

Aislamiento de *Enterobacter cloacae* en una matriz farmacéutica que contiene amoxicilina y ácido clavulánico

Williams Alexander Flores Ortiz

Unidad de Control de Calidad en el Pre y Post

Registro de Medicamentos

Dirección Nacional de Medicamentos

✉ revistadnm@medicamentos.gob.sv

**Artículo original
observacional**

Recibido:

16 de agosto de 2023

Aceptado:

23 de enero de 2024

Publicado:

01 de julio de 2024

Resumen

Antecedentes: en los últimos años se ha detectado una importancia clínica por el complejo *Enterobacter cloacae* Complex debido a su alta resistencia a diversos antimicrobianos y a su asociación con la inactivación y degradación de los mismos y por su patogenicidad de carácter nosocomial. **Objetivo:** mostrar la capacidad de supervivencia de *Enterobacter cloacae* a una mezcla de antimicrobiano e inhibidor de betalactamasa. **Método:** el método de análisis microbiológico utilizado en el presente estudio corresponde al método directo descrito en el capítulo general <62> (Examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de microorganismos específicos) de la Farmacopea de los Estados Unidos de América, el cual consiste en colocar la muestra directamente en el medio nutritivo como preincubación, para completar el esquema con pases directos a caldo y agar selectivo.

Resultados: de la determinación de microorganismos objetables se obtuvo crecimiento microbiano el cual se procedió a purificar para realizar las pruebas preliminares para su identificación, obteniendo en tinción bacilos cortos Gram (-); en la prueba de oxidasa no se obtuvo cambio de color en la tira reactiva, lo que indica un resultado negativo y en galerías miniaturizadas la identificación dio como resultado *Enterobacter cloacae* con un porcentaje de probabilidad de 100 %. Los resultados fueron obtenidos en el análisis microbiológico

(microorganismos objetables) de una matriz farmacéutica evaluada en el Laboratorio de Control de Calidad de Análisis Microbiológico de la Dirección Nacional de Medicamentos llevado a cabo en el 2022. **Conclusión:**

existe una evidente resistencia a fármacos antimicrobianos por parte de *Enterobacter cloacae*, inclusive cuando se trata de multifármacos, destinados a bloquear la acción de las betalactamasas (que es la naturaleza de la matriz estudiada) creadas por microorganismos resistentes.

Palabras Clave: *Enterobacter cloacae* Complex, resistencia bacteriana, aislamiento, microbiología, microorganismos objetables.

Introducción

Las bacterias a lo largo del tiempo han desarrollado mecanismos efectivos para evitar la acción de los antimicrobianos. Estas infecciones resistentes son más difíciles de tratar, generando mayores tasas de morbilidad y mortalidad, necesiéndose a su vez más recursos para controlarlas, lo que genera un aumento significativo en los costos de salud (García, C. 2018).

Las bacterias del género *Enterobacter* son bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se les puede encontrar en el suelo, agua y como parte del microbiota de animales, insectos y tracto gastrointestinal humano. Incluye 21 especies dentro de las cuales se define el complejo *Enterobacter cloacae* (Silva y Martínez, 2018).

La asociación amoxicilina-ácido clavulánico presenta actividad frente a un gran número de enterobacterias incluyendo las resistentes a la amoxicilina por producción de betalactamasas de amplio espectro como TEM-1, TEM-2 o SHV-1. Estas betalactamasas hidrolizan penicilinas (aminopenicilinas [ampicilina, amoxicilina], carboxipenicilinas [ticarcilina]) y, como se ha mencionado, son sensibles a los inhibidores de betalactamasa (Navarro, F. 2011).

La resistencia de las enterobacterias a antimicrobianos ha ido incrementándose en los últimos 20 años. El principal mecanismo involucrado es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) que confiere resistencia a los antimicrobianos de diferente generación. La tasa de producción de BLEEs por las enterobacterias en países de Latinoamérica es más alto que en otras regiones del mundo (García, C. 2018).

