UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO

"*Klebsiella spp* productora de betalactamasas aisladas de urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora de Loja"

MACROPROYECTO

"Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y Solca de Loja"

Tesis previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico

AUTORA:

María del Cisne Cisneros Cuenca

DIRECTORA:

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

LOJA-ECUADOR

2018

CERTIFICACIÓN

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del trabajo investigativo titulado: **"*KLEBSIELLA SPP* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS AISLADAS DE UROCULTIVOS DE USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA DE LOJA",** de autoría de la Srta. **MARÍA DEL CISNE CISNEROS CUENCA**, previo a la obtención del título de Licenciada 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,

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, **MARÍA DEL CISNE CISNEROS CUENCA** con Cl.1106021882 declaro ser autora 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 del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Autora: María del Cisne Cisneros Cuenca

Firma: ……

Cédula: 110602188-2

Fecha: Loja, 23 de Octubre de 2018

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, María del Cisne Cisneros Cuenca, declaro ser autora de la tesis titulada: **"*KLEBSIELLA SPP* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS AISLADAS DE UROCULTIVOS DE USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA DE LOJA"**, como requisito para adoptar el grado de licenciada 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 la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional: los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tengan 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 la autora.

Firma:……..

Autora: María del Cisne Cisneros Cuenca

Cédula de identidad: 1106021882

Correo electrónico: mary.c.cuenca@gmail.com

Teléfono: Dom. 072565899 **Celular**: 0985761192

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora de tesis: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

Tribunal de grado:

Presidenta: Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

Vocal: Dr. Daniel Fernando Aguirre Reyes, Ph. D.

Vocal: Lic. Alicia Silvana Villavicencio Obando, Mg. Sc.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada en primer lugar a Dios por darme la vida y muchos motivos para seguir adelante.

Con mucho cariño a mi madre Gricelda, quien con todo su esfuerzo me dio lo que pudo y más, e hizo de mí la mujer que soy ahora, por enseñarme que solo con las acciones podemos demostrar lo que es el amor incondicional y verdadero, quiero decirle madre que hizo el mejor trabajo, lo que obtengo ahora es suyo más que mío y eso me hace feliz.

A mi padre Yovanny por darme la vida y por todos los buenos momentos que hemos compartido, gracias por ser un buen padre y abuelo, lo quiero mucho.

A mi esposo Fabián, por estar conmigo y apoyarme sin importar el tiempo o la distancia, por cada palabra de aliento y de amor que me han motivado a seguir con mis sueños, sabiendo que la vida en familia y la superación como profesional pueden ir de la mano, te amo.

Especialmente a mi amada hija Fabianita, eres la inspiración más grande que tengo, a tu corta edad y sin saberlo con tus sonrisas me has dado la fuerza necesaria para llegar a mis metas, todo es por ti y para ti, gracias por ayudarme a encontrar siempre el lado hermoso de la vida, eres y serás el mejor regalo que Dios me dio.

A mi hermano Mauricio, gracias por vivir conmigo todas las cosas buenas y no tan buenas de la vida, gracias por ser quien eres y representar esa parte tan importante mientras fui creciendo, eres el mejor.

A mis sobrinas Dome y Cami, a mi cuñada Lizbeth por ser parte de mi vida y apoyarme siempre, las quiero.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Quiero agradecer a la Lic. Carmen Ullauri, Directora del macroproyecto al que pertenezco y con el cual he podido realizar este trabajo de tesis, y de una manera muy especial a la Dra. Sandra Freire, colaboradora del mismo proyecto y por aceptar ser la directora de tesis, porque sin su ayuda no hubiese podido finalizar este estudio.

Por último quiero agradecer a mis compañeros con los cuales conformamos el equipo de trabajo para llevar a cabo el macroproyecto, por todo lo que cada uno pudo aportar y de lo cual nos enriquecimos en conocimientos, gracias por cada momento compartido.

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 de literatura 8
4.1. Infección de vías urinarias 8
4.1.1. Patogenia de las infecciones de vías urinarias 8
4.1.2. Causas 9
4.1.3. Agentes etiológicos 9
4.1.3.1. *Klebsiella spp* 11
4.1.3.2. Especies de *Klebsiella* patógenas para el ser humano 12
4.1.3.2.1. *Klebsiella pneumoniae* 12
4.1.3.2.2. *Klebsiella oxytoca* 13
4.2. Mecanismos de resistencia bacteriana 14
4.2.1. Bombas de expulsión 14
4.2.2. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa 14
4.2.3. Alteraciones del sitio de acción 15
4.2.4. Modificación enzimática del antibiótico 15
4.2.4.1. Betalactamasas 15
4.2.4.2. Clasificación molecular de betalactamasas 15
4.2.4.2.1. Betalactamasas de clase A 15
4.2.4.2.2. Betalactamasas de clase B 16
4.2.4.2.3. Betalactamasas de clase C 16
4.2.4.2.4. Betalactamasas de clase D 16
4.3. Fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos 17

