sup>34</sup> en pocas palabras, como tal no se tiene certeza de la importancia clínica de *L. adecarboxylata* asociada a ITU.

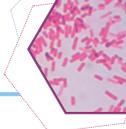
### 3.3.6 Piel y tejidos blancos

#### Celulitis

La celulitis es una infección de la dermis y el tejido subcutáneo, que ocurre cuando los patógenos ingresan a través de roturas en la piel. La interrupción de la barrera cutánea puede ser causada por bacterias del espacio interdigital del dedo del pie, infecciones fúngicas del pie (p. ej. tinea pedis, onicomicosis), úlceras por presión y úlceras venosas de la pierna.<sup>35</sup>



**FIGURA 3.1** Tinción con hematoxilina y eosina a un aumento de 60X, muestra numerosas bacterias de *Leclercia adecarboxylata* dentro de la dermis profunda y el tejido subcutáneo.<sup>36</sup>



La celulitis generalmente se presenta como un área de eritema mal delimitada, aguda y extendida. Los hallazgos cutáneos en la celulitis siguen los signos clásicos de la inflamación: dolor, calor, rubor (eritema), y tumor (hinchazón). Las características histológicas de la celulitis son inespecíficas e incluyen, edema dérmico, dilatación linfática e infiltración intensa y difusa de neutrófilos alrededor de los vasos sanguíneos. Las etapas posteriores también pueden presentar linfocitos e histiocitos, junto con tejido de granulación.<sup>35</sup>

La celulitis por bacterias Gram - negativas es una complicación bien conocida en pacientes inmunodeprimidos. Aunque *Leclercia adecarboxylata* es una causa poco común de celulitis, se han presentado un par de casos en pacientes pediátricos (Figura 3.1), por ello, los médicos deben tener en cuenta este organismo como causa de enfermedad cutánea, especialmente al evaluar a pacientes inmunodeprimidos, en particular aquellos con trastornos hematológicos y oncológicos subyacentes.<sup>36, 37</sup>

### Úlceras pépticas

Aunque las úlceras pépticas no han sido reportadas como una puerta de entrada al torrente sanguíneo para organismos patógenos, *Leclercia adecarboxylata*, que generalmente se considera un transeúnte benigno en humanos, puede tener una propensión a invadir el torrente sanguíneo de pacientes con estrés abdominal específico, como la úlcera duodenal.<sup>24</sup>

En un caso particular de un paciente con enfermedad de úlcera péptica secundaria al uso crónico de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), Jean S.S. y colaboradores concluyeron que la úlcera péptica creó un portal de entrada para la bacteria.<sup>24</sup>

### Heridas y quemaduras

Una gran cantidad de casos de infecciones por *Leclercia adecarboxylata* están asociados a heridas de individuos inmunocompetentes. Varios pacientes con infección de tejidos blandos presentan heridas que podrían actuar como entrada directa al tejido, favoreciendo así la patogenicidad.<sup>5</sup>

En el caso de quemaduras, actualmente sólo se tiene reporte de un caso de infección por *Leclercia adecarboxylata*, sin embargo es importante estar alerta a futuros casos que se puedan presentar dado el amplio espectro de infecciones que el microorganismo puede causar, también por los posibles medios de transmisión bacteriana en pacientes que sufren quemaduras, que son la infección cruzada y el contacto de las áreas quemadas (entrada principal de bacterias) con ambiente acuoso contaminado y objetos inanimados.<sup>34</sup>

### 3.3.7 Hueso y articulaciones

#### Artritis séptica

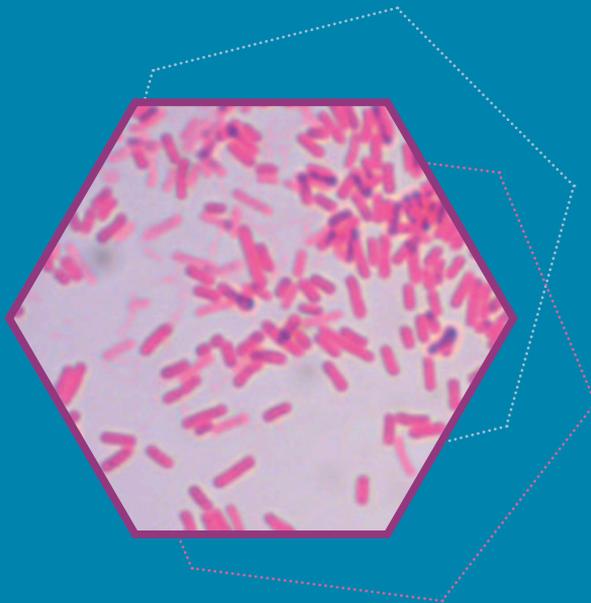
La artritis séptica se define como la presencia de microorganismos en la articulación. La invasión de la articulación ocurre habitualmente por vía hematológica desde un foco primario a distancia y, con mucha menor frecuencia, por diseminación de un foco contiguo o por inoculación directa debida a traumatismos y cirugía ortopédica o bien a procedimientos diagnósticos o terapéuticos, como artrocentesis (punción de la cavidad articular), artroscopia (tipo de endoscopia que consiste en la visualización de una articulación) e infiltraciones intraarticulares.<sup>38</sup>

El primer caso descrito de artritis séptica producida por *Leclercia adecarboxylata* fue en un paciente después de que se le practicara una artrocentesis, por lo tanto, se cree que la infección fue de origen presumiblemente iatrogénico, es decir, el microorganismo pudo contaminar el material empleado en alguna de las maniobras terapéuticas o diagnósticas a las que fue sometido el paciente y provocarle una artritis séptica al ser inoculado directamente en la articulación.<sup>38</sup>

La mayoría de los casos reportados de artritis séptica asociada a *Leclercia adecarboxylata* se han presentado en pacientes inmunocomprometidos y en presencia de otros microorganismos patógenos.<sup>5,20</sup> Sin embargo, un caso particularmente singular se reportó en el 2014, caracterizado por aislarse únicamente *L. adecarboxylata* como causa de artritis séptica en un paciente inmunocompetente.<sup>39</sup>

# CAPÍTULO 4

## Procedimiento diagnóstico para *Leclercia adecarboxylata*



*Leclercia adecarboxylata* tiende a causar infección monomicrobiana en pacientes inmunodeprimidos y requiere de otras bacterias coinfectantes para establecer infección en sujetos inmunocompetentes. Sin embargo, en los últimos años se han descrito casos de infección monomicrobiana en pacientes sin afecciones subyacentes.<sup>6, 8, 15</sup>

Además, aunque *L. adecarboxylata* usualmente es sensible a la mayoría de los antibióticos, hay informes de cepas resistentes, de las más preocupantes son aquellas que exhiben producción de  $\beta$  - lactamasa de SHV-12; y que, por lo tanto, se comportan como un organismo  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido.<sup>8</sup>

Sumado a lo anterior, es probable que exista una subestimación de las infecciones por *Leclercia* debido a la identificación errónea de éstas como *Escherichia coli*, ya que ambas especies comparten varias propiedades estructurales, microbiológicas y bioquímicas.<sup>4, 5</sup>

Por todo lo mencionado, resulta de suma importancia contar con un protocolo integral para el correcto diagnóstico de *Leclercia adecarboxylata*.

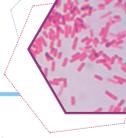
En casi todos los casos de enfermedad infecciosa bacteriana debe confirmarse el diagnóstico bacteriológico con el estudio de laboratorio. Al solicitar el estudio bacterioscópico y el cultivo, es de mucha utilidad comunicar los datos clínicos sobresalientes para seleccionar la metodología que pueda ser de mayor utilidad.<sup>40</sup>

El estudio se inicia tomando la muestra del sitio afectado; después se traslada al laboratorio, donde se realiza el estudio bacterioscópico (examen directo), que consiste en un examen macroscópico, frotis y tinciones (generalmente Gram) e inoculación en medios de cultivo; una vez obtenido el cultivo, se realizan pruebas metabólicas, inmunológicas, entre otras, y también se lleva a cabo pruebas de resistencia a diversos antibióticos; finalmente, se emite un informe.<sup>40</sup>

En todos los casos, debe hacerse un estudio bacterioscópico de la muestra tomada y aprovechar la utilidad de este estudio para orientar la terapia antimicrobiana unos minutos después de haberla tomado.<sup>40</sup>

### 4.1 RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La toma de muestra es la parte más importante de los exámenes preanalíticos, ya que toda la información diagnóstica que puede generar el laboratorio de microbiología depende en gran



medida de la muestra enviada. Esta no sólo tiene que ser la adecuada, sino que además debe cumplir unos requisitos que aseguren su idoneidad y en consecuencia la calidad de nuestro trabajo. 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. <sup>41, 42</sup>

Las consecuencias de una muestra mal tomada y/o mal enviada pueden suponer un fracaso en el aislamiento del agente etiológico o el aislamiento de posibles microorganismos contaminantes que pueden generar tratamientos innecesarios o inadecuados. <sup>42</sup>

*Leclercia adecarboxylata* ha sido aislada de una gran variedad de muestras clínicas humanas, en el presente apartado se describe el procedimiento para la toma de distintas muestras dependiendo del tipo de infección que se sospecha.

### 4.1.1 Bacteriemias

#### Hemocultivo de sangre periférica

Como se ha repetido hasta ahora, *Leclercia adecarboxylata* se caracteriza por causar bacteriemias, y estas suelen diagnosticarse a través de la interpretación de hemocultivos. A continuación, se presentan las recomendaciones que deben seguirse para una adecuada toma de muestra.

#### Material

- Frascos de hemocultivo
- Ligadura de látex o de goma
- Jeringas y agujas de punción
- Gasas estériles
- Guantes estériles
- Mascarilla
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%
- Solución Yodada. <sup>43</sup>

## Obtención de la muestra.

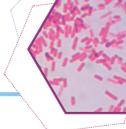
La metodología para seguir en la extracción de un hemocultivo se menciona a continuación:

1. Utilización de guantes y mascarilla.
2. Limpieza con clorhexidina de los tapones de los viales.
3. selección del lugar de la extracción.
4. Desinfectar la piel con clorhexidina y dejar actuar.
5. Realizar la punción sin tocar la piel del paciente con la mano.
6. No poner en contacto la aguja con el algodón.
7. Extraer la sangre necesaria para que se puedan añadir 1<sup>o</sup> mL de sangre en cada frasco en el caso de los adultos y entre 1 a 5 mL en el frasco pediátrico.
8. Inocular primero el frasco anaerobio; no es necesario añadir aire.
9. Inocular después el frasco aerobio; no es necesario añadir aire.
10. Inocular el resto de los tubos si los hubiere (bioquímica, etc)
11. Agitar suavemente los frascos.
12. Llevar de forma urgente al área de microbiología.
13. Si no fuera posible, mantener a temperatura ambiente <sup>44</sup>.

**Venopunción:** La muestra de sangre para hemocultivo debe extraerse de una vena, utilizando generalmente las del antebrazo. La utilización de sangre arterial no ha demostrado ventajas sobre la venosa. La extracción no debe realizarse a través de catéteres intravenosos o intaarteriales, salvo en los casos de sospecha de bacteriemia asociada a catéter (Ver apartado 4.1.2). Cada muestra de sangre se obtendrá de lugares de venopunción diferentes. <sup>44</sup>

## Asepsia de la piel

- Después de la palpación de la vena elegida para la punción, se limpiará la zona seleccionada con alcohol isopropílico o etílico de 70 %, en forma concéntrica de adentro hacia afuera, en un área de 5 cm de diámetro, durante 30 segundos.



- Una vez seco el alcohol, se aplicará una solución yodada (tintura de yodo al 1-2% durante 30 segundos o povidona yodada al 10% durante 1 minuto) cubriendo un área circular de 2- 4 cm de diámetro. Es importante dejar secar el compuesto yodado para que ejerza su acción oxidante y evitar tocar con los dedos el lugar de la venopunción, así como hablar o toser mientras se realiza la extracción.
- En pacientes alérgicos a los compuestos yodados se deben realizar dos limpiezas con alcohol isopropílico.<sup>44</sup>

Con una técnica aséptica correcta, el número de hemocultivos contaminados no debe exceder del 3%.<sup>44</sup>

### Extracción de la muestra de sangre.

- Antes de proceder a la extracción limpiar los tapones de goma con alcohol iodado o con iodóforo, dejándolo secar al menos un minuto.
- A continuación se insertará la aguja en la vena elegida y se extraerá el volumen de sangre necesario sin utilizar anticoagulante. No debe ponerse algodón u otro material no estéril sobre la aguja en el momento de sacarla de la vena.
- Los frascos de hemocultivo deben inocularse rápidamente para evitar la coagulación de la sangre en la jeringa, atravesándolos con la aguja en posición vertical.
- Se inoculará en primer lugar el frasco anaerobio, evitando la entrada de aire, seguido del aerobio, invirtiéndolos varias veces para mezclar la sangre y el medio de cultivo.
- Mantener los frascos a una temperatura de 37°C.<sup>43,44</sup>

### Volumen de la muestra

La cantidad de sangre a introducir en cada frasco viene determinada por el protocolo de cada hospital, entre 15-20 mL por toma en adultos y 1-3 mL en niños. Como norma general es adecuado que la sangre mantenga una proporción 1:10 con el medio de cultivo. Es decir, para un frasco de 100 mL, introducir 10 mL. de sangre. En caso de neonatos y niños pequeños en que no se pueden obtener volúmenes grandes de sangre es suficiente una cantidad de 1-5 mL, que se introduce en un solo frasco.<sup>41</sup>

### Número de muestras

Tres hemocultivos por paciente, previos al tratamiento antimicrobiano. El intervalo entre las extracciones debe ser superior a una hora cuando sea posible, pero cuando exista una gran urgencia en iniciar el tratamiento, este intervalo puede acortarse hasta 15 minutos. En caso de sepsis y endocarditis subaguda las extracciones se reparten en 24 horas y en caso de que sean los hemocultivos negativos, obtener tres muestras más al día siguiente.<sup>43</sup>

La probabilidad de recuperar el agente causal se incrementa en relación con el número de hemocultivos extraídos al paciente. Es cercana al 60-80% en el primer hemocultivo, del 80-90% cuando se realizan dos hemocultivos y del 90-95% con el tercer hemocultivo<sup>44</sup>

### Transporte

Los hemocultivos deben enviarse al laboratorio lo más rápidamente posible, cuando esto no sea posible, mantener a temperatura ambiente hasta su envío. Nunca refrigerar ni congelar. El tiempo máximo que pueden permanecer a temperatura ambiente antes de introducirlos en el sistema no ha sido definido con exactitud, pero nunca debe superar las 18 h.<sup>43,44</sup>

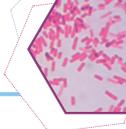
### Observaciones

Cuando no haya venas accesibles puede realizarse la extracción de sangre arterial. No son adecuadas las muestras procedentes de catéter, solamente en caso de que se sospeche contaminación del propio catéter y se complica su retirada; se recomienda tomas del brazo opuesto y otras del brazo del catéter, para saber si es intra o extraluminal.<sup>43</sup>

## 4.1.2 Infecciones cardiovasculares

### Endocarditis

El diagnóstico de endocarditis infecciosa tanto para *Leclercia adecarboxylata* como para cualquier otro microorganismo, requiere la valoración de datos clínicos, análisis microbiológicos y ecocardiográficos. Los criterios de diagnóstico clínico de Duke modificados incorporan estos tres dominios y clasifica los hallazgos como criterios patológicos, mayores o menores (Tabla 4). Tienen una especificidad del 99% y un valor predictivo negativo mayor del 92%.<sup>25</sup>



**Tabla 4.** Criterios de Duke modificados para el diagnóstico de endocarditis infecciosa. <sup>25, 26</sup>

### CRITERIOS PATOLÓGICOS:

- Microorganismos en histología o cultivo de una vegetación o absceso intracardíaco.
- Evidencia de lesiones: vegetación o absceso intracardíaco que muestra endocarditis activa en la histología.

### CRITERIOS MAYORES:

#### A.- Microbiológico:

a.- Microorganismos típicos aislados de 2 hemocultivos separados:

- *Streptococcus viridans*
- *Streptococcus bovis*
- Grupo HACEK (Grupo de bacterias Gram negativas de lento crecimiento que incluyen: *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomy-cetencomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*)
- *Staphylococcus aureus*
- Enterococcus adquirido en la comunidad

b.- Microorganismos compatibles con endocarditis infecciosa aislados de hemocultivos persistentemente positivos: Hemocultivos separados más de 12 horas. Tres o una mayoría de cuatro o más, de los que el primero y el último estén tomados con, al menos, una hora de diferencia.

c.- Hemocultivo único positivo a *Coxiella burnetti* o título de anticuerpo IgG fase I a *Coxiella burnetti* > 1:800.

#### B.- Evidencia de afectación endocárdica:

a.- Nueva regurgitación valvular (El aumento o cambio en un soplo preexistente no es suficiente).

b.- Ecocardiograma positivo:

- Masa intracardiaca oscilante
- Absceso perianular
- Nueva dehiscencia de una válvula protésica.

### CRITERIOS MENORES:

- Enfermedad cardiaca predisponente o uso de drogas por vía intravenosa.
- Fiebre
- Fenómenos vasculares: Embolias, infarto pulmonar séptico, aneurisma micótico, hemorragia intracraneal, hemorragia conjuntival, lesiones de Janeway.
- Fenómenos inmunológicos: Factor reumatoide, glomerulonefritis, nódulos de Osler y manchas de Roth.
- Evidencia microbiológica: Hemocultivos positivos que no cumplen criterios mayores y manchas de Roth.
- Evidencia microbiológica: Hemocultivos positivos que no cumplen criterios mayores
- Evidencia serológica de infección activa con un germen compatible con endocarditis infecciosa.