Entre los β -lactámicos, el complejo *Enterobacter cloacae* se considera intrínsecamente resistente a las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación y cefoxitina debido a la presencia de β -lactamasas del tipo AmpC con distintos grados de expresión, lo que implica susceptibilidad variable a cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Además, se han descrito cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (Silva y Martínez, 2018).

La resistencia a los antimicrobianos (RAM), surge cuando las bacterias cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos, lo que hace más difícil el tratamiento de las infecciones e incrementa el riesgo de propagación de enfermedades, de aparición de formas graves de enfermedades y de muerte. Como consecuencia de la farmacorresistencia, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces, por lo que las infecciones son cada vez más difíciles o imposibles de tratar (OMS, 2021).

Por consiguiente, se ve la necesidad del presente estudio con el objetivo de demostrar la supervivencia que posee el complejo *Enterobacter cloacae* frente a fármacos destinados a tratar infecciones bacterianas, incluso cuando estos fármacos cuentan con

un mecanismo de desactivación contra la resistencia que presentan las bacterias como lo es el ácido clavulánico.

Materiales y métodos

- Frasco de vidrio conteniendo 90 mL de Caldo Digerido de Caseína y Soja
- Frasco de vidrio conteniendo 100 mL de Caldo MacConkey
- Placas Petri conteniendo 30 mL de Agar MacConkey
- Asas serológicas de 10 μ L
- Puntas estériles de 10 mL y 1 mL
- Cabina de bioseguridad
- Pipeteador de 10 mL y 1 mL
- Incubadora a 42 °C – 44 °C
- Incubadora a 30 °C – 35 °C
- Galerías de identificación MICROGEN ID

El método utilizado para el análisis microbiológico fue: Pruebas de Microorganismos Específicos, determinación de *Escherichia coli*, método directo (FEUM, 2021).

Este estudio se realizó utilizando los datos generados en el análisis de control de calidad para verificar la pureza microbiológica de una matriz farmacéutica que contiene amoxicilina y ácido clavulánico, evidenciando la contaminación de *Enterobacter cloacae* que es de importancia clínica, necesitando una confirmación de los datos en un segundo análisis con un segundo analista, llevado a cabo en septiembre de 2022 con el mismo lote de la muestra inicial, los análisis fueron efectuados bajo condiciones controladas según las óptimas prácticas de laboratorio microbiológico (USP, 2022a) en el laboratorio de microbiología de la Dirección Nacional de Medicamentos.

Promoción de crecimiento: previo a la ejecución de las pruebas realizadas, se realiza el control de calidad de los diferentes medios de cultivo utilizados, tanto para medios nutritivos como para medios selectivos y diferenciales realizando la prueba de promoción de crecimiento utilizando los microorganismos presentados en la Tabla 1 (USP, 2022b) (Ph Eur, 2022) (BP, 2022a).

Tabla 1. Promoción de crecimiento, propiedades inhibitorias e indicativas de los medios de cultivo.

	Medio	Propiedad	Cepa de prueba
Prueba para Bacterias gram-negativas bilistolerantes	Caldo Mossel para enriquecimiento de enterobacterias	Promoción de crecimiento	E. coli P. aeruginosa
		Inhibitorio	S. aureus
	Agar Rojo Violeta Bilis Glucosa	Promoción de crecimiento + indicativo	E. coli P. aeruginosa
Prueba para Escherichiacoli	Caldo MacConckey	Promoción de crecimiento	E. coli
		Inhibitorio	S. aureus
	Agar MacConckey	Promoción de crecimiento + indicativo	E. coli
Prueba para Salmonella	Caldo de enriquecimiento para Salmonella Rappaport Vassiliadis	Promoción de crecimiento	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimorium o Salmonella enterica subsp enterica serovar Abony
		Inhibitorio	S. aureus
	Agar Xylosa, lisina Deoxycolato	Promoción de crecimiento + indicativo	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimorium o Salmonella enterica subsp enterica serovar Abony
Prueba para Pseudomonas aeruginosa	Agar cetrimide	Promoción de crecimiento	P. aeruginosa
		Inhibitorio	E. coli

Medios selectivos y diferenciales para la determinación de microorganismos específicos, las siguientes abreviaciones corresponden a los microorganismos presentados en las diferentes pruebas P. (Pseudomonas), E. (Escherichia), S. (Staphylococcus) (BP, 2022b).