4.3.1. BLEE. 17
4.3.1.1. Detección fenotípica 17
4.3.2. Betalactamasas tipo AmpC 18
4.3.2.1. Detección fenotípica 18
4.3.3. Carbapenemasas 18
4.3.3.1. Detección fenotípica 19
4.4. Diagnóstico 19
4.4.1. Examen elemental y microscópico de orina (EMO). 20
4.4.2. Urocultivo. 21
4.4.3. Antibiograma 21
4.4.4. Técnicas para la identificación de betalactamasas 22
4.4.4.1. Identificación de Betalactamasas de espectro extendido. 22
4.4.4.1.1. Prueba de sinergia de doble disco 22
4.4.4.1.2. Prueba de discos combinados con inhibidor 23
4.4.4.2. Identificación de betalactamasas tipo AmpC. 24
4.4.4.2.1. Prueba de sinergia de doble disco 24
4.4.4.2.2. Prueba de discos combinados con inhibidor 24
4.4.4.3. Identificación de carbapenemasas 25
4.4.4.3.1. Prueba de sinergia de doble disco 25
4.4.4.3.2. Prueba de discos combinados con inhibidor 26
4.5. Identificación bacteriana mediante equipo automatizado 27
4.5.2. Procedimiento 27
4.5.3. Proceso de identificación 28
4.6. Control de calidad en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana 28
4.6.1. Cepas de referencia 29
4.6.1.1. *Escherichia coli* ATCC® 25922 29
4.6.1.2. *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 29
4.6.1.3. *Klebsiella pneumoniae* ATCC®BAA-1705 29
4.6.1.4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1706 30
4.6.2. Medio de cultivo: Agar Mueller-Hinton 30
4.6.3. Inóculo 30
4.6.4. Discos de antimicrobianos 30
4.6.5. Equipamiento 30

4.6.6. Incubación de placas y lectura 30
4.7. Recomendaciones del CLSI (2017) para el control de calidad en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....30
5. Materiales y métodos 32
6. Resultados 37
7. Discusión.....42
8. Conclusiones 46
9. Recomendaciones.....47
10.Bibliografía 48
11.Anexos 55

1. Título

"*Klebsiella spp* productora de betalactamasas aisladas de urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora de Loja"

2. Resumen

Las bacterias del género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteriaceae, cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. Las especies *Klebsiella pneumoniae y Klebsiella oxytoca* son patógenos que causan infección de vías urinarias en seres humanos. En las bacterias Gram negativas, la resistencia a los betalactámicos tiene varias causas, principalmente por la producción de enzimas betalactamasas: BLEE, AmpC y Carbapenemasas. *Klebsiella pneumoniae* es uno de los principales microorganismos productores de BLEE, convirtiéndose en el principal responsable de enfermedades infecciosas oportunistas. En la actualidad existen cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas, bacterias de gran importancia epidemiológica. El presente trabajo investigativo titulado "*Klebsiella spp* productora de betalactamasas aisladas de urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora de Loja" tuvo como objetivo determinar la frecuencia de *Klebsiella spp* productora de betalactamasas obtenidas de los urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora. El enfoque del estudio fue de tipo descriptivo y de corte transversal. Se trabajó con 381 muestras de orina identificando las especies de *Klebsiella* productoras de betalactamasas. Tras realizar el urocultivo se observó la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en 20 (9%) muestras y *Klebsiella oxytoca* en 2 (1%) muestras. De las 20 muestras con presencia de *Klebsiella pneumoniae*, 7 (35%) expresan BLEE y 1 (5%) probable carbapenemasa tipo KPC en un adulto mayor de sexo masculino procedente de UCI. La mayor parte de BLEE se encontró en 5 (83%) adultos mayores, 4 (100%) pacientes del servicio de consulta externa y 4 (57%) hombres.

Palabras clave: AmpC, Betalactámicos, Blee, Carbapenemasas, *Klebsiella pneumoniae*

Abstract

The bacteria of the genus *Klebsiella* is gram-negative bacilli which belongs to the Enterobacteriaceae family whose natural habitat is human and animal intestines. The species *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* are pathogens that cause urinary tract infections in humans. In gram-negative bacteria, resistance to beta-lactams has several causes, but it is mainly because of the production of beta-lactamase enzymes: ESBL, AmpC and Carbapenems. *Klebsiella pneumoniae* is one of the leading microorganisms producers of ESBL and becoming the principal cause for opportunistic infectious diseases. Nowadays, there are strains of *Klebsiella pneumoniae* which produce carbapenems, a bacterium of great epidemiological importance. The present research work entitled "*Klebsiella spp* producing beta-lactamases isolated from urine cultures of users of the Isidro Ayora Hospital of Loja" the objective of this research was to determine the frequency of *Klebsiella spp* producer of beta-lactamases, which was obtained from the urine cultures of patients in the Isidro Ayora Hospital. The study was focused in a descriptive and cross-sectional way. The study of the population consisted of 381 patients, identifying the beta-lactamase species producers of *Klebsiella*. After applying the urine culture it was observed presence of *Klebsiella pneumoniae* in 20(9%) samples and *Klebsiella oxytoca* in 2 (1%) samples. Of the 20 samples with presence of *Klebsiella pneumoniae,* 7 (35%) show BLEE and 1(5%) probable KPC type carbapenem in and elderly man originally from ICU. Most of the BLEE was found in 5 (83%) older adults, 4 (100%) outpatients and 4 (57 %) men.