## DEFINICIÓN DE CASO

### I. Endocarditis infecciosa definitiva:

- Un criterio patológico
- 2 criterios mayores
- Un criterio mayor y 3 menores
- 5 criterios menores.

### II. Posible endocarditis infecciosa:

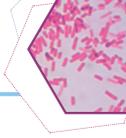
- 1 criterio mayor y 1 criterio menor.
- Criterios menores.

### III. Endocarditis infecciosa descartada:

- Diagnóstico alternativo firme.
- Resolución de las manifestaciones con tratamiento antibiótico en cuatro días o menos.
- No evidencia patológica de endocarditis en la cirugía ni en la autopsia después de cuatro días o menos de tratamiento antibiótico.
- No cumplir criterios para posible endocarditis infecciosa.<sup>25,26</sup>

Ahora bien, cuando se sospecha una endocarditis infecciosa, la toma de muestra para hemocultivos es la misma que la indicada para bacteriemias (Ver apartado 4.1.1), con algunas distinciones; es aconsejable realizar tres hemocultivos con un volumen de sangre por extracción no inferior a 10 mL. Su finalidad es detectar la bacteriemia continua y descartar agentes etiológicos contaminantes como estafilococo coagulasa negativa o corinebacterias.<sup>44</sup>

Además, en endocarditis, infecciones intravasculares y otros casos de bacteriemia continua, pueden extraerse un máximo de 3 hemocultivos repartidos en 24 h con el volumen máximo.<sup>44</sup>



### Infección asociada a catéter.

#### Material

- Guantes de látex estériles.
- Gasas estériles.
- Pinzas y tijeras estériles.
- Recipiente estéril con tapa de rosca y cierre hermético.
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%.
- Alcochol yodado al 1-2 % o un yodóforo al 10%.<sup>44</sup>

#### Obtención de la muestra

- Desinfectar con alcohol una zona de piel de unos 10 cm correspondientes a la zona de entrada del catéter. Hacerlo en forma de círculos concéntricos comenzando por el centro.<sup>44</sup>
- Repetir la misma operación, pero con el alcohol yodado o el iodóforo, dejando que se seque durante 1 minuto.
- Retirar el catéter con la máxima asepsia.
- Con ayuda de pinzas y tijeras estériles, cortar los 5 cm distales del catéter que corresponden a la porción intravascular.
- Introducir el segmento de catéter en un recipiente estéril e identificarlo correctamente.<sup>44</sup>

#### Cantidad de muestra

- Enviar 5 cm de la porción más distal.<sup>44</sup>

#### Transporte y conservación

- Envío inmediato al laboratorio: en < 15 minutos.
- Cuando esto no sea posible: < 24 horas y deberá conservarse la muestra refrigerada a 4°C.<sup>44</sup>

Procedimientos diagnósticos sobre catéteres retirados:

**Cultivo cualitativo de la punta del catéter.** Esta técnica consiste en cortar asépticamente el extremo distal del catéter e introducirlo en un tubo con medio líquido. Es sencilla y sensible, aunque no permite cuantificar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), por lo que no se recomienda en la actualidad.<sup>44</sup>

- **Cultivo semicuantitativo de la punta del catéter.** Descrita por Maki, se cultiva la superficie externa de la punta del catéter. Para ello se rueda la punta distal del catéter intravascular (CIV) en una placa de agar sangre con la ayuda de pinzas estériles. Es la técnica de referencia.<sup>44</sup>
- **Cultivo cuantitativo de la punta del catéter.** Técnicas más complejas descritas por Cleri, Brun-Buisson, Sheretz y Liñares.<sup>44</sup>

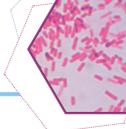
Procedimientos diagnósticos manteniendo el catéter:

Más del 70% de los catéteres retirados por sospecha de infección son estériles, por lo que son necesarios procedimientos diagnósticos que no obliguen a disponer del catéter. Los cultivos de la piel en el punto de inserción y de la conexión, el cepillado endoluminal del catéter y los métodos que comparan los resultados obtenidos de los hemocultivos de sangre extraída de una vena periférica y los realizados a través del catéter son los procedimientos más utilizados. En cuanto a estos últimos, concretamente, se ha propuesto comparar el tiempo de crecimiento de los hemocultivos extraídos de una vena periférica y de los extraídos a través del catéter:<sup>44</sup>

Método de “Diferencia de tiempos para positividad” (DTP):

Los hemocultivos obtenidos a través de catéter se contaminan más que los obtenidos por venopunción a través de piel correctamente desinfectada. Este método de obtención de hemocultivos debería utilizarse sólo en caso de sospecha de bacteriemia relacionada con el catéter para aplicación en el laboratorio del método de DTP. Las condiciones de aplicación del método son las siguientes:

- Se extraerán al menos dos hemocultivos: uno a través del catéter (uno por cada luz) y otro de sangre periférica mediante venopunción.
- Los hemocultivos deben ser extraídos al **mismo tiempo**, inoculados con el **mismo volumen** de sangre y enviados **inmediatamente** al laboratorio, donde serán incubados al mismo tiempo.



- El volante de petición debe reflejar de forma clara el modo de obtención de cada muestra (catéter o sangre periférica, tipo de luz).
- Se debe indicar claramente en la petición si se sospecha de endocarditis.<sup>45</sup>

### 4.1.3 Tracto respiratorio

#### Espujo o espujo inducido.

En las condiciones habituales de la clínica diaria, no es una muestra representativa de la situación existente en el tracto respiratorio inferior por su mezcla con secreciones procedentes de todo el árbol traqueo - bronquial y con la flora saprófita de la orofaringe. No obstante, tomando en cuenta que en la literatura se ha reportado la presencia de *Leclercia adecarboxylata* en muestras de espujo, se incluye en el presente capítulo el procedimiento para su toma de muestra. Además, considerando que es un método fácil y rápido cuya utilidad o relación entre resultado obtenido y verdadera etiología depende en gran medida de su correcta obtención, control de calidad antes de iniciar su procesamiento, tipo de agente que se pretenda detectar y valoración adecuada del resultado.<sup>5,41</sup>

#### Material

- Frasco estéril de boca ancha y hermético.
- Suero fisiológico estéril y nebulizador.
- Agua destilada o solución salina.<sup>41</sup>

#### Técnica o metodología de la obtención del producto

- Enjuagar la boca con agua destilada estéril o solución salina.
- Obtener el espujo tras una expectoración profunda, preferentemente matinal.
- De no producirse expectoración espontánea, puede inducirse el espujo con nebulizaciones de suero fisiológico estéril (15 mL durante 10 minutos), siendo útil además realizar un drenaje postural o fisioterapia respiratoria.<sup>41</sup>

### Volumen mínimo

- De 2 a 10 mL, si es posible. <sup>41</sup>

### Transporte y conservación

- Envío inmediato al laboratorio (no superior a 2 horas). Si no es posible, conservar en refrigeración a 4°C. <sup>41</sup>

### Observaciones

- Es preferible realizar la toma antes de instaurar el tratamiento antibiótico.
- No es útil para anaerobios.

No son inoculables las secreciones de sospechosa procedencia.

- La expectoración debe rechazarse hasta obtener un esputo de calidad suficiente (más de 25 leucocitos polimorfonucleares por campo 100x, y menos de 10 células epiteliales por campo 100x). <sup>41</sup>

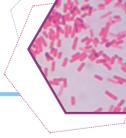
### **Aspirado traqueobronquial simple.**

Obtención con sonda de aspiración. De valor análogo al esputo por su contaminación con la flora orofaríngea. No emplear anestésicos en su obtención por su poder bactericida. <sup>41</sup>

### **Punción transtraqueal.**

#### Material

- Guantes, paños, gasa estériles.
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%.
- Alcohol yodado al 1 ó 2% o un iodóforo al 10% como Povidona iodada.
- Solución salina.
- Jeringas estériles.
- Aguja y catéter nº 14-16 (de subclavia).
- Anestésico local / lidocaína al 1-2% con adrenalina. <sup>41</sup>



Técnica o metodología de obtención del producto.

- Desinfección de la piel con alcohol yodado o Povidona yodada.
- Introducción del catéter por punción a través de la membrana cricotiroidea, inyectar solución salina y aspirar. (Este procedimiento tiene que ser realizado por personal de salud capacitado).<sup>41</sup>
- Volumen de la muestra.
- La máxima cantidad de aspirado posible.<sup>41</sup>

Transporte y conservación.

- Depositar la muestra en un medio de transporte para anaerobios y enviar inmediatamente al laboratorio, de no ser posible mantener a temperatura ambiente hasta su procesamiento (no superior a dos horas).<sup>41</sup>

Observaciones

- Útil en el diagnóstico de anaerobios.
- Útil en enfermos graves que no expectoran o lo hacen con esputos de calidad insuficiente.
- Indicado ante neumonías que responden mal al tratamiento empírico y neumonía nosocomial.
- No aconsejable en enfermedad obstructiva crónica ni en enfermos hospitalizados durante largo tiempo ya que pueden encontrarse muy colonizados. Contraindicado en hipoxia severa y trastornos de coagulación. Posibles complicaciones como enfisema subcutáneo o hemoptisis.<sup>41</sup>

### **Muestras obtenidas a través de fibrobroncoscopía.**

En términos generales las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia salvo el cepillado bronquial por catéter telescopado (CBCT), son muestras contaminadas en mayor o menor grado con flora orofaríngea.<sup>41</sup>

## Material

- Material específico para broncoscopia.
- Recipiente estéril hermético.
- Tubo estéril con 1 mL de solución Ringer.
- Material de corte estéril.<sup>41</sup>

## Transporte y conservación.

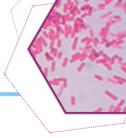
- Enviar inmediatamente al laboratorio. Cuando no sea posible, conservar en refrigeración a 4°C.<sup>41</sup>
- Observaciones
- Es aconsejable recoger tres esputos en días consecutivos tras la broncoscopia.<sup>41</sup>

## Técnica o metodología de obtención del producto.

Pueden emplearse las siguientes:

- **BRONCOASPIRADO (BAS).** Recogida de secreciones respiratorias a través de fibrobroncoscopio, pudiendo introducirse de 3 a 5 mL de suero fisiológico previo a la aspiración. Con menor grado de contaminación que el esputo.
- **CEPILLADO BRONQUIAL POR CATÉTER TELESCOPADO (CBCT).** Cepillado de la mucosa bronquial del lóbulo afectado a través de un fibrobroncoscopio mediante un cepillo telescópado protegido por un doble catéter ocluido distalmente para evitar la contaminación de vías altas.
- **LAVADO BRONCOALVEOLAR LAB.** Lavado de un segmento pulmonar (lóbulo medio o llingula) previo anclado del broncoscopio, introduciendo de 20 a 50 mL de suero fisiológico. Indicado especialmente en procesos pulmonares intersticiales. De escasas complicaciones, pero no obvia la contaminación orofaríngea cuyo problema puede disminuirse si se inserta un tubo endotraqueal para pasar el broncoscopio.
- **BIOPSIA TRANSBRONQUIAL BTB.** Obtención de tejido pulmonar mediante técnica broncoscópica. Posible contaminación de la pinza de biopsia.<sup>41</sup>

Complicaciones: neumotorax, hemorragia.<sup>41</sup>



### Muestras obtenidas por abordaje percutáneo.

Dentro de las técnicas invasivas son las que permiten la obtención de muestras más representativas del parénquima pulmonar, no obstante, sólo deben emplearse cuando fracasen otros métodos menos invasivos o cuando la situación del enfermo haga imprescindible conocer el diagnóstico etiológico.<sup>41</sup>

#### Material

- Material quirúrgico específico para punción.
- Recipiente estéril y hermético.
- Formol al 10%.
- Suero fisiológico.<sup>41</sup>

#### Volumen mínimo

- Si es un producto de aspiración, la mayor cantidad posible. Si es una pieza de biopsia, una cuña de 3mL, cuando sea posible.<sup>41</sup>

#### Transporte y conservación

- Si es un producto de aspiración, depositar en tubo estéril.
- Si es una pieza de biopsia se divide en dos fragmentos: uno se coloca en suero fisiológico o formol al 10% y se envía para estudio anatomo-patológico, y el otro, destinado a ser cultivado en Microbiología, se introduce en un tubo estéril con suero fisiológico. Debe enviarse inmediatamente al laboratorio.<sup>41</sup>

#### Técnica o metodología de obtención del producto

Pueden emplearse las siguientes:

**FUNCIÓN PULMONAR ASPIRATIVA (PPA) TRANSTORÁCICA.** Obtención del exudado de las lesiones pulmonares a través de una punción transtorácica con aguja ultrafina con control radioscópico o ecográfico. Debe aplicarse ante infiltraciones densas (no intersticiales) y sobre todo si son periféricas. Contraindicado en pacientes con bullas, trastornos de coagulación y sospecha de hidatidosis. Posibles complicaciones, como neumotórax y hemoptisis. Es una muestra ideal para estudio en infección anaerobia grave en niños, especialmente en edades tempranas.

- **PUNCIÓN BIÓPSICA PULMONAR.** Biopsia transtorácica con trocar. Sólo en casos excepcionales y en caso de lesiones muy periféricas debido al alto riesgo de neumotórax.
- **BIOPSIA PULMONAR CON TORACOSCOPIO.** Permite Evaluar un paciente con enfermedad pulmonar intersticial
- **BIOPSIA PULMONAR POR TORACOTOMÍA BPT.** Permite la selección visual del aerea neumónica a cielo abierto.<sup>41</sup>

## 4.1.4 Tracto urinario

### Urocultivos

#### ORINA OBTENIDA POR MICCIÓN MEDIA

##### Material

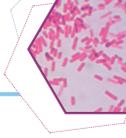
- Gasas estériles.
- Jabón neutro.
- Recipiente de boca ancha con tapa de rosca hermético y estéril.
- Bolsas de plástico o colectores estériles para niños.<sup>41</sup>

##### Obtención del producto

La muestra idónea es la primera micción de la mañana, ya que permite la multiplicación de bacterias durante la noche.<sup>41</sup>

##### Técnicas para mujeres.

- La paciente debe quitarse la ropa interior.
- Se lavará las manos cuidadosamente con agua y jabón, las enjuagará con agua y las secará con una toalla limpia.
- Con una gasa enjabonada se lava bien la vulva pasándola de delante hacia atrás, se repetirá el proceso un total de 4 veces.



- Enjuagar cuidadosamente con agua hervida para eliminar los restos de jabón.
- Se separarán los labios mayores y menores, y los mantendrá separados en todo momento hasta que se haya recogido la orina.
- Se indicará a la paciente que orine desechando los 20-25 primeros mililitros, tras lo cual y sin interrumpir la micción, se recogerá el resto de la orina en el recipiente.
- El frasco debe sujetarse para que no tome contacto con pierna, vulva o ropa del paciente. Los dedos no deben tocar el borde del frasco o su superficie interior.<sup>41</sup>

### **Técnica para hombres.**

- Lavarse las manos con agua y jabón.
- Retraer completamente el prepucio y limpiar el glande con jabón neutro.
- Eliminar los restos de jabón enjuagándolo con agua.
- Desechar los primeros 20 – 25 mililitros de orina y posteriormente, sin interrumpir la micción, recolectar la muestra de orina en el recipiente estéril.
- Cerrar el recipiente. Al igual que en el caso de las mujeres, los dedos no deben tocar el borde del frasco o su superficie interior.<sup>41</sup>

### **Técnica para niños.**

- En niños y niñas mayores la orina se recoge de forma similar a los adultos.
- En niños y niñas más pequeños, la orina se recogerá en colectores o bolsas estériles especialmente diseñadas para ellos de la siguiente forma:
  - Lavado cuidadoso de los genitales y área perineal igual que en los adultos.
  - Colocar la bolsa de plástico o el colector.
  - Vigilar la bolsa cada 30 minutos y tan pronto como el niño haya orinado, deben retirarse y enviarse al laboratorio para su procesamiento.
  - Si la micción no se ha realizado en una hora, se repite la operación colocando una nueva bolsa.<sup>41</sup>

### Volumen mínimo de la muestra

- Es suficiente un volumen de orina de 5-10 mL.<sup>41</sup>

### Transporte

- La orina debe llegar al laboratorio en el plazo de una hora. Cuando esto no sea posible debe refrigerarse a 4°C durante un tiempo máximo de 24 horas. El laboratorio debe controlar el transporte, garantizándose el que las muestras han sido refrigeradas desde el momento de su toma, siendo admisible, si no puede garantizarse el transporte correcto, la utilización de algún conservante (ácido bórico al 2% o el sistema comercial con bórico-formiato).<sup>41</sup>

### Observaciones

- En pacientes ingresados con imposibilidad de recoger la muestra por sí mismos, se realizará sondaje vesical por personal sanitario experto con las medidas asépticas oportunas.<sup>41</sup>

### ORINA VESICAL.

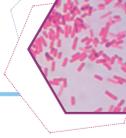
Es la orina obtenida por punción suprapúbica o por citoscopia. La punción suprapúbica requiere un buen conocimiento de la técnica y de las precauciones que hay que adoptar, con rigurosa asepsia, descartando problemas de hemostasia y con la vejiga palpable y previa desinfección y anestesia local.<sup>41</sup>

### Obtención del producto

- Se punciona la vejiga a 1,5 cm de la sínfisis pubiana, en la línea media, estando el paciente en decúbito supino, con una jeringa de 10 mL y con aguja larga (calibre 19) se aspira el contenido vesical (Figura 4.1).<sup>41</sup>

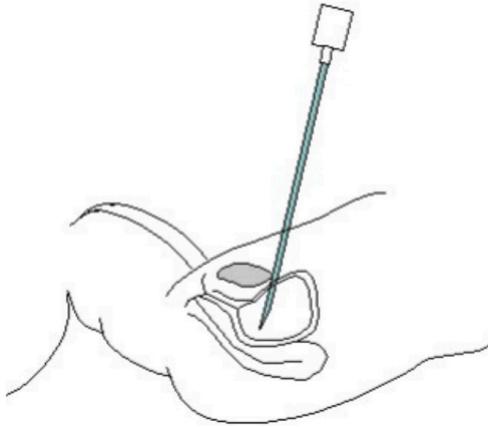
### Transporte

En caso de orina obtenida por punción suprapúbica se enviará al laboratorio lo antes posible en la misma jeringa de la extracción, tras expulsar el aire de su interior y con la aguja pinchada en un tapón de goma estéril, indicando procedencia de la muestra o técnica empleada para su recogida (dato importante a la hora de valorar el recuento de colonias).<sup>41</sup>



Indicaciones.