Preparación de la muestra e incubación previa: se prepara la muestra haciendo una dilución de 10 gramos de la matriz farmacéutica que contiene amoxicilina y ácido clavulánico en 90 mL de caldo digerido de caseína y soja con aditivos (ver Tabla 2), que tienen como función neutralizar la acción antimicrobiana de la matriz farmacéutica. Una vez bien incorporada la matriz farmacéutica en el caldo (dilución 1 en 10), se procede a realizar una segunda dilución tomando 10 mL de la muestra homogenizada colocándola en 90 mL de caldo digerido de caseína y soja con aditivos (dilución 1 en 100) (USP, 2022b).

Se procede a incubar en condiciones controladas (monitoreo continuo), de temperatura de entre 30 °C a 35 °C durante un periodo de 18 a 24 horas (FEUM, 2021).

Control negativo: para verificar las condiciones en las que se ha ejecutado la prueba, se utiliza como control negativo el diluyente seleccionado sin la preparación de la muestra. No debe observarse crecimiento de microorganismos y este control negativo tiene que someterse a las mismas condiciones a las que se enfrenta la dilución de la muestra (USP, 2022b).

Tabla 2. Ingredientes para preparación de caldo nutritivo inicial de prueba determinación de *Escherichia coli*

Caldo Digerido de Caseína y Soja	
Digerido Pancreático de Caseína	17,0 g
Digerido Papáinico de Soja	3,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Fosfato Dibásico de Potasio	2,5 g
Glucosa Monohidrato	2,5 g
Tween 80	5,0 g
Lecitina de soja	0,7 g
Agua Purificada	1000 mL

Los aditivos Tween 80 y lecitina se adicionan para neutralizar la acción antimicrobiana de la matriz farmacéutica analizada, se utiliza la g para indicar gramos y mL para indicar mililitros. (USP, 2022b)

Selección y subcultivo: una vez finalizado el periodo de incubación se procede a agitar la muestra incubada (dilución 1 en 100), se transfiere 1 mL del caldo digerido de caseína y soja a 100 mL de caldo MacConkey y se procede a incubar en condiciones controladas (monitoreo continuo) de temperatura de entre 42 °C a 44 °C durante un periodo de 24 a 48 horas (BP, 2022a).

Al finalizar el periodo de incubación se procede a agitar el caldo MacConkey y se subcultivan 10 µL en una placa de agar MacConkey y se procede a incubar en condiciones controladas (monitoreo continuo) de temperatura de entre 30 °C a 35 °C durante un periodo de 18 a 72 horas (BP, 2022a).

Interpretación: el crecimiento de colonias indica la posible presencia de *E. coli*. Esto se confirma mediante pruebas de identificación. El producto cumple con la prueba si no se

desarrollan colonias o si los resultados de las pruebas de identificación son negativos (USP, 2022b).

Método de identificación: para la identificación del microorganismo detectado en la matriz farmacéutica que contiene amoxicilina y ácido clavulánico se utilizó una galería miniaturizada de pruebas bioquímicas de tipo Microgen GnA+B ID (Microgen Bioproducts Ltd, 2009a).