Keywords: AmpC, Beta-lactamases, ESBL, Carbapenems, *Klebsiella pneumoniae*

3. Introducción

Las infecciones de vías urinarias (IVU) son un problema común en las poblaciones y se considera que los patógenos más importantes causantes de estas infecciones corresponden a bacilos aerobios Gram negativos que constituyen parte de la flora normal intestinal y *Klebsiella spp* es el segundo agente causal más frecuente que es responsable de las mismas (Argüez, 2015).

Argüez (Argüez, 2015) afirma que las betalactamasas son enzimas producidas por los bacilos Gram negativos, especialmente enterobacterias como *Klebsiella spp*, para impedir que los antibióticos betalactámicos ejerzan su acción ya que tienen capacidad hidrolítica sobre ellos, esta resistencia a los antibióticos representa un gran problema porque los antimicrobianos son cada vez menos eficaces y la aparición de enterobacterias productoras de betalactamasas es un problema creciente que dificulta el tratamiento de las infecciones bacterianas.

El incremento de la resistencia bacteriana tiene múltiples factores tales como: el uso indiscriminado de antibióticos en humanos, el empleo de antimicrobianos en la producción industrializada de los alimentos especialmente los proteicos de origen animal, la automedicación en la población, venta de antibióticos sin receta médica, entre otros (OMS, 2015).

La prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en América Latina es de 45,4%, seguido de Europa (22,6%), Estados Unidos (7,6%) y Canadá (4,9%). En Latinoamérica encontramos las tasas de prevalencias más altas en países como Honduras, Chile, Guatemala y Brasil cuyos porcentajes superan el 45%, situándose Colombia y Venezuela en los últimos lugares con porcentajes del 18,7% y 17,2% (López, Guete y Ospina, 2015).

En el estudio denominado "*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario", Argüez (Argüez, 2015) demostró que las cepas de *Escherichia coli* (34%) y *Klebsiella pneumoniae* (14.6%) fueron los aislamientos encontrados en mayor porcentaje en pacientes con IVU, además observaron que en el aislamiento de estas bacterias la resistencia antimicrobiana era por la presencia de BLEE. En otro estudio en Colombia, entre los meses de septiembre de 2014 y marzo de 2015, se observó que 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae* fueron productoras de BLEE y no existieron cepas de *Klebsiella oxytoca* aisladas (López et al., 2015). En la publicación "Factores asociados a la presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes con infección del tracto urinario en el Hospital Militar Central de Lima de febrero-noviembre 2017", De la Cruz (De la Cruz, 2018) identificó a *Klebsiella pneumoniae* como segundo agente etiológico de IVU con 12 casos (9,8%) con una frecuencia de expresión de BLEE de 2 casos (4,9%).

En Honduras, en un estudio realizado en 2013 (Pineda, Herrera y Rivera, 2017) en pacientes con infección por enterobacterias productoras de BLEE, encontraron un 38% de estas bacterias aisladas de urocultivos en adultos y un 20% en adultos mayores, sin aislamientos con este tipo de resistencias en otras edades. En Perú en el estudio "Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional" (Tejada et al., 2015) encontraron de 3149 muestras recolectadas que 70,9% (2235) fueron de mujeres y del total de urocultivos el 29,4% fueron cultivos positivos para bacterias productoras de BLEE, los servicios críticos obtuvieron la mayor prevalencia y tanto *Escherichia coli* (72,4%) como *Klebsiella spp*. (20%) fueron los géneros de bacterias aisladas más prevalentes. En Buenos Aires, en un período de un año en un Hospital Universitario, (Echavarría et al., 2017) identificaron 27 casos de *Klebsiella pneumoniae*

productora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC), por efectos de colonización de esta bacteria en pacientes hospitalizados en dicha casa de salud.

En nuestro país de acuerdo a un estudio realizado en la ciudad de Cuenca en el año 2013, en donde aislaron microrganismos productores de BLEE, *Klebsiella spp* ocupó el tercer lugar en frecuencia y de los 307 urocultivos con bacterias productoras de BLEE, *Klebsiella pneumoniae* fue el tercero con el 5,5% del total (Guamán, 2013).