- Evidencia clínica del cuadro urinario con recuentos bajos o nulos, neonatos y lactantes, cateterización contraindicada o dificultosa, búsqueda de anaerobios y urocultivos repetidos con dos o más bacterias.<sup>41</sup>



**FIGURA 4.1.** Obtención de orina vesical mediante técnica de punción suprapúbica.<sup>41</sup>

### 4.1.5 Piel y tejido blando

Limpieza y desinfección de la piel

En biopsias y heridas cerradas, se recomienda desinfectar la piel con clorhexidina al 2% o etanol de 70°, seguidamente desinfectar con povidona yodada al 10%, dejar secar y eliminar el yodo con etanol antes de tomar la muestra.

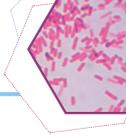
- En heridas abiertas, se recomienda eliminar el material necrótico y los tejidos desvitalizados y lavar a chorro con suero salino estéril.<sup>46</sup>

Obtención de la muestra

- **Abscesos cerrados:** se recomienda aspirar el pus con jeringa y aguja, preferiblemente a través de una zona de piel sana. Si así no se obtuviera una muestra, se puede inyectar suero salino estéril subcutáneo, y volver a aspirar. Una vez realizada la aspiración se

debe expulsar el aire, tapando la aguja con una gasa estéril impregnada en alcohol para eliminar el riesgo de aerosoles. A continuación, se debe cambiar la aguja por otra estéril e inocular el contenido, previa desinfección del tapón de goma, en un vial de transporte para anaerobios. Alternativamente, se puede tapar el cono de la jeringa con un tapón, asegurarlo bien y enviar así la muestra al laboratorio.<sup>46</sup>

- **Heridas abiertas:** con una torunda se debe muestrear un área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> del tejido celular subcutáneo de los bordes de la herida o de la base de la lesión. No se debe frotar con fuerza para evitar el sangrado. En el caso de heridas muy secas, se recomienda impregnar la torunda con suero salino estéril antes de realizar la toma. Se recomienda que la torunda sea de lagunato. Se enviará en un medio de transporte específico (por ejemplo, Amies/Stuart/medio de transporte para anaerobios).<sup>46</sup>
- **Pus:** se recomienda aspirar el pus de la zona más profunda de la herida con jeringa y aguja. La muestra se inoculará en un vial de transporte para anaerobios, como en el caso de los abscesos cerrados.<sup>46</sup>
- **Tejidos obtenidos mediante curetaje y biopsias:** se recomienda obtener suficiente muestra, evitando las zonas necróticas. Estas muestras pueden obtenerse mediante punción – aspiración con aguja fina o con cualquier dispositivo al efecto (por ejemplo, biopsia con sacabocados también llamada “punch”), o mediante procedimiento quirúrgico abierto.<sup>46</sup>
- **Quemaduras:** se recomienda realizar dos incisiones paralelas de 1-2 cm de longitud separadas 1,5 cm; luego, con un bisturí y pinzas estériles, se obtendrá una muestra lo suficientemente profunda como para llegar hasta el tejido viable. En determinadas heridas (como las quemaduras o las heridas crónicas) se recomienda recoger más de una muestra, de diferentes zonas de la herida, porque una única muestra puede no reflejar todos los microorganismos productores de la infección. Si los fragmentos son pequeños se inoculan en un sistema de transporte para anaerobios. Si son más grandes, se introducen en contenedores estériles sobre una gasa estéril humedecida en suero salino estéril para evitar su desecación. Las biopsias se deben fraccionar en dos mitades, una se enviará para estudios microbiológicos y la otra para estudio histológico.<sup>46</sup>
- **Celulitis:** en caso de celulitis, se puede inyectar suero salino estéril subcutáneo en el borde activo de la lesión, y luego intentar aspirarlo (Ver apartado 4.1.6), aunque la sensibilidad diagnóstica de esta técnica es baja (aproximadamente, 30%). Las muestras de tejido se obtienen mediante biopsia (con sacabocados o procedimiento quirúrgico abierto), del borde activo de la lesión.<sup>46</sup>



### 4.1.6 Líquidos biológicos

*Leclercia adecarboxylata* se caracteriza por causar infecciones intraabdominales como colecistitis y peritonitis, para el diagnóstico de dichos padecimientos se requiere de líquido biliar y líquido peritoneal respectivamente. Por otro lado, para el diagnóstico de padecimientos relacionados con los huesos y articulaciones, por ejemplo la artritis infecciosa, la muestra de líquido sinovial suele ser determinante.

Por lo ya mencionado, resulta relevante tener conocimiento de cómo llevar a cabo la toma de muestra de líquidos biológicos que engloba los líquidos orgánicos normalmente estériles.<sup>5,41</sup>

#### Material

- Paños estériles.
- Gasas estériles.
- Guantes estériles.
- Jeringuillas y agujas estériles. No se deben utilizar jeringuillas heparinizadas, pues heparina lleva conservantes que pueden interferir la viabilidad de los microorganismos.
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%.
- Povidona yodada.
- Tubos estériles con tapón de rosca.
- Recipientes estériles de boca ancha (ej. urocultivo).
- Sistemas de transporte de líquidos para estudio de anaerobios.
- Frascos de hemocultivos.
- Hisopos.<sup>41</sup>

#### Obtención de la muestra

- Desinfectar la piel con alcohol, haciendo círculos concéntricos desde el centro hacia la periferia en una zona de unos 10 cm de diámetro.
- Repetir el paso anterior con povidona yodada, dejando secar durante un minuto. En pacientes con hipersensibilidad al yodo, realizar la desinfección con alcohol dos veces consecutivas.

- La toma se hace por punción percutánea (toracocentesis, paracentesis, punción pericárdica o punción articular) de forma aséptica para evitar la contaminación por la flora cutánea o ambiental.
- La punción pericárdica se realiza con control electrocardiográfico.
- Una vez realizada la toma percutánea se retira la povidona yodada de la piel con un apósito impregnado en etanol al 70%.
- Se pueden realizar tomas de líquidos biológicos en el transcurso de intervenciones quirúrgicas, pero hay que evitar la contaminación por la flora de localizaciones próximas. En estas circunstancias debe desaconsejarse el uso de hisopos, siendo preferible también la aspiración; se utilizarán si el contenido no puede ser aspirado.
- La muestra del líquido de diálisis peritoneal ambulatoria crónica puede ser la propia bolsa que lo contiene.
- La aspiración de pus y otros fluidos (bilis, líquido peritoneal, etc.), se puede hacer en el curso de un acto quirúrgico, pero hay que evitar la contaminación por la flora de localizaciones próximas.<sup>41</sup>

### Volumen mínimo

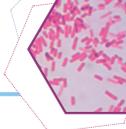
- Para el estudio bacteriano rutinario es suficiente de 1 a 10 mL.<sup>41</sup>

### Transporte.

- Exclusivamente si es necesario evitar la coagulación de algunos de estos líquidos se usará heparina sin conservantes; otros anticoagulantes pueden tener acción bacteriana.

### No usar la jeringuilla utilizada para la recogida.

- Si se emplea es imprescindible sustituir la aguja por una estéril tapada con su correspondiente protector.
- Los recipientes idóneos son tubos estériles de tapón de rosca o de presión negativa sin conservantes. Se llenarán hasta cerca del tapón, de esta forma pueden ser útiles para el estudio de anaerobios, especialmente si la muestra es purulenta.
- Hemocultivos, se inocularán 10 mL. Este es un sistema adicional a los anteriores. Está particularmente indicado cuando el envío se puede retrasar o en los líquidos que pueden coagularse. Si se sospecha anaerobios emplear uno adecuado para estas bacterias.



- Los hemocultivos se mantendrán entre 35°C y 37°C, o en su defecto a temperatura ambiente.
- Las muestras deben ser enviadas inmediatamente al laboratorio y hasta su procesamiento se mantendrán a temperatura ambiente.<sup>41</sup>

Observaciones.

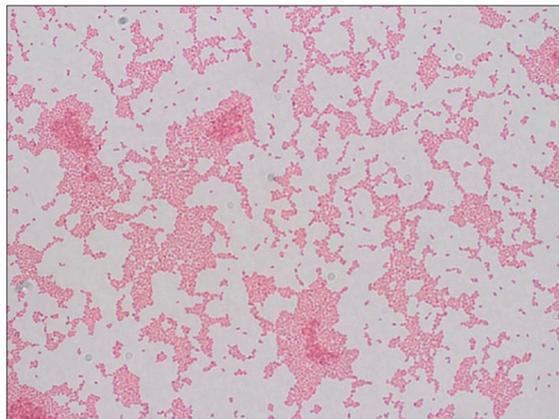
- Cuando se utilice una anestesia local, hay que cambiar de jeringuilla y aguja para hacer la extracción de la muestra, ya que los anestésicos pueden inhibir el crecimiento bacteriano.<sup>41</sup>

## 4.2 EXAMEN MICROSCÓPICO

### 4.2.1 Tinción de Gram

La visualización de *Leclercia adecarboxylata* se logra mediante tinción de Gram (**Ver técnica en Anexo 1**). Se observarán bacilos gramnegativos, con un tamaño de aproximadamente 1 a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 4.2), este resultado únicamente representa una guía para posteriormente seleccionar los medios de cultivo.<sup>13, 19</sup>

Tomando en cuenta que *L. adecarboxylata* suele encontrarse como parte de infecciones polimicrobianas, es importante prestar especial atención en busca de microflora mixta, ya que la bacteria que se encuentre proporcionalmente en mayor cantidad será el agente etiológico más probable.<sup>40</sup>



**FIGURA 4.2.** Tinción de Gram. Bacilos gramnegativos<sup>47</sup>

## 4.3 MEDIOS DE CULTIVO (Ver Anexo 2 para composición y fundamentos)

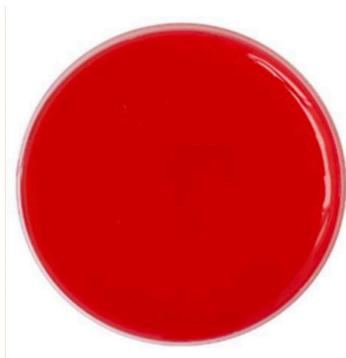
*Leclercia adecarboxylata* se caracteriza por crecer bien en medios de cultivo comunes para enterobacterias como agar sangre de oveja (SBA) y agar MacConkey (MCA).<sup>6,9</sup> Al tratarse de un microorganismo mesófilo los cultivos suelen incubarse a una temperatura óptima de 35 - 37 ° C durante 24 h.<sup>15</sup>

Es de suma importancia mencionar que *L. adecarboxylata* en los medios MacConkey, desoxicolato-lactosa, y eosina-azul de metileno, forma colonias que se asemejan a las de *E. coli* y da los mismos resultados que ésta en las pruebas bioquímicas de Indol, Rojo de metilo, Voges – Proskauer y Citrato (conocidas como sistema IMViC), por lo que se pueden confundir fácilmente en el laboratorio de rutina si no se investiga más.<sup>4,11.</sup>

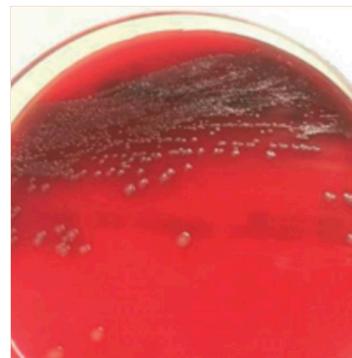
**Morfología macroscópica de *Leclercia adecarboxylata* en diferentes medios de cultivo:**

### 4.3.1 Agar sangre de carnero al 5% (SBA)

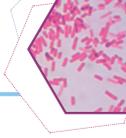
En agar sangre de carnero al 5% (Figura 4.3), tras 24 horas de incubación a 37 ° C en una atmósfera aeróbica suelen presentarse colonias no hemolíticas, grandes, planas y brillantes, además las colonias pueden presentar una pigmentación amarilla. (Figura 4.4)<sup>2, 48, 13, 49.</sup>



**FIGURA 4.3.** Agar sangre de carnero al 5%, sin inocular.<sup>50</sup>



**FIGURA 4.4.** Colonias de *Leclercia adecarboxylata* en agar sangre después de 24 horas de incubación.<sup>51</sup>



### 4.3.2 Agar chocolate

En agar chocolate (Fig. 4.5) suelen observarse colonias mucoides grandes y grises. (Figura 4.6) <sup>47</sup>



**FIGURA 4.5.** Agar chocolate, sin inocular.<sup>52</sup>



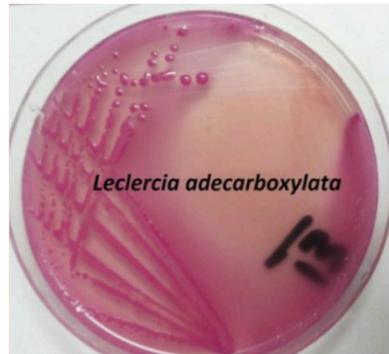
**FIGURA 4.6.** Colonias de *Leclercia adecarboxylata* en agar chocolate. <sup>47</sup>

### 4.3.3 Agar MacConkey (MCA)

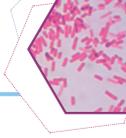
El crecimiento en agar MacConkey (Figura 4.7) da lugar a colonias pigmentadas, mucoides y fermentadoras de lactosa. (Figura 4.8). <sup>12,49</sup>



**FIGURA 4.7.** Agar MacConkey, sin inocular. <sup>53</sup>



**FIGURA 4.8.** *Leclercia adecarboxylata* en agar MacConkey <sup>54</sup>

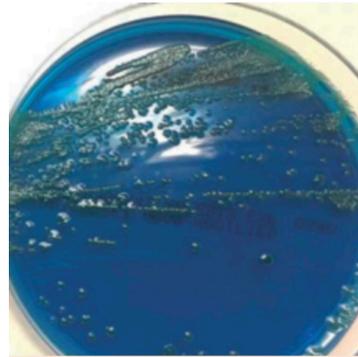


### 4.3.4 Agar lactosa azul de bromotimol (BTB)

En placas de agar lactosa azul de bromotimol (Figura 4.9), predomina la morfología de una colonia que se asemeja al crecimiento de la familia Enterobacteriaceae. (Figura 4.10).<sup>5</sup>



**FIGURA 4.9.** Agar lactosa azul de bromotimol (BTB), sin inocular.

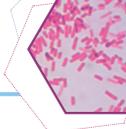


**FIGURA 4.10.** Colonias de *Leclercia adecarboxylata* en agar BTB lactosa después de 24 horas de incubación.<sup>51</sup>

## 4.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Es importante separar *L. adecarboxylata* de otros miembros similares de la familia Enterobacteriaceae. Por ejemplo, las pruebas positivas de urea y ácido fenilpirúvico para *Providencia* y la mayoría de las especies de *Proteus*, nos sirven para descartar dichos microorganismos. Mientras que las pruebas positivas de Voges Proskauer y citrato, para las cuáles *Leclercia* es negativo, pueden ser útiles para diferenciarla de *Pantoea agglomerans*.<sup>2</sup>

Sin embargo, la identificación tradicional basada en propiedades morfológicas y metabólicas es insuficiente para diferenciar correctamente *Escherichia* spp. de *L. adecarboxylata* ya que ambas especies comparten varias propiedades estructurales, microbiológicas y bioquímicas; *L. adecarboxylata* da los mismos resultados que *E. coli* en el sistema IMViC; sus propiedades metabólicas son idénticas en las pruebas de indol, rojo de metilo, citrato, fenilalanina desaminasa, conversión de nitrato a nitrito, ácido múxico, D-glucosa, fermentación de L-arabinosa, fermentación de maltosa, fermentación de L-ramnosa, fermentación de dulcitol, fermentación de eritritol y D-fermentación del manitol. Debido a las similitudes, estas propiedades metabólicas no pueden utilizarse con certeza para distinguirlas. (Tabla 4.1)<sup>4,5</sup>



