



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**TÍTULO**

***“Escherichia coli productora de betalactamasas  
aisladas de urocultivo de usuarios del Hospital Isidro  
Ayora- Loja”***

*Tesis previa a la obtención del Título de  
Licenciado en Laboratorio Clínico.*

**AUTOR:**

***Jhordy Alexis Córdova Balcazar***

**DIRECTORA:**

***Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.***

**LOJA-ECUADOR**

**2018**

## CERTIFICACIÓN

Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.


**DIRECTORA DE TESIS**

### CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del trabajo investigativo titulado: **“*Escherichia coli* productora de betalactamasas aisladas de urocultivo de usuarios del Hospital Isidro Ayora- Loja”**, de autoría del Sr. **Jhordy Alexis Córdova Balcazar**, previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico, ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección y en el marco del reglamento del régimen académico de la Universidad Nacional de Loja vigente.

Loja, 23 de octubre de 2018

Atentamente:

  
Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

**DIRECTORA DE TESIS**

## AUTORÍA

Yo, **Jhordy Alexis Córdova Balcazar** con **Cl. 1105445850** declaro ser autor del presente trabajo de investigación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi tesis en el Repositorio Digital Institucional- Biblioteca Virtual como documento de lectura y consulta.

**Firma:**.....



**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Cédula:** 1105445850

**Fecha:** 23 de octubre de 2018

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo Jhordy Alexis Córdova Balcazar, autor del trabajo de investigación “*Escherichia coli* productora de betalactamasas aisladas de urocultivo de usuarios del Hospital Isidro Ayora- Loja”, como requisito para optar al grado de Licenciado en Laboratorio Clínico; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la universidad, a través de su visibilidad del contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de investigación en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con los cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 23 días del mes de octubre del dos mil dieciocho, firma el autor.

**Firma:** .....

**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Cedula de identidad:** 1105445850

**Correo electrónico:** jhordycordova@yahoo.es

**Celular:** 0988148903

**Dirección:** Barrio la Tebaida Baja

### DATOS COMPLEMENTARIOS

**Directora de tesis:** Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

**Tribunal de Grado:**

**Presidente:** Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. Gladys Margoth Jumbo Chuquimarca, Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

## DEDICATORIA

### **A Dios:**

Por todas las bendiciones y ser mi guía en este trayecto, y permitirme cumplir mi sueño.

### **A mis padres:**

Por todo el apoyo, cariño y palabras de aliento para continuar con mi sueño y lograr llegar a ser un profesional digno a los valores que me han inculcado.

### **A mis hermanos:**

Por sus consejos, apoyo y ejemplo para seguir avanzando hasta lograr cumplir este anhelo.

### **A mis amigos:**

Por todo su cariño, palabras y ayuda que me han permitido llegar hasta este punto del camino.

## AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por todas las bendiciones en mi vida y en este largo y duro trayecto para permitirme llegar a cumplir esta meta propuesta. A mis padres, Carmen y Ever por todo el apoyo que me brindaron durante estos 4 años y medio, guiarme, cuidarme, darme la confianza para no desistir por más duro que se haya puesto el camino y permitirme cumplir con este anhelo.

Agradecer a mis amigos que fueron una parte importante en mi camino hasta aquí, sus palabras, aliento y confianza en mí fueron fundamentales para continuar avanzando hasta llegar a mi meta.

A la Universidad Nacional de Loja, carrera de Laboratorio Clínico por permitirme formar parte de su personal estudiantil, permitirme estudiar y lograr ser un profesional. De igual manera agradecer a mi Directora de Tesis, Lic. María del Cisne Loján que con su apoyo, confianza, paciencia y conocimientos me han permitido lograr terminar mi proyecto.

Finalmente agradecer a todas esas personas que formaron parte de mi vida durante mi estancia en la Universidad, ayudarme en mi formación, proyectos y de una u otra manera ser parte de mi formación; solo me queda decir a todos: ¡GRACIAS!, de ahora en adelante es otro camino el que he de seguir, y el no defraudarlos será mi doctrina en mis nuevos proyectos.

## ÍNDICE

Carátula.....	i
Certificación.....	ii
Autoría .....	iii
Carta de autorización.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice.....	vii
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
Abstract .....	3
3. Introducción .....	4
4. Revisión literaria.....	7
1. Infecciones de Vías Urinarias (IVU).....	7
1.1. Concepto.....	7
1.2 Etiología. ....	7
2. <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.1 Concepto.....	8
2.2 Taxonomía.....	8
2.3 Clases de <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.4 Cultivo y características de crecimiento.....	9
3. Identificación bacteriana mediante equipo automatizado (Vitek) .....	10
4. Resistencia Bacteriana .....	12
4.1 Tipos de resistencia. ....	12
4.2 Mecanismos de resistencia .....	13
5. Betalactamasas .....	13
5.1 Betalactamasas de clase A.....	14

5.2	Betalactamasas de clase B.....	14
5.3	Betalactamasas de clase C.....	14
5.4	Betalactamasas de clase D.....	14
6.	Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	16
6.1	Identificación en el laboratorio.....	16
7.	Betalactamasas de tipo AmpC .....	17
7.1	Identificación en el laboratorio.....	18
8.	Betalactamasas tipo Carbapenemasas .....	19
8.1	Identificación en el laboratorio.....	20
9.	Diagnóstico .....	21
9.1	EMO.....	21
9.2	Cultivo.....	22
10.	Antibióticos.....	23
10.1	Concepto.....	23
10.2.	Clasificación.....	23
10.3	Antibióticos para Enterobacterias.....	25
10.4	Antibiograma.....	27
11.	Control de calidad en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana .....	28
11.1	Cepas de referencia ATCC.....	28
11.2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	28
11.3	<i>Klepsiella pneumoniae</i> ATCC 700603.....	28
11.4	<i>Klepsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705.....	29
11.5	<i>Klepsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1706.....	29
5.	Materiales y métodos .....	30
	Tipo de estudio .....	30
	Área de estudio.....	30



Universo .....	30
Muestra.....	30
Criterios de Inclusión .....	30
Criterios de Exclusión .....	30
Métodos, Técnicas y Procedimientos.....	31
Fase Pre analítica.....	31
Control de calidad.....	32
Fase Analítica.....	32
Fase Post analítica .....	33
Plan de tabulación y análisis de datos .....	34
6. Resultados .....	35
7. Discusión.....	41
8. Conclusiones .....	43
9. Recomendaciones .....	44
10. Bibliografía .....	45
11. Anexos .....	51
Anexo N° 1 Oficio de autorización .....	51
Anexo N° 2 Consentimiento informado .....	52
Anexo N° 3 Formulario para el paciente .....	53
Anexo N° 4 Triptico pacientes ambulatorios .....	54
Anexo N° 5 Triptico pacientes hospitalizados .....	56
Anexo N° 6 Protocolo transporte de muestras.....	57
Anexo N° 7 Inserto <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	59
Anexo N° 8 Inserto <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 .....	61
Anexo N° 9 Inserto <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 1705.....	63
Anexo N° 10 Inserto <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 1706.....	65

Anexo N° 11 Protocolo siembra de muestras .....	67
Anexo N° 12 Guia de uso equipo VITEK .....	71
Anexo N° 13 Formato de registro de laboratorio .....	77
Anexo N° 14 Técnica para identificación fenotípica Blee .....	78
Anexo N° 15 Técnica para identificación fenotípica AmpC .....	86
Anexo N° 16 Técnica para identificación fenotípica Carbapenemasas.....	92
Anexo N° 17 Formato confirmación de producción Blee .....	103
Anexo N° 18 Formato confirmación de producción AmpC.....	104
Anexo N° 19 Formato confirmación de producción Carbapenemasas.....	105
Anexo N° 20 Anexo fotos .....	106
Anexo N° 21 Certificación de traducción del resumen .....	112

## **1. Título**

**“*Escherichia coli* productora de betalactamasas aisladas de urocultivo de usuarios del Hospital Isidro Ayora- Loja”**

## 2. Resumen

La resistencia es un fenómeno caracterizado por la refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no solo por la presión evolutiva que ejerce en el uso terapéutico (Malla, 2014). El presente estudio descriptivo de corte transversal, tuvo como objetivo investigar la frecuencia de *E. coli* aislada de urocultivos de pacientes del Hospital “Isidro Ayora” de la ciudad de Loja, identificar los tipos de betalactamasas, y analizar su producción de acuerdo a la edad, sexo y servicio de procedencia. La muestra de estudio fue de 225 urocultivos con crecimiento durante el periodo diciembre 2017- abril 2018, se aislaron 173 cepas de *Escherichia coli* (76.89 %); de las cuales 31 cepas fueron productoras de betalactamasas esto representa el 17.9%. De las 31 cepas de *E. coli* productoras de betalactamasas, 30 (96.8%) fueron productoras de BLEE, mientras que 1 (3.2 %) fue productora de AmpC; además, se aislaron otros géneros bacterianos 52 (23.11 %) cepas en total, y 156 cultivos sin crecimiento. Para asegurar la integridad en los procedimientos fenotípicos, se siguió las instrucciones del manual del CLSI M100-S27, realizando control de calidad; como control positivo para BLEE se utilizó *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; para carbapenemasas se utilizó *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 y como control negativo *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA- 1706. La mayor parte de betalactamasas producidas por *E. coli* se encontró en la población adulta (>60 años) con 15 (48.5 %) cepas productoras de Blee y 1 (3.2 %) cepa productora de AmpC, además *E. coli* produce betalactamasas en mayor frecuencia en el sexo femenino y usuarios provenientes del servicio de emergencia.

### **PALABRAS CLAVES**

(BLEE) Betalactamasas de espectro extendido, *Escherichia coli*, (IVU) Infecciones de vías urinarias.

## Abstract

Resistance is a phenomenon characterized by the partial or total refractoriness of microorganisms to the effect of the antibiotic generated mainly by the indiscriminate and irrational use of these and not only by the evolutionary pressure that exerts in the therapeutic use (Malla, 2014). The present descriptive study of transversal section, had as purpose research the frequency of *E. coli* isolated of urocultivos of patients at Hospital "Isidro Ayora" in Loja city, identify the types of betalactamases, and analyze its production according to the age, sex and provenience service. The study sample was of 225 urine cultures with growth during the period of December 2017- April 2018, 173 strains of *Escherichia coli* were isolated (76.89 %); of which 31 strains were producing betalactamases this represents 17.9 %. Of the 31 strains of *E. coli* producing betalactamases, 30 (96.8 %) were producers of BLEE, while 1 (3.2 %) was the producer of AmpC. In addition, other bacterial types were isolated 52 (23.11 %) strains in total, and 156 cultures without growth. To ensure integrity in phenotypic procedures, the instructions in the CLSI M100- S27 manual were followed, performing quality control; as a positive control for BLEE (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 was used and, as a negative control, *Escherichia coli* ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 was used for carbapenemases and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 as a negative control. The majority of betalactamases produced by *E. coli* were found in the adult population (> 60 years) with 15 (48.5 %) producing strains of BLEE and 1 (3.2 %) AmpC producing strain. Moreover, *E. coli* produces betalactamases more frequently in females and users coming from the emergency service.

### KEYWORDS

(ESBL) Betalactamasas extended spectrum, *Escherichia coli*, (IVU) Urinary tract infections.

### 3. Introducción

La infección del tracto urinario es una de las principales causas de consulta médica en la atención primaria de salud; existen un sin número de factores de riesgo para contraer esta patología, como por ejemplo la actividad sexual, los embarazos, la edad, defectos anatómicos, mala higiene íntima, entre otros (Montero, 2017).

*Escherichia coli* es el microorganismo uropatógeno más frecuente, causante de 75-90% de las Infecciones de Vías Urinarias (IVU), es importante determinar el modo de transmisión ya que la colonización de esta bacteria se da en el intestino (Montero, 2017).

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que ejerce el uso terapéutico. Las infecciones causadas por bacterias multiresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad; así mismo, causan un mayor costo por mayor estancia hospitalaria y complicaciones. El uso de antibióticos se ha extendido, tanto en el campo de la medicina humana como en veterinaria y agricultura, lo cual ha traído consigo nuevas dificultades en la lucha frente a las infecciones: las resistencias bacterianas (Duarte Jarquin, 2016).

En 1965 se descubrió en Grecia la primera cepa de *E. coli* resistente a la ampicilina, revelando la capacidad de las enterobacterias para adquirir y transmitir factores genéticos de resistencia que desencadenan la producción de un tipo de enzima a la que se denominó betalactamasa de espectro amplio (BLEA) tipo TEM, por las iniciales del apellido Temoneira del primer paciente afectado. Luego de la producción sintética e industrialización de las cefalosporinas en 1983 se reportaron las primeras cepas de *Klebsiella spp* capaces de resistir la acción de las cefalosporinas mediante la generación de BLEA tipo SHV, denominada así por la presencia de puentes disulfuro en su estructura molecular; después de la reclasificación

de las BLEA se describió a un subgrupo mutante de ellas que se la llamó betalactamasa de espectro extendido (BLEE) (Chiriboga Urquiza, Chiriboga Acosta, & Araujo López, 2012).

En las bacterias Gram negativas la resistencia a betalactámicos está originada por varios mecanismos, pero el más importante, por su frecuencia y eficacia, es la producción de betalactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos y se producen de manera constitutiva o inducible. De todas las betalactamasas descritas hasta el momento cabe destacar, por su interés e implicaciones clínicas, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), betalactamasas tipo AmpC y las carbapenemasas (Malla, 2014).

Las betalactamasas es una preocupación a nivel mundial, sobre todo cuando son producidas por *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, siendo alta la producción de BLEE en América Latina, en comparación con otros países del mundo; son los principales agentes etiológicos, a nivel hospitalario. Se asocia a brotes nosocomiales, principalmente en áreas de cuidados intensivos y quirúrgicas; sin embargo, los últimos años se ha aislado las bacterias de infecciones adquiridas en la comunidad y asilos, así como en muestras de orina y heces de portadores sanos (Macero, 2013).

Diferentes estudios epidemiológicos llevados a cabo en Europa y otras áreas geográficas como México y Colombia revelan un aumento de la prevalencia y la dispersión de las BLEE, principalmente en *E. coli*. En España la frecuencia de BLEE se encuentra entre el 5-10%; mientras que a nivel de Latinoamérica hay estudios que documentan aislamientos de *E. coli* productora de BLEE en urocultivos de usuarios ambulatorios, así en México con una frecuencia del 15,5% y Colombia con 3,4%, existiendo diferencias entre distintos países según regiones e incluso centros sanitarios de un mismo ámbito. En nuestro medio los datos de *E. coli* productora de BLEE de pacientes ambulatorios no se le ha dado la debida importancia por parte del personal de salud, por lo cual esta bacteria sigue propagándose en la

comunidad, creando resistencia y con el pasar de los años podría llegar a aumentar la prevalencia en nuestra localidad y ser causante de infección de vías urinarias complicadas. El cultivo es el principal método para demostrar la presencia de cepas *E. coli* productora de betalactamasas en muestras de orina (Villavicencio Pacheco, 2015).

La presente investigación se ejecutó como parte del Macroproyecto titulado: “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los hospitales Isidro Ayora y SOLCA de Loja”, permitiendo establecer la presencia de *E. coli* productora de betalactamasas, identificar los tipos y analizarlos según edad, sexo y servicio de procedencia.



## 4. Revisión de literatura

### 1. Infecciones de Vías Urinarias (IVU)

**1.1. Concepto.** Es la presencia y multiplicación de microorganismos con invasión de los tejidos adyacentes que forman parte del aparato genitourinario, son producidas generalmente por bacterias y en menor proporción por hongos y virus (Alvarez, 2007).

Las IVU siguen en frecuencia a las infecciones del aparato respiratorio en todo el mundo, son más frecuentes en el sexo femenino: hasta un 50 % de las mujeres puede presentar una IVU a lo largo de su vida, lo que se relaciona con la actividad sexual, los embarazos y la edad. En el varón las IVU tienen dos picos de incidencia: durante el primer año de vida y en mayores de 50 años, relacionado con una patología prostática (Gonzalez Monte , 2012).

La búsqueda del microorganismo productor de la infección urinaria se debe realizar por un cultivo de orina (urocultivo) destinado al aislamiento de la bacteria productora de la infección, para ello debe existir una bacteriuria de gérmenes en orina que no procedan de flora normal de la uretra, periné o genitales externos y mayor a 100.000 UFC/mL, la mayoría de infecciones del tracto urinario son causadas por la bacteria *Escherichia coli* (Sanchez Cruzatty, 2002).

**1.2 Etiología.** La etiología de las infecciones de las vías urinarias se ve modificada por factores como el tipo epidemiológico o geográfico, la edad, existencia de enfermedades de base, como diabetes o lesiones de médula espinal, o por maniobras instrumentales, tales como la cateterización urinaria. La exposición a antibióticos y el antecedente de hospitalización son dos contextos que condicionan diferencias en el perfil etiológico, por lo que la elección del tratamiento empírico en estos pacientes será más dificultosa (Ochoa, Eiros, Pérez, & Galiana , 2005).

Las bacterias que generalmente producen IVU son Gram negativas de origen intestinal; de estas, *E. coli* representa el 75-95%; el resto es causado por *Klebsiella sp*, *Proteus sp* y *Enterobacter sp*. Entre las bacterias Gram positivas los *enterococos*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus agalactiae* son los más frecuentes. En el grupo neonatal, la frecuencia de Gram positivos aumenta, aunque predominan los Gram negativos (Calderón, Casanova , Galindo , Gutiérrez , & Landa , 2013).

## 2. *Escherichia coli*

**2.1 Concepto.** *E. coli* es un bacilo gram negativo, habitante natural del tubo digestivo y colon; productor de varias vitaminas importantes para el organismo, como la B y K; es anaerobio facultativo, es móvil por flagelos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Coloniza vagina y uretra; desde la uretra asciende y causa infección del tracto urinario (Vignoli, 2008).

Al ser parte de la flora intestinal se puede utilizar como indicador para detectar y medir la contaminación fecal en alimentos y agua. Por lo general, son comensales inofensivas, que constituyen el 1% de la población microbiana del tracto gastrointestinal; pero algunas *E. coli* son patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua, medioambiente y vías urinarias (Franco , Ramirez , & Orozco , 2013).

### 2.2 Taxonomía.

- Reino: Protista procariota.
- Filo: *Proteobacteria*
- Clase: *Gamma proteobacteria*
- Orden: *Enterobacteriaceae*
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Escherichia*
- Especie: *E. coli* (Guzman , Alvarado , & Saquipay , 2011).

*E. coli* es la causa principal de infecciones de vías urinarias (IVU) adquirida comunitaria y hospitalariamente, de septicemia, meningitis neonatal y gastroenteritis. En la infección urinaria los factores que predisponen en las mujeres son la proximidad del ano a la vagina y uretra; esto lleva a colonización de uretra y vagina por flora fecal. Si se adquiere la bacteria durante el nacimiento causa meningitis neonatal, y diarrea, esta bacteria es la segunda causa de meningitis neonatal en el mundo (Torres, 2013).

**2.3 Clases de *Escherichia coli*.** Existen diversas clases de *E. coli*, la enterotoxigénica es responsable de causar diarrea del viajero, *E. coli* enteroinvasiva invade las células epiteliales humanas causando disentería similar a la causada por *Shigella*, *E. coli* enterohemorrágica se asocia con diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, *E. coli* enteropatogénica causa diarrea infantil particularmente en países en vías de desarrollo (Torres, 2013).

**2.4 Cultivo y características de crecimiento.** Crece en los medios de cultivo usual de laboratorio, simples o adicionados de sangre, en los sólidos las colonias son de crecimiento rápido, grandes, elevadas, convexas, de bordes regulares blanco-grisáceas, húmedas y de consistencia semejante a la mantequilla. En los medios líquidos su crecimiento se manifiesta por enturbamiento homogéneo del mismo, en cualquier cultivo que se aísla el colibacilo, se produce un olor intensamente fecaloide. Crece en aerobiosis y en ocasiones es anaerobio facultativo, su temperatura de crecimiento va desde 20 a 40°C, con una óptima de 37°C, y su pH es de 7.0 a 7.7 (Guzman et al., 2011).

**Agar sangre.** Es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento de numerosos microorganismos, al ser suplementado con 5-10 % de sangre ovina, permite el crecimiento de microorganismos exigentes y la visualización de hemólisis (Britanialab, 2015).

**Agar EMB.** Agar de Levine con Eosina y Azul de Metileno es un medio de cultivo indicado para el aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram negativos

fermentadores y no fermentadores de lactosa. El Azul de Metileno inhibe bacterias Gram positivas y junto con la eosina ayudan a diferenciar colonias fermentadoras de lactosa de las que no la fermentan (Soria, 2009).

**Agar MacConkey.** Es un medio de diferenciación selectivo para aislamiento de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos. La concentración de sales biliares, inhibe microorganismos Gram positivos; mientras que las peptonas proporcionan nutrientes a los microorganismos que se desarrollan en el medio (Britanialab, 2014).

Actualmente no se recomienda la realización de urocultivo en mujeres con infección de tracto urinario no complicada. Por el contrario, el espectro etiológico de las infecciones de tracto urinario complicadas y las de adquisición nosocomial es mucho más amplio, y muchos de los agentes causales son resistentes a los antibióticos prescritos (Pigrau, 2011).

En las infecciones de vías urinarias existen complicaciones a corto y largo plazo, por lo que un diagnóstico precoz, tratamiento eficaz y un seguimiento clínico debe ser efectivo en la eliminación del microorganismo causante de la infección, lo que depende de una elección correcta del fármaco, basada en los patrones de aislamiento y sensibilidad antimicrobiana de los patógenos implicados mediante la realización de estudios clínicos que fomenten el uso más racional de antibióticos (Moya , Diaz , & Ibañez , 2016).