Las galerías miniaturizadas utilizan una combinación de resultados de pruebas bioquímicas para realizar una caracterización del microorganismo, con base a su metabolismo a través del uso de diferentes sustratos, los cuales se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Sustratos empleados en pruebas bioquímicas

Sustratos del Kit de identificación miniaturizado Microgen GnA+B ID					
Lisina	Ornitina	H ₂ S	Glucosa	Manitol	Xilosa
Galactosidasa de Orto-Nitro fenol	Nitrato	Indol	Ureasa	Voges Proskauer	Citrato
Triptófano desaminase	Gelatina	Malonato	Inositol	Sorbitol	Ramnosa
Sucrosa	Lactosa	Arabinosa	Adonitol	Rafinosa	Salicina

Fuente: elaboración propia

Cabe destacar que todo microorganismo detectado durante la ejecución de pruebas de pureza microbiológica de microorganismos específicos a las diferentes matrices farmacéuticas se les realiza su respectiva identificación hasta llegar a nivel de género y especie con su respectivo porcentaje de probabilidad (Microgen Bioproducts Ltd, 2009a).

Análisis estadístico: en el formulario de informe Microgen GnA+B ID se ha dispuesto de los sustratos en conjunto de 3 reacciones, asignándose a cada sustrato un valor numérico de 1, 2 o 4. La suma de las reacciones positivas para cada triplete da un único dígito del código octal utilizado para determinar la identidad del microorganismo aislado (Microgen Bioproducts Ltd, 2009a).

El código octal se ingresa en el programa informático para proceder a identificar, el cual es un programa de identificación basado en probabilidades asistido por ordenador, este determina la mejor gama de pruebas para obtener las máximas capacidades de diferenciación para las especies que se están investigando. Dicho programa genera un informe de los cinco microorganismos de la base de datos que es más probable que se encuentre. El software genera una identificación basada en la probabilidad, porcentaje de probabilidad, y verosimilitud, con un análisis de la calidad de diferenciación, ver Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de probabilidad del análisis de diferenciación

Porcentaje de probabilidad		Interpretación
Primera elección	Segunda elección	
99.9	<0.01	La primera opción es 10,000 veces más probable que la segunda opción, es decir, las dos opciones están muy bien separadas
99	<1	La primera opción es 100 veces más probable que la segunda opción, es decir, las dos opciones están bien separadas
70	25	La primera opción es 3 veces más probable que la segunda opción, es decir, las dos opciones están mal separadas

Esto proporciona una medida de la extensión de las 5 opciones siempre que estén separados o diferenciados entre sí. (Microgen Bioproducts Ltd, 2009a)

Resultados

Promoción de crecimiento: los medios de cultivo utilizados en la prueba donde se detectó la presencia de *Enterobacter cloacae* se evaluaron con cepas madre ATCC de cuarto pasaje, para lo cual se verificaron los diferentes aspectos de calidad del medio de cultivo, determinando que: apariencia del medio de cultivo preparado, pH posterior a esterilización, prueba de esterilidad y prueba de promoción de crecimiento ver Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de control de calidad de los medios de cultivo utilizados en las pruebas.

Dictamen final para el lote de medio de cultivo												
Código interno	Cepa madre	Número ATCC	Lote de cepa	Lote de prueba	Lote de referencia	Apariencia	pH final	Esterilidad	Productividad	Selectividad	Especificidad	Dictamen
B12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	70006683	260722-3-2	120722-1-1	C	7.3	Cumple los requerimientos de la prueba	2			A
	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	61864407									
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	70005675									
B12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	70006683	300822-3-2	260722-3-2	C	7.3	Cumple los requerimientos de la prueba	2			A
	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	61864407									
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	70005675									
B05	<i>Escherichia coli</i>	8739	48310201	050722-3-2	010622-1-1	C	7.2	Cumple los requerimientos de la prueba	2	SC		A
	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	61864407									
B05	<i>Escherichia coli</i>	8739	48310201	120822-1-1	030622-1-1	C	7	Cumple los requerimientos de la prueba	1.2	SC	C	A
	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	61864407									

Fuente: elaboración propia. las siguientes abreviaciones corresponden a: C. (Cumple), SC. (Sin Crecimiento), A. (Aprobado), códigos internos B12(Caldo Digerido de Caseína y Soja), B05(Caldo MacConkey), A08 (Agar MacConkey))

Preparación de la muestra e incubación previa: en los dos análisis realizados en diferentes tiempos y con diferentes analistas, se pudo observar que, luego del periodo de incubación de la muestra homogenizada en caldo digerido de caseína y soja, esta reportó turbidez ya que la muestra es de origen sólido, por tanto, se procede a continuar con la siguiente fase del análisis.