**TABLA 4.1.** Propiedades bioquímicas de las cepas de *Leclercia adecarboxylata*.<sup>4</sup>

Prueba Bioquímica	Método	Reacción positiva (%)				
		<i>Leclercia adecarboxylata</i>			<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> (inactiva)
		Stock, Burak & Wiedemann	Tamura et al.	Farmer	Farmer	Farmer
Desaminación de aminoácidos	MCN-E, API20E	0	0	0	0	0
Arginina dihidrolasa	MCN-E, API20E	0	0	0	17	3
$\beta$ - galactosidasa (ONPG) <sup>b</sup>	MCN-E, API20E	99	100	100	95	45
Gelatinasa	API20E	12	0	0	0	0
$\beta$ – glucosidasa (hidrólisis de esculina)	MCN-E, API20E	100	100	100	35	5
$\beta$ – glucuronidasa (PGUR) <sup>c</sup>	MCN-E,	0	0	NT	NT	NT
Producción de H <sub>2</sub> S	MCN-E, API20E	0	0	0	1	1
Lisina descarboxilasa	MCN-E, API20E	0	0	0	90	40
Ornitina descarboxilasa	MCN-E, API20E	0	0	0	65	20
Triptofanasa (producción de indol)	MCN-E, API20E	100	100	100	98	80
Ureasa	MCN-E, API20E	12	10	48	1	1
Prueba de Voges - Proskauer	MCN-E, API20E	0	0	0	0	0
Xilosidasa (ONPX) <sup>d</sup>	MCN-E	94	100	NT	NT	NT
Pigmento amarillo	Prueba de placa (48 h)	19	14	37	0	0
Asimilación de:						
Citrato	MCN-E, API20E	0	0	0	1	1
Malonato	MCN-E	100	100	93	0	0
Fermentación de:						
Adonitol	MCN-E, Prueba de placa (48 h)	73	98	93	5	3

TABLA 4.1. Propiedades bioquímicas de las cepas de *Leclercia adecarboxylata* (continuación).<sup>4</sup>

Prueba Bioquímica	Método	Reacción positiva (%)				
		<i>Leclercia adecarboxylata</i>			<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> (inactiva)
		Stock, Burak & Wiedemann	Tamura et al.	Farmer	Farmer	Farmer
L – arabinosa	API20E	100	NT (99°)	NT (99°)	NT (20°)	NT (12°)
D – arabitol	Prueba de placa (48 h)	100	100	100	99	85
D – celobiosa	Prueba de placa (48 h)	91	96	96	5	5
Dulcitol	Prueba de placa (48 h)	100	100	100	2	2
Glucosa	MCN-E	100	100	100	100	100
<i>myo</i> – Inositol	MCN-E	3	0	0	1	1
D – lactosa	Prueba de placa (48 h)	90	100	93	95	20
D – Manitol	API20E	100	100	100	98	93
D – Melibiosa	API20E, Prueba de placa (48 h)	100	100	100	75	40
Rafinosa	API20E	68	59	66	50	15
L – Ramnosa	MCN-E, API20E	99	100	100	80	65
D – Sorbitol	MCN-E, API20E	25	9	0	94	75
Sucrosa	MCN-E, API20E	42	52	66	50	15
D – Xilosa	MCN-E	100	100	100	95	70

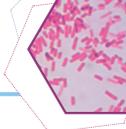
\*La identificación se llevó a cabo con dos sistemas de identificación comercial para Enterobacterias y bacterias relacionadas, conocidos como: Micronaut-E (MCN – E), API 20E y siete pruebas convencionales.

\*Los resultados obtenidos del estudio realizado por Stock, Burak & Wiedemann se contrastan con los datos de Tamura et al. y Farmer. Las características discriminatorias se muestran en las áreas sombreadas. Cabe señalar que los resultados de Farmer se obtuvieron después de 48 h de incubación.

<sup>b</sup> Abreviatura de o-nitrofenil-β-galactopiranosido, <sup>c</sup> p-nitrofenil-β glucurónido, <sup>d</sup> o-nitrofenil-β-xilosido, <sup>e</sup> según la base de datos API20E.

NT, no probado o sin información disponible.<sup>4</sup>

## CAPÍTULO 4. Procedimiento diagnóstico para *Leclercia adecarboxylata*



A pesar de que *L. adecarboxylata* comparte muchas propiedades estructurales y microbiológicas con el género *Escherichia*, existen algunas diferencias; acidifican el adonitol, fermentan el malonato y son tolerantes al KCN, además de que no forman lisina descarboxilasa ni producen álcali cuando se cultivan en un medio de citrato de Christensen (Tabla 4.2). Asimismo, algunas cepas de *L. adecarboxylata* producen un pigmento amarillo. Estas características podrían suponer la separación definitiva de *L. adecarboxylata* de *E. coli*, sin embargo, se debe prestar especial atención a las leclercias bioquímicamente aberrantes, por ejemplo, varias leclercias no pueden producir ácido a partir del adonitol, pero pueden fermentar sorbitol, que es un patrón bioquímico característico de *E. coli*.<sup>4, 5, 11, 48, 55</sup>

**Tabla 4.2.** Comparación de diferencias en pruebas metabólicas entre *L. adecarboxylata* y *E. coli*.<sup>5</sup>

Prueba	% positivo para <i>L. adecarboxylata</i>	% positivo para <i>E. Coli</i>
Lisina descarboxilasa	0	90
Arginina descarboxilasa	0	17
Ornitina descarboxilasa	0	65
Malonato	93	0
Crecimiento en KCN	97	3
Fermentación de celobiosa	100	2
Fermentación de adonitol	94	5
Fermentación de D – arabitol	96	5
Fermentación de D – sorbitol	0	94
Hidrolisis de urea	48	1
Hidrolisis de esculina	100	35
Glicerol	3	75
Salicina	100	40

Se probaron varias cepas y se observa qué porcentaje fueron positivas a la prueba metabólica.<sup>5</sup>

Además de las características bioquímicas, *L. adecarboxylata* presenta resistencia natural a la fosfomicina, dicha característica es distintiva para diferenciarla de *E. coli*.<sup>4, 48</sup>

Finalmente, los medios cromogénicos CPSE (agar translúcido) (Figura 4.11) se utilizan para diferenciar *E. coli* de *L. adecarboxylata* en laboratorios pequeños donde no se dispone de técnicas automatizadas costosas, en dichos medios *L. adecarboxylata* suele presentar colonias verde

turquesa, mientras que *E. coli* generalmente produce colonias de color rosa (Figura 4.12)<sup>55,57</sup> Por otro lado muchas cepas producen un pigmento amarillo no difusible que puede ser débil y puede perderse con el almacenamiento y el subcultivo.<sup>1,9</sup>



**Figura 4.11.** Medio de cultivo cromogénico translucido. (chromID® CPS® Elite agar). Sin inocular.<sup>57</sup>



**FIGURA 4.12.** Medios de cultivo cromogénicos chromID® CPS® agar, inoculados con diferentes bacterias.<sup>58</sup>

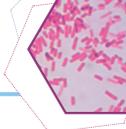
## 4.5 OTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Como ya se ha mencionado, *L. adecarboxylata* comparte muchas propiedades estructurales y microbiológicas con el género *Escherichia*, y los casos clínicos pueden confundirse con una infección por *Escherichia* spp cuando la identificación se basa puramente en determinadas propiedades morfológicas y metabólicas.<sup>5</sup>

Los sistemas de identificación automatizados y la espectrometría de masas en los laboratorios de microbiología clínica juegan un papel muy crítico en el aislamiento de organismos atípicos como *L. adecarboxylata*, y garantizan un diagnóstico correcto del organismo infectante de manera rápida y precisa.<sup>1,5</sup>

### 4.5.1 Sistemas automatizados

La seguridad y rapidez en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana son esenciales en el manejo de los pacientes con enfermedades infecciosas.<sup>59</sup>



Durante la última década se han desarrollado aparatos automatizados y semiautomatizados que permiten obtener resultados de identificación bacteriana y de sensibilidad en un período que oscila entre 2 y 7 h comparado a las 15-24 h que habitualmente demoran los métodos tradicionales.<sup>59</sup>

Existen diferentes tipos de aparatos. La diferencia entre éstos radica en varios factores: la rapidez y confiabilidad en los resultados de identificación y sensibilidad antimicrobiana, el espectro de microorganismos abarcado, los costos de mantenimiento, control de calidad y la presencia de un *software* anexo con capacidad de controlar los mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia antimicrobiana.<sup>59</sup>

El sistema VITEK (Laboratorio bioMérieux, Argentina) (Figura 4.13) es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) del CDC de Atlanta EE.UU.<sup>59</sup>



**FIGURA 4.13.** Sistema de identificación microbiana completamente automatizado VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.<sup>60</sup>

Para la identificación de *Leclercia adecarboxylata* con el Sistema automatizado Vitek 2, (BioMérieux Inc.), se utiliza la tarjeta de identificación GN-VITEK - 2 ref. 21341 indicada para organismos Gram negativos, basado en los estándares del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) del CDC de Atlanta EE.UU.<sup>8</sup>

Distintos estudios han evaluado el rendimiento del sistema *VITEK* en la identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos clínicos. Robinson y cols. obtuvieron una concordancia del 95,5% en la identificación a nivel de especie bacteriana en bacilos gramnegativos, a la cual pertenece *Leclercia adecarboxylata*.<sup>59</sup>

Por otro lado, en un estudio realizado por Jordá V. y col, para el análisis de sensibilidad antimicrobiana el sistema *VITEK* demostró tener una buena confiabilidad en la detección de distintos mecanismos de resistencia antimicrobiana, como la resistencia a  $\beta$  – lactámicos y fluoroquinolonas en enterobacterias. En este estudio la concordancia global de sensibilidad antimicrobiana entre *VITEK* y método de difusión por disco fue del 99,5%.<sup>59</sup>

Las tarjetas de sensibilidad del sistema *VITEK* poseen paneles fijos de antibióticos. Esto constituye una desventaja, debido a que no es posible seleccionar los antibióticos a ensayar. La combinación de varias tarjetas podría obviar este inconveniente, aunque aumentaría notablemente los costos del análisis.<sup>59</sup>

### 4.5.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (EM) es una técnica poderosa para caracterizar a las proteínas, en especial para determinar la masa de una proteína o fragmentos de ella. Con información de este tipo en mano, también es posible determinar parte de la secuencia de una proteína o toda ella. Este método permite una determinación directa muy precisa del cociente de masa ( $m$ ) de una molécula cargada (ion molecular) con relación a su carga ( $z$ ) o  $m/z$ . La espectrometría de masas fue utilizada históricamente como una técnica analítica de la química clínica, pero no fue hasta hace tres décadas con la aparición de las técnicas de “ionización suave” cuando se consiguió analizar biomoléculas de gran tamaño utilizando un láser como fuente de ionización y una matriz orgánica para facilitar el proceso. De ahí el nombre MALDI-TOF, que obedece a las siglas Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI – TOF) o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo.<sup>61, 62</sup>

La espectrometría de masas (EM) ha irrumpido en el laboratorio de microbiología ofreciendo una alternativa rápida y fiable para la identificación de microorganismos. A pesar de que esta tecnología se ha aplicado en diferentes campos durante los últimos años, la reciente creación de plataformas simples y fáciles de utilizar dirigidas al diagnóstico microbiológico ha conllevado su creciente incorporación a los laboratorios de microbiología. Las plataformas comercializadas hasta



el momento utilizan la EM para la identificación de microorganismos mediante dos aproximaciones diferentes: la identificación basada en el perfil proteico específico de cada microorganismo (aproximación proteómica) o el análisis de sus ácidos nucleicos (aproximación genómica).<sup>63</sup>

La fiabilidad del MALDI-TOF no es la misma para la identificación de los distintos grupos de bacterias, sin embargo para *Leclercia adecarboxylata* la espectrometría de masas ayuda a identificar las especies mejor que los sistemas bioquímicos convencionales (92,2% frente a 83,1%) y también da lugar a una mejor identificación del género. La espectrometría de masas MALDI - TOF identifica hasta el 97,7% de las enterobacterias.<sup>1, 62</sup>

Por otro lado, durante el análisis de hemocultivos la identificación de bacterias mediante MALDI-TOF directamente a partir de un hemocultivo positivo permite reducir el tiempo de obtención del resultado en comparación con los métodos convencionales, ofreciendo la posibilidad de mejorar el manejo de los pacientes con sepsis.<sup>63</sup>

Otra ventaja de la tecnología MALDI - TOF es que durante el análisis de hemocultivos generalmente identifica la bacteria más abundante, aunque se ha visto que, si se observan manualmente los espectros y el listado de diferentes identificaciones con valores de fiabilidad más bajos, es posible identificar más de un microorganismo. Esto es de gran valor durante el diagnóstico de *Leclercia adecarboxylata* visto que es usual que se encuentre como parte de infecciones polimicrobianas.<sup>1, 63</sup>

### 4.5.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde y permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula.<sup>64</sup>

Para la biotipificación de *Leclercia adecarboxylata* se utiliza tecnología basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), con secuenciación del marcador molecular 16S rRNA y electroforesis de proteínas de ácidos nucleicos.<sup>8</sup>

Un marcador molecular es un segmento de ADN que corresponde a un gen o regiones no codificantes del genoma, estos segmentos de ADN permiten identificar diferentes variantes (alelos) y se localizan en un sitio determinado en los cromosomas (locus). Las diferencias que se obtienen

en estos fragmentos de ADN se conocen como polimorfismos y se pueden detectar por hibridación de secuencias de ácidos nucleicos, secuenciación de nucleótidos, comparación de la longitud de los fragmentos producidos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a través de sitios reconocidos por enzimas de restricción. Los marcadores moleculares se pueden utilizar para clasificar grupos taxonómicos, poblaciones, familias o individuos, tanto en eucariotas como en procariontes.<sup>65</sup>

El gen ribosomal 16S rRNA (establecido así por la American Society for Microbiology, ASM) se ha utilizado como marcador molecular, ya que permite clasificar a las bacterias y arqueas en grupos taxonómicos de acuerdo con las familias o géneros. Este gen tiene una secuencia aproximada de 1.550 pb de longitud y contiene regiones variables y conservadas con secuencias de oligonucleótidos únicas para cada grupo filogenético. La comparación de las secuencias del gen 16S rRNA de bacterias desconocidas con secuencias conocidas en las bases de datos es de gran ayuda para clasificar a las bacterias a nivel de género e incluso se ha llegado a identificar especies en algunos casos.<sup>65</sup>

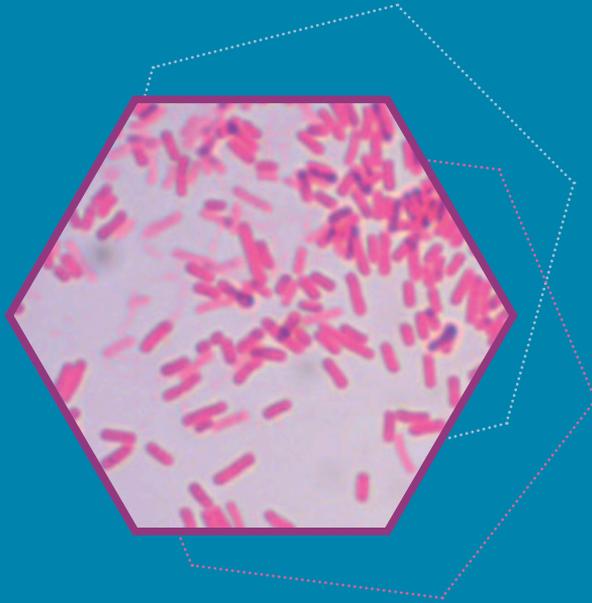
Los ARNr 16S pueden caracterizarse en términos de secuencia parcial, mediante el método de catalogación de oligonucleótidos, utilizado en los estudios pioneros de Woese. Siguiendo esta técnica, el ARNr 16S marcado in vivo, y purificado, se trata con la enzima ribonucleasa T1. Los fragmentos generados se separan, determinándose posteriormente la secuencia de todos aquellos que incluyan al menos seis nucleótidos. A continuación, las secuencias de la colección de fragmentos correspondientes a diferentes bacterias se alinean y comparan, utilizando programas informáticos, para calcular finalmente los coeficientes de asociación.<sup>66</sup>

En microbiología clínica, la identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y la aplicación posterior de un tratamiento adecuado. En la actualidad, la mayor parte de las bacterias de interés clínico pueden identificarse fácilmente mediante técnicas microbiológicas convencionales, que requieren el aislado previo del agente patógeno y se basan en características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica necesita mucho tiempo o resulta difícil, como es el caso de *Leclercia adecarboxylata*, en estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis del ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, aunque cabe mencionar que para *L. adecarboxylata* esta técnica se ha utilizado escasamente para confirmar el microorganismo.<sup>1, 66, 67</sup>

Para la identificación mediante PCR, la amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de una muestra clínica.<sup>42</sup>

# CAPÍTULO 5

# Tratamiento



No existen pautas de tratamiento para la infección por *Leclercia adecarboxylata*, sin embargo, se ha demostrado que este agente causa diferentes tipos de bacteriemias según su lugar de adquisición y para las cuales los regímenes de antibióticos resultan eficaces.<sup>13,1</sup> En tal sentido, a continuación, se describe brevemente el tratamiento antimicrobiano empírico de las bacteriemias según el lugar de adquisición y según la enfermedad subyacente del paciente:<sup>43</sup>

### 5.1 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria de adquisición comunitaria

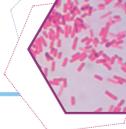
La bacteriemia comunitaria es aquella que tiene su origen en la comunidad y es detectada dentro de las primeras 48 h de hospitalización, no mediando durante ese período ninguna actividad asistencial que pueda haberla inducido. La etiología de las bacteriemias de adquisición comunitaria con criterios estrictos muestra un predominio de las bacterias gramnegativas (68%) sobre las grampositivas (31%).<sup>43</sup> *Leclercia adecarboxylata* al ser gramnegativa es propensa a causar este tipo de bacteriemias.