Uno de los estudios clínicos para determinar la sensibilidad antibiótica es el método de difusión con disco (KirbyBauer) que es un método cualitativo muy bien estandarizado que permite total flexibilidad en la elección de los antibióticos estudiados (Pigrau, 2011).

### **3. Identificación bacteriana mediante equipo automatizado (Vitek)**

**Fundamento.** El sistema del equipo utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen,

cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras; las tarjetas están selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema (UNAM, 2012).

Existen 4 tipos de tarjetas reactivas disponibles para la identificación de diferentes clases de organismos:

1. GN – Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores.
2. GP - Cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos
3. YST – Levaduras y organismos levaduriformes
4. BCL – Bacilos formadores de esporas Gram positivos (UNAM, 2012).

**Procedimiento.** Transferir con asa estéril, a partir de un cultivo puro, una cantidad suficiente de inóculo a un tubo de ensayo que contiene 3 mL de solución salina estéril, se ajusta la turbiedad a 0.5 unidades de la escala de McFarland, se coloca el tubo de ensayo que contiene la suspensión bacteriana dentro de la gradilla especial (cassette), y la tarjeta de identificación se coloca en la ranura cercana, en el sistema del equipo (UNAM, 2012).

**Lectura de reacciones.** Cada tarjeta es removida del carrusel cada 15 min, transportada al sistema óptico de transmitancia el que usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar las reacciones de turbiedad o el color de los productos metabólicos, y devuelta a su sitio en el carrusel hasta el siguiente tiempo de lectura; los datos son registrados a intervalos de 15 min durante el periodo de incubación total. Los cálculos se realizan con los

datos “crudos” y se comparan en los umbrales para determinar las reacciones para cada prueba, los resultados aparecen como “+”, “- “, o cuando las reacciones son débiles estas se indican como “?”. Las bases de datos de los productos de identificación están contruidos con un gran número de cepas de microorganismos caracterizados y probados bajo varias condiciones de cultivo (UNAM, 2012).

#### **4. Resistencia Bacteriana**

La resistencia antimicrobiana es la capacidad de las bacterias para soportar el efecto de los antibióticos sobre ellas, las bacterias que eran vulnerables al efecto de un antimicrobiano y que posteriormente no lo son, se consideran bacterias farmacorresistentes. Las bacterias sensibles a un determinado antibiótico pueden volverse resistentes por una mutación en sus genes o por la adquisición de genes de resistencia presentes en otro microorganismo, proceso natural que ha ido sucediendo desde hace mucho tiempo (Instituto Nacional de Salud Publica, 2017).

##### **4.1 Tipos de resistencia.**

**4.1.1 *Resistencia Intrínseca.*** Es una propiedad innata que permite a todas las bacterias de una misma especie sean resistentes por naturaleza a algunas familias de antibióticos y esto ofrece tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y puedan sobrevivir en caso que se emplee un antibiótico de esa familia (Torres, 2013).

**4.1.2 *Resistencia Adquirida.*** Este tipo de resistencia se da evolutivamente y su frecuencia depende de la utilización de antibióticos, se produce a través de mutaciones y por la transmisión de material genético extra cromosómico procedente de otras bacterias (Torres, 2013).

## 4.2 Mecanismos de resistencia

**4.2.1 Barreras de permeabilidad.** Las bacterias pueden generar modificaciones que impidan la llegada del fármaco al punto diana mediante dos formas:

*Permeabilidad de membrana externa.* Mediante la membrana lipídica externa que es una barrera intrínseca para la penetración del antibiótico (Torres, 2013).

*Permeabilidad de la membrana interna.* Mediante la modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula (Torres, 2013).

**4.2.2 Bombas de eflujo.** Son transportadores de membrana involucrados en la expulsión de sustancias desde el interior de las células hacia el exterior, en bacterias productoras de betalactamasas, estas bombas les confieren autoinmunidad contra antibióticos (Marchetti, Errecalde , & Mestorino , 2011).

**4.2.3 Alteración del sitio blanco.** Las bacterias pueden modificar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta. Se produce mediante cambios estructurales en los sitios de acción de los betalactámicos (Tafur, Torres, & Villegas, 2008).

**4.2.4 Inactivación del antibiótico.** Se da mediante la producción de enzimas que causan la destrucción o modificación de la estructura química del fármaco. Las enzimas que causan la destrucción del fármaco y son utilizadas por gérmenes gram negativos, como las betalactamasas que hidrolizan el núcleo betalactámico rompiendo el enlace amida de antibióticos betalactámicos y carbapenémicos (Torres, 2013).

## 5. Betalactamasas

En la actualidad la resistencia bacteriana está en aumento, existen diversos mecanismos por los cuales las bacterias crean resistencia a antibióticos; unos de los principales mecanismos es la producción de betalactamasas (Bueno, 2009).

Las betalactamasas son enzimas producidas por algunas bacterias y es responsable de la resistencia que éstas exhiben ante la acción de antibióticos betalactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (carbapenemasas), se clasifican en cuatro clases: A, B, C y D (Solorzano, 2004).

**5.1 Betalactamasas de clase A.** Son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia o sensibilidad disminuida a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Entre ellas se encuentran las de tipo TEM, SHV, CTX-M, PER, entre otras (Navarro, Calvo, Cantón, & Fernandez, 2011).

**5.2 Betalactamasas de clase B.** Requieren zinc para su actividad y son consideradas por ello metalobetalactamasas. En general son plasmídicas, inhibibles por Ácidoetilendiaminotetraacético (EDTA), incluyendo las enzimas que confieren resistencia a los carbapenemes (Solorzano, 2004).

**5.3 Betalactamasas de clase C.** Son enzimas cromosómicas de expresión inducible, con actividad contra penicilinas, pero tienen mayor actividad frente a cefalosporinas, monobactámicos y aminopenicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasas (López, Torres, & Prada, 2015).

**5.4 Betalactamasas de clase D.** También llamadas "oxacilinasas" por su capacidad de hidrolizar oxacilinas y benzilpenicilinas, involucran a las OXA tipo BLEE responsables de generar resistencia a penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido (OXA-11, OXA-16, OXA-17) y las OXA tipo carbapenemasas que confieren resistencia a carbapenemes (OXA-48). Los genes de la enzima son de origen cromosómico como en *Acinetobacter baumannii* o de origen plasmídico como ocurre en algunas enterobacterias (García, Astocondor, & Banda, 2012).



En 1995 Bush, Jacob y Medeiros proponen una clasificación funcional para las betalactamasas, esta se basa en el peso molecular de la enzima, su punto isoeléctrico, el perfil de sustrato y la propiedad de ser inhibidas por la presencia de ácido clavulánico o EDTA (Vignoli, 2008).

En base a este esquema surgen cuatro grupos funcionales que se correlacionan bien con la clasificación de AMBLER (Distingue cuatro grupos de betalactamasas en función de sus secuencias aminoacídicas) denominándose: 1, 2, 3 y 4 (Solorzano, 2004).

Grupo 1: Cefalosporinasas que no son adecuadamente inhibidas por el ácido clavulánico.

Grupo 2: Penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas que generalmente son inhibidas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Grupo 3: Metalobetalactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenemes que son inhibidas por EDTA y no por ácido clavulánico.

Grupo 4: Penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el ácido clavulánico (Marroquin, 2008).

La íntima proximidad que se genera entre el grupo hidroxilo de la serina 70 y el grupo amida del anillo culmina con la hidrólisis del betalactámico. La presencia de una molécula de agua en el sitio activo de estas enzimas produce la liberación del antibiótico (deacilación), devolviendo la actividad enzimática (Vignoli, 2008).

Las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por bacterias productoras de betalactamasas son muy limitadas. A la elevada resistencia intrínseca a betalactámicos se une la resistencia cruzada a otros antibióticos no betalactámicos, el efecto inóculo (aumento de la CMI debido a una sobrecarga bacteriana), la pérdida de porinas y la sobreproducción de betalactamasas resistentes a inhibidores, limitando así el uso de antibióticos (García, 2013).

## 6. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Son enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, fundamentalmente enterobacteria, frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, aunque también por microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y otros. Son capaces de inactivar, además de las penicilinas y las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam (Álvarez Almanza, 2010).

La mayoría de las BLEE son derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, se diferencian entre sí de sus precursoras por algunos aminoácidos. Son comúnmente encontradas en *E. coli*, *Klebsiella sp*, y *Proteus mirabilis*, aunque, existen otras BLEE que difieren filogenéticamente de TEM y SHV, como las CTX-M, las carbapenemasas tipo OXA común en *Acinetobacter* y las metalobetalactamasas VIM e IMP, encontradas en especies de *Pseudomona aeruginosa*, *Serratia sp* y *Enterobacter sp* (Carrillo, 2014).

Las mutaciones en el centro activo de estas enzimas 2b, han determinado la aparición de las BLEE, capaces de hidrolizar también a las cefalosporinas de tercera generación y los monobactámicos. Las BLEE, por tanto, se clasifican dentro de ese gran grupo 2b, constituyendo el subgrupo 2be (clase molecular A). Hasta la fecha se han descrito más de cien variantes distintas de BLEE, derivadas de las betalactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de las derivadas de SHV (Álvarez Almanza, 2010).

### 6.1 Identificación en el laboratorio.

**6.1.1 Método de difusión.** En este procedimiento inicialmente se utiliza Agar Mueller Hinton, el inóculo a emplearse se obtiene de la suspensión bacteriana, equivalente al estándar 0,5 McFarland, este inóculo es extendido en toda la placa de agar. Los discos antimicrobianos usados en este método de tamizaje para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli* son cefpodoxima (10 ug), ceftazidima (30 ug), aztreonam (30 ug),

cefotaxima (30 ug), ceftriaxona (30 ug). Una vez colocados los discos en la placa de agar, esta se incuba a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 16 a 20 horas (Villavicencio Pacheco, 2015).

El uso de más de un disco aumenta la probabilidad de detección de cepas BLEE. El resultado se interpreta como cepa sospechosa de BLEE, si al menos uno de los siguientes diámetros del halo de inhibición están presentes en los siguientes valores: cefpodoxime < 17mm, ceftazidima < 22mm, aztreonam < 27 mm, cefotaxima < 27 mm, ceftriaxona < 25 mm. La cepa sospechosa deberá ser sometida a una nueva prueba para determinar la confirmación del fenotipo productor de BLEE según lo establecido en el manual del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI) (Villavicencio Pacheco, 2015).

**6.1.2 Prueba confirmatoria de BLEE.** Las potenciales productoras de BLEE son analizadas tanto con cefotaxima y ceftazidima solas y en combinación cefalosporina/ácido clavulánico. Si el aislamiento produce una BLEE, el ácido clavulánico inhibirá la actividad de la enzima y restaurará la actividad de la cefotaxima o la ceftazidima. Se puede usar un método de difusión por disco o de CIM (Martínez, 2009).

Interpretación: Un incremento  $\geq 5$  mm en el diámetro del halo para cefotaxima o ceftazidima cuando se prueban en combinación con ácido clavulánico, comparado con el diámetro del halo de la cefalosporina sin ácido clavulánico, confirma la producción de BLEE (Martínez, 2009).

## **7. Betalactamasas de tipo AmpC**

Las AmpC son serin-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Ciertas enterobacterias poseen de manera natural betalactamas de tipo AmpC como el *Enterobacter spp*, *Providencia spp*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei*, *Morganella organii*, *Pseudomonas aeruginosa*. Las AmpC producidas son de naturaleza cromosómica inducible con resistencia natural a las

aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación, cefamicinas (cefexitina, cefotetán) y aminopenicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam), no tienen efecto sobre cefalosporinas de cuarta generación, ni sobre carbapenémicos, siendo estos últimos los betalactámicos de elección en cepas productoras de AmpC, además de no ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam), aunque algunas pueden ser inhibidas por sulbactam o tazobactam (Martínez, 2009).

Las AmpC se codifican de manera intrínseca en el cromosoma bacteriano de algunas especies de enterobacterias, en algunas circunstancias se puede hiperproducir o hiperexpresarse. En *E. coli*, *Shigella spp* son intrínsecamente constitutivas y se expresan en bajo nivel de manera continua; algunas variables cromosómicas “saltaron” a plásmidos por lo que su localización también puede ser plasmídica (Porres, 2015).

AmpC cromosómicas inducibles: Se producen a bajos niveles de manera natural y aumentan su síntesis en presencia de inductores (betalactámicos); pueden reprimirse, perdiendo así la característica de inducción. Por ejemplo: *Enterobacter spp*, *M. morganii*, *Providencia spp*, *P. aeruginosa*, entre otras (Martínez, 2009).

AmpC cromosómicas no inducibles (constitutivas): Su expresión es a niveles muy bajos sin mostrar resistencia. Cuando se encuentran hiperproducidas pueden conferir resistencia a todos los betalactámicos a excepción de cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos, la principal bacteria es *E. coli* (Martínez, 2009).

## **7.1 Identificación en el laboratorio.**

**7.1.1 Método de difusión.** Son el método de sinergia de doble disco (usando discos de cloxacilina o ácido fenil-borónico y discos de cefotaxima y ceftazidima) y el método de discos combinados con inhibidores. En el caso concreto de *E. coli*, la utilización del método

de inducción de AmpC puede resultar útil en la detección de AmpC plasmídica puesto que un resultado positivo solo es posible si media la adquisición de una AmpC plasmídica inducible y descarta sin lugar a dudas la hiperproducción de la AmpC cromosómica, dado que ésta no es inducible (Paredes, 2013).

Interpretación: Un aumento del halo de inhibición (sinergia) de las cefalosporinas hacia la zona adyacente a la cloxacilina, se interpreta como prueba positiva para la producción de AmpC (Martínez, 2009).

**7.1.2 Método de difusión con inhibidores.** Se utiliza discos de cefotetán (30 µg) solos y suplementados con 20 µl de una solución de Ácido fenil borónico (AFB 400 µg). Tras la realización de un antibiograma convencional, con los dos discos.

Interpretación: Se considera que existe una betalactamasa de tipo AmpC, si el halo de inhibición del disco con presencia de AFB es mayor o igual a 5 mm, en comparación con el halo del disco que no contiene este inhibidor (Martinez , 2009).

## **8. Betalactamasas tipo Carbapenemasas**

Son enzimas producidas por bacterias gram negativas que contienen un anillo betalactámico unido a un anillo insaturado de cinco miembros, los representantes más utilizados son imipenem y meropenem a los que se les añadió el ertapenem. Presentan un amplio espectro de actividad y una gran resistencia a todas las betalactamasas, tanto cromosómicas como plasmídicas, pero se inactivan por las denominadas carbapenemasas, en general no deben utilizarse como tratamiento de primera línea, excepto para tratar infecciones por bacterias multirresistentes (Paredes, 2013).

Las carbapenemasas se clasifican en dos grupos; serinobetalactamas y metalobetalactamas:

Serinobetalactamasas: Son enzimas de la clase A o D de Ambler y tienen menor actividad hidrolítica que las metaloenzimas, no hidrolizan aztreonam, pueden ser inhibidas por

inhibidores de betalactamasas. Se incluyen: .KpC, OXA, NMC, IMI, GES, SME (Morejón, 2012).

Metalobetalatamasas: Pertenecen a la clase B de Ambler, y al grupo 3 de la clasificación de Bush, constituyen las carbapenemasas adquiridas de mayor relevancia clínica ya que tienen capacidad de hidrolizar a todos los antibióticos betalactámicos, excepto el aztreonam y no ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas, entre ellas están: IMP, VIM, SPM, SPM, GIM, AIM, DIM, NDM-1 (Morejón, 2012).

### **8.1 Identificación en el laboratorio.**

**8.1.1 Método de difusión.** Se debe inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina ajustado a la escala de McFarland, se colocan discos con carbapenémicos (imipenem, meropenem) y un disco con inhibidor (ácido borónico) para descartar carbapenemasas de clase A y (ácido dipicolínico o EDTA) para carbapenemasas de clase B a 20-25 mm y a continuación se incuba a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 16-20 horas (Navarro et al., 2011).

Interpretación: Se considera positivo si existe ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” entre el carbapenémico y el inhibidor. Y negativo si no existe ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de “zona fantasma” (Navarro et al., 2011).

**8.1.2 Método de discos combinados con inhibidor.** Se inocula una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina ajustado a la turbidez de la escala de McFarland, se coloca un disco con meropenem, meropenem+cloxacilina, meropenem+ácido borónico y meropenem+ ácido dipicolínico o meropenem+EDTA y se incuba a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 16-20 horas (Navarro et al., 2011).

Interpretación: Se considera positivo si existe incremento mayor a 5 mm de diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico solo; y negativo si no existe incremento del diámetro del halo (Martinez , 2009).

**8.1.3 Inactivación de carbapenemasas.** Se utiliza Caldo de triptacasa de soya (TBS), en un tubo con 2 ml de TBS se disuelve 1 µl del aislamiento que se desea confirmar la producción de carbapenemasa y se le agrega un disco de meropenem (10 µg). Se mezcla e incuba por 4 horas a 37°C, se inocula en una placa con agar Mueller Hinton la suspensión de *E. coli* ATCC 25922 (sensible a meropenem) y se deja secar de 3-5 minutos para luego agregar el disco de Meropenem en la placa de Mueller Hinton y se incuba a 37 °C de 18- 24 horas (Navarro et al., 2011).

Interpretación: Se considera positivo si la zona de inhibición está entre 6- 15mm o hay la presencia de colonias dentro del halo de inhibición, se considera negativo si el halo de inhibición es superior a 19 mm (Martinez , 2009).

## 9. Diagnóstico

**9.1 Emo.** El examen elemental y microscópico de orina (EMO) es la evaluación física, química y microscópica de la orina. Este análisis consta de muchos parámetros para detectar y medir diversos compuestos que salen a través de la orina, entre los procesos para un examen de orina tenemos:

- Análisis físico: Se observa a simple vista el color, aspecto, olor y volumen de la orina.
- Análisis químico: Con una tira especial (tira reactiva) en orina se analizan parámetros como: densidad, pH, leucocitos, nitritos, sangre, urobilinógeno, cuerpos cetónicos, hemoglobina, glucosa, bilirrubinas y proteínas (Villavicencio Pacheco, 2015).

- **Análisis microscópico:** Se analiza el sedimento de la muestra de orina en un microscopio, esto se hace para observar hematíes, leucocitos, células, cristales urinarios, moco, bacterias, etc (Villavicencio Pacheco, 2015).

Nitritos en orina es un indicador de IVU, la enzima reductasa bacteriana metaboliza los nitratos urinarios en nitritos. Si la orina contiene bacterias, por este método se podrá detectar bacteriuria con una sensibilidad del 50 % (Laso , 2002).

La leucocituria o piuria, es la presencia de más de 5 leucocitos por campo (40x) en orina centrifugada, que aportan gran información sobre si el paciente sufre de IVU, la ausencia de piuria hace poco probable su diagnóstico. Los falsos negativos suelen deberse al inicio de un tratamiento antibiótico, orinas poco concentradas o alcalinas, o infección en su fase inicial (Gonzalez Monte , 2012).

La llamada piuria estéril, o piuria con urocultivo negativo, puede deberse a inflamación no infecciosa (nefritis intersticial aguda), a uretritis aguda por enfermedades de transmisión sexual, o a tuberculosis del sistema urinario (Wurgaft, 2010).

Además del EMO, la coloración de Gram es una prueba que permite una orientación adicional sobre el tipo de microorganismo causante de la IVU. La presencia de un microorganismo por campo de 100x en la coloración de Gram de una gota de orina se correlaciona con un cultivo de 100.000 UFC/ml; es una prueba que aumenta la sensibilidad y especificidad del sedimento si se los evalúa en conjunto (Lopardo, 2007).

**9.2 Cultivo.** El cultivo de orina se realiza para cuantificar el número de bacterias por mililitros y se expresa como unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml). Teóricamente, cada UFC en el cultivo representa una bacteria viable en la muestra; sin embargo, cuando las bacterias en orina existen como agregados (*estafilococos*) o como cadenas (*estreptococos*) el número de UFC es inferior al número real de bacterias en la muestra. La técnica de cultivo



cuantitativo más utilizada es la siembra con asa calibrada, que permite depositar sobre la superficie del medio de cultivo un volumen determinado de orina (Pigrau, 2011).

### **Reporte de Urocultivo:**

Según (Villavicencio Pacheco, 2015) el reporte de un urocultivo debe ser:

Menos de 1.000 o 10.000 UFC/ml, se informará: “Menos de 1.000 o 10.000 UFC/ml”.

De 10.000 a 100.000 UFC/ml.

- Un patógeno sin células epiteliales: informar microorganismo, número de colonias, antibiograma y valorar clínicamente.
- Dos patógenos: informar microorganismos, número de colonias y solicitar nueva muestra.
- Más de dos patógenos: informar “Cultivo mixto, probable contaminación”.

Mayor a 100.000 o más UFC/ml

- Uno o dos patógenos: informar identificación más antibiograma.
- Más de dos especies: informar “cultivo mixto, probable contaminación”.

## **10. Antibióticos**

**10.1 Concepto.** Son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos (OMS, 2018).

### **10.2. Clasificación.**

#### ***Según su efecto.***

*Efecto bactericida de los antibióticos.* El efecto bactericida consiste en producir la muerte del microorganismo sensible. Se deben administrarse siempre en infecciones graves, cuando se necesita la muerte rápida de los microorganismos para controlar la infección, y cuando no

se cuenta con un sistema inmune adecuado para detener el proceso infeccioso (Agrovet, 2007).

*Efecto bacteriostático de los antibióticos.* El efecto bacteriostático consiste en producir la inhibición del crecimiento bacteriano; mientras tanto, se espera que la inmunogénesis aporte los elementos defensivos necesarios para el control de la enfermedad (Agrovet, 2007).