Control negativo: los distintos medios de cultivo utilizados en las diferentes pruebas fueron evaluados al mismo tiempo que las muestras, bajo las mismas condiciones, y no se observó crecimiento, dando como resultado para el control negativo en cumplimiento.

Selección y subcultivo: en esta etapa del análisis se observó cambio de color en el caldo MacConkey a color amarillo claro, este caldo contiene lactosa que según lo indicando en la ficha técnica con la presencia de enterobacterias se degrada y produce ácido y gas, la producción de ácido es detectado por el indicador púrpura de bromocresol, que se torna amarillo. La bilis de buey promueve el crecimiento de varias especies de bacterias intestinales e inhibe la de los microorganismos que no habitan en el intestino (Merck, 2021a). En la lectura de las placas de agar MacConkey se observó un crecimiento de colonias circulares, convexas de color rosado, indicando sospecha para microorganismos específicos.

Método de identificación: se procedió a purificar la sospecha en agar nutritivo, obteniendo colonias aisladas, circulares, color crema. Se tomó una colonia para realizar las pruebas preliminares para su identificación, obteniendo en la tinción bacilos cortos Gram (-). Mientras que, en la prueba de oxidasa, no se obtuvo cambio de color en la tira reactiva, lo que indica una prueba negativa, por lo que se procede a montar las galerías miniaturizadas de Microgen GnA+B ID, ver resultados en Tabla 6. La identificación dio como resultado *Enterobacter cloacae* con un porcentaje de probabilidad del 100 %.

Tabla 6. Pruebas de identificación del microorganismo aislado de una matriz farmacéutica

Pruebas de identificación	
Prueba de Oxidasa	No presenta coloración azul-violeta en la tira de oxidasa
Tinción al gram	Bacillos cortos gram (-)
Galerías GnA+B en el primer aislamiento	<i>Enterobacter cloacae</i> 100%
Galerías GnA+B en el segundo aislamiento	<i>Enterobacter cloacae</i> 100%
Código octal	27562745

Fuente: Elaboración propia

Análisis estadístico: una vez creada la tabla de datos adecuada, se pueden organizar en una base (ver Figura 1), sustentada en el porcentaje de un organismo positivo determinado para una prueba seleccionada.

Figura 1. Patrón de reacción de la cepa aislada**Introducción de resultados**

Código octal 27562745

- LYS	Lysine Decarboxylase	+ ORN	Ornithine Decarboxylase	- H ₂ S	H ₂ S Production
+ GLU	Acid from Glucose	+ MAN	Acid from Mannitol	+ XYL	Acid from Xylose
+ ONP	ONPG	- IND	Indole	+ UR	Urea Hydrolysis
+ VP	Voges Proskauer	+ CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	+ MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
+ SOR	Acid from Sorbitol	+ RHA	Acid from Rhamnose	+ SUC	Acid from Sucrose
+ LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
+ RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	+ ARG	Arginine Dihydrolase

Fuente: Elaboración propia mediante software Microgen ID versión 2.0.8.33

Figura 2. Resultado obtenido del microorganismo en estudio en las galerías de identificación del sistema GN-ID panel A y B**GN-ID A+B PANEL
REPORT FORM**

Lab. No. ID-049122	Specimen Type: Lim356122 Agar Macconkey
	Date: 25/08/22

Well Number				GN A wells												G N B wells											
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
				Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Reaction index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of positive Reactions	N/A			2			7			5			6			2			7			4			5		

Octal Code: 27562745

Final Identification: Enterobacter cloacae

El cálculo de probabilidades de una cepa aislada desconocida se realiza (teorema binomial) para cada especie de la base de datos, ver Figura 3.

$$A/100 * (1 - B/100) * C/100 = \text{probabilidad}$$

Figura 3. Grado de diferenciación de cada opción de identificación con respecto a las otras opciones.