La amoxicilina-ácido clavulánico es un tratamiento empírico apropiado para el paciente con bacteriemia de origen desconocido procedente de la comunidad sin signos de gravedad.<sup>4</sup>

Se sugiere evitar el tratamiento combinado con aminoglucósidos en el paciente con sospecha de bacteriemia ya que comparado con monoterapia no ofrece beneficio clínico y, por el contrario, aumenta la nefrotoxicidad.<sup>43</sup>

### 5.2 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria asociada a los cuidados sanitarios

En esta categoría se incluyen las bacteriemias secundarias a un procedimiento diagnóstico o terapéutico realizado de forma ambulatoria, las bacteriemias en pacientes ambulatorios portadores de sondas urinarias y catéteres intravenosos (CV), las bacteriemias en pacientes en hemodiálisis crónica y en diálisis peritoneal y las bacteriemias en pacientes ingresados en residencias de ancianos y en centros de larga estancia.<sup>43</sup>



La bacteriemia asociada a los cuidados sanitarios comprende un grupo muy heterogéneo de pacientes con características propias. En general, la etiología y la sensibilidad de las bacteriemias en estos pacientes son más parecidas a las nosocomiales que a las comunitarias.<sup>43</sup>

El tratamiento empírico recomendado en los pacientes estables y sin particulares factores de riesgo es amoxicilina- ácido clavulánico o ceftriaxona. En los pacientes con grave o shock séptico, ertapenem y, si son portadores de sonda vesical permanente, piperacilina-tazobactam o imipenem o meropenem, combinados con vancomicina.<sup>43</sup>

Además, de acuerdo con De Mauri y cols. (2019), las estrategias para tratar la bacteriemia relacionada con el catéter en mencionan en la Tabla 5.1:<sup>1</sup>

**TABLA 5.1.** Tratamiento recomendado para bacteriemias relacionadas con catéter.<sup>1</sup>

<b>Catéteres temporales que pueden ser fácilmente sustituidos</b>	<b>Monoterapia con antibióticos de corta duración (1 a 2 semanas) y reemplazo del catéter.</b>
<b>Catéteres temporales en pacientes complicados con alto riesgo de resultado adverso tras la sustitución del catéter.</b>	Terapia a largo plazo con dos antibióticos y mantenimiento del catéter <i>in situ</i> con monitorización constante
<b>Catéteres de hemodiálisis tunelizados permanentes</b>	Ciclo largo (2 a 4 semanas) con al menos dos antibióticos intravenosos, combinados con terapia “bloqueada”; reteniendo el catéter con monitorización constante

No se recomienda el tratamiento combinado con aminoglucósidos por las razones que se han comentado previamente en las bacteriemias adquiridas en la comunidad, y más aún en estos pacientes más vulnerables a la toxicidad renal de los aminoglucósidos por razones de edad, comorbilidad e interacciones con otros fármacos.<sup>43</sup>

## 5.3 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria de adquisición nosocomial

El origen más común de la bacteriemia nosocomial es el catéter intravenoso (14-52%), seguido de la infección del tracto urinario (18-39%), la neumonía (10-16%), y la infección intraabdominal (9-13%). La bacteriemia es de origen desconocido en el 16% de los casos.<sup>43</sup>

El tratamiento empírico apropiado de estas bacteriemias es más difícil, especialmente las adquiridas en las unidades de cuidados intensivos (UCI), por la mayor frecuencia de bacterias multirresistentes, las enterobacterias productoras de BLEE (como puede ser el caso de *L. adecarboxylata*), e incluso potencialmente panresistentes, en estas circunstancias los informes del Servicio de Microbiología local son imprescindibles para guiar el tratamiento antimicrobiano empírico.<sup>43</sup>

En pacientes con sospecha de bacteriemia nosocomial se recomienda iniciar un tratamiento antibiótico de amplio espectro, especialmente si los signos de infección persisten después de haber retirado el catéter intravenoso.<sup>43</sup>

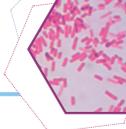
En los pacientes con catéter intravenoso central sin otro foco aparente de infección se recomienda añadir vancomicina al tratamiento inicial. En los pacientes con sepsis grave o shock séptico el tratamiento empírico debe ser más amplio.<sup>43</sup>

En general, el tratamiento combinado con aminoglucósidos no se recomienda porque no ha demostrado beneficio frente a la monoterapia e incrementa los efectos adversos.<sup>43</sup>

## 5.4 Tratamiento antimicrobiano empírico de la bacteriemia primaria en poblaciones especiales de pacientes por su enfermedad subyacente

### 5.4.1 Pacientes en hemodiálisis

Si la situación clínica es estable la vancomicina es el tratamiento empírico de elección. En caso de sepsis grave o shock séptico, es recomendable ampliar la cobertura frente a bacilos gramnegativos.<sup>43</sup>



### 5.4.2 Receptores de trasplante de órgano sólido y de progenitores hematopoyéticos

El tratamiento empírico recomendado en los receptores de trasplante con sospecha de bacteriemia de origen desconocido adquirida en la comunidad sería un betalactámico de amplio espectro, ceftriaxona o amoxicilina-ácido clavulánico.<sup>43</sup>

### 5.4.3 Pacientes con cáncer y neutropenia secundaria a quimioterapia

Ante la sospecha de sepsis sin foco aparente, sin mucositis importante y con estabilidad clínica, está indicado el tratamiento con un betalactámico. Se recomienda añadir un glicopéptido, preferentemente vancomicina, en presencia de mucositis grave, colonización previa por SARM (*S. aureus* resistente a la metilina), infección del catéter intravenoso, y sepsis grave o shock séptico.<sup>43</sup>

### 5.4.4 Pacientes con infección por VIH

En los pacientes con infección por VIH con sospecha de bacteriemia comunitaria y con linfocitos CD4 > 50 cel/ $\mu$ l se recomienda amoxicilina-ácido clavulánico o una cefalosporina de amplio espectro como ceftriaxona o cefotaxima.<sup>43</sup>

### 5.4.5 Adictos a drogas por vía parenteral (ADVP)

En los pacientes con ADVP cuando se sospechen infecciones mixtas con *Streptococcus pyogenes* e incluso anaerobios y bacilos gramnegativos procedentes de la boca, el tratamiento empírico recomendado es amoxicilina-ácido clavulánico.<sup>33</sup> Esto es de relevancia ya que como se ha revisado *L. adedecarboxylata* suele presentarse como parte de infecciones polimicrobianas.<sup>1,2</sup>

## 5.4.6 Otros grupos de pacientes con enfermedades subyacentes

En los pacientes con cirrosis hepática, el tratamiento empírico recomendado es ceftriaxona o cefotaxima.

En los pacientes con lesión medular con sospecha de bacteriemia en los que la etiología mixta es frecuente, el tratamiento empírico recomendado es amoxicilina – ácido clavulánico.<sup>43</sup>

## 5.5 Tratamiento antimicrobiano dirigido

La confirmación de la bacteriemia con la identificación del microorganismo y la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos está disponible generalmente a las 48-72 h de la extracción de los hemocultivos. Esta información junto con la evolución clínica del paciente son la base para modificar, si es necesario, el tratamiento empírico e indicar el tratamiento antimicrobiano dirigido.

Para la selección del tratamiento antimicrobiano dirigido deben tenerse en cuenta cinco principios básicos:

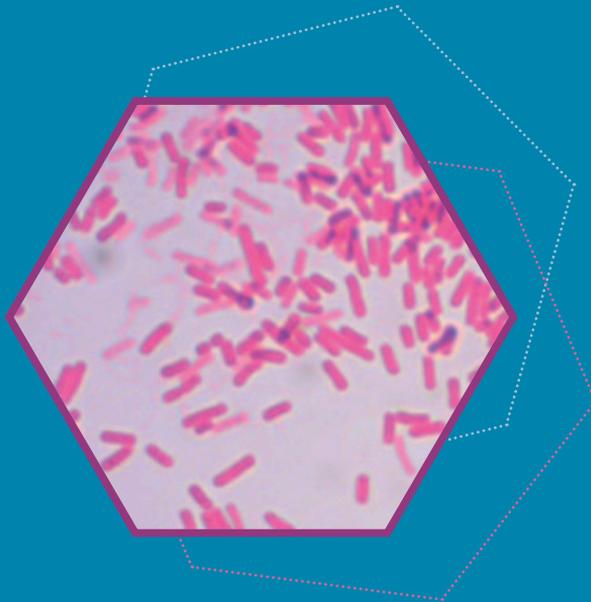
- el antimicrobiano seleccionado debe ser el más eficaz;
- debe ser el más seguro;
- debe ser el de espectro más reducido;
- debe ser el más fácil de administrar, y
- debe ser el más económico.<sup>43</sup>

Para el caso de *Leclercia adecarboxylata*, aparte de la fosfomicina, los patrones naturales de susceptibilidad a los antimicrobianos no indican dificultades terapéuticas para el tratamiento de las infecciones. Sin embargo, se debe prestar especial atención a las *Leclercias* aberrantes que se asemejan a *E. coli* en numerosas propiedades bioquímicas.<sup>4</sup>

En vista de ello, en el Capítulo 6 se describen sus características de sensibilidad y resistencia a antimicrobianos para poder modificar y redirigir el tratamiento de manera más precisa en caso de que el tratamiento empírico no haya resultado eficaz.

# CAPÍTULO 6

## Sensibilidad y resistencia a los antibióticos



*Leclercia* es susceptible a una gran diversidad de fármacos, en el 2004, un estudio realizado por Burak, Stock y Wiedemann, demostró que las cepas de *L. adecarboxylata* son naturalmente sensibles a las tetraciclinas, quinolonas, inhibidores de la vía del folato, cloranfenicol, nitrofurantoína y azitromicina.<sup>1, 11</sup> Es decir que es susceptible a la mayoría de los antibióticos habituales, como la colistina, ácido nalidíxico, sulfadiazina, gentamicina, estreptomycin, kanamicina, carbenicilina y cefaloridina.<sup>1, 5, 9, 21</sup> También es naturalmente sensible a los aminoglucósidos, sin embargo, en años recientes se han detectado casos de resistencia a éstos.<sup>4, 5.</sup>

Por otro lado, se han informado cepas de *Leclercia* resistentes a la ampicilina, así como casos excepcionales de cepas que producen betalactamasas de espectro extendido, resistentes a la penicilina.<sup>1, 5, 9, 21</sup> Así mismo, *Leclercia adecarboxylata* es naturalmente resistente a la penicilina G, oxacilina, eritromicina, roxitromicina, claritromicina, cetólidos, lincosamidas, estreptograminas, linezolid, glicopéptidos, rifampicina, ácido fusídico y, curiosamente, a la fosfomicina.<sup>4</sup>

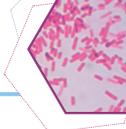
### 6.1 Resistencia a la fosfomicina

La resistencia natural a la fosfomicina puede ser de interés clínico por las siguientes razones: en varios países, la fosfomicina se usa como un agente terapéutico importante contra la osteomielitis y las infecciones del tracto urinario no complicadas, donde están involucradas especies de la familia Enterobacteriaceae (y probablemente también *L. adecarboxylata*). Además, la resistencia natural a la fosfomicina de *L. adecarboxylata* puede representar un parámetro adicional para su separación fenotípica confiable de *E. coli*; esta última especie es naturalmente sensible a la fosfomicina, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el 90% de las cepas en la población natural fueron de 0,5 a 2 mg/L y el grado de resistencia adquirida a la fosfomicina en *E. coli* es generalmente bajo (0 a 1,5%).<sup>4</sup>

El genotipo de la resistencia natural a la fosfomicina en *L. adecarboxylata* es completamente desconocido y podría atribuirse a uno de varios mecanismos diferentes. Una transferasa con baja afinidad por la fosfomicina, o una expresión enzimática de bajo nivel, podrían ser responsables.<sup>4</sup>

### 6.2 Causas de resistencia a antibióticos

Existen reportes en la literatura de cepas de *Leclercia adecarboxylata* que expresan diversos mecanismos de resistencia adquiridos:



En primer lugar, las resistencias naturales que presenta *L. adecarboxylata* son típicas de la mayoría de las enterobacterias; son patrones cromosómicos de resistencia mediados genéticamente y es probable que se deban principalmente a la exclusión del fármaco por la envoltura celular. Por ejemplo, se puede asumir que la vancomicina y la rifampicina no pueden atravesar la membrana externa de *Leclercia* debido a sus grandes tamaños moleculares. Otros antibióticos, como algunos macrólidos, lincosamidas, ácido fusídico y estreptograminas, probablemente no atraviesan la membrana externa debido a sus restos hidrofóbicos; en general, la membrana externa constituye una barrera eficaz contra estos lipofílicos. <sup>8,4</sup>

Igualmente, la resistencia observada de *L. adecarboxylata* a todos los macrólidos, excepto a la azitromicina, es también un fenotipo antimicrobiano común que se encuentra en numerosas enterobacterias. La azitromicina azalida dicatiónica se difunde mejor que la mayoría de los otros macrólidos a través de los canales de porina inespecíficos de la membrana externa y, además, interactúa con el lipopolisacárido ácido y penetra la membrana externa en virtud de esta interacción. <sup>4</sup>

Además *L. adecarboxylata* presenta resistencia a fármacos transferible a través de plásmidos R, y se ha sugerido que los plásmidos R pueden transferirse a bacterias patógenas humanas. Esto posiblemente podría aumentar el riesgo de desarrollar bacterias resistentes a los medicamentos. En el 2020 Sasagaki y col. reportaron un caso de *L. adecarboxylata* resistente a meropenem debido a la producción de carbapenemasa, que se confirmó mediante el método de activación de carbapenemasa modificado. El análisis genómico reveló la presencia del gen carbapenemasa IMP-6 en un plásmido, lo que confirma la adquisición de resistencia por transferencia de plásmidos. <sup>12,15</sup>

También se ha reportado resistencia a la sulfonamida, debido a dos genes de resistencia a aminoglucósidos (*strA* y *aph (6) Id*) y un fragmento de *sul1*, que confiere resistencia a dicho fármaco. <sup>13</sup>Del mismo modo, se ha identificado el gen de  $\beta$ -lactamasa *blaSHV-12* que es transferido por el plásmido “*pAJ1*” en muestras clínicas de *Leclercia adecarboxylata*. <sup>8,3</sup>

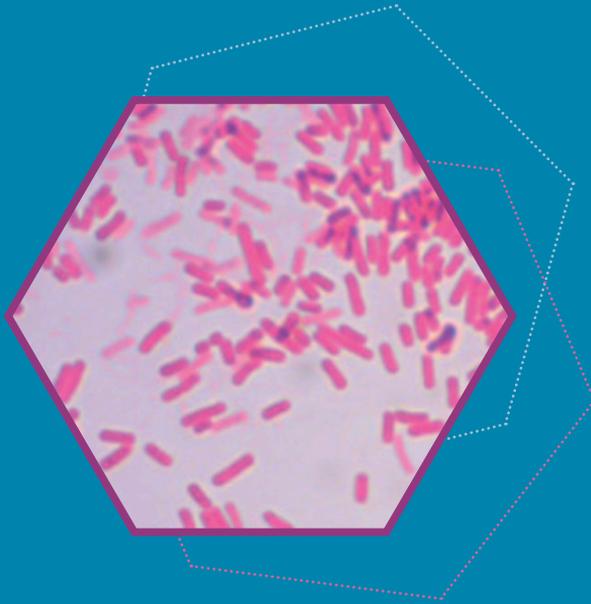
En los últimos años se han reportado más casos inusuales de resistencia por parte de *Leclercia adecarboxylata*, en la Tabla 6 se dan a conocer algunos de estos casos y sus mecanismos de resistencia: <sup>68</sup>

**TABLA 6.** Casos de cepas de *Leclercia adecarboxylata* resistentes a diversos antibióticos. <sup>68</sup>

Mecanismo de resistencia	Aislamiento	Ubicación geográfica	Año
<b>Producción de NDM-1 codificado por plásmido. Gen blaNDM-1, y los genes del grupo blaCTX-M-1, blaTEM y blaOXA-1.</b>	Espuito de un hombre de 43 años con neumonía.	Ciudad de Chongqing, China	2012
<b>Plásmido que contenía el gen bla-VIM-1, con capacidad de transferencia conyugal a la cepa A15 de <i>E. coli</i>.</b>	Estudio de higiene de manos entre el personal del Hospital Na Homolce.	Praga, República Checa.	2013
<b>Presencia de blaTEM-1, blaCTX-M-3 e intl1 con genes dfrA12 y aadA2 (resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos, respectivamente).</b>	Hemocultivos de una paciente con cáncer de mama con un catéter central insertado periféricamente para administración de quimioterapia.	Hospital Universitario en Jeonju, Corea del Sur	2012
<b>Plásmido que porta el gen blaKPC-2.</b>	Cultivos de vigilancia rectal de pacientes.	Laniado Medical Center, Israel.	2013