### ***Según su mecanismo de acción***

En dependencia de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos, los antibióticos se clasifican en:

*Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.* Y afectan la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana (penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos betalactámicos, y agentes disímiles, como vancomicina, bacitracina, cicloserina, inhibidores de betalactamasa y los antimicóticos (imidazólicos, miconazol, ketoconazol y clotrimazol) (Cué Brugueras & Morejón.).

*Agentes que afectan la síntesis de proteínas.* A nivel ribosomal entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la subunidad 30s (aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas) y los que actúan sobre la subunidad 50s (macrólidos, lincosamidas y amfenicoles) (Cué Brugueras, et al.).

*Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos.* Como antibióticos (quinolonas, rifamicinas y antivirales) (Cué Brugueras, et al.).

*Agentes antimetabolitos.* Que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico (sulfonamidas y trimetoprima) (Cué Brugueras, et al.).

*Agentes que actúan sobre la membrana celular.* Del microorganismo como (polimixina B, colistina, colistimetato, detergentes y antimicóticos poliénicos, como nistatina y anfotericina B, que se unen a los esteroides de la pared celular) (Cué Bruguera, et al.,).

### ***Según su espectro bacteriano***

De acuerdo a la variedad de especies sobre las cuales ejercen su acción, los antibacterianos pueden dividirse en tres grupos:

*De espectro reducido.* Agentes que actúan sólo contra un escaso grupo de gérmenes. Ejemplo Penicilina G, que actúa básicamente contra cocos Gram positivos (Azúero & Carrión Dávila, 2013).

*De espectro amplio.* Agentes que son eficaces contra Gram positivos y, además contra un gran número de gramnegativos. Ejemplo la Ampicilina que es activa contra los mismos gérmenes que la penicilina G y que, además, es activa contra algunos gramnegativos (Azúero et al., 2013).

*De amplio espectro.* Actúan frente a múltiples grupos de gérmenes (Gram positivos, gram negativos, *Rickettsias*, *espiroquetas*), conteniendo un gran número de especies de los mismos. Por ejemplo, las tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, etc (Azúero et al., 2013).

### **10.3 Antibióticos para Enterobacterias.**

*Cefalosporinas.* Son los agentes antimicrobianos más recomendados para la susceptibilidad bacteriana, debido a su amplio espectro, probada eficacia y alto perfil de seguridad. Sobre la base de su espectro de actividad frente a gérmenes se clasifican en cuatro grupos o generaciones:

Las cefalosporinas de primera generación o de espectro reducido son activas frente a la mayoría de los cocos gram Positivos aerobios (*Staphylococcus spp.* sensibles y resistentes a penicilina) y *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina, pero no son activas contra las cepas resistentes a esta última. Las cefalosporinas de segunda generación, tienen menor actividad frente a *Staphylococcus spp.* sensible a meticilina, pero son más efectivas frente a algunos gérmenes Gram negativos, en particular contra *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoea* (Rodríguez, Tolón , & Lopez, 2013).

Las cefalosporinas de tercera generación o de amplio espectro son muy activas contra gérmenes Gram negativos. La ceftizoxima, cefotaxima, ceftriaxona y cefoperazona son las que exhiben una mayor efectividad frente a *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina. Solo la cefoperazona y la ceftazidima son activas frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Las cefalosporinas de cuarta generación tienen mayor espectro frente a gérmenes gram negativos y positivos. En comparación con las de tercera generación tienen una actividad mayor frente a gérmenes gram positivos, similar contra gram negativos productores de betalactamasas plasmídicas (Rodríguez et al., 2013).

**Penicilinas.** Compuestas por un anillo betalactámico unido a un anillo de tiazolidina con una cadena lateral que les confiere diferentes características. Al manipular la cadena, se logra modificar a los compuestos y obtener diferentes clases penicilinas. Algunas bacterias poseen enzimas llamadas betalactamasas, que alteran el anillo betalactámico y logran inactivar el medicamento. Estos fármacos actúan alterando la síntesis de pared bacteriana, inhibiendo enzimas que crean uniones peptídicas como: transpeptidasa, carboxipeptidasa, endopeptidasa; conocidas como proteínas unidoras de penicilinas (PBP) y activando el sistema autolítico; las carboxipenicilinas y ureido penicilinas tienen incremento de actividad contra bacterias gram negativas (Villavicencio Pacheco, 2015).

**Aminoglucósidos.** Son una familia de antimicrobianos, conformada por sustancias básicas, cuya acción se inhibe en medios ácidos o abundantes en cationes bivalentes (Aliño , López, Navarro , & Duperval, 2007).

Los aminoglucósidos como son amikacina, gentamicina, tobramicina son activos contra *Enterobacteriaceae*, y en combinación sinérgica con agentes antimicrobianos activos que actúan sobre la pared celular (por ejemplo, penicilina, ampicilina, vancomicina) ejercen su actividad contra algunas bacterias grampositivas, como los *enterococos* (CLSI, 2010).

**Monobactámicos.** El espectro del antibiótico monobactámico aztreonam se reduce a microorganismos gramnegativos aeróbios, de forma similar a los aminoglucósidos (Rodrigo, 2010).

**Inhibidores de betalactamasas.** Estos agentes antimicrobianos son combinaciones que incluyen un antibiótico de la clase de las penicilinas y un segundo agente con actividad antibacteriana mínima, pero que funciona como inhibidor de algunas betalactamasas. Actualmente se usan tres son inhibidores de betalactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Villavicencio Pacheco, 2015).

#### **10.4 Antibiograma.**

Tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos y traducir en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El comité internacional de estandarización redefinió tres categorías de interpretación de un antibiograma con el fin de evitar confusión:

**Sensible:** cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico (Cantón, 2011).

Intermedio: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto (Cantón, 2011).

Resistente: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico (Cantón, 2011).

## **11. Control de calidad en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

El control de calidad es el conjunto de acciones que se aplican en el laboratorio durante la ejecución de cada prueba para asegurar que las mismas están llevándose a cabo de la manera correcta. Para el control de calidad en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se debe tener en cuenta: Control de calidad del medio, ph, inóculo, incubación, sensidiscos, cepas ATCC (CLSI, 2010).

### **11.1 Cepas de referencia ATCC**

Estas cepas han sido seleccionadas con base en su susceptibilidad o resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y a su confiabilidad en los métodos de referencia. De acuerdo a la prueba de susceptibilidad (método de difusión en disco, dilución en agar y microdilución) y al agente antimicrobiano se selecciona la cepa ATCC (CLSI, 2010).

#### **11.2 *Escherichia coli* ATCC 25922**

- Betalactamasa negativa
- Indicado para control de calidad interno
- Control negativo de test de screening y confirmatorio de BLEE (Araya & Prat, 2015, págs. 5-8).

#### **11.3 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603**

- Productora de betalactamasa de espectro expandido tipo SHV- 18

- Control positivo de test de screening y confirmatorio de BLEE (Araya et al., 2015, págs. 5-8).

#### **11.4 *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705**

- Productora de carbapenemasa tipo KPC
- Control positivo de test de screening y confirmatorio de Carbapenemasas (Araya et al., 2015, págs. 5-8).

#### **11.5 *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706**

- Productora resistente a carbapenémicos por un mecanismo diferente a la producción de carbapenemasa
- Control negativo de test de screening y confirmatorio de Carbapenemasas (Araya et al., 2015, págs. 5-8).

## 5. Materiales y métodos

### Tipo de estudio

El estudio es de tipo descriptivo y corte transversal.

### Área de estudio

El estudio se realizó en el Hospital Isidro Ayora de la ciudad de Loja, ubicado en las calles Manuel Montero y Av. Iberoamericana perteneciente al barrio El Pedestal, parroquia Sucre de la ciudad de Loja, provincia Loja de la República del Ecuador.

### Universo

El universo estuvo constituido por 591 usuarios que acudieron al laboratorio del Hospital Isidro Ayora de la ciudad de Loja con pedido de urocultivo durante el periodo diciembre 2017- abril 2018.

### Muestra

Para el presente estudio se tomaron todas las muestras de urocultivo positivas durante el periodo diciembre 2017- abril 2018, las mismas que fueron de 225 muestras que cumplieron con criterios de inclusión y exclusión.

### Criterios de Inclusión

- Pacientes con pedido de urocultivo.
- Cultivos primarios con crecimiento  $\geq 100.000$  UFC/ml (pacientes inmunocompetentes)
- Cultivos con crecimiento  $\geq 1.000$  UFC/ml (pacientes inmunodeprimidos, síndrome uretral femenino, punción suprapúbica o renal percutánea).

### Criterios de Exclusión

- Muestras que no vengan en hielo.



- Pacientes que hayan recibido terapia antibiótica por lo menos 7 días antes del examen.
- Pacientes que ya hayan sido muestreados durante este estudio.
- Muestras contaminadas con espermatozoides, sangre o secreción vaginal.
- Más de dos patógenos aislados.

## **Métodos, Técnicas y Procedimientos**

### **Fase Pre analítica.**

**Oficio.** Se aprobó la ejecución del Macroproyecto por parte del Subdirector de docencia e investigación del Hospital Isidro Ayora (Ver anexo 1).

**Consentimiento Informado.** Se les informó a los pacientes que participaron del estudio, el procedimiento que se iba a realizar, se respondió algunas inquietudes que tenían, para luego proceder a firmar un consentimiento informado (Ver anexo 2).

**Registro de pacientes.** En el formulario se recolectó datos del paciente concernientes a su edad, profesión, consumo de antibióticos, infección de vías urinarias recurrentes o primera vez, hora de toma de muestra, servicio de procedencia, entre otros, asegurando la confidencialidad de sus datos (Ver anexo 3).

**Tríptico.** Se realizó la socialización de Macroproyecto, entrega de trípticos a médicos y personal de salud de las áreas del Hospital Isidro Ayora de como informar a sus pacientes la toma y transporte de la muestra de orina (paciente ambulatorio) Ver anexo 4, o la forma en que los responsables deben hacer el transporte en caso de ser un paciente hospitalizado (Ver anexo 5).

**Protocolo de transporte de muestras.** Se elaboró un protocolo para el correcto traslado de muestras desde el Hospital Isidro Ayora hasta el Centro de Diagnóstico Médico (CDM) de la Facultad de la Salud Humana UNL (Ver anexo 6).

### **Control de calidad.**

Para el control de calidad de los discos de antibióticos tanto para el método de sinergia de discos como de discos combinados se ensayó la cepa control *E. coli* ATCC 25922 BLEE negativa (Ver anexo 7) , mientras que como control positivo para BLEE se probó la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Ver anexo 8); para el método de inactivación de carbapenemasas se utilizó la cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (Ver anexo 9) como control positivo, mientras que como control negativo se utilizó la cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706 (Ver anexo 10); cumpliendo criterios del CLSI.

Mientras que los medios de Mueller Hinton y agar sangre que fueron utilizados en la realización de pruebas fenotípicas y resiembra bacteriana, fueron adquiridos a una casa comercial. Los mismos que cumplen con las características del documento del CLSI M100 por lo que son medios con un control de calidad confiable.

### **Fase Analítica**

***Protocolo de siembra de muestras.*** Se elaboró un protocolo para la siembra de muestras recolectadas, en los medios de crecimiento adecuados para el desarrollo de bacterias provenientes del tracto urinario mediante la técnica de estría (Ver anexo 11).

***Identificación y susceptibilidad antimicrobiana.*** Para la identificación de las bacterias presentes en las muestras de estudio se utilizó un equipo automatizado VITEK Systems, basado en métodos bioquímicos establecidos (d-GLU, GGT, Manitol, Manosa, entre otros) mediante el uso de tarjetas (GN, AST-GN) que miden la utilización de la fuente de carbono, actividades enzimáticas y antibiograma (Ver anexo 12).

***Registro de muestras.*** Donde se hizo constar la fecha, el código de la muestra, la procedencia del paciente, el sexo, la bacteria aislada y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana (Ver anexo 13).

**Protocolo de Betalactamasas.** Identificación fenotípica de betalactamasas en bacterias gram negativas de tipo BLEE (CIM de  $> 16$  ug/ml a ceftazidime, aztreonam, y  $> 4$  ug/ml a ceftriaxone), AmpC (CIM  $> 4$  ug/ml a cefotaxime, resistencia a cefoxitin e inhibidores de betalactamasas), Carbapenemasas (CIM  $> 1$  ug/ml a meropenem o CIM  $> 2$  ug/ml a imipenem) (Ver anexo 14,15,16 respectivamente).

### **Fase Post analítica**

**Registro de datos.** Se fue documentando la sinergia de discos, discos combinados, aproximación de discos, inactivación de carbapenémicos en la muestra aislada en el caso de BLEE, AmpC y Carbapenemasas, permitiéndonos así interpretar el resultado (Ver anexo 17,18, 19 respectivamente).

A medida que se documentaba los resultados en los registros físicos, se almacenaba los datos en la base virtual del computador en el Centro de Diagnóstico Médico, del cual me permitió tabular los datos para realizar el informe final de tesis.

Además, se envió al INSPI (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública) todas las cepas que requerían confirmación molecular, se llenó un formulario en el cual contenía la información del paciente, mecanismo de resistencia inferido, código de la muestra, y antibiograma que presentaba.

Una vez terminado el análisis, identificación y confirmación fenotípica de las muestras; se procedió a eliminar los desechos de acuerdo a protocolos ya establecidos. Finalmente, todo el material de vidrio, hisopos, gasas fue lavado y esterilizado en autoclave para asegurar la confiabilidad de los procesos realizados y evitar la contaminación por agentes externos.

### **Plan de tabulación y análisis de datos**

Para la presentación de resultados de la presente investigación se utilizó técnicas de estadística, utilizando el programa de Microsoft Excel; presentando los resultados mediante tablas, calculando frecuencias y porcentajes.

## 6. Resultados

**Tabla 1**

*Frecuencia de Escherichia coli aislada en urocultivos de usuarios del Hospital “Isidro Ayora” - Loja, diciembre 2017- abril 2018.*

<b>Bacterias</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje de bacterias</b>
<i>Escherichia coli</i>	173	76.89 %
<i>K. pneumoniae</i>	20	8.89 %
<i>K. oxytoca</i>	2	0.89 %
<i>Proteus mirabilis</i>	10	4.44 %
Otros Géneros	20	8.89 %
<b>TOTAL</b>	<b>225</b>	<b>100 %</b>

**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Fuente:** Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018

### Interpretación

Del total de muestras de orina que tuvieron crecimiento, se encontró que *Escherichia coli* con un 76.89 % es la Enterobacteria causal de la mayoría de las IVU, seguido de *Klebsiella pneumoniae* con un 8.89 %, además de encontrarse el desarrollo de otros géneros bacterianos que representan el 14.22 %, lo que se debería a que la mayoría de infecciones de vías urinarias están producidas por bacterias gram negativas.

**Tabla 2**

*Producción de betalactamasas por Escherichia coli aislada de urocultivos de usuarios del Hospital “Isidro Ayora”- Loja, diciembre 2017- abril 2018.*

<b>Indicador</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje de bacterias</b>
<i>Escherichia coli</i> productora de betalactamasas	31	17.9 %
<i>Escherichia coli</i> no productora de betalactamasas	142	82.1 %
<b>TOTAL</b>	<b>173</b>	<b>100 %</b>

**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Fuente:** Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018

### **Interpretación**

La mayor parte de cepas de *Escherichia coli* no fueron productoras de betalactamasas esto representa el 82.1 %; mientras que en menor proporción, mediante pruebas fenotípicas se confirmó que el 17.9 % de las cepas bacterianas son productoras de betalactamasas que podrían ser cromosómicas o extra cromosómicas confiriéndoles resistencia a los betalactámicos; la producción de estas enzimas se puede deber a fracasos terapéuticos en el tratamiento con antibióticos betalactámicos, según Alvarez (2007).

**Tabla 3**

*Tipos de betalactamasas producidas por Escherichia coli aislada de urocultivos de usuarios del Hospital “Isidro Ayora”- Loja, diciembre 2017- abril 2018.*

<b>Indicador</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje de bacterias</b>
AmpC	1	3.2 %
Blee	30	96.8 %
Carbapenemasas	0	0 %
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>100 %</b>

**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Fuente:** Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018

### **Interpretación**

La confirmación fenotípica de las muestras analizadas, teniéndose en cuenta criterios del manual del CLSI M100- S27, que indica puntos de corte para betalactamasas. En primer lugar, se ubica la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) con un 96.8 %, seguida de la producción de AmpC con un 3.2 %, mientras que en tercer lugar se ubica la ausencia de producción de carbapenemasas. Como se puede apreciar las betalactamasas de espectro extendido tienen una mayor relevancia que las betalactamasas de tipo AmpC en nuestro medio.

**Tabla 4**

*Distribución de betalactamasas producidas por Escherichia coli en relación al sexo, diciembre 2017- abril 2018.*

<b>Tipo de betalactamasa</b>	<b>Masculino</b>		<b>Femenino</b>		<b>TOTAL</b>
	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	
AmpC	0	0 %	1	3.2 %	3.2 %
Blee	5	16.0 %	25	80.8 %	96.8 %
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>16 %</b>	<b>26</b>	<b>84 %</b>	<b>100 %</b>

**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Fuente:** Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018

### **Interpretación**

La producción de betalactamasas de espectro extendido (Blee) en hombres fue mínima lo que representa el 16 % en comparación con el sexo femenino que fue mayor, representando el 80.8 %; además que la producción de AmpC en mujeres representa el 3.2 % la cual en comparación con el género masculino que fue negativa. Esto podría deberse a que las infecciones de vías urinarias son más frecuentes en mujeres que hombres debido a la ubicación de los genitales femeninos más cercanos a la región perianal de la mujer según Villavicencio Pacheco (2015).



**Tabla 5**

*Distribución de betalactamasas producidas por Escherichia coli en relación a la edad, diciembre 2017- abril 2018.*

Edad	AmpC		Blee		TOTAL
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
Adultos (20 a 59 años)	0	0 %	15	48.4 %	48.4 %
Adulto Mayor (más de 60 años)	1	3.2 %	15	48.4 %	51.6 %
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>3.2 %</b>	<b>30</b>	<b>96.8 %</b>	<b>100 %</b>

**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Fuente:** Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018

### Interpretación

La producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) tiene predisposición de afectar en mayor simetría a los grupos etarios de adultos y adultos mayores con un 48.4 % en ambos grupos etarios. Mientras que la producción de AmpC confirmada en laboratorio afecta enteramente al grupo etario de adulto mayor la cual fue de un 3.2 % del total de betalactamasas producidas por *E. coli*. Según Alvarez (2007) la edad constituye un factor predisponente para desarrollar infecciones y por ende resistencias, debido a que en las personas mayores las infecciones son más factibles que en los jóvenes. Además de otros factores como el sistema inmunológico, aumentando el riesgo de contraer infecciones causadas por microorganismos productores de Betalactamasas.

**Tabla 6**

*Distribución de betalactamasas producidas por Escherichia coli en relación al servicio de procedencia del Hospital “Isidro Ayora”, diciembre 2017- abril 2018.*

Servicio	AmpC		Blee		TOTAL
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
Consulta externa	0	0 %	9	29.0 %	29.0 %
Emergencia	1	3.2 %	18	58.1 %	61.3 %
Otros ( Clínica, Unidad de quemados)	0	0 %	3	9.7 %	9.7 %
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>3.2 %</b>	<b>30</b>	<b>96.8 %</b>	<b>100 %</b>

**Autor:** Jhordy Alexis Córdova Balcazar

**Fuente:** Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018

### **Interpretación**

La mayor producción de Blee se confirmó que procede del área de emergencia del Hospital “Isidro Ayora” de la ciudad de Loja con un 58.1 %, así mismo esta fue la única área donde se corroboró la producción de AmpC, la cual fue del 3.2 %; seguida del área de consulta externa donde la producción de Blee fue menor en comparación con emergencia, la misma que representa el 29.0 %, finalmente el área donde se da la menor producción de betalactamasas fueron en otros servicios.

## 7. Discusión

La infección de vías urinarias se define como la invasión, multiplicación y colonización del tracto urinario causada en su mayor parte por microorganismos de origen intestinal, como *E. coli* y otras enterobacterias que pueden llegar a las vías urinarias y producir infección. Algunos microorganismos causantes de este tipo de infecciones manifiestan el fenómeno de resistencia a través de diversos mecanismos, siendo uno de estos la producción de enzimas tipo betalactamasas, existiendo en la actualidad un incremento de estas cepas bacterianas en pacientes ambulatorios con infección de vías urinarias, en la cual la producción de betalactamasa por parte de *E. coli* varía dependiendo de la población, país o región donde se realiza el estudio (Villavicencio Pacheco, 2015).

La presente investigación se la realizó con un total de 225 muestras de urocultivos de pacientes que acuden al Hospital “Isidro Ayora” de la ciudad de Loja durante el periodo Diciembre 2017- Abril 2018, según criterios de inclusión y exclusión se obtuvo un crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* en 173 muestras; de las cuales 31 cepas, es decir el 17.9 % fueron productoras de betalactamasas, de estas 30 cepas fueron productoras de BLEE y una cepa productora de AmpC. De todos los aislamientos, la población más afectada por la producción de betalactamasas fue el género femenino donde se aislaron 26 cepas productoras de betalactamasas. Para el desarrollo de esta investigación se utilizó el método de sinergia de discos, discos combinados, además del método de aproximación de discos para la confirmación de AmpC, en el medio de Mueller Hinton.