Según Íñiguez (Iñíguez et al., 2012) *Klebsiella pneumoniae* ha sido asociada a un 2-5% de las infecciones nosocomiales, la resistencia de esta especie a las cefalosporinas de tercera generación mediante la producción de BLEE es frecuente, situando a los carbapenémicos como el tratamiento de elección en las infecciones producidas por estos aislamientos. Sin embargo, Queenan y Bush mencionan que en 2001 se realizó el primer aislamiento clínico de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos, mediante la producción de carbapenemasa tipo KPC en Carolina del Norte, Estados Unidos, a partir de este primer aislamiento, se reconocen brotes en diversas regiones del mundo, en Ecuador, la primera detección de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC tipo 2 fue en el año 2012 (Íñiguez et al., 2012, p. 39).

Por todos estos motivos relacionados con la resistencia bacteriana se realizó la presente investigación, de la cual se obtuvieron datos con los que puede ser posible actualizar las estadísticas a nivel local para establecer la frecuencia de *Klebsiella spp* productora de betalactamasas causante de infecciones del tracto urinario. En vista de lo mencionado luego de conocer que a nivel mundial existe una elevada cantidad de aislamientos de estas bacterias y su gran impacto en la salud, es que surge la necesidad de investigar cuán frecuente es encontrar la presencia de estas enzimas en los aislamientos bacterianos de *Klebsiella spp.* Frente a lo expuesto me planteé la interrogante: ¿cuál es la frecuencia de *Klebsiella spp* que produzca betalactamasas aisladas de los urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora?

El presente estudio es parte del proyecto de la Universidad Nacional de Loja titulado "Caracterización Molecular de Betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y SOLCA de Loja" del cual existen subtemas, siendo esta investigación uno de ellos en la que me planteé como objetivos identificar las especies de *Klebsiella* productora de betalactamasas aisladas de urocultivos, determinar el tipo de betalactamasas producidas por las especies de *Klebsiella* y establecer el tipo de betalactamasas presentes según la edad, sexo y el área de procedencia (hospitalario o ambulatorio).

4. Revisión de literatura

4.1. Infección de vías urinarias

La IVU consiste en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del trayecto del tracto urinario. Se denomina pielonefritis si afecta al riñón y la pelvis renal, cistitis si implica a la vejiga, uretritis si afecta a la uretra y prostatitis si la infección se localiza en la próstata (González, 2015).

Se trata de una patología que puede afectar en cualquier edad, en ambos sexos y puede ser de origen nosocomial o comunitaria (Cortés et al., 2011).

La IVU puede ser sintomática, la cual se define como la presencia de síntomas clínicos atribuidos al tracto genitourinario en asociación con bacteriuria significativa o puede ser asintomática, definida por la presencia de bacterias en las muestras de orina en un paciente sin sintomatología urinaria, el diagnóstico etiológico de estas infecciones se demuestra por la presencia en orina de 100000 o más Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/ml, lo cual es indicativo de bacterias multiplicándose en el tracto urinario y, por tanto, recuentos bacterianos iguales o superiores a este umbral se han considerado como bacteriuria significativa indicativa de IVU; sin embargo, cifras que oscilan entre 1000-10000 UFC/ml deben considerarse significativo e indicativo de IVU, cuando proceden de muestras obtenidas adecuadamente y el paciente presenta síntomas urinarios específicos (Rocaro, 2016).

4.1.1. Patogenia de las infecciones de vías urinarias. Los microorganismos pueden llegar a las vías urinarias por diseminación hematógena o linfática, aunque hay abundantes datos clínicos y experimentales que demuestran que el ascenso de microorganismos a través de la uretra es la vía más frecuente que produce IVU, especialmente por microorganismos de origen intestinal como las enterobacterias, esto ofrece una explicación lógica de la mayor frecuencia de IVU en las mujeres que en los varones debido a la cercanía anatómica del ano y la uretra, y del mayor riesgo de infección después de un sondaje o instrumentación vesical, no

todas las especies bacterianas son igual de capaces de provocar una infección, cuanto más comprometidos se encuentran los mecanismos de defensa naturales (por ejemplo, obstrucción o sondaje vesical) menor es la necesidad de virulencia de una cepa bacteriana para producir infección (Grabe, Bjerklund, & Botto, 2010).

4.1.2. Causas. De acuerdo a Calderón (Calderón et al., 2013) son diversas las causas que intervienen en el desarrollo de la infección de vías urinarias, algunas de ellas se las describe en este apartado: el ascenso retrógrado de las bacterias es el mecanismo más común de infección en niñas, pueden acceder y ascender más fácilmente al tracto urinario debido a la relativa cercanía del orificio uretral con el ano y a la menor longitud de la uretra. Otro reservorio de bacterias uropatógenas es la presencia del prepucio íntegro en neonatos, las presiones altas en la vejiga, el vaciamiento vesical incompleto o infrecuente y la falta de relajación del piso pélvico durante la micción, son otros factores que predisponen a las IVU. Las anomalías congénitas de vías urinarias (uropatía obstructiva y reflujo) y la vejiga neurogénica, incluyendo al grupo de pacientes con cateterismo vesical intermitente, son factores de riesgo de especial importancia a tomar en cuenta, existen pacientes que tienen un urotelio susceptible que facilita el incremento de la colonización bacteriana. La predisposición a la colonización en pacientes con IVU recurrentes, en ausencia de alteraciones anatómicas o funcionales, tiene relación con una mayor capacidad de adherencia de bacterias como *Escherichia coli* a la piel prepucial interna, al periné, al introito vaginal y a la uretra.