Por último, es preciso tener presente que la resistencia a antibióticos en *L. adecarboxylata* también puede surgir como un problema relacionado con la exposición ambiental a antibióticos en la producción de alimentos. Los antibióticos se utilizan como aditivos alimentarios para animales de granja para prevenir y tratar enfermedades y mejorar la utilización y producción de alimentos. Sin embargo, los antibióticos no están regulados y se usan indiscriminadamente en muchas partes del mundo, especialmente en Asia y África, y rara vez se recopilan estadísticas sobre su uso. De igual manera, la presencia de *L. adecarboxylata* en la flora intestinal de algunos insectos es de importancia, ya que durante el cultivo de alimentos el microorganismo se ve expuesto a la acción de múltiples insecticidas y antibióticos utilizados para combatir plagas, lo cual da lugar a cambios de virulencia, patogenicidad y susceptibilidad a diversos antibacterianos. Por ello, la educación de las personas que se dedican a la agricultura, así como la vigilancia periódica de *L. adecarboxylata* para monitorear los cambios en la resistencia a los antibióticos es un tema importante y un tema a evaluar en estudios futuros.<sup>8,12</sup>

# ANEXOS

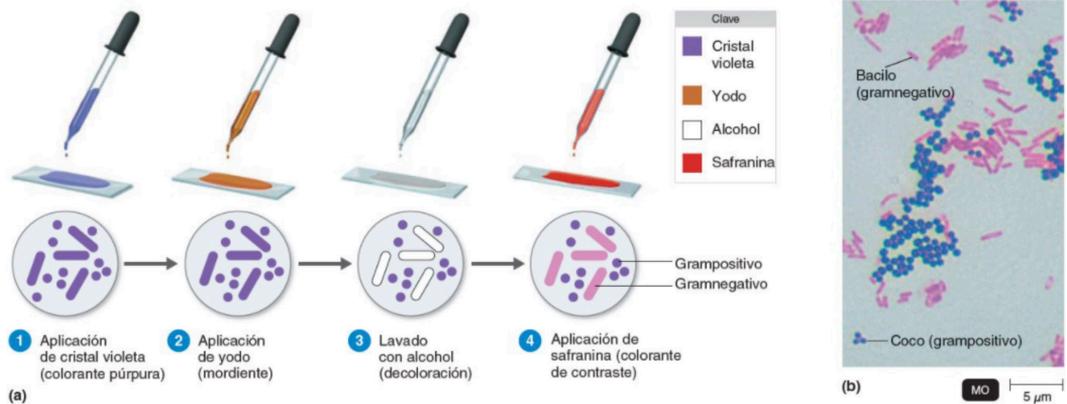


# Anexo 1. Tinciones

## Tinción de Gram

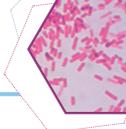
La tinción de Gram fue desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884 y es uno de los procedimientos de tinción más útiles porque permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas.<sup>40</sup>

En este procedimiento (Figura 1 – 1):



**FIGURA A. Tinción de Gram. (a) Procedimiento. (b) Microfotografía de bacterias teñidas con Gram. Los cocos (púrpura) son grampositivos y los bacilos (rosados) son gramnegativos.<sup>27</sup>**

1. Un frotis fijado con calor se cubre con un colorante violeta básico durante 1 minuto, por lo general violeta de genciana. Como el colorante violeta imparte su color a todas las células, se le denomina colorante primario.
2. Se escurre el colorante violeta, se lava el frotis con agua corriente y se cubre con yodo (1 minuto), un mordiente. Cuando se retira el yodo, tanto las bacterias grampositivas como las gramnegativas aparecen de un color violeta oscuro o púrpura.



3. A continuación, se lava el portaobjetos con una solución de alcohol – acetona (1:1) durante 10 segundos. Esta solución es un agente decolorante que elimina el color violeta de las células de algunas especies, pero no de otras.
4. Se elimina el alcohol con agua y se tiñe la preparación con safranina (30 segundos), un colorante básico. Luego se vuelve a lavar el frotis con agua, se seca con papel absorbente y se examina al microscopio. <sup>40, 69</sup>

El colorante violeta y el yodo se combinan en el citoplasma de cada bacteria y lo colorean de violeta oscuro o púrpura. Las bacterias que conservan este color después de haberles agregado el alcohol para decolorarlas se clasifican como grampositivas; las bacterias que pierden el color violeta oscuro y después de la decoloración se tiñen de rojo se clasifican como gramnegativas. <sup>40</sup>

## Anexo 2. Medios de cultivo

### Agar sangre de cordero al 5%

Es un medio muy nutritivo de uso general para el aislamiento y el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes a partir de muestras clínicas.<sup>70</sup>

**Fórmula** (en gramos\* por litro de agua destilada)<sup>70</sup>

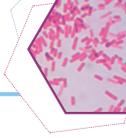
Digerido pancreático de caseína	12,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0
Extracto de levadura	3,0
Extracto de carne bovina	3,0
Almidón de maíz	1,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	13,5
Sangre de carnero, desfibrinada	5%

pH 7,3 ± 0,2

\*Ajustada o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

### Fundamento

El crecimiento se deriva de la combinación de dos peptonas y del extracto de levadura como fuente de vitaminas del complejo B. Se incluye almidón de maíz para absorber los derivados tóxicos contenidos en la muestra y sirve como fuente de energía para los microorganismos que poseen alfa-amilasas. La sangre de carnero permite detectar las reacciones hemolíticas y aporta el factor X (hemo) necesario para el crecimiento de numerosas especies patogénicas. En este medio, las colonias suelen ser más grandes y el crecimiento más profuso que en otros que contienen diferentes bases de agar sangre.<sup>70</sup>



## Agar Mac Conkey

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, aguas y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo.<sup>71</sup>

**Fórmula** (en gramos por litro de agua destilada)<sup>71</sup>

Peptona de carne	1.5 g
Peptona de gelatina	17.0
Tripteína	1.5
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Rojo neutro	0.03
Agar	13.5

pH FINAL: 7.1 ± 0.2

### Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.<sup>71</sup>

## Agar Chocolate

Agar Chocolate consiste en un medio enriquecido con complemento VX de tal forma que favorece el crecimiento de diversos patógenos fastidiosos como *Haemophilus* spp. y *Neisseria* spp. aislados de materiales clínicos nobles (LCR, aspirados invasivos) o no (sangre, secreciones) entre otros.<sup>72</sup>

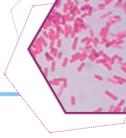
**Fórmula** (en gramos por litro de agua destilada)<sup>72</sup>

Hidrolizado pancreático de caseína	7.5
Peptona de carne	7.5
Fosfato dipotásico	4.0
Fosfato monopotásico	1.0
Almidón de maíz	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Ágar Base	13.0
Hemoglobina	10.0
Complemento VX	10 mL

pH final: 7,3 ±0,2 a 25

### Fundamento

El medio contiene nutrientes nitrogenados en forma de caseína y peptonas de carne, tampón de fosfato para mantener el pH y almidón de maíz, que neutraliza los ácidos grasos tóxicos que pueden estar presentes en el agar. La hemoglobina suministra el factor X (hemin) y el calor libera el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido NAD) para el desarrollo de las especies de *Haemophilus* spp. El enriquecimiento favorece una mayor concentración de los factores V y X, además de vitaminas, aminoácidos, coenzimas, dextrosa, ion férrico y otros factores que mejoran la recuperación de microorganismos fastidiosos, como *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp.<sup>72</sup>



## Agar lactosa con azul de bromotimol y cristal violeta

Medio selectivo para Enterobacterias Gram-negativas en la orina y las heces. <sup>73</sup>

**Fórmula** (en gramos por litro de agua destilada) <sup>73</sup>

Agar bacteriológico	12
Extracto de carne	3
Azul de bromotimol	0.08
Peptona de caseína	7.5
Cristal violeta	0.005

Lactosa	15
Peptona de carne	7.5
Desoxicolato de sodio	1
Tiosulfato de sodio	1
Extracto de levadura	3

### Fundamento

La peptona de caseína, la peptona de carne y el extracto de carne proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B. La lactosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. El tiosulfato de sodio, el desoxicolato de sodio y la violeta cristal inhiben los organismos Gram-positivos. El azul de bromotimol es el indicador de pH. El agar bacteriológico es el agente solidificante. El crecimiento de bacterias Gram-negativas depende de su capacidad para fermentar la lactosa. Los organismos coliformes (*E.coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) fermentan lactosa con producción de ácido, lo que produce un cambio de color del indicador de pH azul de bromotimol que se torna amarillo cuando se produce el ácido. Las bacterias no fermentadoras de lactosa Gram negativas (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Alkaligenes*, *Pseudomonas*, etc.) crecen con colonias azul-verdes. <sup>73</sup>

## Medio cromogénico

Utilizado para la identificación y confirmación presuntiva de microorganismos causantes de infecciones del tracto urinario. Entre las bacterias más comúnmente aisladas en las infecciones urinarias, se encuentran *Escherichia coli*, otros miembros de la familia Enterobacteriaceae y *Enterococcus* spp.<sup>74</sup>

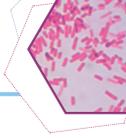
**Fórmula** (en gramos por litro de agua destilada)<sup>75</sup>

Almidón	1.0
Extracto de levadura	6.0
Peptona de carne	6.0
Tripteína	14.0
L-triptofano	1.0
Piruvato de sodio	1.0
Citrato de hierro y amonio	0.02
Mezcla cromogénica	0.2
Agar	15.0

pH final: 6,9 ± 0.2 a 25 °C

### Fundamento

Es un medio que presenta una mezcla de peptonas que proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento y una mezcla de sustratos cromogénicos que son escindidos por enzimas producidas por *Enterococcus* spp, *Escherichia coli* y coliformes. Esta mezcla de cromógenos liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas microbianas específicas por lo que se asegura la diferenciación directa de determinadas especies o la detección de ciertos grupos de organismos, con solo un mínimo de pruebas de confirmación.<sup>74</sup>



# Anexo 3. Principios e interpretación de pruebas bioquímicas

A continuación, se presentan el fundamento e interpretación de las principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Leclercia adecarboxylata*, se ha dado prioridad a aquellas pruebas que sirven para su diferenciación de *E. coli*.

## SISTEMA IMViC

En general, las pruebas indol-rojo de metilo-Voges-Proskauer-citrato (IMViC) son útiles para la identificación de la familia Enterobacteriaceae, de microorganismos gramnegativos relacionados y de bacterias no fermentadoras.

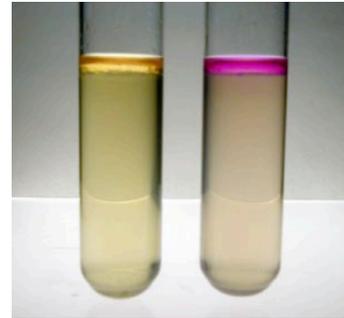
## Indol

### Fundamento

Utilizada para diferenciar bacterias que producen triptofanasa, convirtiendo el triptófano en indol, utilizando como medio de cultivo el caldo de triptona con NaCl 0.5 % y para la detectar la producción de indol se puede usar el reactivo de Ehrlich o el de Kovacs según la preferencia del laboratorio.<sup>76,77</sup>

**Interpretación** (Figura 3.1.)<sup>77</sup>

<b>Positivo (+)</b>	En segundos, aparece un anillo rojo (fucsia brillante) en la interfase del medio con la porción inferior de la fase alcohólica, sobre el medio.
<b>Negativo (-)</b>	No hay ningún desarrollo de color en la capa de alcohol o aparece un anillo turbio; toma el color del reactivo de Kovacs o de Ehrlich (amarillo).
<b>Variable (±)</b>	Un color anaranjado en la superficie del medio, debido al escatol, un compuesto metilado que puede ser un precursor de la formación de indol.



**FIGURA 3.1.**  
Prueba de Indol.<sup>78</sup>

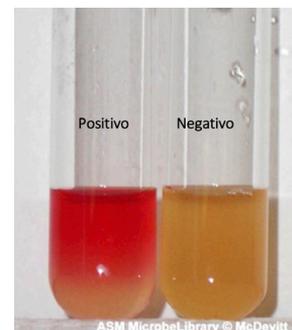
## Rojo de metilo

### Fundamento

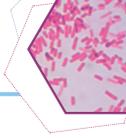
La prueba de rojo de metilo (MR) es una prueba cuantitativa basada en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo, para determinar la concentración de ion hidrógeno (pH) cuando un microorganismo fermenta la glucosa. Para la realización de esta prueba se cultiva el microorganismo en caldo RM/VP (medio de Clark y Lubs) y se incuba a 33 - 37 °C durante 48 a 72 horas.<sup>76, 77, 79</sup>

### Interpretación (Fig. 3.2)<sup>77</sup>

<b>Positivo (+)</b>	El cultivo es suficientemente ácido para permitir que el reactivo rojo de metilo permanezca con un color distintivo rojo brillante, estable (pH 4,4), en la superficie del medio. Los microorganismos MR-positivos producen más ácidos con un pH resultante terminal bajo. Ellos vencen el sistema buffer fosfato y mantienen una acidez en el medio (pH 4,2 o menor).
<b>Negativo (-)</b>	Color amarillo (pH 6) en la superficie del medio
<b>Reacción tardía (±)</b>	El color naranja - rojizo indica que el microorganismo produce menos ácido a partir del sustrato de prueba. Continuar la incubación hasta 4 días y repetir la prueba.



**FIGURA 3.2.**  
Prueba de rojo de metilo.<sup>80</sup>



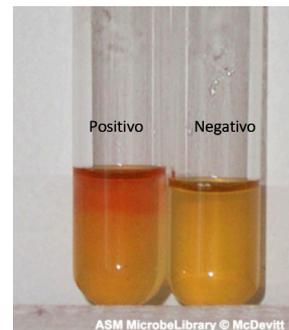
## Voges Proskauer

### Fundamento

La prueba de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección de acetoína, un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. La glucosa es metabolizada a ácido pirúvico, el principal intermediario en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, las bacterias pueden seguir muchos caminos metabólicos; la producción de acetoína es una de las vías metabólicas de la degradación de la glucosa en las bacterias. Al igual que para la prueba de Rojo de Metilo se cultiva el microorganismo en caldo RM/VP (medio de Clark y Lubs) y se incuba a 33 - 37 °C durante 48 a 72 horas. No realizar las pruebas a las 24 horas debido a la presencia de falsos negativos.<sup>76, 77, 79</sup>

### Interpretación (Fig. 3.3)<sup>77</sup>

<b>Positivo (+)</b>	Color rosado-rojo en la superficie del medio (acetoína presente)
<b>Negativo (-)</b>	Color amarillo en la superficie del medio (igual color que el reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero es un resultado negativo (debido a la acción de los reactivos cuando se mezclan).



**FIGURA 3.3.**  
Prueba de Voges-Proskauer<sup>80</sup>

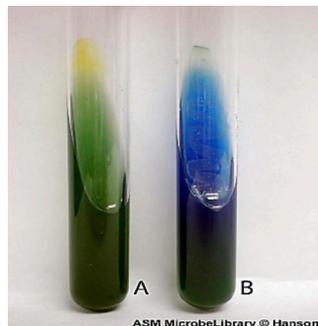
## Citrato

### Fundamento

Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante. Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons, este medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente y azul de bromotimol como indicador de pH.<sup>76, 77</sup>

Interpretación (Figura 3.4.)<sup>77</sup>

<b>Positivo (+)</b>	Crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta.
<b>Negativo (-)</b>	Ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color (verde).



**FIGURA 3.4.**  
Prueba de citrato. **A.** Resultado negativo. **B.** Resultado positivo.<sup>81</sup>

## Prueba LIA (lisina – hierro – agar)

### Fundamento

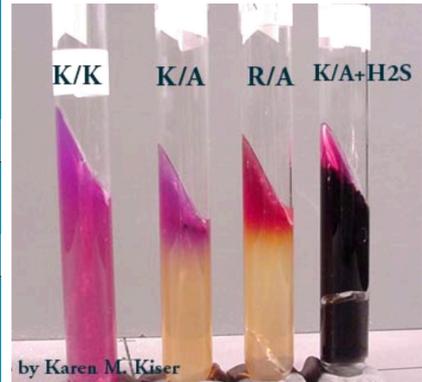
Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, basado en la decarboxilación y desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.<sup>82</sup>

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio y el tiosulfato de sodio son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol, es el indicador de pH (su color es amarillo a pH igual o menor a 5.2 y violeta a pH igual o mayor a 6.8) y el agar es el agente solidificante. Los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio y provocan el viraje del color púrpura al amarillo. El ambiente ácido favorece la actividad enzimática decarboxilasa y se metaboliza la lisina a cadaverina elevando el pH del medio de cultivo y tornándolo al color púrpura o violeta. Los microorganismos fermentadores de glucosa que no tienen actividad lisina decarboxilasa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al color amarillo. A las 24 horas de incubación se observa el fondo del tubo color amarillo y la superficie de color violeta debido al consumo de las peptonas que producen alcalinidad. La generación de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio

debido a la formación de sulfuro de hierro.<sup>82</sup>

**Interpretación** (Figura 3.5)<sup>77, 82</sup>

<b>Descarboxilación de la lisina</b>	
<b>Positivo (+)</b>	<b>K/K:</b> Superficie alcalina (pico violeta) / profundidad alcalina (fondo violeta)
<b>Negativo (-)</b>	<b>K/A:</b> Superficie alcalina (pico violeta) / profundidad ácida (fondo amarillo) La reacción en el extremo inferior se debe a la fermentación de la glucosa.
<b>Desaminación de la lisina</b>	
<b>Positivo (+)</b>	<b>R/A:</b> Superficie rojiza (Desaminación) / profundidad ácida.
<b>Producción de SH<sub>2</sub></b>	
<b>Positivo (+)</b>	Ennegrecimiento del medio de cultivo (especialmente en el límite entre la superficie y profundidad). El H <sub>2</sub> S sólo se produce en un medio alcalino (púrpura). La reacción tiene lugar en anaerobiosis en el extremo inferior del tubo.
<b>Negativo (-)</b>	No se presenta ennegrecimiento del medio.