Análisis de identificación					
	Enterobacter cloacae	Enterobacter dissolvens	Enteric Gp69	Enterobacter amnigenusbiogp	1 Enterobacter hormaechei
Opción de ID seleccionada	Sí	No	No	No	No
Probabilidad	1/18,607	<1/10,000,000	<1/10,000,000	<1/10,000,000	<1/10,000,000
Porcentaje de probabilidad	100%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Similitud	0.03%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Cepa aislada humana	Sí	No	No	Sí	No
Pruebas contrarias					
Pruebas 1		ARA (99.9%)	ARA (99.9%)	ARA (99.9%)	ARA (99.9%)
Pruebas 2	ARA (99.99%)	SAL(99.9%)	SAL(99.9%)	UR(0.1%)	SOR(0.1%)
Pruebas 3		LAC(0.1%)	UR (0.1%)	SOR (9%)	RAF(0.1%)
Pruebas adicionales	SI	SI	SI	SI	SI
Acid from Dulcitol	15%	0.1%	99.9%	0.1%	87%
Acid from Melibiose	90%	99.9%	99.9%	99.9%	0.1%
Motility (37C)	95%	0.1%	99.9%	92%	52%
Esculin Hydrolysis	30%	99.9%	99.9%	91%	0.1%
Acid from Glyceral	40%	0.1%	0.1%	0.1%	4%
Comentarios adicionales		18			16

16. Anteriormente grupo entérico 75.J. Clin. Microbiol. (1989) 27: 2046-2049
 18. Anteriormente Erwinia dissolvens.J. Clin. Microbiol. (1986) 23: 1114-1120

Fuente: Elaboración propia mediante software Microgen ID versión 2.0.8.33

Discusión: La presencia de *Enterobacter cloacae* en un antimicrobiano nos indica la capacidad que tiene este microorganismo a sobrevivir a dicho agente y es debido a que ha cambiado su material genético, por lo que se vuelve de interés farmacéutico el estudiarlo a nivel de biología molecular, ya que de esta forma se pueden conocer los metabolitos generados por estos microorganismos. Si bien esta matriz farmacéutica tiene un antimicrobiano también cuenta con un agente bloqueador de beta lactamasas, que no permite que los microorganismos sobrevivan a los antimicrobianos.

Para poder tener un panorama más amplio del impacto que pueda generar este aislamiento de *Enterobacter cloacae*, es necesario evaluar la estabilidad de la matriz farmacéutica y verificar a lo largo de su vida útil cómo impacta este hallazgo, y así, verificar si este microorganismo es capaz de degradar un antimicrobiano a través de la valoración de los diferentes principios activos presentes en esta.

En la investigación se tuvo como limitante, para poder ampliar y reforzar el estudio, la falta de capacidad instalada para evaluar pruebas de resistencia a los diferentes tipos de antimicrobianos que siguen distintos mecanismos de acción, con el fin de verificar el impacto en la RAM que este aislamiento pueda significar. Esto debido a que se ha aislado un microorganismo de una matriz que cuenta con una mezcla de fármacos que están destinados a bloquear la capacidad de resistencia de los microorganismos. También se ha tenido limitación para realizar pruebas a nivel genético y determinar cuáles son las causas del mecanismo de defensa que presenta la bacteria aislada.