En un estudio realizado por Marilín Alonso Sicilia, junto a Yanet Rodríguez Sigler, Luis Gustavo García en la ciudad de San Antonio. Cuba (2013) se obtuvo una incidencia de *Escherichia coli* productora de BLEE en un 70.4 %, este estudio fue aplicado a pacientes hospitalizados y ambulatorios, comparándolo con el presente estudio donde la producción de

BLEE expresadas por *E. coli* fue mayor representando el 96.8 %, por lo tanto, se demuestra que *E. coli* expresa en mayor proporción enzimas de tipo BLEE, esto puede ser debido a una mayor expresión de tipo cromosómico o plasmídico que les confiere resistencia a antibióticos betalactámicos.

En la ciudad de Quito, Villavicencio (2014) estableció que la frecuencia de *E. coli* productora de BLEE fue del 25,5 % en pacientes ambulatorios; utilizando el mismo método de detección y confirmación incluidos en el manual del CLSI, resultados similares en nuestro estudio ya que la frecuencia de *E. coli* productora de BLEE fue del 29.0 % en pacientes de consulta externa.

En una investigación realizada por Tejada (2012) en el Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión de Callao-Perú, presentó un 71,1 % de *Escherichia coli* productora de BLEE en el sexo femenino, datos que se encuentran relacionados con este estudio donde el porcentaje de *E. coli* productora de BLEE aisladas en el sexo femenino fue del 80.8 %. Estos datos corroboran que la población más propensa a adquirir infección por *E. coli* productora de BLEE es el sexo femenino, según datos obtenidos en este estudio.

En un estudio realizado por Louro (2013) en tres hospitales en la ciudad de Barcelona, se aisló *Escherichia coli* en la cual la prevalencia de AmpC fue de un 1.1 %, mientras que la mayor parte de betalactamasas eran BLEE, en relación a nuestra localidad, se presenta resultados similares en la cual la producción de AmpC fue del 3.2 %, confirmándose así que AmpC expresada por *E. coli* se produce en menor proporción que las de tipo BLEE.

Gracias a la presente investigación se puede observar que, en la población de estudio, existe resistencia bacteriana en caso de microorganismos que afectan a vías urinarias, muchas son las razones para que esto suceda sobre todo si se toma como factor de riesgo el grupo etario de adultos mayores y sexo femenino.

## 8. Conclusiones

- La frecuencia de *Escherichia coli* aislada de urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora fue de 76.89 % lo que nos indica que es la bacteria más habitual de infecciones de vías urinarias.
- *Escherichia coli* produce en mayor porcentaje, betalactamasas de espectro extendido con un 96.8 %, en relación a las betalactamasas de tipo AmpC que representan un 3.2 % del total de betalactamasas producidas.
- El sexo femenino es más propenso a infecciones por *Escherichia coli* productora de betalactamasas, debido a la proximidad de la uretra con el ano, además de que los grupos etarios de adultos y adultos mayores son más proclives a este tipo de infecciones.
- Los usuarios del servicio de emergencia son la población más susceptible a infecciones de vías urinarias por *Escherichia coli* productora de betalactamasas.

## 9. Recomendaciones

- Se recomienda a los integrantes del proyecto “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y SOLCA de Loja” de la cual es parte la presente investigación, realizar la respectiva socialización de los resultados fenotípicos.
- Se recomienda a las autoridades de la Universidad Nacional de Loja, impulsar más investigaciones similares, con el fin de identificar los factores de riesgo que conllevan a la infección por este tipo de bacterias resistentes.
- Se recomienda realizar periódicamente estudios similares para tener una idea epidemiológica de cambios en la prevalencia y frecuencia de betalactamasas, además de la respuesta por parte de los microorganismos hacia los antibióticos

## 10. Bibliografía

- Agrovvet. (2007). *Agrovvetmarket*. Obtenido de <https://www.agrovvetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/antibioticos-y-antimicrobianos>
- Aliño , M., López, J., Navarro , R., & Duperval, P. (Junio de 2007). Aminoglucósidos: una mirada actual desde su historia. *Revista cubana de pediatría*, 79(2), 1-3. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312007000200009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312007000200009)
- Álvarez Almanza, D. (Noviembre de 2010). Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Habanera de ciencias médicas*, 9(4), 1-3. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2010000400011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000400011)
- Alvarez, L. (2007). Infecciones de vias urinarias en el Hospita Universidad del Norte. *Salud uninorte*, 23(1), 1-2. Recuperado el 22 de Agosto de 2018, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81723103>
- Araya, I., & Prat, S. (2015). *Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología*. Guía de calidad para Laboratorios Clínicos, Gobierno de Chile , Instituto de Salud Pública . Obtenido de [http://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendacion\\_Contro\\_Calidad\\_Bacteriologia.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendacion_Contro_Calidad_Bacteriologia.pdf)
- Azuero , L., & Carrión Dávila, T. (2013). *Sensibilidad antimicrobiana de Escherichia coli en pacientes con infecciones de vías urinarias que acuden al Hospital IESS en el periodo de diciembre 2012-febrero-2013*. Repositorio digital de la Universidad Nacional de Loja, Loja. Recuperado el 22 de Agosto de 2018, de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/7003>
- Biomerieux. (2013). *VITEK*. Recuperado el 30 de Agosto de 2018, de <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitekr-2-advanced-expert-system>
- Britanialab. (2014). *MacConkey Agar*. Recuperado el 30 de Agosto de 2018, de [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2ed674cf661.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed674cf661.pdf)
- Britanialab. (Noviembre de 2015). *Sangre Agar Base*. Recuperado el 30 de Agosto de 2018, de [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2975a1ab740.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2975a1ab740.pdf)

- Bueno, G. (2009). *Factores asociados a la infección por Escherichia coli y Klebsiella sp productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión - Callao: septiembre 2008-diciembre 2009*. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Humana, Lima. Obtenido de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3281/Bueno\\_bg.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3281/Bueno_bg.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Calderón, J., Casanova, G., Galindo, A., Gutiérrez, P., & Landa, S. (Febrero de 2013). Diagnostico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Medigraphic*, 70(1), 4-7.
- Cantón, R. (Marzo de 2011). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(6), 2-6. doi:10.1016/j.eimc.2010.01.001
- Carrillo, B. (2014). Bacterias productoras de BLEE. *Revista Médica digital*(21), 2-3. Recuperado el 15 de Julio de 2018, de <http://botica.com.ve/PDF/bleeB21.pdf>
- Chiriboga Urquiza, M., Chiriboga Acosta, M., & Araujo López, C. (2012). *Nuevo método alternativo para la detección de Betalactamasas de espectro extendido en Escherichia coli y Klebsiella spp*. Tesis, Universidad Central del Ecuador, Repositorio institucional, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/644/1/T-UCE-0006-28.pdf>
- CLSI. (2010). Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010. Bogotá, Colombia. Recuperado el 2 de Julio de 2018, de [http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual\\_Resistencia\\_SDS\\_2010.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf)
- Cué Brugueras, M., & Morejón, M. (s.f.). Antibacterianos de acción sistémica. *Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 1-2. Recuperado el 14 de Junio de 2018, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21251998000400009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21251998000400009)
- Duarte Jarquin, A. (Mayo de 2016). *Infecciones por Escherichia Coli y su perfil de resistencia en niños atendidos en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera (La Mascota)*. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Facultad de Medicina. Repositorio digital, Managua. Recuperado el 28 de Julio de 2018, de <http://repositorio.unan.edu.ni/3571/1/23351.pdf>



- Franco , P., Ramirez , L., & Orozco , M. (2013). Determinación de Escherichia Coli e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Lasallista de Investigación*, 1-2.
- García , C., Astocondor, L., & Banda , C. (Septiembre de 2012). Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Médica Peruana*, 29(3), 1-3.
- Garcia, M. (Diciembre de 2013). Escherichia coli portado de betalactamasas de espectro extendido. *Sanidad militar*, 69(4), 1. doi:10.4321/S1887-85712013000400003
- Gonzalez Monte , E. (12 de Octubre de 2012). Infecciones del tracto urinario. *Nefrología*, 6(1), 1-2. doi:10.3265/Nefrologia.2010.pub1.ed80.chapter1830
- Guzman , F., Alvarado , S., & Saquipay , W. (2011). *Caracterización y resistencia de Escherichia Coli a los antimicrobianos en los hospitales Vicente Corral Moscoso y Jose Carrasco*. Tesis, Universidad de Cuenca , Cuenca, Ecuador. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3816/1/TECL10.pdf>
- Instituto Nacional de Salud Publica. (2017). *Resistencia bacteriana a los Antibióticos*. Morelos. Recuperado el 29 de Julio de 2018, de <https://www.insp.mx/avisos/3476-resistencia-bacteriana.html>
- Laso , M. d. (2002). *Interpretacion del analisis de Orina*. Recuperado el 31 de Agosto de 2018, de Researchgate: [https://www.researchgate.net/publication/266245003\\_Interpretacion\\_del\\_analisis\\_de\\_orina](https://www.researchgate.net/publication/266245003_Interpretacion_del_analisis_de_orina)
- Lopardo, H. (2007). *Urocultivo*. Recuperado el 12 de Agosto de 2018, de Britanialab: <http://www.laensenadacorp.com/documentos/ApunteIII-UROCULTIVO.pdf>
- López, D., Torres, M., & Prada , C. (23 de Noviembre de 2015). Genes de resisitencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud publica de Colombia. *Universidad y salud*, 18(1), 6-8. doi:<https://doi.org/10.22267/rus.161801.30>
- Louro, N. A. (2014). *Caracterización molecular de los genes *|Amp* cromosomicos y adquiridos en aislados clinicos de Escherichia coli en el área de Barcelona*. Tesis, Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Genética , Barcelona. Obtenido de UAB: [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2014/hdl\\_10803\\_285112/nal1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2014/hdl_10803_285112/nal1de1.pdf)

- Macero, R. (2013). *Frecuencia de Escherichia coli betalactamasa de espectro extendido (BLEE), en infecciones de vías urinarias en pacientes que acuden al Hospital Jose Carrasco Arteaga del Instituto Ecuatoriano de Seguro social*. Tesis, Universidad de Guayaquil, Repositorio institucional, Guayaquil. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/7543>
- Malla Bravo , Y. (2014). *Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del Hospital "Manuel Ygnacio Monteros"*. Tesis, Universidad Técnica Particular de Loja, Repositorio institucional, Loja, Ecuador. Obtenido de [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9119/1/MALLA\\_BRAVO\\_YOMAIR\\_%20MARIBEL.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9119/1/MALLA_BRAVO_YOMAIR_%20MARIBEL.pdf)
- Marchetti, M., Errecalde , J., & Mestorino , O. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. *Analecta Veterinaria*, 31(2), 2-3. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11280>
- Marroquin, C. (2008). *Aislados de Acinetobacter spp, resisitentes a carbapenemes en pacientes del Hospital General San Juan de Dios*. Tesis , Usac , Repositorio digital , Guatemala.
- Martinez , D. D. (Diciembre de 2009). Betalactamasas de tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 1-2. Obtenido de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562009000200003](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200003)
- Montero, R. I. (23 de Noviembre de 2017). *Factores de riesgo en la infección del tracto urinario causados por Escherichia coli productoras de Betalactamasas de espectro extendido*. Machala. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11888/1/IÑAGUAZO%20MONTERO%20ROBERT%20KEVIN.pdf>
- Morejón, M. (2012). Carbapenemasas, una amenaza actual. *Bvs*, 1-2. Recuperado el Julio 14 de 2018, de [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mie/vol11\\_4\\_12/05412.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mie/vol11_4_12/05412.pdf)
- Moya , V., Diaz , M., & Ibañez , A. (2016). Patrón de aislamiento bacteriano y sensibilidad antimicrobiana en urocultivos positivos obtenidos de una población pediátrica. *Quimioter*, 2.

- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., & Fernandez, F. (Septiembre de 2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gram negativos. *ScienceDirect*, 29(7), 2-3. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.011
- Ochoa, C., Eiros, J., Pérez, C., & Galiana, L. (Junio de 2005). Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. *Quimioterapia*, 18(2), 3-4. Recuperado el 30 de Agosto de 2018
- OMS. (2018). Resistencia a antibióticos. 1. Recuperado el 1 de Septiembre de 2018, de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos>
- Paredes, R. (2013). *Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en la clínica Good Hope*. Obtenido de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3497/Paredes\\_gr.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3497/Paredes_gr.pdf?sequence=1)
- Pigrau, C. (2011). *Infección del tracto urinario* (Vol. 1). Madrid: Salvat. Obtenido de <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeinteres/seimc-dc2013-LibroInfecciondeltractoUrinario.pdf>
- Porres, N. (2015). *Detección y bases genéticas de betalactamasas AmpC y carbapenemasas en aislados clínicos y comensales de enterobacterias*. Logroño.
- Rodrigo, C. (2010). Uso de los antimicrobianos en la población pediátrica. *Elsevier*, 3. Obtenido de <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-uso-los-antimicrobianos-poblacion-pediatrica-S0213005X10001138>
- Rodríguez, Z., Tolón, B., & López, M. (2013). Antibióticos cefalosporánicos: Actualidades y perspectivas. *Cenic*, 1-4.
- Sanchez Cruzatty, M. (2002). *Factores asociados a las infecciones urinarias, en adolescentes del Instituto Técnico Superior Guayaquil*. Tesis, Universidad de Guayaquil, Repositorio institucional, Guayaquil. Recuperado el 17 de Mayo de 2018, de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/765/4/TESIS%20FINAL%20final%202.pdf>
- Santambrosio, I. E. (2009). *Universidad Tecnológica Nacional*. Obtenido de [https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf)

- Solorzano, A. (2004). *Betalactamasas de espectro extendido en nuestro medio: Aportaciones científicas*. Granada. Recuperado el 8 de Junio de 2018, de <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/16915173.pdf>
- Soria, F. (Septiembre de 2009). *Leviene EMB Agar*. Recuperado el 30 de Agosto de 2018 de [http://fsoria.es/Inform\\_soria/Difco%20Fichas%20tecnicas/PLACAS%20DIFCO%20Y%20CROMOGENICAS%20BD/FT%20LEVINE%20AGAR.pdf](http://fsoria.es/Inform_soria/Difco%20Fichas%20tecnicas/PLACAS%20DIFCO%20Y%20CROMOGENICAS%20BD/FT%20LEVINE%20AGAR.pdf)
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (Septiembre de 2008). Mecanismo de resistencia en bacterias Gram negativas. *Scielo*, 12(3), 3-5. Recuperado el 1 de Septiembre de 2018, de <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>
- Tejada , P. (2 de Junio de 2015). Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Redalyc.org*, 76(2), 161-166. Recuperado el 31 de Agosto de 2018, de <http://www.redalyc.org/pdf/379/37941081009.pdf>
- Torres, A. (2013). *Resistencia bacteriana en bacilos gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del hospital "Manuel Ygnacio Monteros " durante el periodo agosto- septiembre*. Loja.
- UNAM. (28 de Septiembre de 2012). *IDENTIFICACIÓN MICROBIANA MEDIANTE EL SISTEMA VITEK 2 DE BIOMÉRIEUX*. Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IdentificacionConVITEK2\\_21548](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IdentificacionConVITEK2_21548)
- Vignoli, R. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. En U. d. República, *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (págs. 649-652).
- Villavicencio Pacheco, P. (2015). *Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en Urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora*. Tesis, Universidad Nacional de Loja , Repositorio digital , Loja, Ecuador. Obtenido de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/13758/1/PABLO%20VILLAVICENCIO.%20WORD.pdf>
- Viña, I. P. (2016). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas*. Obtenido de <http://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>
- Wurgaft, A. (2010). Infección del tracto urinario. *Revista Médica las Condes*, 1-2. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864010705794>

## 11. Anexos

### Anexo N° 1:


 Ministerio de Salud Pública  
**HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA**  
 Dirección Médica Asistencial



Memorando Nro. MSP-CZ7-HIAL-DI-2017-0049-M

Loja, 15 de junio de 2017

**PARA:** Sr. Ldo. Angel Minos Luzon Ramirez  
 Responsable del Servicio de Laboratorio Clínico

**ASUNTO:** AUTORIZANDO DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN.

De mi consideración:

Por medio de la presente me permito comunicar a Ud. que luego de la revisión del proyecto de investigación: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS DE MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA LOJA 2017", dirigida por la Lda. Carmen Ullauri González docente de la carrera de Laboratorio Clínico de la UNL, se autoriza el desarrollo de mencionado estudio, con el cumplimiento de todas las normas éticas y de bioseguridad del caso, por lo que solicito a Ud. se digne supervisar su proceso, recordando que está prohibido fotocopiar cualquier documento del expediente clínico, llevarlo fuera del servicio o tomar fotografías al paciente, imágenes o su entorno sin autorización del responsable del servicio, sus pacientes y/o familiares.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

  
 HOSPITAL GENERAL  
 "ISIDRO AYORA"  
 COORDINACIÓN DE DOCENCIA  
 E INVESTIGACIÓN  
 Dr. Daniel Villego Pacheco Montoya  
**SUBDIRECTOR DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN**

Avenida Manuel Agustín Aguirre y Juan José Samaniego  
 Teléfono: 2570540 ext. 7275  
<http://instituciones.msp.gob.ec/dps/loja/>

## Anexo N° 2:

## Consentimiento informado

## ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MOLECULAR PARA AISLAR BETALACTAMASAS EN EL HOSPITAL SOLCA DE LOJA Y HOSPITAL ISIDRO AYORA

Historia Clínica.....  
Fecha: .....Número de cédula.....  
Hora:.....

<b>APELLIDO PATERNO</b>	<b>APELLIDO MATERNO</b>	<b>NOMBRES</b>	
<b>ESTADO CIVIL</b>	<b>NACIONALIDAD</b>	<b>DOMICILIO</b>	<b>EDAD</b>

**¿EN QUÉ CONSISTE?**

Su muestra de orina que va a ser incluida en un estudio se usará para identificar las bacterias causantes de la infección y determinar la posible presencia de bacterias resistentes y ciertas sustancias (betalactamasas) que causan que las bacterias sean resistentes al tratamiento con ciertos antibióticos.

La muestra debe ser la primera orina de la mañana, o por lo menos luego de 4 horas de retención, se debe realizar lavado de los genitales con agua y jabón, luego orinar desechando el primer chorro, y recolectar el resto de la orina en un frasco estéril. Se debe llevar la muestra enseguida al laboratorio de SOLCA.

Los resultados se informarán al propio laboratorio y no tienen ningún costo extra. En caso de que su muestra de orina sea positiva para infección uno de los participantes del presente proyecto tomará una muestra de las bacterias que crecieron y las transportará hacia los laboratorios de la Universidad Nacional de Loja donde se realizará el estudio específico.

**BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Beneficiará al paciente ya que el tratamiento será instaurado o modificado por el médico correspondiente siendo éste el principal beneficio para el paciente.

**EFFECTOS Y RIESGOS**

No existen efectos secundarios ni riesgos de ningún tipo para el paciente.

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRA**

Fecha: Hora:

Estoy de acuerdo con el procedimiento (enviar la muestra de orina para que sea sometida a estudios en el proyecto de investigación de la UNL), que se me ha propuesto; he sido informado de las ventajas e inconvenientes del mismo; se me ha explicado de forma clara en qué consiste, los beneficios y posibles riesgos del procedimiento. He escuchado, leído y comprendido la información recibida y se me ha dado la oportunidad de preguntar lo que he necesitado consultar sobre el procedimiento. He tomado consciente y libremente la decisión de autorizar el procedimiento. También conozco que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.

<b>Nombre del paciente</b>	<b>Firma del paciente</b>
----------------------------	---------------------------

Firma del Responsable de la investigación

**NEGATIVA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

FECHA:

No autorizo y me niego a que se me realice el procedimiento propuesto, responsabilidades futuras de cualquier índole al servicio de salud y a la intervención sugerida

<b>Nombre completo del paciente</b>	<b>Cédula de ciudadanía</b>	<b>Nombre del Investigador</b>
-------------------------------------	-----------------------------	--------------------------------

**REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Revoco el consentimiento realizado en fecha.....y no deseo que prosigan con el procesamiento de la muestra entregada, doy por finalizado en esta fecha.....Asumo la responsabilidad sobre mi salud y desvinculo de responsabilidades futuras de cualquier índole al servicio de salud y al profesional sanitario que me atiende.

<b>Nombre completo del paciente</b>	<b>Cédula de ciudadanía</b>	<b>Nombre del Investigador</b>
-------------------------------------	-----------------------------	--------------------------------

## Anexo N° 3:



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
 FACULTAD DE LA SALUD HUMANA  
 CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

FORMULARIO PARA PACIENTES QUE SE SOMETERÁN AL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MOLECULAR  
 PARA AISLAR BETALACTAMASAS EN EL HOSPITAL ISIDRO AYORA- LOJA

Hospital		Servicio	
Edad		Género	
Profesión		Procedencia	
Tipo de muestra		Hospitalizado	Si   No
Sondas, catéteres	Si	No	
Hora de la toma de muestra		Hora de llegada al laboratorio	
¿Consume antibióticos con regularidad?	Si	No	¿Por qué?
¿Consume pollo, huevos o leche?	Si	No	
Primera vez con infección de vías urinarias	Si	No	Recurrente (2 o más veces al año)   Si   No
¿Supo qué bacteria le causó la infección?	Si	No	¿Cuál?
¿Qué antibiótico o antibióticos usó?			¿Por cuánto tiempo?
¿Cumplió el tratamiento?	Si	No	¿Por qué?

## Anexo N° 4:

## Tríptico para pacientes ambulatorios

**NIÑOS QUE UTILIZAN PAÑAL****Antes de la recolección:**

- ✓ Retirar el pañal del lactante y lavar bien el área genital con jabón y agua y séquela.
- ✓ No utilizar desinfectantes.