4.1.3. Agentes etiológicos. Los principales microorganismos causantes de IVU son bacterias de origen intestinal (enterobacterias) siendo *Escherichia coli* la más frecuente (sobre 86%), el restante 14% se distribuye entre *Klebsiella spp, Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis, Enterobacter spp, Enterococcus spp* y *Pseudomonas spp.* Estas bacterias (no *Escherichia coli*) se presentan con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos,

infecciones nosocomiales asociadas a catéter vesical permanente, presencia de malformaciones de la vía urinaria, vejiga neurogénica e instrumentación urológica (Peña, 2013).

Característicamente, las IVU complicadas tienen un espectro más amplio de microorganismos causales; la probabilidad de infección por hongos es alta, así como la resistencia a antimicrobianos comunes (Lifshitz, Arredondo, Amábile y Pacheco, 2010).

Jawetz (Jawetz, 2010) describe a la familia Enterobacteriaceae y los principales grupos que la conforman como se lo narra en los siguientes párrafos:

Las Enterobacteriaceae son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. Sus características son: móviles con flagelos, peritricosos o no móviles; se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros suplementos; se multiplican bien en agar de MacConkey; proliferan en medios aerobios y anaerobios (son anaerobios facultativos); fermentan en vez de oxidar glucosa, a menudo produciendo gas; catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitrato a nitrito.

Escherichia: Escherichia coli es parte de la flora normal y en forma incidental puede ocasionar enfermedad, suele producir pruebas con positividad para indol, lisina descarboxilasa y fermentación de manitol y produce gas a partir de glucosa. Una cepa de la orina se puede identificar rápidamente como *Escherichia coli* por su hemólisis en agar sangre, su morfología de colonia característica con un lustre "iridiscente" en medios diferenciadores como agar EMB y una prueba de indol de mancha positiva.

Grupo de *Proteus-Morganella-Providencia:* Las bacterias del género *Proteus* se mueven muy activamente por medio de flagelos peritricosos, lo que da como resultado "enjambre" en medios sólidos a menos que el enjambre se inhiba por sustancias químicas, por ejemplo, feniletil alcohol o medio de CLED (deficiente en cistina-lactosa-electrólitos). Las bacterias

del género *Proteus y Morganella morganii* producen ureasa, en tanto que las bacterias del género *Providencia* no suelen producirla. El grupo *Proteus-Providencia* fermenta lactosa con mucha lentitud o no la fermenta siquiera.

Citrobacter: Estas bacterias suelen producir citrato y difieren de las salmonelas en que no descarboxilan lisina. Fermentan lactosa con gran lentitud.

Shigella: Las shigelas son no móviles y por lo general no fermentan lactosa pero sí fermentan otros hidratos de carbono, produciendo ácido pero no gas. No producen H_2S.

Grupo de *Klebsiella-Enterobacter-Serratia:* Las bacterias del género *Klebsiella* muestran multiplicación mucoide, cápsulas de polisacárido de gran tamaño y falta de motilidad, y por lo general producen pruebas positivas para lisina descarboxilasa y citrato. La mayor parte del género *Enterobacter* produce pruebas positivas para motilidad, citrato y descarboxilasa de ornitina y produce gas a partir de glucosa.

Enterobacter aerogenes tiene cápsulas pequeñas. *Serratia* produce DNasa, lipasa y gelatinasa.

4.1.3.1. Klebsiella spp. Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos inmóviles, anaerobios facultativos y con una prominente cápsula de polisacáridos que los diferencia de otros microorganismos de la misma familia, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Puertas y Mateos, 2010).

De acuerdo a Podschun y Ullmann (Podschun y Ullmann, 2010) las bacterias que pertenecen al género Klebsiella con frecuencia causan infecciones nosocomiales humanas. En particular, la especie *Klebsiella pneumoniae,* médicamente más importante, representa una proporción significativa de infecciones del tracto urinario adquiridas en el hospital, así como neumonía, septicemias e infecciones de tejidos blandos. Los principales reservorios patógenos para la transmisión de *Klebsiella* son el tracto gastrointestinal y las manos del personal del hospital. Debido a su capacidad para diseminarse rápidamente en el ambiente

hospitalario, estas bacterias tienden a causar brotes nosocomiales que suelen ser resistentes a múltiples fármacos, especialmente en las salas neonatales. A menudo son causados por nuevos tipos de cepas los productores de BLEE, la incidencia de cepas productoras de BLEE entre los aislados clínicos de *Klebsiella* ha ido aumentando constantemente en los últimos años y poseen factores de patogenicidad tales como las cápsulas o los lipopolisacáridos.