Con esta investigación se ha logrado ampliar el cepario de microorganismos salvajes con el que cuenta el laboratorio de microbiología de la DNM, el cual se va expandiendo con los diferentes aislamientos obtenidos y con los cuales se puede realizar a futuro una investigación de Resistencia Antimicrobiana (RAM), que pueden presentar a diferentes productos farmacéuticos destinados a la eliminación de bacterias. Esta creación de ceparios podría utilizarse como plan general en la creación de una serie de algoritmos que permitan enfrentar a este tipo de microorganismos en situaciones de urgencias sanitarias y a la vez, tener bien establecida la causa raíz de los diferentes fenómenos que conllevan a la generación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos.

De comprobar la resistencia a múltiples antimicrobianos podríamos llegar a clasificar a *Enterobacter cloacae* como una nueva súper bacteria, teniendo consecuencias graves en los esquemas de tratamientos antimicrobianos en los sistemas de salud.

Una de las aplicaciones principales para las que se puede utilizar el presente estudio es para evitar recomendar o administrar mezclas de amoxicilina y ácido clavulánico a pacientes de los que se tengan comprobados cuadros clínicos de infección por *Enterobacter cloacae*.

Conclusión

En la prueba de pureza microbiológica de microorganismos específicos de una matriz farmacéutica que contiene agentes antimicrobianos, se aisló *Enterobacter cloacae*, microorganismo oportunista que es capaz de poblar el intestino humano y causar enfermedades infecciosas.

Para el análisis de productos farmacéuticos que contienen agentes antimicrobianos, no se puede dar por hecho que están exentos de contaminación. En el presente estudio se puede demostrar que sí pueden contaminarse por diferentes motivos, pero lo importante es la capacidad que tiene el analista para poder detectarlos y evidenciarlos, la capacidad de poder neutralizar el efecto antimicrobiano por los diferentes métodos que existen, como la utilización de sustancias inhibidoras o la realización de diluciones seriadas, que para este estudio se optó por los dos métodos.

Se recomienda para los laboratorios fabricantes de productos antimicrobianos realizar evaluaciones microbiológicas a todas las materias primas involucradas en la fabricación de estos productos, así como realizar todos los controles de calidad, tanto a materias primas como producto terminado, utilizando las diferentes formas de inactivación de los agentes antimicrobianos.

Referencias bibliográficas

1. García, C. (2018). Resistencia antimicrobiana. *DIAGNOSTICO*, 57(2) 79-81. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i2.81>
2. Silva, F. y Martínez, P. (2018). Complejo *Enterobacter cloacae*. *Revista chilena de infectología*, 35, 2. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000300297>
3. Organización Mundial para la Salud [OMS] (2021): Resistencia a los antimicrobianos.
4. Navarro F., Calvo J., Cantón R., Fernández F., Mirelis B. (2011) Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 524-534. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
5. Farmacopea de los Estados Unidos de América [USP], 2022. ÓPTIMAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO MICROBIOLÓGICO, 1117.
6. Farmacopea de los Estados Unidos de América [USP], 2022. Examen Microbiológico de Productos No Estériles: Pruebas de Microorganismos Específicos, 62.
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos [FEUM] (2021). Pruebas para microorganismos específicos: *Escherichia coli*.
8. Farmacopea Europea [Ph. Eur.], 2022. Examen Microbiológico de Productos no Estériles (prueba para microorganismos específicos) 2.6.13
9. Farmacopea Británica, [BP], (2022) Examinación microbiológica de productos no estériles.
10. Farmacopea Británica, (2022) Propiedades promotoras del crecimiento e inhibitorias de los medios, idoneidad de la prueba y controles negativos.
11. Microgen Bioproducts Ltd (2009). Microgen GnA+B ID instructions for use. <https://www.kemitekskimya.com.tr/files/101200b4084682.pdf>
12. Microgen Bioproducts Ltd (2009). Gram Negative Bacillus Training Manual. <https://www.kemitekskimya.com.tr/files/101200b4084682.pdf>
13. Merck Millipore, (2021). MacConkey Broth acc. harm. EP/USP/JP ficha técnica. https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/MacCONKEY-broth,MDA_CHEM-105396?referrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_DS