Abra y coloque la bolsa de niño/a sobre los genitales de su bebe:

- ❖ Para los niños se puede colocar todo el pene dentro de la bolsa



- ❖ Para las niñas poner la bolsa sobre los labios de la vagina y colocar el pañal un poco apretado



- ❖ Observar la bolsa cada media hora. Tan pronto como orine, retirar la bolsa. Si no consigue que el niño orine en menos de una hora o la bolsa se ensucia, sustituirla por otra.
- ❖ Trasvasar la muestra dentro de un frasco recolector de orina o trasladar la bolsa bien cerrada al laboratorio en un plazo máximo de 2 horas.



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LOJA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**



**INDICACIONES PARA  
RECOLECCIÓN DE  
MUESTRA DE ORINA**

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE  
ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO  
AVORA Y SOLCA DE LOJA.



## MUJERES

- ✓ Recoger la primera orina de la mañana, en caso de emergencia con una retención mínima de 4 horas.
- ✓ Utilizar frasco estéril de tapón de rosca

### Antes de la recolección:

Lavarse las manos con agua y jabón



Lavar la zona genital con jabón y abundante agua. Este lavado se hará siempre de adelante hacia atrás y secar con una toalla limpia



Separando con los dedos los labios mayores se recoge la parte media de la micción para esto orine primero fuera del frasco, continúe orinando directamente dentro del frasco hasta llenar aproximadamente la mitad. Cerrar el frasco anotar el nombre y apellidos del paciente. Evitar tocar el interior del recipiente



Llevar la muestra en el plazo de 2 horas al laboratorio.

## HOMBRES

- ✓ Recoger la primera orina de la mañana, en caso de emergencia con una retención mínima de 4 horas.
- ✓ Utilizar frasco estéril de tapón de rosca

### Antes de la recolección:

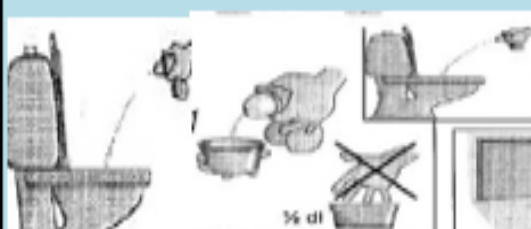
Lavarse las manos con agua y jabón



Retraer el prepucio dejando al descubierto la cabeza del pene, lavar con agua y jabón y secar



Recoger la parte media de la micción para esto orine primero fuera del frasco, continúe orinando directamente dentro del frasco hasta llenar aproximadamente la mitad. Cerrar el frasco anotar el nombre y apellidos del paciente. Evitar tocar el interior del recipiente



Llevar la muestra al laboratorio en el plazo de 2 horas.

## Anexo N° 5:

## Tríptico para pacientes hospitalizados

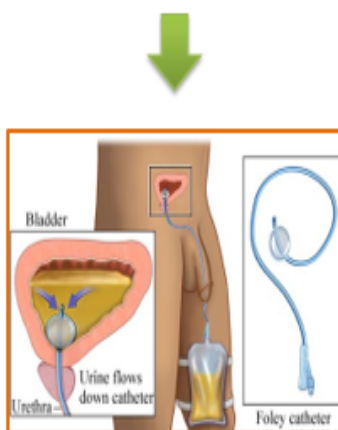
**TOMA DE MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES HOSPITALIZADOS****A. ORINA OBTENIDA A TRAVÉS DE CATETERISMO TRANSURETRAL**

**TÉCNICA DE RECOLECCIÓN:** Realizar higiene de genitales con guantes no estériles. Eliminar la primera porción de orina obtenida, coleccionar la siguiente porción de orina (5-10 mL) en el frasco estéril. retirar la sonda y tapar el frasco

**FRASCO ESTÉRIL****B. ORINA OBTENIDA A TRAVÉS DE SONDA VESICAL.**

Realizar desinfección del cono de la sonda con alcohol al 70% o solución yodada. No enviar orina que ha estado depositada en la bolsa colector.

**TÉCNICA DE RECOLECCIÓN:** Puncionar la sonda con jeringa estéril con aguja de calibre pequeño, aspirar 5 a 10 mL de orina, retirar jeringa. Envasar en el frasco estéril, manteniendo la técnica aséptica

**C. PACIENTES SIN CONTROL DE ESFÍNTER**

Realizar higiene de genitales y secar adecuadamente. Colocar bolsa recolectora, si la micción no se da en 20 minutos se deberá repetir el aseo y colocar nueva bolsa.


**TÉCNICA DE RECOLECCIÓN:** Colocar bolsa plástica adherente, verificando ausencia de fugas. Estar atento cuando elimine, para retirar pronto la bolsa y evitar derramamiento o contaminación de la muestra. Son suficientes 5 - 10 mL de orina.



**NOTA:** Las muestras tomadas deben ser enviadas al laboratorio lo más pronto posible, hasta un máximo de 2 horas. Colocar las muestras en hielo seco y garantizar la calidad de muestra.

**Anexo N° 6:**

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>Transporte de muestras al Laboratorio de la Facultad de la Salud Humana: CDM</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB02 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b> 1 <b>FECHA:</b> 10-11-2017 <b>PÁGINA:</b> 1/2</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## **Protocolo para transporte de muestras**

### **1. INTRODUCCION**

La obtención y el transporte de muestras son etapas fundamentales en el diagnóstico clínico y en la investigación. Para mantener la integridad de las muestras se deberá tener en cuenta los procedimientos de obtención, transporte, condiciones de conservación, destino final y bioseguridad.

El control de estos proporcionará valor a las muestras asegurando la calidad y estabilidad para obtener resultados confiables y oportunos.

El transporte de muestras biológicas tiene importancia a nivel mundial ya que un manejo incorrecto de sustancias con agentes infecciosos puede ocasionar morbilidad y mortalidad (Rodriguez, 2013).

### **2. OBJETIVO**

2.1. Determinar los pasos y requerimientos necesarios para garantizar el transporte adecuado de las muestras biológicas dentro de los parámetros requeridos para su análisis posterior

### **3. ALCANCE**

Este procedimiento forma parte del proyecto “Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y Solca Loja” que garantizará el correcto transporte de muestras de urocultivo del Hospital Isidro Ayora y Solca hacia el CDM para su análisis posterior

### **4. RESPONSABLES:**

4.1. ESTUDIANTES: transporte de muestras.

4.2. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.

### **5. MATERIALES:**

5.1. Cooler hermético

5.2. Medio de transporte Stuart


5.3. Medios de cultivo Agar Sangre

### **6. PROCEDIMIENTO:**

6.1. Transporte en el Hospital Isidro Ayora:

6.1.1. Una vez analizada la muestra e identificado el germen, y en el caso de que el equipo reporte una resistencia BLEE, procedemos a tomar un medio de

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA\*

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>Transporte de muestras al Laboratorio de la Facultad de la Salud Humana: CDM</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB02 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b> 1 <b>FECHA:</b> 10-11-2017 <b>PÁGINA:</b> 2/2</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

transporte Stuart retiramos el hisopo y recolectamos dos colonias representativas del cultivo para llevar a confirmar BLEE.

6.1.2. Se rotula el medio de Stuart con el código del paciente de cada una de las muestras que nos reportaron sospechosas de BLEE, se las guardas en el cooler hermético sin hielo y se las transporta al CDM.

## 7. OBSERVACIONES

7.1. Debe ser transportada por personal capacitado en recipientes de material sólido, impermeable y de fácil limpieza.

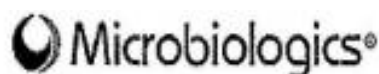
7.2. El contenedor debe tener papel absorbente en el fondo para eventuales derrames

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

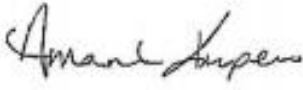
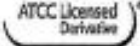

Rodriguez, T. (2013). *Cursep*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/parasito/cursep/Transp.pdf>

<p>ELABORADO POR: Andrea del Cisne Quezada López</p>	<p>REVISADO Y APROBADO POR: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta</p>
----------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------

## Anexo N° 7

Inserto cepa *Escherichia coli* ATCC 25922

## Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-219 Reference Number: ATCC® 25922™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/11/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/1/23
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly rose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, rose edge & rough <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System: MALDI-TOF</b> See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/ MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging even number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small>	
<small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small>	
<small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small>	
<small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small>	
	<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small>
 TESTING CERT #2655.01	<small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small>  <b>MEDIBAC-INC S.A.</b> Distribuidor para el Ecuador de <b>MICROBIOLOGICS</b> Registro Sanitario AD-541-04-13

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



## Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69		(-)	red

## Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Escherichia coli  
 Sample Description: 0335  
 Sample ID: 335-219  
 Sample Creation Date/Time: 2017-01-12T15:07:53.975 CC  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

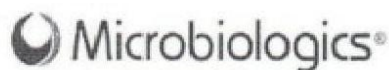
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
E1( +++ ) ( A )	335-219	Escherichia coli	2.508

## Comments:

closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment

**MEDIBAC-INCSA.**  
 Distribuidor para el Ecuador de  
 MICROBIOLOGICS  
 Registro Sanitario AD-541-04-13

## Anexo N° 8

Inserto cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

## Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> <b>Catalog Number:</b> 0784 <b>Lot Number:</b> 784-49 <b>Reference Number:</b> ATCC® 700603™* <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2018/10/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Tracy A Blenker <b>Release Date:</b> 2016/12/6
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types possible: Large, circular, convex, entire edge, gray, glistening. Large, circular, convex, entire edge, cream / off white, mucoid, glistening. <b>Microscopic Features:</b> Gram negative short, plump, straight rod.	<b>Medium:</b> SBAP  <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative (1) Ceftazidime (30 mcg - Disk Susceptibility): 10 - 18 mm (1) Ceftazidime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): $\geq$ 5 mm CAZ zone (1) Cefotaxime (30 mcg - Disk Susceptibility): 17 - 25 mm (1) Cefotaxime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): $\geq$ 3 mm CTX zone   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p><b>MEDIBAC-INC S.A.</b>          Distribuidor para el Ecuador de          MICROBIOLOGICS          Registro Sanitario AD-541-04-13</p> <p>TESTING CERT #2655-01</p>	



## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



## Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	no identification	(-)	red

## Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	<b>Species Consistency:</b> The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	<b>Genus Consistency:</b> The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	<b>No Consistency:</b> Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

Analyte Name: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*  
 Analyte Description: 0784  
 Analyte ID: 784-49  
 Analyte Creation Date/Time: 2016-11-30T08:08:14.304 TB  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, IVD, Listeria  
 Applied Taxonomy Tree:

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
FB(++) (A)	784-49	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2384

## Comments:

N/A

**MEDIBAC-INC S.A.**

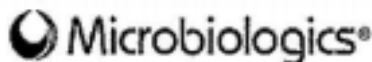
Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICS

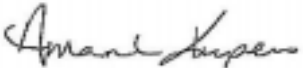


Registro Sanitario A2-541-04-13



## Anexo N° 9

Inserto cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705

## Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Catalog Number: 01005 Lot Number: 1005-22 Reference Number: ATCC® BAA-1705™** Purity: Pure Passage from Reference: 3		Expiration Date: 2019/6/30 Release Information: - Quality Control Technologist: Mary L. Bowman Release Date: 2017/7/17	
<b>Performance</b>			
<b>Macroscopic Features:</b> Large, circular, convex, entire edge, light gray, glistening and mucoid. A SBAP second type that is flatter and less mucoid may be seen.		<b>Medium:</b> SBAP	
<b>Microscopic Features:</b> Short, broad, straight, gram negative bacilli with rounded ends.		<b>Method:</b> Gram Stain (1)	
<b>ID System: MALDI-TOF</b> See attached ID System results document.		<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Coagulase (Kovacs): negative Modified Hodge Test: positive	
		 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<small>Disclaimer: The lot digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small>			
<small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small>			
<small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard safety information.</small>			
<small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small>			
		<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and its self products derived from ATCC® cultures.</small>	
 TESTING CERT #2655.01		<small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small>	
		<b>MEDIBAC-INC S.A.</b> Distribuidor para el Ecuador de MICROBIOLOGICS Registro Sanitario AD-541-04-13	

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



## Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69		(-)	red

## Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: *Klebsiella pneumoniae*  
 Sample Description: 01005  
 Sample ID: 1005-22  
 Sample Creation Date/Time: 2017-07-13T12:15:26.004 MB  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
C12 (+++)(A)	1005-22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.99

Comments:

N/A
-----

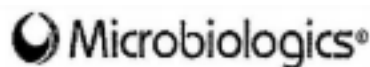
**MEDIBAC-INC S.A.**

Distribuidor para el Ecuador de

**MICROBIOLOGICS**

Registro Sanitario AD-541-04-13

## Anexo N° 10

Inserta cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706

## Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Catalog Number: 01006 Lot Number: 1006-20 Reference Number: ATCC® BAA-1706™ <sup>†</sup> Purity: Pure Passage from Reference: 3		Expiration Date: 2019/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2017/3/23
<b>Performance</b> <b>Macroscopic Features:</b> Large (size may vary), circular, convex, entire edge, pale gray, glistening and mucoid.		<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight bacilli from coccobacillary to long forms present.		<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System: MALDI-TOF</b> See attached ID System results document.		<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Modified Hodge Test: negative   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p><small>Disclaimer: The last 4 digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Users: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <p><small>† The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiology, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>‡ These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p>		
   TESTING CERT #2655.01		<b>MEDIBAC-INCSA.</b> Distribuidor para el Ecuador de MICROBIOLOGICS Registro Sanitario A.D-541-04-13

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



## Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69		(-)	red

## Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: *Klebsiella pneumoniae*  
 Sample Description: 01006  
 Sample ID: 1006-20  
 Sample Creation Date/Time: 2017-03-14T13:24:36.977 cs  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B1 (+++)(A)	1006-20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.45

Comments:

N/A

**MEDIBAC-INC S.A.**


Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICS

Registro Sanitario A.D. 541-04-13

**Anexo N° 11**

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>Siembra de muestra y conteo de colonias</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB03  <b>REVISIÓN:</b> 1  <b>EDICIÓN:</b> 1  <b>FECHA:</b> 10-11-2017  <b>PÁGINA:</b> 1/4</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Protocolo para siembra de muestras

### 1. Introducción

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento bacteriano. El método más usual para la siembra es la técnica de estría en la cual podemos obtener colonias aisladas en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies (Santambrosio, 2009).

Una colonia bacteriana es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido; aunque varía de tamaño generalmente es visible a simple vista. Las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura y en algunos casos color característicos, que aunque puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, es constante bajo condiciones controladas y depende de la especie bacteriana que la forme.


Debido a que las características de las colonias ocurren en varios grados y combinaciones dependiendo de las bacterias y son a menudo muy uniformes, sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados. La morfología colonial es comparable a una estadística ya que se deriva de una célula individual pero es la característica de la masa celular. En una colonia pueden distinguirse varios aspectos como forma, elevación, borde, tamaño, color.

Para el conteo de colonias se usan varios métodos cuantitativos, en este caso utilizaremos el método de asa calibrada, el cual consiste contar el número de colonias desarrolladas después de incubar la siembra a 37<sup>a</sup> C durante 24 horas, el resultado se multiplica por 100 ya que el asa de platino contiene 0,01 ml de orina.

Cuando se obtienen dos recuentos sucesivos con más de 100.000 colonias por ml., la probabilidad de infección es de 80%, cifra que se eleva a 95% si el mismo resultado se logra en tres recuentos sucesivos.

Por lo general, las muestras contaminadas tienden a mostrar cuentas inferiores a 10.000 colonias/ml. Cuando el recuento revela valores intermedios, entre 10.000 y 100.000 colonias/ml, el examen debe repetirse. Conviene advertir que pueden pasar inadvertidas infecciones urinarias verdaderas, si no se toman en cuenta cuentas inferiores a 100.000 colonias por ml, ya que existen diversos factores que pueden explicar recuentos bajos en

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>Siembra de muestra y conteo de colonias</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB03  <b>REVISIÓN:</b> 1  <b>EDICIÓN:</b> 1  <b>FECHA:</b> 10-11-2017  <b>PÁGINA:</b> 2/4</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

infecciones urinarias verdaderas, diuresis acentuada, obstrucción uretral, infecciones crónicas e infecciones por cocos grampositivos (Lopardo, 2015).

## 2. Objetivo

Definir los pasos necesarios que garantice el procedimiento para siembra de muestras de orina en medios de cultivo de forma que se logre el aislamiento de bacterias y así poder diferenciar el fenómeno de hemólisis en agar sangre e identificar las características de las colonias.

## 3. Alcance

Este procedimiento forma parte del macroproyecto “Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y Solca Loja” y garantizará el aislamiento e identificación de bacterias.

## 4. Responsables:

- 4.1. ESTUDIANTES: elaboración del procedimiento.
- 4.2. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.
- 4.3. COLABORADORES INSTITUCIONES PARTICIPANTES: aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

## 5. Materiales

### Equipos

- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol con alcohol al 70%
- Incubadora


### Instrumentos

- Asas de platino
- Hisopos estériles
- Soportes para las asas de platino

### Insumos

- Cajas Petri con medio de cultivo elaborado

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA  
PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p align="center"><b>Siembra de muestra y conteo de colonias</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB03 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b> 1 <b>FECHA:</b> 10-11-2017 <b>PÁGINA:</b> 3/4</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- Lápiz graso
- Guantes

**Sustancias y reactivos**

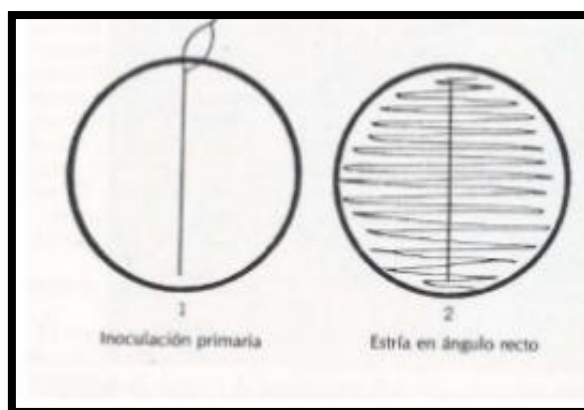
- Muestra a estudiar

**6. Procedimiento**

Para realizar un cultivo bacteriano es necesario:

1. Tomar el asa calibrada e introducirla al fuego para que se esterilice, dejar enfriar unos segundos y tomar la muestra que se va a estudiar,
2. La orina se mezcla bien, no se centrifuga.
3. Se usa asa calibrada de platino o de plástico (0.01 ml).
4. Se inocula la placa de agar MacConkey por estría primaria y secundaria.
5. Se incuba a 35°C, por 24 horas.
6. Se anotan las características de las colonias y el número de colonias diferentes.
7. Se cuantifican las colonias para obtener las UFC/ml. Se deben anotar todas estas características


**Técnica de estría**



**Lectura de cultivo en UFC/ml**

- Después de incubar las siembras a 37° durante 24 a 48 horas, se cuenta el número de colonias desarrolladas y el resultado se multiplica por 100, ya que el asa de platino contiene 0.01 ml. de orina.

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>Siembra de muestra y conteo de colonias</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB03  <b>REVISIÓN:</b> 1  <b>EDICIÓN:</b> 1  <b>FECHA:</b> 10-11-2017  <b>PÁGINA:</b> 4/4</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- Los resultados del estudio cuantitativo se informan de la siguiente manera:
  - ❖ No hubo desarrollo microbiano.
  - ❖ Menos (<) de 10.000 colonias por ml.
  - ❖ Entre 10.000 y 100.000 colonias por ml.
  - ❖ Más de (>) 100.000 colonias por ml.

## 7. Observaciones

- La siembra debe realizarse de la orina sin centrifugar con un asa calibrada, lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo microbiano.
- Marcar las cajas antes de empezar a trabajar
- No hablar durante la siembra
- Flamear el asa antes de realizar la serie de estrías y enfriar en una orilla.
- Las placas no se descartan si no hay crecimiento a las 24 horas, se vuelven a incubar hasta por 72 horas (observando cada 24 horas), si transcurrido el tiempo no hay crecimiento, si se descartan

## 8. Bibliografía


Lopardo, D. H. (26 de Enero de 2015). Obtenido de BritaniaLab.com:  
<http://www.laensenadacorp.com/documentos/Apuntelll-UROCULTIVO.pdf>

<p><b>ELABORADO POR:</b>          María de los Ángeles Ucho.</p>	<p><b>REVISADO Y APROBADO:</b>          Dra. Sandra Freire Cuesta.</p>
----------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------



**Anexo N° 12**

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB04 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b> 1 <b>FECHA:</b> 10-11-2017 <b>PÁGINA:</b> 1/4</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## GUÍA DE USO DEL EQUIPO VITEK 2 Systems


### 1. INTRODUCCIÓN:

VITEK® 2 Systems identifica un organismo mediante una metodología basada en las características de los datos, información acerca del organismo (información guardada en la base de datos del equipo) y las reacciones que se analizan. Se fundamenta en un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibidoras.

Se han recogido datos suficientes de cepas conocidas como para estimar las reacciones típicas de las especies solicitadas a un juego de perfiles bioquímicos discriminantes. Si no se reconoce un patrón de identificación único, se presenta una lista de organismos posibles o se determina que la cepa está fuera del alcance de la base de datos. El informe de laboratorio impreso contiene sugerencias de los tests complementarios necesarios para completar la identificación. Si los tests no son suficientes para completar la identificación, deberán consultarse las referencias y la bibliografía microbiológica estándar.

La tarjeta de identificación de Gram negativos (GN) VITEK® 2 está diseñada para ser utilizada con VITEK® 2 Systems para la identificación automatizada de los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores clínicamente más significativos. La tarjeta de identificación GN VITEK® 2 es un producto desechable de un solo uso.