**FIGURA 3.5.**

Prueba LIA. Posibles resultados.<sup>83</sup>

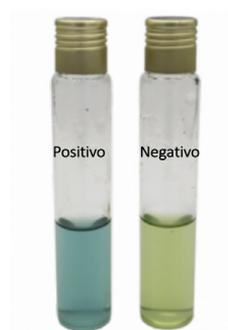
## Malonato

### Fundamento

Determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono con la resultante alcalinidad. El microorganismo se puede inocular en Caldo para malonato de Ewing que utiliza azul de bromotimol (BTB) como indicador de pH o bien en el medio de Shaw y Clarke que requiere de fenilalanina. (Figuras 3.6 y 3.7)<sup>77</sup>

Interpretación (Figura 3.6 )<sup>77</sup>

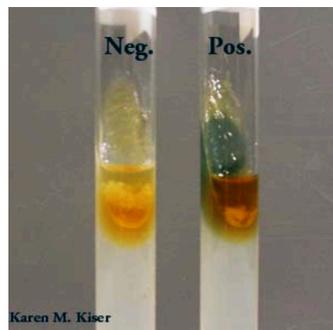
<b>Positivo (+)</b>	a. Reacción alcalina. b. Color azul pálido a color azul Prusia oscuro en todo el medio.
<b>Negativo (-)</b>	Sin cambios de color (verde) o amarillo (sólo fermentación de la glucosa)



**FIGURA 3.6.**  
Prueba de malonato.<sup>84</sup>

Fenilalanina<sup>77</sup>

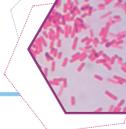
<b>Positivo (+)</b>	Color verde oscuro.
<b>Negativo (-)</b>	Sin cambios; el medio permanece de color azul pálido.



**FIGURA 3.7.**  
Prueba de fenilalanina.<sup>83</sup>

## Crecimiento en caldo KCN

La Base de Caldo KCN Moeller, complementada con una solución de cianuro de potasio, se utiliza en la diferenciación de bacilos entéricos en función de su capacidad para crecer rápidamente en presencia de cianuro. El medio se debe inocular ligeramente para que el inóculo no pueda ser mal interpretado como crecimiento cuando se examinen los cultivos. Esto se puede lograr sembrando



con un asa de 3 mm de un caldo de 24 h, o transfiriendo un inóculo ligero de un cultivo inclinado de agar con un alambre recto. Incubar a  $35 \pm 2$  °C durante 24-48 horas.<sup>85</sup>

**Interpretación** (Figura 3.8)<sup>85</sup>

<b>Positivo (+)</b>	Se observa crecimiento del microorganismo
<b>Negativo (-)</b>	Crecimiento nulo



**FIGURA 3.8.**

Base de Caldo KCN Moeller, sin inocular.<sup>85</sup>

## Pruebas de fermentación de hidratos de carbono

### Fundamento

Pruebas para determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible. El indicador de pH utilizado con más frecuencia para demostrar la fermentación del hidrato de carbono es el rojo fenol, ya que la mayoría de los productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono son ácidos orgánicos. Con el rojo fenol, el cambio de color ocurre cerca del pH original del medio (pH ácido 6,8; medio pH 7,4). Se puede utilizar caldo base con rojo de fenol o bien medio de agar con rojo de fenol, esto dependerá de si se requiere un medio líquido o semisólido y dependerá de cada laboratorio.<sup>77</sup>

Una vez preparado el medio que se va a utilizar, se agregan los hidratos de carbono individuales deseados a alícuotas de caldo base preparado; concentración final:

(1) Salicina, 0,5%

(2) Todos los otros, 1%<sup>77</sup>

Puede utilizarse una variedad de hidratos de carbono de acuerdo con las dificultades encontradas en la identificación de un microorganismo particular.<sup>77</sup> En el caso de *Leclercia adecarboxylata* los azúcares más utilizados con frecuencia y que sirven para diferenciarla de *Escherichia coli* son:

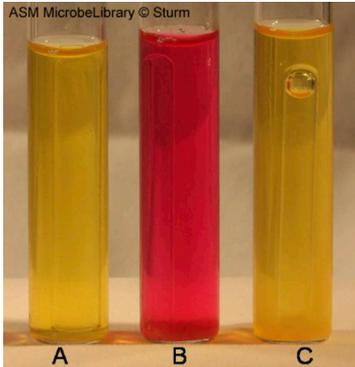
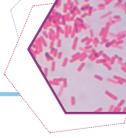
- Manitol
- Celobiosa
- Adonitol
- D – arabitol
- D – sorbitol
- Glicerol
- Salicina<sup>13</sup>

**Interpretación** (Figura 3.9)

### Medio líquido con hidratos de carbono y rojo fenol.<sup>77</sup>

<b>Positivo (A/F)<sup>a</sup></b>	Ácido: color amarillo, pH 6.8
<b>Negativo (-)</b>	a. Color anaranjado o rosa rojizo. b. Peptonas utilizadas con la resultante alcalinidad, pH 8,4.
<b>Producción de gas</b>	
<b>Positivo para el gas (G, ⊕)<sup>b</sup></b>	(a) <b>Aerógeno: CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> presentes.</b> (b) Burbujas de gas presentes en el tubo de Durham insertado o medio completamente desplazado por el gas que deja una porción incolora en el tubo de Durham. (c) Una única burbuja en el tubo de Durham es significativa; registrar como producción de gas. (d) Registrar como producción de ácido y gas (AG, ⊕)
<b>Negativo para el gas</b>	(a) <b>Anaerógeno.</b> (b) Ausencia de burbujas de gas y el medio en los tubos de Durham insertados permanece amarillo. (c) Registrar como producción de ácido solamente.

**a. A:** Acidez. **F:** Fermentación. **G:** Gas, **⊕:** Producción de ácido y gas



**FIGURA 3.9. Fermentación de hidratos de carbono con rojo fenol.**

- a. Positivo. Producción de ácido sin gas.
- b. Negativo. No hay producción de ácido, permaneces color del rojo fenol.
- c. Positivo con producción de gas. El color amarillo indica la producción de ácido. La burbuja en el tubo de Durham indica la producción de gas.<sup>86</sup>

## Prueba de ureasa

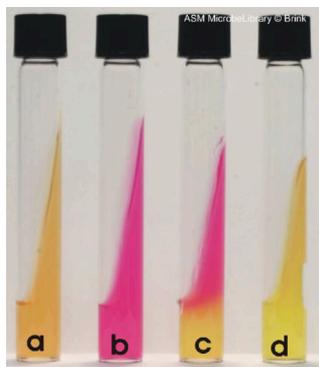
### Fundamento

Esta prueba determina la capacidad de un organismo de hidrolizar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa, con la resultante alcalinidad. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se utiliza sobre todo para diferenciar este género de otras Enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.<sup>78,79</sup>

Se cultiva el microorganismo en agar urea de Christensen, este medio se complementa después del autoclavado con 50 mL/L de urea. Esta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir enzima ureasa. Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndole así de manifiesto la actividad ureasa.<sup>76,77</sup>

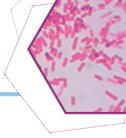
Interpretación (Figura 3.10)<sup>77</sup>

<b>Positivo (+)</b>	Color rosa-rojo (rojo-violeta) intenso en el pico de flauta. El color puede penetrar en el interior del agar; la extensión del color indica la velocidad de la hidrólisis de la urea. a. Grado de hidrólisis 1) 4+; todo el tubo rosa-rojo. 2) 2+; pico de flauta rosa, fondo sin cambios. 3) + débil; la parte superior del pico de flauta rosa, el resto sin cambios.
<b>Positivo rápido</b>	1-6 h para todos los microorganismos Proteeae positivos
<b>Positivo tardío</b>	24 h a 6 días de incubación o más Algunas cepas de <i>Klebsiella</i> Algunas cepas de <i>Enterobacter</i> Algunas cepas de <i>Citrobacter</i> Bacterias distintas de las pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae
<b>Negativo (-)</b>	Sin cambios de color (color piel a amarillo pálido).



**FIGURA 3.10. Prueba de ureasa.**

- a. Control. No inoculado.
- b. Positivo rápido. Rosa brillante en todo el agar.
- c. Positivo tardío. Extensión de color rosa, sólo en el pico de flauta.
- b. Negativo. Coloración amarilla.<sup>87</sup>



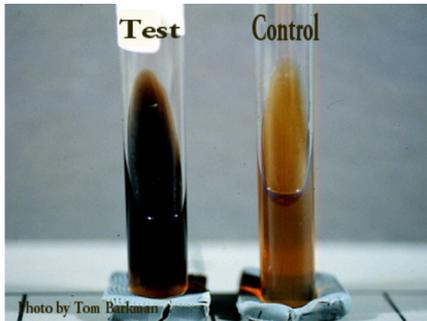
## Pruebas de hidrólisis de bilis y esculina

### Fundamento

Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido esculina a esculina y glucosa en presencia de bilis; una prueba aglucona. Se pueden utilizar el medio de bilis y esculina (BEM) agar (BEA), medio de bilis y esculina modificado (MBEM): sin suero de caballo, o bien bilis esculina azida agar/caldo.<sup>77</sup>

**Interpretación** (Figura 3.11 y 3.12)<sup>77</sup>

<b>Positivo (+)</b>	<p><b>1. Pico de flauta (medio en tubo)</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Un color castaño oscuro a negro difunde hacia el pico de flauta y hacia las colonias translúcidas a blancas.</li> <li>La mitad o más del medio se tiñe de negro</li> </ol> <p><b>2. Medio en placa</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Cualquier ennegrecimiento del medio es significativo.</li> <li>Las colonias están rodeadas por halos de color negro a castaño oscuro.</li> </ol>
<b>Negativo (-)</b>	<p>De la prueba BE para la hidrólisis de la esculina existen tres posibles lecturas:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>No existe ennegrecimiento del medio.</li> <li>Ennegrecimiento de menos de la mitad del medio en los tubos después de una incubación de 72 h (reacción ±).</li> <li>El crecimiento puede ocurrir, pero esto no indica ruptura de la esculina; sólo indica que la concentración de la bilis no inhibió el crecimiento habitual de microorganismos distintos de los enterococos del grupo D.</li> </ol>

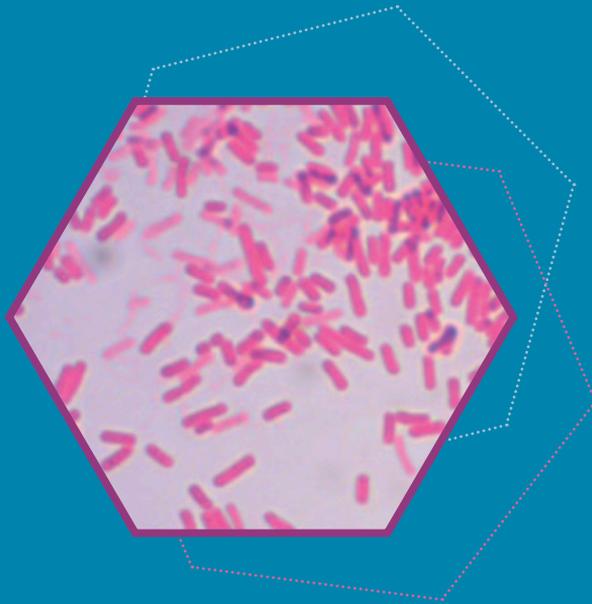


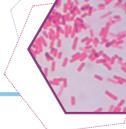
**FIGURA 3.11. Prueba de hidrólisis de bilis y esculina (medio en tubo).** **Test:** Se puede apreciar un color negro que se extiende en todo el medio. **Control:** no se presenta ennegrecimiento del medio.<sup>83</sup>



**FIGURA 3.12. Prueba de hidrólisis de bilis y esculina (medio en placa).** **Positiva.** Las colonias están rodeadas de color castaño oscuro.<sup>88</sup>

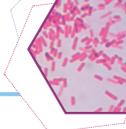
# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





1. Adapa S., Konala V.M., Nawaz F., Javed T., Dhingra H., Gutiérrez I.A., Ramírez M.L. Peritonitis from *Leclercia adecarboxylata*: An emerging pathogen. *Clinical Case Reports* [Internet]. 2019 [Fecha de acceso 28 de diciembre de 2020]; 7(4): 829–831. Disponible en: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/ccr3.2094>
2. Abbott S.L., Janda J.M. *The enterobacteria*. 2<sup>th</sup> ed. Washington D.C.: ASM Press; 2006.
3. Muresu, R., Maddau, G., Delogu, Cappuccinelli P., Squartini A. Bacteria colonizing root nodules of wild legumes exhibit virulence-associated properties of mammalian pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* [Internet]. 2010 [Fecha de acceso 11 de mayo de 2021]; 97, 143–153. Disponible en: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s10482-009-9396-6>
4. Stock, I., Burak, S., Wiedemann, B. Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2004 [Fecha de acceso 01 de marzo de 2021]; 10(8): 724 - 733. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15301675/>
5. Roed S. M., Fruergaard A. P., Havnhøj F. T., Møller N., Percival A. L. *Leclercia adecarboxylata*: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. *Infectious Diseases*. [Internet]. 2019 [Fecha de acceso 15 de marzo de 2021]; 51 (3), 179-188 Disponible en: <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1536830>
6. Secretaría de Salud Jalisco. Concluye brote por *Leclercia adecarboxylata* registrado en Sector Salud. Secretaría de Salud [Internet]. 2019 [Fecha de acceso 15 de marzo de 2021]; Disponible en: <https://ssj.jalisco.gob.mx/prensa/noticia/8565>
7. Hernández P. Brote de *Leclercia adecarboxylata* en Guadalajara vinculado a nutrición parenteral total. *Medscape Noticias Médicas* [Internet]. 2019 [Fecha de acceso 15 de marzo de 2021]; Disponible en: [https://espanol.medscape.com/verarticulo/5904090\\_print](https://espanol.medscape.com/verarticulo/5904090_print)
8. González A.E., González C.Z., Gómez G.L., Ordóñez G.E. Sepsis nosocomial por *Leclercia adecarboxylata* en un lactante. *Acta Pediátrica de México* [Internet]. 2011. [Fecha de acceso 28 de diciembre de 2020]; 32(5): 273-276. Disponible en: [medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2011/apm115c.pdf](http://medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2011/apm115c.pdf)
9. O'Hara, C.M., Farmer, III J.J. *Leclercia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [Internet]. 2015 [Fecha de acceso 05 de enero de 2021]. 1 – 15. Disponible en: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/9781118960608.gbm01152>

10. Davenport P., Land J.K. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from the blood culture of an asymptomatic platelet donor. Transfusion complications [Internet]. 2007 [Fecha de acceso 28 de diciembre de 2020]; 47(10): 1816 – 1819. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17880606/>
11. Mahy B.W., Meulen V.t., Borriello S.P., Murray P.R., Funke G., Kaufmann S.H., Steward M.W., Merz W.G., Hay R.J., Cox F., Wakelin D., Gillespie S.H., Despommier D.D., Borriello S.P. (Eds). Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections. 10<sup>th</sup> ed; John Wiley & Sons; Ltd.2010.
12. Matsura H., Sugiyama S., Sepsis and *Leclercia adecarboxylata*. QJM: An International Journal of Medicine [Internet]. 2018 [Fecha de acceso 03 de marzo de 2021]; 111 (10): 733 – 734. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/325878635\\_Sepsis\\_Leclercia\\_adecarboxylata](https://www.researchgate.net/publication/325878635_Sepsis_Leclercia_adecarboxylata)
13. Deotale V., Shelke Y., Maraskolhe D., Attal R. *Leclercia adecarboxylata* Infection in Protein Energy Malnutrition (PEM) Patient: A Case Report. International Journal of Science and Research (IJSR)[Internet]. 2016 [Fecha de acceso 03 de mayo de 2021]; 5 (1): 1991 – 1992. Disponible en: <https://www.ijsr.net/archive/v5i1/NOV161018.pdf>
14. Teng Z., Shao W., Zhang K., Huo Y., Zhu J., Li M. Pb biosorption by *Leclercia adecarboxylata*: Protective and immobilized mechanisms of extracellular polymeric substances. Chemical Engineering Journal [Internet]. 2019 [Fecha de acceso 07 de noviembre de 2021]; 375 (2019): 1-10. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/pii/S1385894719315074/pdf?md5=12460b6f3e104237d2fb06d14f825619&pid=1-s2.0-S1385894719315074-main.pdf>
15. Barbuddhe S.B., Bera B.C., Bhojar S., Chaudhari S.P., Choudhary B.K., Choudhary M., Jain A., Kale S.B., Isolation and characterization of multidrug-resistant *Leclercia* species from animal clinical case. Letters in Applied Microbiology [Internet]. 2017 [Fecha de acceso 24 de febrero de 2021]; 66 (1): 44 – 48. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/lam.12811>
16. Larry Lefever/Grant Heilman Photography, Inc. Landrace breed. Encyclopædia Britannica [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 10 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.britannica.com/animal/pig-mammal-group#/media/1/1378988/10597>
17. Adrian Davies/Bruce Coleman Inc. Edible snail. Encyclopædia Britannica. [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 10 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.britannica.com/animal/snail/images-videos#/media/1/550259/14418>