4.1.3.2. Especies de Klebsiella patógenas para el ser humano. Se consideran a *Klebsiella pneumoniae y Klebsiella oxytoca* como microorganismos patógenos para el ser humano (Díaz y López, 2015).

4.1.3.2.1. Klebsiella pneumoniae. Es un patógeno bacteriano importante, asociado a infecciones en la comunidad y nosocomiales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, las cepas de *Klebsiella pneumoniae* tienen el potencial para causar morbilidad y mortalidad, particularmente en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos (González et al., 2013). Aunque puede causar enfermedad en la población sana, afecta generalmente a pacientes hospitalizados o con enfermedades de base como diabetes mellitus, es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica (Puertas y Mateos, 2010).

Echeverri y Cataño (Echeverri y Cataño, 2010) en su estudio denominado *"Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario" detallan lo que a continuación se narra:

Klebsiella pneumoniae es una bacteria de forma bacilar, Gram negativa, anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. La tasa de detección de adultos portadores de *Klebsiella pneumoniae* en materia fecal es de 5-38%, y en nasofaringe entre 1 y 6%; en los niños el estado de portador fecal puede alcanzar el 100%. Es importante señalar que la tasa de

colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, en forma directamente proporcional a la duración de la estancia y, especialmente, a la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre la flora comensal.

Sus características son su capacidad de resistir a la desecación en el medio y la de sobrevivir en la piel debido a su cápsula hidrófila que también protege a la bacteria de la fagocitosis por los polimorfonucleares y macrófagos y de los diversos factores bactericidas del hospedero. La cápsula de *Klebsiella pneumoniae* se compone de polisacáridos complejos y tiene subunidades repetidas de 4 a 6 azúcares.

Las adhesinas y fimbrias no flagelares en la superficie de la bacteria, constituidas por subunidades de proteínas poliméricas, le permiten adherirse a las superficies y mantener el contacto con la célula hospedera. Posee el antígeno O, lipopolisacárido que protege a la bacteria contra la muerte mediada por el complemento; cuenta con la actividad de la endotoxina, que facilita su multiplicación en los tejidos del hospedero. Recientemente se ha demostrado también la presencia de plásmidos relacionados con la expresión de proteínas que median la fijación de este microorganismo a superficies plásticas, como las de catéteres vasculares y sondas vesicales.

4.1.3.2.2. Klebsiella oxytoca. Es una bacteria Gram negativa con forma de varilla cilíndrica que mide 2 μm por 5 μm, tiene una estructura bimembrana, es decir una membrana plasmática, y una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos (LPS) que tienen antígenos O. Entre estas dos membranas se encuentra una fina capa de peptidoglicano. La capa de LPS tiene una cadena de polisacáridos conocida como lípido A, que produce endotoxinas que contribuyen a su patogenicidad. *Klebsiella oxytoca* es un anaerobio facultativo que puede fijar nitrógeno e hidrolizar celulosa, también produce betalactamasas, lo que las hace altamente resistentes a la penicilina y ampicilina (Keren, 2012).

Klebsiella oxytoca es una especie de bacterias Gram negativas estrechamente relacionadas con *Klebsiella pneumoniae*, de la que se distingue por ser indol positiva en los resultados de pruebas bioquímicas; y por tener ligeras diferencias en relación a los medios en que puede crecer, la mayor parte de las infecciones por *Klebsiella oxytoca* son infecciones urinarias o de vías biliares, en muchas ocasiones son infecciones adquiridas en el hospital, especialmente en pacientes diabéticos, tratados con antibióticos anteriormente o que presentan alguna enfermedad previa de gravedad (Ryan y Ray, 2004).

4.2. Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes Gram negativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la meticilina, esta resistencia adquirida es la que estudiamos en el laboratorio e informamos al clínico (Vignoli y Seija, 2010).

Conforme expresan Tafur, Torres y Villegas (Tafur, Torres, y Villegas, 2008) la resistencia adquirida puede resumirse en cuatro mecanismos, descritos algunos de ellos por estos autores en los puntos 4.2.1.; 4.2.2.; 4.2.3.

4.2.1. Bombas de expulsión. Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción, este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas.

4.2.2. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa. Cambios en el diámetro y/o número de porinas pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria.

4.2.3. Alteraciones del sitio de acción. La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano, por ejemplo la modificación de las proteínas de unión a penicilinas que es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos.

4.2.4. Modificación enzimática del antibiótico. Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo, las betalactamasas son las más prevalentes, capaces de hidrolizar el anillo betalactámico que poseen los antibióticos de esta familia (Moreno, González y Beltrán, 2009).