La tarjeta GN se basa en métodos bioquímicos establecidos (1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25) y sustratos recientemente desarrollados para medir la utilización de la fuente de carbono, las actividades enzimáticas y la resistencia. Existen 47 tests bioquímicos y un pocillo de control negativo. El pocillo Control negativo de descarboxilasa (pocillo 52)

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	<b>Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK</b>	<b>CÓDIGO: PB04</b> <b>REVISIÓN: 1</b> <b>EDICIÓN: 1</b> <b>FECHA: 10-11-2017</b> <b>PÁGINA: 2/4</b>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

se usa como referencia basal para los pocillos de análisis de descarboxilasa. Se obtienen resultados finales en aproximadamente 10 horas o menos (Biomerieux, 2013).

## 2. OBJETIVO:

2.1 Definir o establecer los pasos necesarios que garanticen que el procedimiento de preparación e identificación de muestras en el equipo automatizado VITEK sea efectuado de manera correcta.

## 3. ALCANCE:

El presente protocolo se cumplirá en el marco del proyecto de investigación “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los hospitales Isidro Ayora- Loja”. Lo que asegurará su correcta realización.

## 4. RESPONSABLES:

4.1 ESTUDIANTES: aplicación del procedimiento, registro de resultados.

4.2 DOCENTES/INVESTIGADORES: validación.

4.3 COLABORADORES: aplicación procedimiento, validación de datos y llenado de registros.

## 5. MATERIALES:

5.1 Tarjeta de identificación bacteriana que viene con el equipo.

5.2 Solución salina estéril (NaCl acuoso al 0,45 a 0,50 %, con un pH de 4,5 a 7,0).

5.3 Tubos de ensayo desechables de plástico transparente (poliestireno) limpios de 12 x 75 mm.


5.4 Medio de cultivo apropiado (Mac Conkey)

5.5 Bastoncillos o torundas estériles.

5.6 Dispensador de solución salina de volumen ajustable.

5.7 Asas desechables.


5.8 Tubos de ensayo con solución salina ya dispensada (NaCl acuoso al 0,45 – 0,50 %, con un pH de 4,5 a 7,0).

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	<b>Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK</b>	<b>CÓDIGO: PB04</b> <b>REVISIÓN: 1</b> <b>EDICIÓN: 1</b> <b>FECHA: 10-11-2017</b> <b>PÁGINA: 3/4</b>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 6. PROCEDIMIENTOS

- 6.1 Prepare el inóculo a partir de un cultivo puro (muestra sembrada en agar Mac Conkey), según las buenas prácticas de laboratorio.
- 6.2 Siga uno de estos pasos: Elija colonias aisladas de una placa primaria si se satisfacen los requisitos del cultivo. O subcultive el organismo a analizar en el medio de agar apropiado e incúbelo adecuadamente.
- 6.3 Transfiera asépticamente 3,0 mL de solución salina estéril (NaCl acuoso al 0,45 – 0,50 %, con un pH de 4,5 a 7,0) en un tubo de ensayo de plástico transparente (poliestireno) de 12 x 75 mm.
- 6.4 Utilice un palillo o torunda estériles para transferir una cantidad suficiente de colonias morfológicamente similares al tubo con solución salina preparado en el paso 3. Prepare una suspensión homogénea de organismo con una densidad equivalente a McFarland N°. 0,50 a 0,63 utilizando un densitómetro. El tiempo de suspensión no debe superar los 30 minutos antes de inocular la tarjeta de identificación bacteriana.
- 6.5 Coloque el tubo con la suspensión y la tarjeta en donde corresponde en el equipo de acuerdo al manual de usuario.
- 6.6 Eliminar correctamente los desechos biológicos peligrosos y todo el material utilizado como corresponda, ya sea en desechos comunes, cortopunzantes o especiales.
- 6.7 El software compara el conjunto de reacciones de tests con el conjunto de reacciones previstas de cada organismo o grupo de organismos que pueda identificarse con el producto.
- 6.8 Se calcula un valor cuantitativo (el porcentaje de probabilidad), que representa el nivel de comparación entre las reacciones observadas y las reacciones habituales de cada organismo.
- 6.9 Se obtiene la identificación y resultados a ser interpretados por quien corresponda (Biomerieux, 2013).

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	<b>Identificación bacteriana en</b> <b>el equipo automatizado</b> <b>VITEK</b>	<b>CÓDIGO: PB04</b> <b>REVISIÓN: 1</b> <b>EDICIÓN:1</b> <b>FECHA: 10-11-2017</b> <b>PÁGINA: 4/4</b>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 7. OBSERVACIONES

Debe realizarse una tinción de Gram con el fin de determinar la reacción de Gram y morfología de un organismo antes de seleccionar qué tarjeta de identificación usar para inocular.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BioMérieux. (2013). VITEK. Obtenido de file:///C:/Users/User/Downloads/514740-1ES1 VITEK\_2\_Systems\_Product\_Information\_b04.pdf

<b>ELABORADO POR:</b> Glenda Maribel Morocho Sofía Soria Jumbo	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b> Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta
----------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------

Marcadores	
Tests complementarios de la tarjeta BCL	
Tabla de requisitos de cultivo	
Referencias	
Información del producto para CBC	
Información del producto GN	
Uso previsto	
Descripción	
Precauciones	
Almacenamiento y manipulación	
Preparación de la muestra	
Materiales	
Procedimiento	

### Contenido de los pocillos de la tarjeta GN

Tabla 31: Contenido de los pocillos de la tarjeta GN

Pocillo	Análisis	Abreviatura	Cantidad/Pocillo
2	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASA	APPA	0,0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0,1875 mg
4	L-Pirrolidoniil- ARILAMIDASA	PyrA	0,018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0,3 mg
7	D-CELOBIOSA	dCEL	0,3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASA	BGAL	0,036 mg
10	PRODUCCIÓN DE H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S	0,0024 mg
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA	BNAG	0,0408 mg
12	Glutamil Arilamidasa pNA	AGLTp	0,0324 mg
13	D-GLUCOSA	dGLU	0,3 mg
14	GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	GGT	0,0228 mg
15	FERMENTACIÓN/GLUCOSA	OFF	0,45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASA	BGLU	0,036 mg
18	D-MALTOSA	dMAL	0,3 mg
19	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg
20	D-MANOSA	dMNE	0,3 mg
21	BETA-XILOSIDASA	BXYL	0,0324 mg
22	BETA-Alanina arilamidasa pNA	BAlap	0,0174 mg
23	L-Prolina-ARILAMIDASA	ProA	0,0234 mg
26	LIPASE	LIP	0,0192 mg
27	PALATINOSA	PLE	0,3 mg
29	Tirosina ARILAMIDASA	TyrA	0,0276 mg
31	UREASE	URE	0,15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg
33	SACAROSA	SAC	0,3 mg
34	D-TAGATOSA	dTAG	0,3 mg
35	D-TREALOSA	dTRE	0,3 mg
36	CITRATO (SODIO)	CIT	0,054 mg
37	MALONATO	MNT	0,15 mg
39	5-CETO-D-GLUCONATO	5KG	0,3 mg

40	Alcalinización de L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
----	-----------------------------	-------	---------

514740-1ES1 4-15 VITEK® 2 Systems

---

Tests complementarios de la tarjeta GN Información del producto GN

**Tabla 31: Contenido de los pocillos de la tarjeta GN (Continúa)**


Pocillo	Análisis	Abreviatura	Cantidad/Pocillo
41	ALFA-GLUCOSIDASA	AGLU	0,036 mg
42	Alcalinización de SUCCINATO	SUCT	0,15 mg
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASA	NAGA	0,0306 mg
44	ALFA-GALACTOSIDASA	AGAL	0,036 mg
45	FOSFATASA	PHOS	0,0504 mg
46	Glicina ARILAMIDASA	GlyA	0,012 mg
47	ORNITINA DESCARBOXILASA	ODC	0,3 mg
48	LISINA DESCARBOXILASA	LDC	0,15 mg
52	BASE DESCARBOXILASA	ODEC	N/C
53	Asimilación de L-HISTIDINA	IHISa	0,087 mg
56	COURMARATO	CMT	0,126 mg
57	BETA-GLUCURONIDASA	BGUR	0,0378 mg
58	RESISTENCIA O/129 (comp.vibrio.)	O129R	0,0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARILAMIDASA	GGAA	0,0576 mg
61	Asimilación de L-MALATO	IMLTa	0,042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
64	Asimilación de L-LACTATO	ILATa	0,186 mg

*Nota: Los pocillos con los números entre 1 y 64 no designados en esta tabla están vacíos.*



**Anexo N° 14**

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 1/ 8</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

**1. INTRODUCCIÓN**

Las betalactamasas de espectro extendido son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, los bacilos Gram negativos tienen gran capacidad de producirlas; pertenecen al grupo A de Ambler y sus representantes principales son las de tipo CTX –M, PER ½, TEM ½, SHV. Son capaces de hidrolizar la mayoría de betalactámicos, monobactams, sin embargo, no afectan a carbapenémicos. Su detección puede hacerse por medios fenotípicos y moleculares, se considerarán el método de sinergia de discos y discos combinados usando controles de calidad internos y externos.

Una BLEE proporciona la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos, además de producir un efecto sinérgico entre las cefalosporinas de amplio espectro o monobactámicos y el ácido clavulánico, cuando previamente se han situado de forma estratégica los discos, otra técnica basada en el mismo principio son la utilización de discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico.

**2. OBJETIVOS:**


Detectar por el método de sinergia de discos y discos combinados la presencia de enzimas BLEE en bacterias Gram negativas aisladas de muestras de orina.

**3. ALCANCE:**

Estos métodos serán aplicados como parte del proyecto de investigación titulado: “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas de muestras de orina procedentes del Hospital Isidro Ayora -Loja” y se realizarán a todas las cepas bacterianas presuntivas



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS  
HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA

 <p style="text-align: center;"><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB07 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 2/ 8</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

de expresar betalactamasas, aquellas que tengan una CMI de  $\geq$  a 1 ug/ml de ceftazidime, aztreonam o ceftriaxona.

#### 4. RESPONSABLES:

**4.1** Docente(s)/Investigador (es): Indicaciones, procesamiento y validación de resultados. Reporte y entrega de resultados a Coordinador de los laboratorios participantes

**4.2** Colaborador en cada hospital: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas BLEE

**4.3** Estudiantes: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas BLEE y procesamiento.


#### 5. MATERIALES:

- |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hisopos estériles</li> <li>✓ Tubos de Ensayo con 3 ml de suero fisiológico estéril</li> <li>✓ Agar Mueller – Hinton</li> <li>✓ Densitómetro</li> <li>✓ Cultivo de bacterias</li> <li>✓ Gasas</li> <li>✓ Gradilla</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pinzas metálicas</li> <li>✓ Lámpara de alcohol</li> <li>✓ Contenedores para materiales cortopunzantes, especiales, comunes e infecciosos.</li> <li>✓ Cabina de seguridad biológica</li> <li>✓ Incubadora de 35°C</li> </ul> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### Sinergia de discos:

- |                                                                                       |                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cefotaxime</li> <li>✓ Ceftazidime</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cefepime</li> <li>✓ Aztreonam</li> <li>✓ Amoxicilina-ácido clavulánico</li> </ul> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS  
HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 3/8</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

**Discos combinados:**

- ✓ Ceftazidime 30 ug
- ✓ Ceftazidime + Ác. Clavulánico 30/10 ug
- ✓ Cefotaxime
- ✓ Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug

**6. PROCEDIMIENTO:**

**-Sinergia de Discos:**

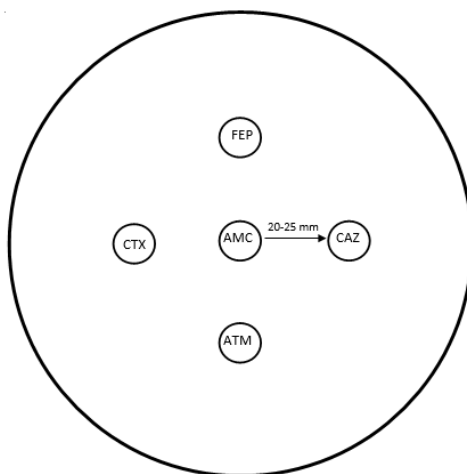
1. Preparar los materiales que se van a utilizar.
2. Rotular los tubos y la caja Petri con Agar Mueller – Hinton a utilizar.
3. Tomar con un hisopo estéril una colonia del cultivo y suspenderla en solución salina.
4. Medir en el densitómetro la turbidez del inóculo, que debe ser equivalente a 0,5 en la escala McFarland, tener precaución de limpiar con gasa estéril el fondo del tubo.
5. En caso de ser menor a 0,5 McFarland se procederá a tomar otra colonia y disolver hasta llegar a la escala indicada.
6. En caso de ser mayor a 0,5 McFarland se procederá a agregar solución salina estéril al inóculo.
7. Impregnar el hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
8. A continuación, se colocan los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría y colocar los discos de cefotaxime, ceftazidime, cefepime y aztreonam a una

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 4/8</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina-ácido clavulánico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

9. En este sentido, solo para *Proteus mirabilis* se recomienda una distancia de 40-45 mm.




10. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C y se realiza la lectura dentro de las 16-20 horas siguientes.
11. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.

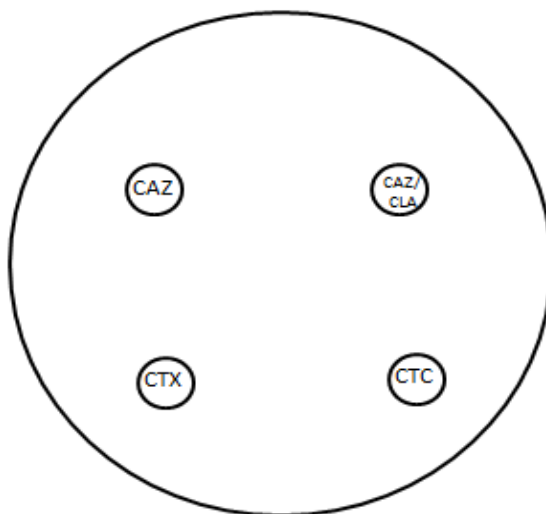
**-Discos combinados:**


1. Preparar los materiales que se van a utilizar
2. Rotular el tubo de ensayo y la caja Petri con Agar Mueller – Hinton a utilizar
3. Dispensar 3ml de solución salina en un tubo de ensayo
4. Tomar con un hisopo estéril una colonia del cultivo y suspenderla en solución salina.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS  
HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA

<p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>  <p>1959</p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB07 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 5/8</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

5. Medir en el densitómetro la turbidez del inóculo, que debe ser equivalente a 0,5 en la escala McFarland, tener precaución de limpiar con gasa estéril el fondo del tubo.
6. En caso de ser menor a 0,5 McFarland se procederá a tomar otra colonia y disolver hasta llegar a la escala indicada.
7. En caso de ser mayor a 0,5 McFarland se procederá a agregar solución salina al inóculo.
8. Impregnar el hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
9. A continuación, se colocan los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría y colocar los discos de Cefotaxime 30 ug, Cefotaxime + Ác.Clavulánico 30/10 ug, Cefotaxime, Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug.



 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 6/8</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

10. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C +/- 2°C y se realiza la lectura dentro de las 10 a 18 horas.

11. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.

## 7. OBSERVACIONES:

### Reporte:

Para todas las cepas productoras de ESBL confirmadas:

Reportar el nombre de la bacteria más productora de BLEE; ya que se usan los puntos de corte actuales de cefalosporina y aztreonam; por lo tanto, la interpretación de la prueba debe informarse como resistente para todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.

### Discos combinados:


Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completas (incluyendo el diámetro del disco).

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

**a) Positivo.** Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime, cefotaxime o cefepime en presencia de ácido clavulánico  $\geq 5$  mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico

**b) Negativo.** No incremento o diferencia  $< 5$  mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con ácido clavulánico respecto a los de las cefalosporinas correspondientes sin ácido clavulánico. Los resultados positivos se interpretan según la tabla:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS  
HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 7/8</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Mecanismo de resistencia	de CTX	CTX+CLA	CTX+CLO	
BLEE	CTX+CLA o CTX+CLA+CLO	$\geq 5$ mm -	- < 4 mm	- $\geq 5$ mm

**Nota:** Comparar siempre con el control positivo y negativo


**Sinergia de Discos:**

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

**a) Positivo.** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor. Usualmente el halo se deforma adquiriendo formas ovaladas o con cola de pescado.

**b) Negativo.** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam ni presencia de "zona fantasma" (inhibición de crecimiento entre las cefalosporinas y el inhibidor de betalactamasas). Se interpreta de la siguiente manera:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS  
HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 8/8</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Mecanismo de resistencia	Positivo	Negativo
BLEE	Deformación del halo de inhibición (sinergia) entre cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam, con el disco de amoxicilina-ácido.	Halos de inhibición bien definidos, no existe ampliación del halo de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam hacia la zona próxima al disco de amoxicilina-ácido clavulánico.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:


CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

SEIMC. (2015). Procedimientos en Microbiología Clínica.

ELABORADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edgar Jara</li> <li>• Diana Ramón</li> <li>• Sthefany Torres</li> </ul>	<p>Lcda. Carmen Ullauri</p>

## Anexo N° 15

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB07 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 1/6</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 1. INTRODUCCIÓN O FUNDAMENTO:

Betalactamasas AmpC: Son enzimas que cuando algunas bacterias las portan o producen generan resistencia a ciertos antibióticos betalactámicos hasta las cefalosporinas de amplio espectro, pueden ser constitutivas o plasmídicas en cuyo caso tienen más potencial de diseminación, pertenecen al grupo C de Ambler y entre las más importantes tenemos a CIT, DHA, FOX, CMY, MIR.

Las AmpC cromosómicas inducibles están presentes en enterobacterias como: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp*, *Providencia spp*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, bacterias en las que cuando está presente el mecanismo de resistencia de pérdida de permeabilidad puede confundir el patrón con una BLEE. Se realizará la detección con el uso de sinergia y aproximación de discos.

### 2. OBJETIVO:

Detectar por los métodos de sinergia y aproximación de discos, la presencia de enzimas de tipo AmpC plasmídicas en bacterias Gram negativas aisladas de muestras de orina.

### 3. ALCANCE:

Estos métodos serán aplicados como parte del proyecto de investigación titulado: “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas de muestras de orina procedentes del Hospital Isidro Ayora y SOLCA de Loja” y se realizarán a todas las cepas bacterianas presuntivas de expresar enzimas AmpC que tengan la disminución de sensibilidad o resistencia a cefotaxima con una CIM  $\geq 1$  ug / ml y la Resistencia a cefoxitina, son resistentes también a los inhibidores de betalactamasas.



	<p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB07  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 2/6</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### 4. RESPONSABLES:


**4.1** Docente(s)/Investigador (es): Indicaciones, procesamiento y validación de resultados, reporte y entrega de resultados a Coordinador de los laboratorios participantes

**4.2** Colaborador en cada hospital: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas AmpCp y procesamiento.

**4.3** Estudiantes: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas AmpC y procesamiento.

#### 5. MATERIALES

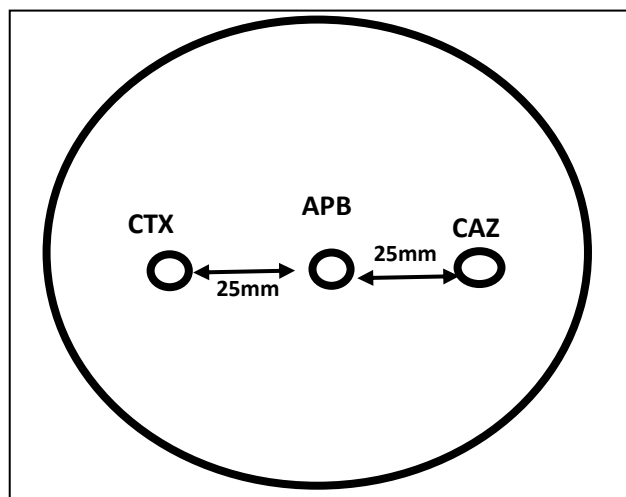
- Cefotaxima (30 ug)
- Ceftazidima (30 ug)
- Cefoxitina (... ug)
- Ácido fenil borónico (400 µg)
- Hisopos estériles
- Tubos con 3ml de suero fisiológico estéril
- Densitómetro
- Gradilla
- Placas de agar Mueller Hinton
- Pinzas metálicas
- Lámpara de alcohol
- Contenedores para desechar materiales cortopunzantes, especiales, comunes e infecciosos.
- Cabina de seguridad biológica
- Incubadora de 35°C
- Agitador tipo vórtex


	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	<b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</b>	<b>CÓDIGO:</b> PB07 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b> 1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 3/6
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1 Prueba de sinergia de doble discos

- 6.1.1** Rotular con el número de muestra un tubo con 3 ml de suero fisiológico o agua destilada estéril por cada cepa en cultivo puro al que se le vaya a realizar la determinación.
- 6.1.2** Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de suero fisiológico con una colonia del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 MacFarland, ajustar si es necesario.
- 6.1.3** Impregnar un hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
- 6.1.4** Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías situar un disco con cefotaxima y un disco con ceftazidima a una distancia de 20 - 25 mm (centro a centro) de un disco con ácido borónico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.
- 6.1.5** Incubar de 35-37°C durante 16-20 horas (Ardanuy, Cercenado, Morosini, & Torres, 2011).