18. Malik K., Davie R., Whitters A., Faisal M., Lawal F. A case of *Leclercia adecarboxylata* endocarditis in a 62-year-old man. IDCases [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 10 de noviembre de 2021]; 24(2021): 1-3. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214250921000470/pdf?md5=bf46b557a3af732cbd15fe4854ee2792&pid=1-s2.0-S2214250921000470-main.pdf>
19. Romero C. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 4ta ed. Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana, 2018.
20. King M.A., Brackney C.K., Vesely B.D., Teasdall R.D., Scott A.T., Luther V.P. Osteomyelitis and septic arthritis from rare pathogen *Leclercia adecarboxylata*: A case study. Foot & Ankle Surgery: Techniques, Reports & Cases. [Internet]. 2021. [Fecha de acceso 11 de noviembre de 2021]; 1 (2): 1-3. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667396721000240/pdf?md5=f0c5799ab6260e1645071c65c3a2769d&pid=1-s2.0-S2667396721000240-main.pdf>
21. Courtois M.F., Hernando A., Jokanovich M. V., Paruelo F., Plat F. Colonización de catéter por *Leclercia adecarboxylata*: reporte de un caso pediátrico. Arch Argent Pediatr [Internet]. 2020. [Fecha de acceso 14 de abril de 2021]; 118(4): 418-420. Disponible en: <https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2020/v118n4a21.pdf>
22. Garza-González et al. Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM - producing *Leclercia adecarboxylata*. BMC Infectious Diseases [Internet]. 2021. [Fecha de acceso 11 de noviembre de 2021]; 21(235): 2-8. Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-021-05923-0>
23. Ruiz-Giardín JM, Noguerado Asensio A. Bacteriemias. Anales de Medicina Interna. [Internet]. 2005. [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 22(3): 105-107. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992005000300001](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992005000300001)
24. Jean S.S. et al. *Leclercia adecarboxylata* bacteremia in a patient with long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Journal of Microbiology, Immunology and Infection [Internet]. 2019 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 49 (3): 452 – 454. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1684118213001710?token=7EFEADB290D7EA2474A2EF54E875F4967CE0296DC71B39E708952238785C92DE9E7E16E49496C82A4EF3D7AE27F87941&originRegion=us-east-1&originCreation=20220118031209>
25. Fajardo L. Endocarditis infecciosa. Revista Médica Hondureña [Internet]. 2005 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 73 (2): 83 – 89. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2005/pdf/Vol73-2-2005-7.pdf>

26. Cahill J., Prendergast B. Infective endocarditis. Lancet [Internet]. 2016 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 387(10021): 882 – 893. Disponible en: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736\(15\)00067-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736(15)00067-7)
27. Lee B. A Case of *Leclercia adecarboxylata* Endocarditis in a Woman With Endometrial Cancer. The American Journal of the Medical Sciences [Internet]. 2009 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 337(2): 146 – 147. Disponible en: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/19214035/>
28. Torres A. Pneumonia. Nature Reviews Disease Prime [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 7(25): 1-28. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41572-021-00259-0>
29. Temesgen Z. *Leclercia adecarboxylata* Infections: Case Report and Review. Clinical Infectious Diseases. [Internet]. 1997. [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 25:79 -81. Disponible en: <https://academic-oup-com.pbidi.unam.mx:2443/cid/article-pdf/25/1/79/960296/25-1-79.pdf>
30. Eiland E.H., et al. Pneumonia due to multidrug-resistant *Leclercia adecarboxylata*. American Journal of Health-System Pharmacy [Internet]. 2013 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 70 (11): 940. Disponible en: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.2146/ajhp120525>
31. Prakash M.R. Hospital acquired pneumonia due to *Leclercia adecarboxylata* in a neurosurgical centre. Journal of Postgraduate Medicine [Internet]. 2015 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 61 (2): 123 – 125. Disponible en: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/pmc/articles/PMC4943433/>
32. Gil F. M. et al. Microbiota biliar en pacientes colecistectomizados: Revisión de la antibioterapia empírica. *Revista española de quimioterapia* [Internet]. 2019 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 32(5): 426-431. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6790889/>
33. Merza N. et al. *Leclercia adecarboxylata* Cholecystitis with Septic Shock in Immunocompetent Patient. Case Reports in Critical Care. [Internet]. 2019. [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 2019: 1 - 6. Disponible en: <https://downloads.hindawi.com/journals/cricc/2019/5057071.pdf>
34. Dalamaga M. et al. Isolation of *Leclercia adecarboxylata* from blood and burn wound after a hydrofluoric acid chemical injury. Burns [Internet]. 2009 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 35 (3): 443-445. Disponible en: <https://www-sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0305417908000247?via%3Dihub>

35. Raff, A. B., Kroshinsky, D. *Cellulitis*. Journal of the American Medical Association [Internet]. 2016 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 316 (3): 325. Disponible en: <https://jamanetwork-com.pbidi.unam.mx:2443/journals/jama/article-abstract/2533510>
36. Shah B.S. et al. *Leclercia Adecarboxylata* Cellulitis in a Child with Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatric Dermatology [Internet]. 2011 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 28 (2): 162 – 164. Disponible en: <https://onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/epdf/10.1111/j.1525-1470.2011.01348.x>
37. Keyes J. et al. *Leclercia adecarboxylata*: An Emerging Pathogen Among Pediatric Infections. Cureus. [Internet]. 2020. [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 12 (5): 8049. Disponible en: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/pmc/articles/PMC7286590/pdf/cureus-0012-0000008049.pdf>
38. Pérez M. et al. Artritis séptica por *Leclercia adecarboxylata* de origen probablemente yatrogénico. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2003 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 21 (3): 167 – 168. Disponible en: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/12586025/>
39. Haji S., Kimura H., Yamashita H. Arthritis and bacteremia due to *Leclercia adecarboxylata*. Internal Medicine. [Internet]. 2014. [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]; 53 (22): 2659. Disponible en: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/53/22/53\\_53.2990/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/53/22/53_53.2990/_pdf/-char/en)
40. Tortora G. Introducción a la microbiología [Internet]. 12ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2017 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021].
41. Picazo J. (Ed.) Recogida, transporte y conservación de las muestras. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 1993 [Fecha de acceso 06 de agosto de 2021]; Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1.pdf>
42. Guerrero G., Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2003 [Fecha de acceso 06 de agosto de 2021]; Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
43. Cisneros H., Cobo R., Pujol R., Rodríguez., Salavert L. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas

- y Microbiología Clínica (SEIMC). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2007 [Fecha de acceso 21 de agosto de 2021]; 25(2):111-30. Disponible en: <https://www.elsevier.es/en-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-guia-el-diagnostico-tratamiento-del-13098572>
44. Rodríguez J., Guna M., Larrosa N., Marín M. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares [Internet]. 2017. [Fecha de acceso 6 de junio de 2023]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia62.pdf>.
  45. Caridad S. et al. Manual de recogida, transporte y conservación de muestras. Laboratorio de Microbiología y parasitología [internet] 5ta ed. España: Complejo Hospitalario Universitario de Albacete [Internet]. 2020 [Fecha de acceso 05 de enero de 2022]; Disponib.le en: [https://www.chospab.es/area\\_medica/microbiologia/docTomaMuestras/1\\_Manual\\_recogida\\_transporte\\_conservacion\\_muestras\\_microbiologia.pdf7](https://www.chospab.es/area_medica/microbiologia/docTomaMuestras/1_Manual_recogida_transporte_conservacion_muestras_microbiologia.pdf7)
  46. Cercenado E., Cantón R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2006 [Fecha de acceso 5 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia22.pdf>
  47. Shaikhain T. et al. *Leclercia adecarboxylata* bacteremia without a focus in a non-immunosuppressed patient. American Journal of Case reports [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 23 de mayo de 2021]; 22: 929537. Disponible en: <https://www.amjcaserep.com/abstract/index/idArt/929537>
  48. De la Obra P., Domingo D., Casaseca R., Del Carmen M., López – Brea M. Bacteremia due to *Leclercia adecarboxylata* in a Patient with Multiple Myeloma. Clinical Microbiology Newsletter [Internet]. 1999 [Fecha de acceso 02 de marzo de 2021]; 21 (17): 142 – 143. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0196-4399\(00\)89202-8](https://doi.org/10.1016/S0196-4399(00)89202-8)
  49. Otani E., Bruckner D. *Leclercia adecarboxylata* Isolated from a Blood Culture. Clinical Microbiology Newsletter [Internet]. 1991 [Fecha de acceso 01 de mayo de 2021]; 13(20): 157 -158. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0196-4399\(91\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0196-4399(91)90067-6)
  50. MIDI GLOBAL GROUP S.A.C. Agar Sangre de Cordero 5%. [Internet]. 2020 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://midiglobalgroup.com/wp-content/uploads/2020/11/001-102-Agar-Sangre-de-Cordero-5.pdf>

51. Sasagaki T., Ueda K., Tanaka M., Matsumura Y. Postoperative abscess caused by IMP-6 carbapenemase-producing *Leclercia adecarboxylata* in a patient with intrahepatic cholangiocarcinoma. The Japanese Society for Clinical Microbiology [Internet]. 2020 [Fecha de acceso 03 de mayo de 2021]; 30 (3): 135 – 138. Disponible en: <http://www.jscm.org/journal/full/03003/030030135.pdf>
52. MIDI GLOBAL GROUP S.A.C. Agar Chocolate [Internet]. 2020 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://midiglobalgroup.com/wp-content/uploads/2020/11/001-103-Agar-Chocolate.pdf>
53. MIDI GLOBAL GROUPS.A.C. Agar Mac Conkey [Internet]. 2020 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://midiglobalgroup.com/wp-content/uploads/2020/11/001-101-Agar-Mac-Conkey.pdf>
54. Enas I. J., Basam B. A., Duaa S.S. Lactobacillus casei isolated from Human Milk and Three Natural Agents act as Antibacterial against Gram Negative Pathogenic Bacteria isolated from Infected Eye. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences [Internet]. 2017 [Fecha de acceso 04 de mayo de 2021]; 6 (4): 2568 – 2580. Disponible en: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.299>
55. Cooney S., O'Brien S., Iversen C., Fanning S. Encyclopedia of Food Safety. Academic Press. 2014.
56. Gajdács M. et al. *Leclercia adecarboxylata* as an emerging pathogen in human infections: a 13-year retrospective analysis in Southern Hungary. The Journal Of Infection In Developing Countries [Internet]. 2020 [Fecha de acceso 5 de enero de 2022]; 14(9):1004-1010. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/1897/81a35c838e015d2c0f81f08da6c61f2b7bdd.pdf>
57. BIOMÉRIEUX U.K. chromID® CPS® Elite agar. bioMérieux S.A [Internet]. 2022 [Fecha de acceso 27 de enero de 2022]; Disponible en: [https://www.biomerieux.co.uk/sites/subsidiary\\_uk/files/protocole\\_cps\\_elite.pdf](https://www.biomerieux.co.uk/sites/subsidiary_uk/files/protocole_cps_elite.pdf)
58. Çiçek M. et al. A rarely isolated Gram-negative bacterium in microbiology laboratories: *Leclercia adecarboxylata* . Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica [Internet]. 2018 [Fecha de acceso 03 de febrero de 2022]; 65(2): 241- 244. Disponible en: <http://real.mtak.hu/80910/1/030.65.2018.009.pdf>
59. Jordá V.L. et al. Utilidad del Sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana [Internet]. 2005 [Fecha de acceso 02 de julio de 2021]; 39 (1): 19 – 25. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53522191005.pdf>

60. BIOMÉRIEUX México. Identificación & genotipado microbiano. VITEK® 2 Compact. Sistema de identificación microbiana completamente automatizado [Internet]. 2021 [fecha de acceso 02 de julio de 2021]; Disponible en: <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/vitek-2-compact>
61. Harvey L. et al. Biología celular y molecular. 7ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.: Editorial Médica Panamericana, 2016.
62. Oviaño G., Rodríguez S., Caballero P., Muñoz B. Procedimiento de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. [internet]. 2019. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia65.pdf>
63. Jordana L., Martró C., Ausina R. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica [Internet]. 2012 [Fecha de acceso 25 de junio de 2021]; 31 (2): 635 -644. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-espectrometria-masas-el-laboratorio-S0213005X12000547>
64. Cornejo R., Serrato D., Rendón A., Rocha M. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). México. 2014.. Disponible en: he
65. Cortés L., Ordóñez B., Domínguez V. Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias [Internet]. 2020 [Fecha de acceso 17 de julio de 2021]; 11(4): 1150-1173. Disponible en: <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/5202>
66. Rodicio M.R., Mendoza M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2004 [Fecha de acceso 17 de julio de 2021]; 22 (4):238-245. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>
67. Ordoñez S. Guías prácticas para los laboratorios de Bacteriología clínica [Internet]. Bogotá. Editorial Médica Panamericana. 2014 [Fecha de acceso 25 de julio de 2021]; Disponible en: [https://www-medicapanamericana-com.pbidi.unam.mx:2443/VisorEbookV2/Ebook/9789588443560?token=b2884f6c-45cd-45ff-8308-735afe59fca3#\(%22Pagina%22:%2266%22,%22Visita%22:%22Buscador%22,%22Busqueda%22:%22muestra%22\)](https://www-medicapanamericana-com.pbidi.unam.mx:2443/VisorEbookV2/Ebook/9789588443560?token=b2884f6c-45cd-45ff-8308-735afe59fca3#(%22Pagina%22:%2266%22,%22Visita%22:%22Buscador%22,%22Busqueda%22:%22muestra%22))

68. Botero G., Bravo J. S., Gómez C. H., Pescador L.A. *Leclercia adecarboxylata*, a rare cause of soft tissue infections in immunocompromised patients, case report and review of the literature. Infectio [Internet]. 2018 [Fecha de acceso 06 de mayo de 2021]; 22 (4): 222 – 225. Disponible en: <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/741/776>
69. Forbes B.A., Sahm D., Weissfeld A. Bailey & Scot: Diagnóstico microbiológico. 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
70. Becton, Dickinson and Company. BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood. Instrucciones de uso – Medio en placa listo para su uso [Internet]. 2013 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8760>
71. Laboratorios Britania. Mac Conkey Agar [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_60707267ecda2.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707267ecda2.pdf)
72. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Agar chocolate [Internet]. 2019. [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2020/02/540198-BIPLACA-CHOCOLATE-ENRIQ.-AGAR-2X10mL-10PL.pdf>
73. Condalab. Agar Lactosa con Azul de Bromotimol y Cristal Violeta (Drigalski) [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: [https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=18724](https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=18724)
74. Laboratorios Britania. Chromobrit IU Orientación Agar. Para el aislamiento y diferenciación de patógenos en el tracto urinario [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 23 de octubre de 2021]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5f206f0d662d6.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5f206f0d662d6.pdf)
75. Laboratorios Britania. Chromobrit IU. [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 23 de octubre de 2021]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6151da33809b6.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6151da33809b6.pdf)
76. Benavides M. Propuesta de guía de aplicación de técnicas de microbiología (bacteria y hongos) para ser utilizado en microbiología general. [Tesis de Licenciatura]. [Internet]. El Salvador: Universidad del Salvador; 2004 [Fecha de acceso 21 de agosto de 2021] Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4768/1/16100029.pdf>
77. MacFaddin J. F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires, Bogotá: Médica Panamericana; 2004.

78. University of Lethbridge. Indole test for tryptophanase activity [Internet]. 2022 [Actualizado 31 de enero del 2022]. [Fecha de acceso 31 de enero de 2022]. Disponible en: <https://people.uleth.ca/~selibl/Biol3200/BiochTests/Indole.html>
79. Laboratorios Britania. MR – VP Medio [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070751064820.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070751064820.pdf)
80. McDevit S. Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. American Society for Microbiology [internet]. 2016 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/0c828061-9d6f-4ae7-aea3-66e1a8624aa0/Methyl-Red-and-Voges-Proskauer-Test-Protocols.pdf>
81. American Society for Microbiology. Citrate test [Internet]. 2009 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://asm.org/Image-Gallery/Citrate-Test>
82. Laboratorios Britania. Lisina Hierro Agar [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6054e85d48c47.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e85d48c47.pdf)
83. St. Louis Community College. Biochemical Tests [Internet]. 2008 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://users.stlcc.edu/kkiser/biochem.html>
84. Condalab. Caldo Malonato de Ewing Modificado [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 04 de septiembre de 2021]. Disponible en: [https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=23913](https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id_attachment=23913)
85. Condalab. BasedeCaldoKCNMoeller [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 04 de septiembre de 2021]. Disponible en: [https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=23898](https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=23898)
86. American Society for Microbiology. Fermentation [Internet]. 2012 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://asm.org/Image-Gallery/Fermentation>
87. American Society for Microbiology. Urease Test [Internet]. 2010 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://asm.org/Image-Gallery/Urease-Test>
88. Fisher Scientific. Thermo Scientific™ Bile Esculin Azide Agar [Internet]. 2021 [Fecha de acceso 23 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.fishersci.com/shop/products/bile-esculin-azide-agar/R01195>