4.2.4.1. Betalactamasas. Enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico en la clase de antibióticos betalactámicos, inactivando así el antibiótico. Las enzimas específicas para las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos son las penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas, respectivamente, tienen una amplia gama de actividad, y son capaces de inactivar la mayoría de los antibióticos betalactámicos, las bacterias pueden producir estas enzimas que inactivan los antibióticos betalactámicos, las betalactamasas pertenecen a la familia de serina proteasas, son más de 200 las betalactamasas diferentes que se han descrito (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

4.2.4.2. Clasificación molecular de betalactamasas. Por medio de un esquema de clasificación, las betalactamasas han sido separadas en cuatro clases (A a D) (Casellos, 2011).

4.2.4.2.1. Betalactamasas de clase A. Son serinabetalactamasas, las más comunes son SHV-1 y TEM-1, penicilinasas que se encuentran en bacilos Gram negativos comunes, por ejemplo, en *Escherichia coli*, o *Klebsiella*), con una mínima actividad frente a cefalosporinas. Sencillas mutaciones puntuales en los genes que codifican estas enzimas han creado

betalactamasas con actividad frente a todas las penicilinas y cefalosporinas, a esta clase de betalactamasas pertenecen las BLEE que son muy problemáticas, porque la mayoría son codificadas en plásmidos que pueden ser transferidos de un microorganismo a otro (Morejón, 2013).

4.2.4.2.2. Betalactamasas de clase B. Son metalobetalactamasas, enzimas dependientes de zinc que poseen un amplio espectro de actividad frente a todos los antibióticos betalactámicos, incluidas las cefamicinas y los carbapenémicos, incluye la mayoría de las betalactamasas que son inhibidas por EDTA pero no inhibidas por ácido clavulánico (Abarca y Herrera , 2011).

4.2.4.2.3. Betalactamasas de clase C. Son serinabetalactamasas, principalmente cefalosporinasas que son codificadas en el cromosoma bacteriano, comúnmente la expresión de estas enzimas están reprimidas, aunque este hecho puede verse alterado por exposición a ciertos antibióticos betalactámicos inductores o por mutaciones en los genes que controlan la expresión de las enzimas, la expresión de esta clase de betalactamasas es particularmente problemática, porque son activas frente a las cefalosporinas de espectro extendido más potentes (López, Barcenilla y Amaya, 2011).

4.2.4.2.4. Betalactamasas de clase D. Son serinabetalactamasas, son penicilinasas que se encuentran principalmente en bacilos Gram negativos. Las betalactamasas tipo OXA pertenecen a esta clase molecular, son menos comunes pero también es la única variedad que puede hidrolizar la oxacilina y otras penicilinas relacionadas con estafilococos, las betalactamasas tipo OXA confieren resistencia a ampicilina y a cefalotina y se caracterizan por su gran actividad hidrolítica contra la oxacilina y cloxacilina, y el hecho de que son pobremente inhibidas por el ácido clavulánico (Romero, Salazar, Morales y Rojas, 2011).

4.3. Fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos

Díaz y Hernández (Díaz y Hernández, 2008) explican el mecanismo de resistencia conferido por las BLEE y su detección fenotípica en los puntos 4.3.1. y 4.3.1.1.

4.3.1. BLEE. Enzimas capaces 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, estas betalactamasas pertenecen a la clase molecular A de Ambler y entre ellas se encuentran las de tipo TEM y SHV derivadas de enzimas con menor espectro de hidrólisis y la familia CTX-M procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*.

4.3.1.1. Detección fenotípica. La detección de BLEE se basa en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos. Otra de las características de estas enzimas es que son inhibidas por el ácido clavulánico.

Se han desarrollado diversas pruebas fenotípicas para la detección de BLEE, la mayoría basadas en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico, entre ellas destaca la técnica de disco-difusión en la que la presencia de una BLEE se sospecha no solo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de amplio espectro o los 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.

Jacoby (Jacoby, 2009) explica el mecanismo de resistencia conferido por las betalactamasas tipo AmpC y su detección fenotípica como se describe en los puntos 4.3.2. y 4.3.2.1.

4.3.2. Betalactamasas tipo AmpC. Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler, hidrolizan cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas las cefamicinas y, en menor medida las de tercera generación, mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación y los carbapenémicos. La cloxacilina y el aztreonam, así como el ácido borónico y sus derivados (ácido fenil-borónico), inhiben a las betalactamasas de tipo AmpC.

4.3.2.1. Detección fenotípica. Los métodos fenotípicos para la detección de AmpC plasmídicas solo resultan de utilidad en aislados que no tienen una AmpC cromosómica natural como *Klebsiella spp.*, *Salmonella enterica, Proteus mirabilis* o que la expresan constitutivamente a muy bajo nivel como *Escherichia coli*. La presencia de AmpC plasmídica debe sospecharse cuando estos aislados presenten un patrón de resistencias a betalactámicos (fenotipo AmpC) diferente al de su respectivo fenotipo salvaje o de resistencia natural, siendo los marcadores de mayor utilidad la sensibilidad intermedia o resistencia a amoxicilina – ácido clavulánico y a algunas de las cefalosporinas de tercera generación.