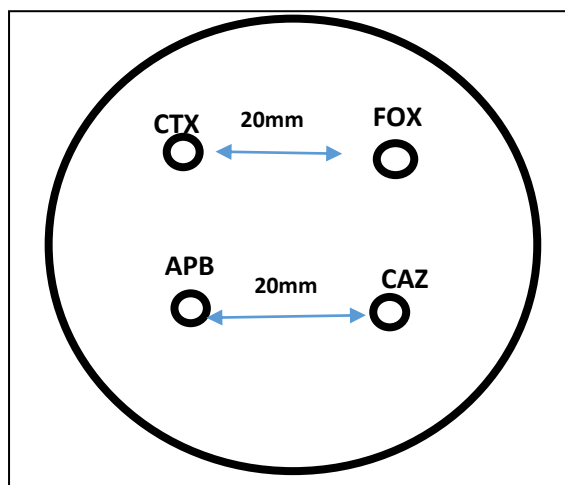
	<p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB07  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 4/6</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 6.2 Prueba de aproximación de discos (antagonismo)

**6.2.1** Realizar el mismo procedimiento anterior hasta el literal (6.1.3).

**6.2.2** Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías situar en la parte superior un disco con cefotaxima y un disco con cefoxitina a una distancia de 20 mm (borde a borde), y en la parte inferior un disco con ácido fenil borónico y un disco con ceftazidima a una distancia de 20 mm (borde a borde). La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

**6.2.3** Incubar de 35-37°C durante 16-20 horas.



### Consideraciones:

- Hay que tener en cuenta los diámetros de inhibición con el fin de ajustar la distancia de separación entre los discos.
- En el caso enterobacteriaceae se usa cefotaxime, y en el caso de bacilos no fermentadores se utilizará cefatazidima en lugar de cefotaxime.

	<p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB07  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 5/6</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**NOTA:** Si se trata de una AmpC cromosómica inducible que están presentes en enterobacterias como: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp*, *Providencia spp*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* realizar el mismo procedimiento, pero utilizando una cefalosporina de cuarta generación como Cefepime.

## 7. OBSERVACIONES:

**La interpretación de los resultados de la prueba de sinergia de doble discos se realizará de la siguiente manera:**

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición.

- ✓ Positivo: Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en la zona próxima al disco con cloxacilina o ácido borónico (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas y el inhibidor.
- ✓ Negativo: No ampliación de los halos de inhibición de las cefalosporinas ni presencia de “zona fantasma”.

El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpCp (Plasmídico).

**NOTA:** Colocar los desechos en los contenedores correspondientes: Desechos cortopunzantes, comunes, especiales e infecciosos.

### 7.1 La interpretación de los resultados de aproximación de discos (antagonismo) se realizará de la siguiente manera:

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición.

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	<b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</b>	<b>CÓDIGO:</b> PB07 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b> 1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 6/6
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- ✓ Positivo: Se observa un achatamiento del halo (D invertida) de cefotaxima o ceftazidima en la zona próxima al disco con cefoxitina y en el caso de sinergia se observa una deformación del halo de la cefalosporina hacia el ácido fenil borónico.
- ✓ Negativo: No se observa achatamiento ni deformación del halo de inhibición de las cefalosporinas.

El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpC.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:


Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M., & Torres, C. (2011). *Deteccion Fenotipica de Mecanismos de Resistencia en Gram Negativos* . Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia39.pdf>

Bou, G., Chávez, F., Oliver, A., & Jesús, O. (2015). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Obtenido de <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>

<b>ELABORADO POR:</b>	<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atancuri Evelyn</li> <li>- Cisneros María</li> <li>- Ontaneda Alex</li> </ul>	Lic. Carmen Ullauri

## Anexo N° 16

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 1/11</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 1. Introducción:

Las carbapenemasas son enzimas que confieren resistencia a todos los antibióticos betalactámicos, las enterobacterias que las producen constituyen una emergencia ya que el tratamiento se restringe a muy pocas y tóxicas opciones terapéuticas.


Pueden ser serin betalactamasas o metalobetalactamasas según tengan en su sitio activo serina o zinc; pertenecen al grupo A, B y D de Ambler y sus principales representantes son KPC – IMI –SME, VIM, IMP, NDM y OXA respectivamente. Se considerarán para su detección método de sinergia de discos, discos combinados, inactivación de carbapenémicos y método colorimétrico.

### 2. Objetivos:

- Identificar por el método de sinergia de discos y discos combinados la presencia de enzimas carbapenemasas en bacterias Gram negativas aisladas de muestras de orina.
- Detectar por el método de inactivación de carbapenémicos la presencia de enzimas carbapenemasas en bacterias Gram negativas aisladas de muestras de orina.

### 3. Alcance:

Estos métodos serán aplicados como parte del proyecto de investigación titulado: “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas de muestras de orina procedentes del Hospital Isidro Ayora-Loja” y se realizarán a todas las cepas bacterianas presuntivas de expresar carbapenemasas, aquellas que tengan una CMI de  $\geq 1$  ug/ml para meropenem,  $\geq 2$  ug/ml de imipenem para Enterobacterias; en el caso de Acinetobacter una CIM de  $\geq 4$  ug / ml para imipenem y en el caso de Pseudomona aeruginosa se usarán puntos de corte de ceftazidime  $\geq 16$  ug/ml;  $\geq 1$  ug/ml para meropenem,  $\geq 2$  ug/ml de imipenem.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 2/11</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### 4. Responsables:

Docente(s)/Investigador (es): Indicaciones, procesamiento y validación de resultados. Reporte y entrega de resultados a Coordinador de los laboratorios participantes

Colaborador en cada hospital: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas carbapenemasas

Estudiantes: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas carbapenemasas y procesamiento.

#### 5. Materiales:


##### 4.1 Materiales para el método de sinergia de doble disco:

- Tubo de ensayo con 3ml de solución salina esteril
- Caja de Petri con medio Muller-Hinton
- Hisopo estéril
- Densitómetro
- Lámpara de alcohol
- Pinza metálica
- Disco con Meropenem (10 µg)
- Disco con EDTA (1000 µg)
- Disco con Ácido Fenil borónico
- Incubadora
- Guardián

##### 4.2 Materiales para el método de discos combinados con inhibidor:

- Tubo de ensayo
- Caja de Petri con medio Mueller-Hinton
- Solución salina estéril.
- Hisopo estéril

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 3/11</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- Densitómetro
- Lámpara de alcohol
- Pinza metálica
- Disco Meropenem (10 µg)
- Disco de Meropenem /ácido borónico (10/600 µg)
- Disco con Meropenem/EDTA (10/1000 µg)
- Disco con Meropenem/cloxacilina (10/500-750 µg)
- Incubadora
- Guardián

#### 4.3 Materiales para el método inactivación de carbapenemasas:

- TSB (alícuotas de 2 ml)
- Discos Meropenem (10 µg)
- Asas de inoculación (1-uL o 10-µL).
- Solución salina estéril
- Placas agar Mueller Hinton.(MHA)
- Cepa *E. coli* (ATCC 25922).
- Tubos Eppendorf


## 6. Procedimiento:

### 6.1. Procedimiento para el método de sinergia de doble disco:

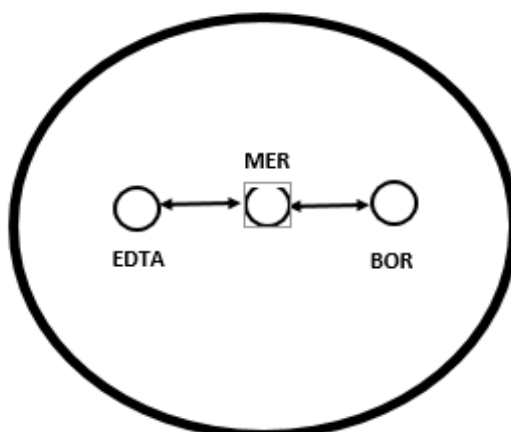
- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con Mueller-Hinton.
- Tomar con un hisopo estéril de 2 a 3 colonias de un cultivo puro de la muestra problema.
- Transferir las colonias al tubo de ensayo que contiene la solución salina estéril y suspender las colonias en esta solución.
- Ajustar la turbidez de la suspensión en el densitómetro al 0,5 McFarland.




CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 4/11</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------


- Sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, elimine el exceso de líquido presionando firmemente contra las paredes internas del tubo.
- Inocular antes de 15 minutos después de haber ajustado la suspensión.
- Inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril.
- Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo.
- Finalmente, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.
- Dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos.
- Esterilizar una pinza a la llama de la lámpara de alcohol.
- Tomar con la pinza estéril el disco de Meropenem y colocarlo en la superficie del agar ya inoculado.
- Nuevamente se esteriliza la pinza y se toma un disco con inhibidor EDTA y se lo coloca a una distancia de 1 o 2 cm (margen a margen) del disco de Meropenem.
- Repetir la esterilización de la pinza y realizar el mismo proceso para colocar el disco con inhibidor que contiene ácido fenilborónico.
- Incubar a temperatura de  $35 \pm 2$  °C, durante 16-20 horas.
- Realizar el protocolo con las cepas control positivo y negativo.

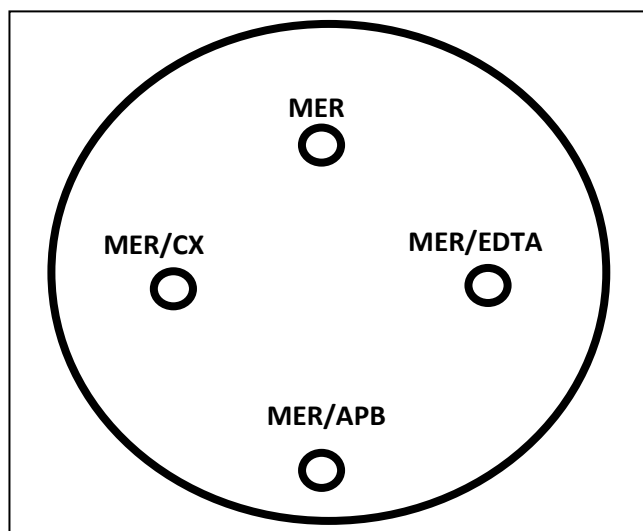


 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 5/11</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 6.2. Procedimiento para el método de discos combinados con inhibidor


- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con Mueller-Hinton.
- Tomar con un hisopo estéril de 2 a 3 colonias de un cultivo puro de la muestra problema.
- Transferir las colonias al tubo de ensayo que contiene la solución salina estéril y suspender las colonias en esta solución
- Ajustar la turbidez de la suspensión en el densitómetro al 0,5 McFarland.
- Sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, elimine el exceso de líquido presionando firmemente contra las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido.
- Inocular antes de 15 minutos después de haber ajustado la suspensión.
- Tomar la caja de Petri por la base e inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril.
- Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo.
- Finalmente, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.
- Dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos.
- Esterilizar una pinza a la llama de la lámpara de alcohol.
- Tomar con la pinza estéril el disco de Meropenem y colocarlo en la superficie del agar ya inoculado.
- Repetir la esterilización de la pinza y se toma un disco de meropenem/cloxacilina, meropenem/ácido fenilborónico y meropenem/EDTA
- Incubar a temperatura de  $35 \pm 2$  °C, durante 16-20 horas.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 6/11</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



### 6.3. Procedimiento para el método inactivación de carbapenemasas:

- Rotular los tubos Eppendorf para cada aislamiento a ensayar, y emulsionar bacterias (1  $\mu$ L) de una placa de agar sangre con cultivo puro de la bacteria problema (se necesita cultivo fresco) en 2 ml de TSB y vórtexear por 10-15 segundos.
- Agregar un disco meropenem de 10  $\mu$ g a cada tubo Eppendorf usando pinzas estériles, y asegurarse que todo el disco esté sumergido en la suspensión.
- Incubar a  $35 \pm 2$  ° C en atmosfera ambiental durante 4 horas  $\pm$  15 minutos.
- Después de completar la incubación de la suspensión, preparar la suspensión 0.5 de McFarland (usando el método directo) de *E. coli* ATCC 25922 en solución salina estéril.
- Inocular una placa MHA con la suspensión preparada, antes de los 15 minutos y dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos de meropenem.
- Sacar el tubo Eppendorf de la incubadora, remover el disco de meropenem usando un asa estéril presionando la parte plana del asa contra una de las paredes del disco usando la tensión superficial para sacar el disco fuera del líquido, no olvide

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</p>	<p>CÓDIGO: PB06 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 7/11</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

- presionar el disco contra la pared del tubo para eliminar el exceso de líquido, luego colocarlo en la placa MHA previamente inoculada con la cepa *E. coli* ATCC 25922 susceptible a meropenem. Capacidad de las cajas: 4 discos en una placa MHA de 100 mm.
- Invertir e incubar las placas MHA a  $35^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$  en el aire ambiente durante 18-24 horas, después de la incubación, medir las zonas de inhibición como para el método rutinario de difusión de disco.
- Realizar el protocolo con las cepas control positivo y negativo.

## 7. Observaciones:


### 7.1. Interpretación de resultados para el método de sinergia de doble disco:

Se reportará el resultado de la siguiente manera:

- **Positivo:** ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre el carbapenémico y el inhibidor.
- **Negativo:** No ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de “zona fantasma”.

Resultado	Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia
Sinergia carbapenémico- ácido borónico	<b>Carbapenemasa de Clase A</b> <b>Serincarbapenemas:</b> KPC, SME, NMC-A, IMI, PER, GES, SFO, SFC, IB y/o Hiperproducción de AmpC
Sinergia carbapenémico-ácido dípicolínico o Sinergia carbapenémico-EDTA	<b>Carbapenemasa de Clase B</b> <b>Metallo betalactamasas:</b> VIM, GIM, SIM, NDM, IMP y SPM.

Fuente: SEIMC 2011

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 8/11</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 7.1.1. Reporte de resultados:

- **SME/NMC:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (1ra y 2da generación) y carbapenems independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): amoxicilina/clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, y monobactames (demostrar ausencia de BLEE asociada) y agentes no betalactámicos.
- **KPC:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones), monobactames y carbapenems independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): amoxicilina/clavulánico, piperacilina-tazobactam, y aagentes no betalactámicos.
- **MBL:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones), monobactames y carbapenems independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): monobactaames, piperacilina-tazobactam, y agentes no betalactámicos.

**Nota.** Para todos las carbapenemasas, se recomienda aislamiento del paciente.

## 7.2. Interpretación de resultados para el método de discos combinados con inhibidor:


**7.2.1. Obtención y expresión de resultados:** Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) con un pie de rey.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- **Positivo:** Incremento  $\geq 5$  mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.
- **Negativo:** No hay diferencia o incremento  $< 5$  mm en el halo de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.

Los resultados positivos se interpretan según la tabla siguiente:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 9/11</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Resultado</b>	<b>Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia</b>
CAR+BOR $\geq$ 5mm CAR y CAR+CLO < 5mm CAR <sup>1</sup>	Carbapenemasa de Clase A: KPC, SME, NMC-A, IMI, PER, GES, SFO, SFC, IB
CAR+DPA $\geq$ 5mm CAR CAR+EDTA $\geq$ 5mm CAR	Carbapenemasa de Clase B: VIM, GIM, SIM, NDM, IMP y SPM.
CAR+BOR y CAR+CLO $\geq$ 5mm CAR	Hiperproducción de AmpC o Hiperproducción de AmpC + Carbapenemasa de Clase A

*Fuente: CLSI 2017*

### 7.2.2. Limitaciones del procedimiento:


Los métodos basados en la utilización de ácido borónico pueden presentar baja especificidad y pueden producirse resultados falsos positivos debido a la hiperproducción de enzimas de tipo AmpC ya que también es un inhibidor de estas enzimas. Adicionalmente, los métodos fenotípicos resultan inadecuados para la detección de las carbapenemasas tipo OXA.

### 7.3. Reporte de resultados para el método inactivación de carbapenemasas.

#### 7.3.1. Interpretación de resultados:

- **Carbapenemasa positiva:** Halo de 6-15 mm o presencia de colonias intrahalo en una zona de 16-18 mm. Si el aislado de prueba produce carbapenemasa, el meropenem del disco se hidrolizará y no habrá inhibición o inhibición limitada del crecimiento de la *E. coli* ATCC 25922 susceptible a meropenem.


CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b>  <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b>  <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06  <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1  <b>FECHA:</b> 07/11/2017  <b>PÁGINA:</b> 10/11</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- **Carbapenemasa negativa:** Halos igual o mayores a 19 mm. Si el aislado de prueba no produce carbapenemasa, el meropenem del disco no se hidrolizará e inhibirá el crecimiento de *E. coli* susceptible a meropenem ATCC 25922.
- **Indeterminado:** Zona 16-18 mm. La presencia o ausencia de una carbapenemasa no se puede confirmar por este método.

### 7.3.2. Reporte de resultados:

- **Positivo:** "Carbapenemasa detectada".
- **Negativo:** "Carbapenemasa no detectada".
- **Indeterminado:** "Pruebas no concluyentes por la presencia de carbapenemasa. Llamar al laboratorio para hablar".


 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b></p>	<p><b>TÉCNICA PARA IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</b></p>	<p><b>CÓDIGO:</b> PB06 <b>REVISIÓN:</b> 1 <b>EDICIÓN:</b>1 <b>FECHA:</b> 07/11/2017 <b>PÁGINA:</b> 11/11</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 8. Referencias bibliográficas:

- CLSI. (2009). Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. USA.
- CLSI, C. a. (2017). Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 27<sup>a</sup> ed. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.
- SEIMC. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*. Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
- SEIMC. (2015). *Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes*. Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>



Anexo N° 17

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>FACULTAD DE LA SALUD HUMANA</b> <b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	<b>FORMATO DE CONFIRMACIÓN</b> <b>DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA</b> <b>DE BETALACTAMASAS</b>	<b>CÓDIGO: RG002</b> <b>REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1</b> <b>FECHA:</b> <b>PÁGINA: 1/1</b>
-----------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------

Fecha: \_\_/\_\_/\_\_

<b>FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS</b>										
<b>BLEE</b>										
Código de muestra	Organismo identificado	Sinergia de discos		Discos combinados						
		CRO FEP AMC CAZ ATM	Control de calidad	CAZ	CAZ/CLA	Interpretación de Resultado	CTX	CTX/CLA	Interpretación de resultado	Control de calidad

**SIGNIFICADO DE SIGLAS:**

- CRO:** Ceftriaxone
- FEP:** Cefepime
- AMC:** Amoxicilina
- CAZ:** Ceftazidime
- ATM:** Aztreonam
- CTX:** Cefotaxime
- CAZ/CLA:** ceftazidime/ ac. Clavulánico
- CTX/CLA:** cefotaxime/ ac. Clavulánico

**Obtención y expresión de resultados**

**Prueba de Sinergia de Discos:**

- **Positivo:** Ampliación del Halo de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam en la “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor.
- **Negativo:** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam ni presencia de “zona fantasma”.

**Prueba de Discos combinados:**

- **Positivo:** Incremento del halo de inhibición (>5mm) de ceftazidime o cefotaxime con inhibidor en presencia de ceftazidime o cefotaxime sin inhibidor.
- **Negativo:** No incremento o diferencia (<5 mm) en los halos de inhibición de ceftazidime o cefotaxime con inhibidor respecto a los de ceftazidime o cefotaxime sin inhibidor.

Anexo N° 18

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS	CÓDIGO: RG003 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 1/1
-----------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------

Fecha: \_\_/\_\_/\_\_

FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS										
AMP C										
Código de Muestra	Germen aislado	Sinergia de discos			Disco combinados					
		FOX CLO CAZ	INTERPRETACIÓN RESULTADO	CONTROL DE CALIDAD	FEP	FEP/ CLO	CTX	CTX/ CLO	INTERPRETACIÓN RESULTADO	CONTROL DE CALIDAD

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Significado de siglas:

- FOX = Cefoxitin
- CAZ = Ceftazidime
- CLO = Cloxacilina
- FEP= Cefepime
- CTX= Cefotaxime
- FEP/CLO = Cefepime/Cloxacilina
- CTX/CLO = Cefotaxime/Cloxacilina

AMPC:

SINERGIA DE DISCOS

**Positivo.** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxime o ceftazidime en la zona próxima al disco con cloxacilina o presencia de una "zona fantasma". **Cepa portadora de AmpCp.**

**Negativo.** No ampliación de los halos de inhibición de las cefalosporinas ni presencia de "zona fantasma".

DISCOS COMBINADOS:

**Positivo.** Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime o cefotaxime en presencia de cloxacilina o ácido borónico  $\geq 5$  mm al de la cefalosporina correspondiente sin inhibidor.

**Negativo.** No diferencia o diferencia  $< 5$  mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con cloxacilina o ácido borónico con respecto al de las cefalosporinas correspondientes sin inhibidor. El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpCp.

CONTROL DEL CALIDAD:

**Positivo:** presencia de halo en forma de D

**Negativo:** no modificación de halos de inhibición

Anexo N° 19

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR D BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS	CÓDIGO: RG004 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 1/1												
<b>FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS</b>															
<b>CARBAPENEMASAS</b>															
Fecha: __/__/__															
Código de Muestra	Microorga-nismo identificado	Sinergia de discos		Discos combinados								Método directo		Inactivación	
		MM/APB/EDL	Control de calidad	APB	MM/APB	EDL	MM/EDL	CLO	MM/CLO	Interpretación de resultado	Control de calidad	Resultado	Control de calidad	Resultado	Control de calidad

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

**Sinergia de discos:**  
**Positivo:** Ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" entre el carbapenémico y el inhibidor. Sinergia MM/APB identifica Carbapenemasa de Clase A y/o hiperproducción de AmpC. Sinergia MM/EDTA identifica carbapenemasa de Clase B  
**Negativo:** No ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de "zona fantasma".

**Discos combinados**  
**Positivo:** Incremento de halo de inhibición ≥5 del carbapenémico con inhibidor con respecto el Carbapenémico  
**Negativo:** No hay incremento de halo de inhibición ≥5 del carbapenémico con inhibidor con respecto el carbapenémico

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.**

**Inactivación de carbapenemasas**  
 - **Positivo:** Halo de 6-15 mm o presencia de colonias intra halo en una zona de 16-18 mm  
 - **Negativo:** Halo mayor o igual a 19 mm  
 - **Indeterminado:** Halos de entre 16-18 mm, carbapenemasa no se puede detectar por este método.

**SIGNIFICADO DE SIGLAS:**

MM = Meropenem  
 OXA = Oxacilina  
 APB = Acido fenilborónico  
 EDL = EDTA  
 CLO = Cloxacilina  
 MM/CLO = Meropenem / Cloxacilina  
 MM/APB = Meropenem / Acido fenilborónico  
 MM/EDTA= Meropenem / EDTA

**REPORTE:**

1. Sinergia de discos, e inactivación se reportará como POS (Positivo)/ NEG (Negativo).
2. Discos combinados se reportará la medida del Halo de inhibición en mm.

## Anexo N° 20

## ANEXO FOTOS

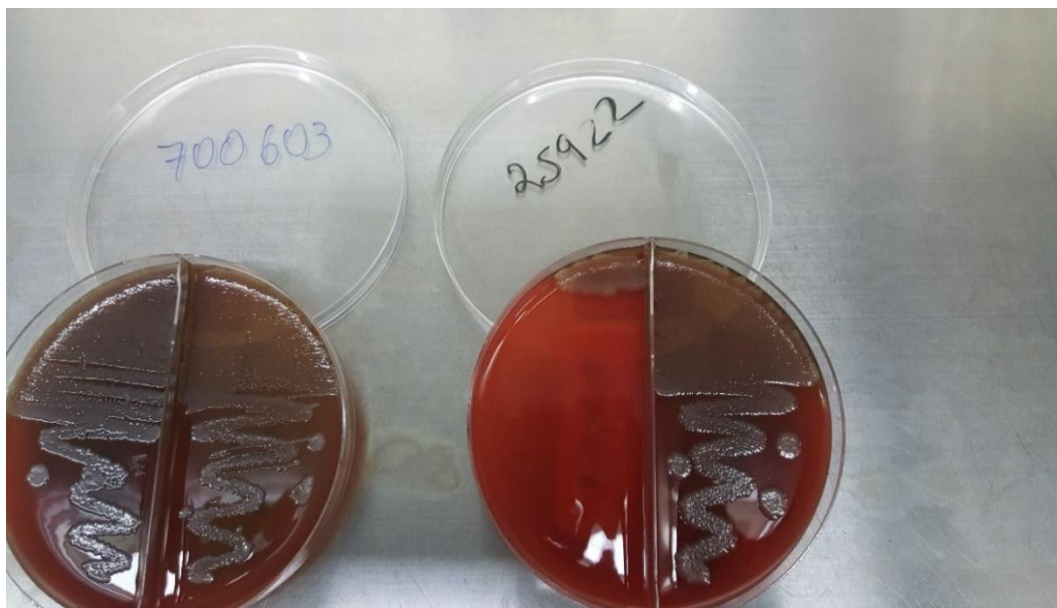


Imagen 1. Recuperación de las cepas control. Izquierda cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 control positivo. Derecha *Escherichia coli* ATCC 25922 control negativo.

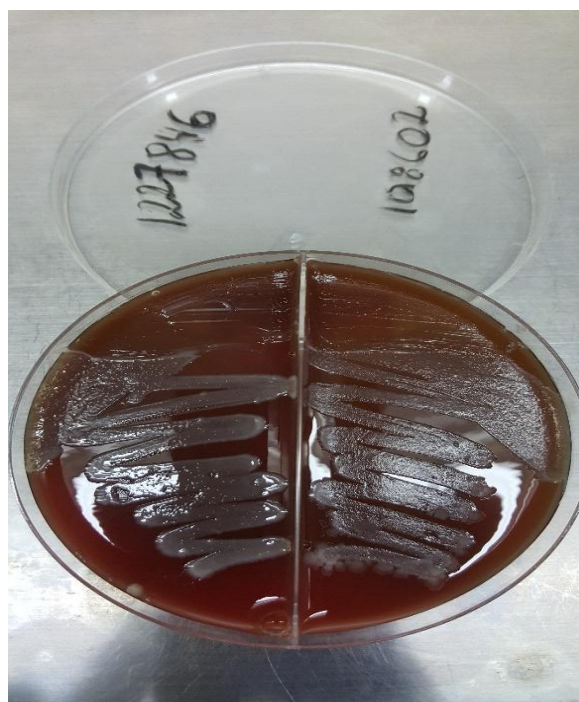
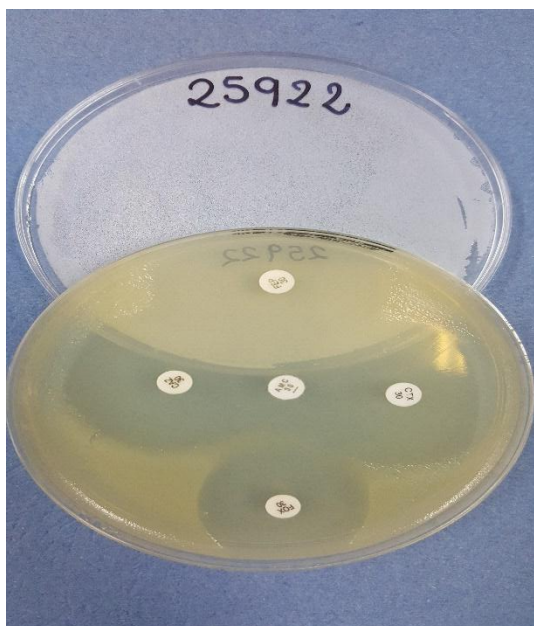
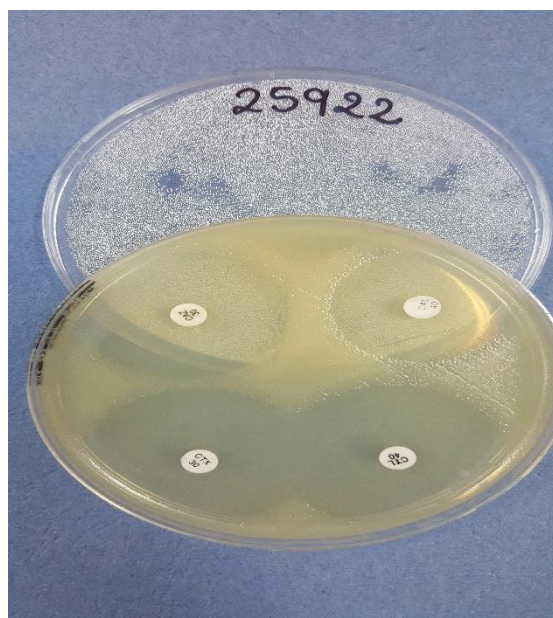


Imagen 2. Recuperación bacteriana en el medio de Agar sangre.

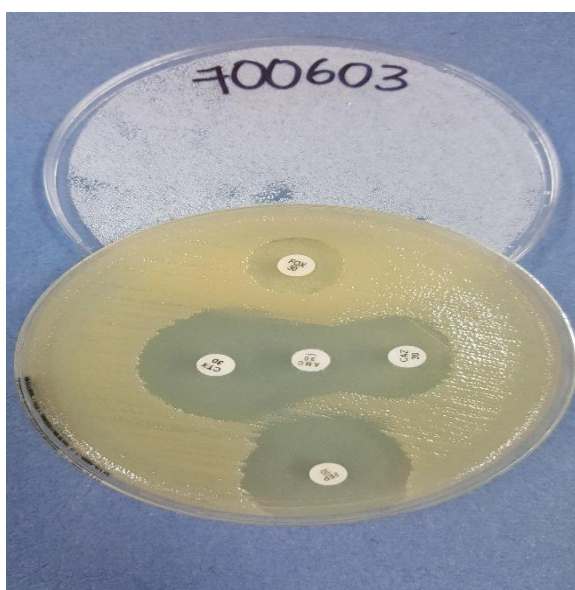
## Cepas control



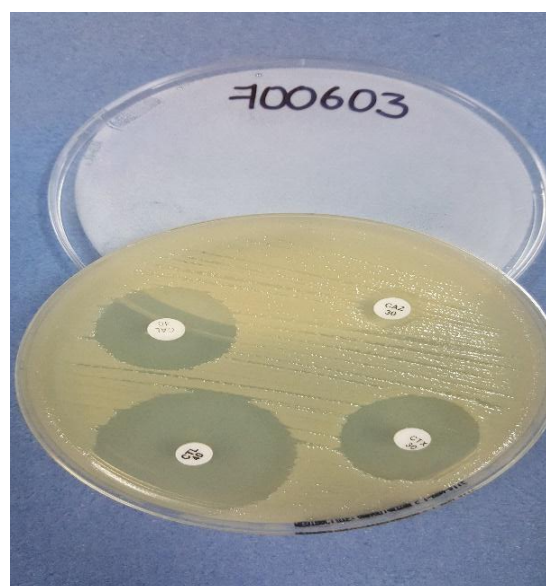
*Imagen 3.* Control negativo ATCC 25922 identificación fenotípica BLEE. No hay sinergia entre las cefalosporinas y el inhibidor de betalactamasa.



*Imagen 4.* Control negativo ATCC 25922 identificación fenotípica BLEE. No existe incremento  $>5$  mm entre la cefalosporina con ácido clavulánico con respecto a la cefalosporina sin ácido clavulánico



*Imagen 5.* Control positivo BLEE ATCC 700603. Sinergismo y deformación del halo de la cefalosporina en la zona próxima al disco de ácido clavulánico.



*Imagen 6.* Control positivo BLEE ATCC 700603. Hay incremento del halo entre cefotaxime y ceftazidime con ácido clavulánico  $>5$ mm frente a la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico.





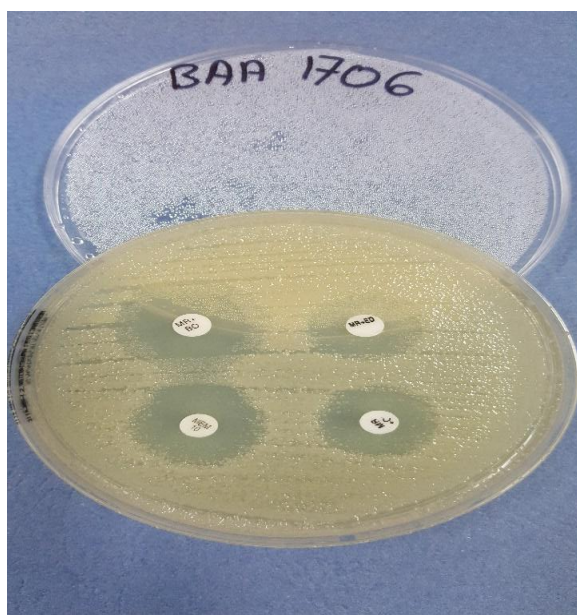
*Imagen 7.* Cepa control positivo ATCC BAA 1705 para test confirmatorio de carbapenemasas. Izquierda: Sinergismo entre el carbapenémico en la zona cercana al disco del inhibidor (APB).



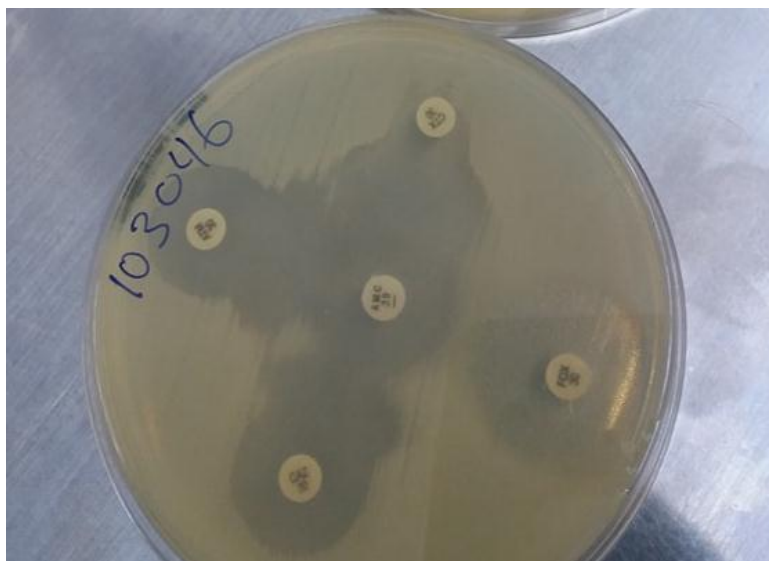
*Imagen 8.* Cepa control positivo ATCC BAA 1705 para test confirmatorio de carbapenemasas. Aumento de diámetro del halo de inhibición >5 mm entre el carbapenémico con inhibidor, frente al carbapenémico sin inhibidor



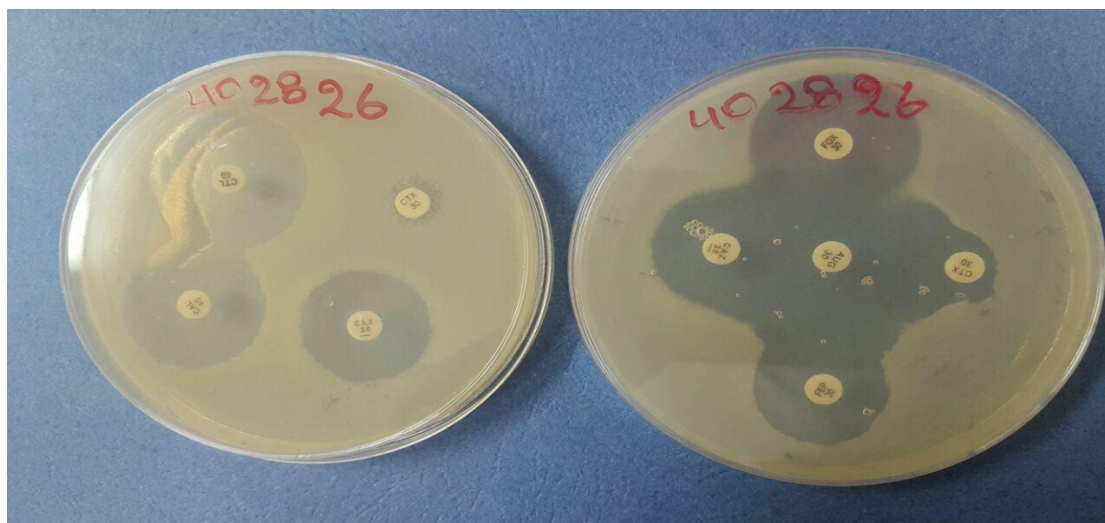
*Imagen 9.* Cepa control negativo ATCC BAA 1706 para test confirmatorio de carbapenemasas. No se observa ampliación del halo entre el carbapenémico y el inhibidor.



*Imagen 10.* Cepa control negativo ATCC BAA 1706 para test confirmatorio de carbapenemasas. No existe aumento > 5mm entre el carbapenémico con inhibidor frente al carbapenémico solo.



*Imagen 11. Escherichia coli*, BLEE positiva identificada mediante el método de sinergia de discos en agar Mueller Hinton, se observa ampliación del halo de la ceftriaxone, ceftazidime y aztreonam en la zona próxima al disco de amoxicilina- ácido clavulánico.



*Imagen 12. Escherichia coli*, productora de BLEE. Izquierda: Discos combinados con inhibidor positivo, se observa un aumento en el halo de inhibición del disco de cefotaxime/ácido clavulánico  $>5$  mm en relación a la cefotaxime sin inhibidor. Derecha: Sinergia de discos, se observa ampliación del halo de inhibición de cefotaxime en la zona próxima al disco de amoxicilina-ácido clavulánico.



## Procesamiento de muestras



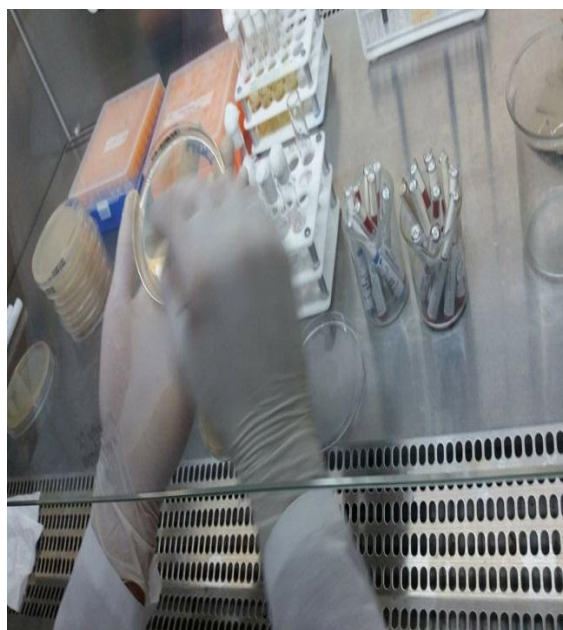
*Imagen 13.* Preparación del inóculo bacteriano.



*Imagen 14.* Siembra del inóculo en placa de agar Mueller Hinton.

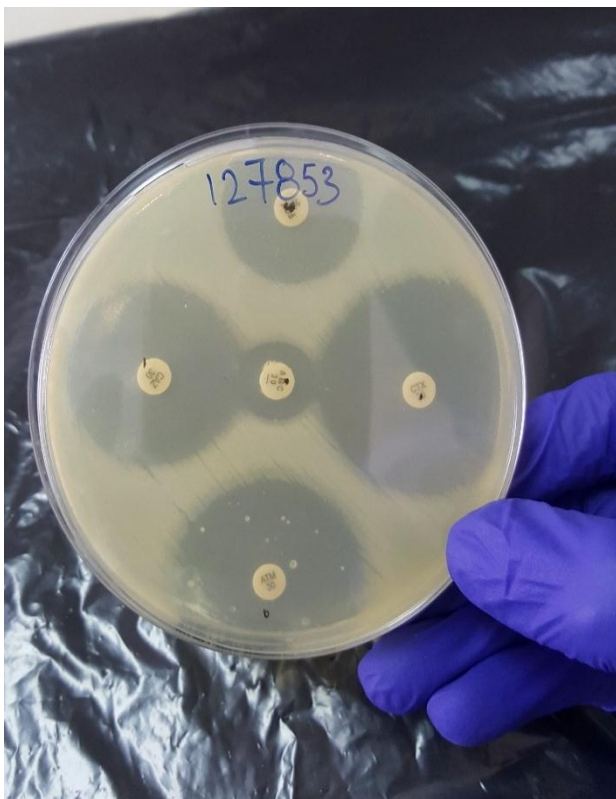


*Imagen 15.* Selección de antibióticos para pruebas fenotípicas de betalactamasas.

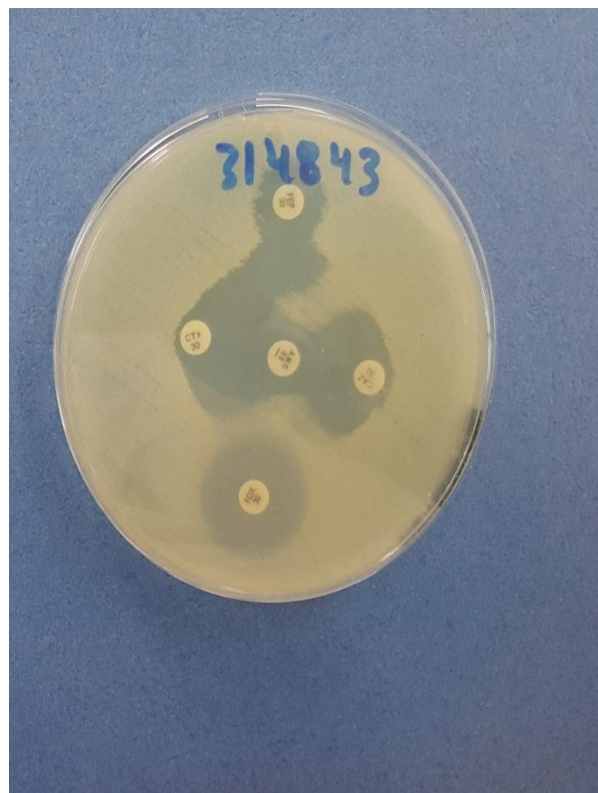


*Imagen 16.* Distribución de discos de antibióticos para pruebas fenotípicas de betalactamasas.





*Imagen 17.* Cepa de *E. coli* no productora de betalactamasas.



*Imagen 18.* Cepa de *E. coli* productora de betalactamasas, detectada mediante test de sinergia.



*Imagen 19.* Cepa de *E. coli* productora de betalactamasa de espectro extendido, identificada mediante test de sinergia.

**Anexo N° 21**

Lic. Cristian Efraín Flores Pasaca.

**DOCENTE DE LA UNIDAD EDUCATIVA “MANUEL DE JESUS MACAS MINGA” DE LA CARRERA DE IDIOMA INGLÉS.**

**CERTIFICA:**

Haber revisado la traducción al inglés del resumen de la Tesis titulada “*Escherichia coli* productora de betalactamasas aisladas de urocultivo de usuarios del Hospital Isidro Ayora- Loja”, autoría del Señor Jhordy Alexis Córdova Balcazar, con número de cédula 1105445850, egresado de la carrera de Laboratorio Clínico, de la Universidad Nacional de Loja; cuyo resumen es correcto y hace referencia al contenido del citado trabajo.

Lo certifico en honor a la verdad y autorizo al interesado, hacer uso del presente en lo que a sus intereses convenga.

Loja, 17 de octubre de 2018.



Lic. Cristian Efraín Flores Pasaca.

**Docente De La Carrera De Idioma Inglés.**

I.D 1105164907

Registro Senescyt: 1008-2018-1987031