Los métodos fenotípicos más rentables por su eficacia, su sencillez y su bajo costo económico, 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.

4.3.3. Carbapenemasas. Las carbapenemasas son betalactamasas que hidrolizan las penicilinas, en la mayoría de los casos cefalosporinas, y varios grados de carbapenémicos y monobactámicos (estos últimos no son hidrolizados por metalobetalactamasas) (EUCAST, 2017).

Según Hirsch y Tam (Hirsch y Tam, 2010) otro grupo importante de carbapenemasas son las de clase A, dentro de las cuales las que tienen mayor importancia epidemiológica son las denominas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) son de naturaleza plasmídica asociadas al trasposón Tn4401. Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas KPC hidrolizan de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, no se inhiben por el ácido clavulánico, pero sí por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para su reconocimiento fenotípico.

4.3.3.1. Detección fenotípica. El fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa, es generalmente ilustrado por la sensibilidad disminuida o resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y a alguno de los carbapenémicos, para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas directamente de muestras clínicas se ha propuesto la utilización de medios cromogénicos, los cuales tienen una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de cepas con enzimas tipo VIM y KPC pero no discrimina el tipo de carbapenemasa (Hirsch y Tam, 2010).

4.4. Diagnóstico

El diagnóstico de infección de vías urinarias se realiza con base en una clínica presuntiva caracterizada por fiebre elevada sin foco aparente, molestias urinarias, orina mal oliente y turbia, dolor lumbar, rechazo al alimento, diarrea, irritabilidad, antecedentes familiares, entre otros (Cortés et al., 2011). La sospecha de IVU debe confirmarse mediante la realización de un examen elemental y microscópico de orina (EMO), urocultivo y antibiograma; en recién nacidos y lactantes es recomendable tomar la muestra de orina a través de un catéter uretral y en niños, con control de esfínteres y adultos se debe tomar la muestra de orina de la segunda mitad del chorro, ya sea después de retraer el prepucio y desinfectar el glande en niños y hombres o de abrir los labios y limpiar el área periuretral en niñas y mujeres (Calderón et al., 2013).

4.4.1. Examen elemental y microscópico de orina (EMO). De María (De María, 2017) en su trabajo "Guía práctica para la estandarización del procesamiento y examen de las muestras de orina" detalla las características del EMO y su procedimiento, como se indica en este apartado, e indica que el uroanálisis debe realizarse dentro de las primeras dos horas de emitida la muestra, después de las dos horas el deterioro que experimenta la muestra de orina incluye: destrucción de leucocitos y eritrocitos, proliferación de bacterias, degradación bacteriana de la glucosa, aumento del pH por formación de amoníaco como resultado de la degradación bacteriana de la urea, y oxidación de la bilirrubina y del urobilinógeno.

El procedimiento es el siguiente:

1. La muestra se homogeniza, es decir se mezcla con movimientos del frasco lenta y cuidadosamente, de tres a cinco veces para lograr una buena mezcla sin formar espuma.
2. Se separa una alícuota de 10 a 12ml en un tubo de ensayo.
3. Examen macroscópico, en el que se observa el color y aspecto de la muestra.
4. Examen químico, en el que se da la determinación cuantitativa y semicuantitativa de diversos parámetros y sustancias excretadas en la orina, se realiza mediante reacciones químicas y enzimáticas de química seca, en la cual se impregna una fase sólida con los reactivos respectivos a cada determinación. El examen de orina con tira reactiva puede revelar la presencia de esterasa leucocitaria y nitritos.
5. Se centrífuga la muestra: 400 g a 1500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga en la que los tubos queden horizontales al girar.
6. Se decanta el sobrenadante cuidadosamente, para resuspender el sedimento es suficiente una agitación manual.
7. Se coloca una gota de sedimento sobre una placa portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos.

8. Se procede a la observación en el microscopio.
9. En el análisis microscópico, una cuenta de cinco o más leucocitos por campo y bacteriuria sugieren IVU.

4.4.2. Urocultivo. Calderón (Calderón et al., 2013) en su investigación titulada "Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados" detalla las características del urocultivo y hace una breve referencia sobre el procedimiento a seguir en la realización de este análisis, tal como se indica en este apartado, y define que el urocultivo es la prueba de orina que identifica la presencia de bacterias, el cual se realiza colocando la orina en un medio propicio a la reproducción de bacterias, llamado medio de cultivo, si la orina contiene gérmenes en 48 horas se podrá identificar la formación de colonias de bacterias y así se puede identificar qué tipo de bacteria está presente y qué antibióticos son eficaces para luchar contra ellas (antibiograma).

El urocultivo se considera positivo si hay >100000 UFC/ml en una muestra adecuadamente colectada, las muestras para cultivo de orina deberán refrigerarse si no se tiene la posibilidad de enviarlas al laboratorio dentro de los 30 minutos posteriores a su recolección, un urocultivo con hasta 1000 UFC/ml en ciertas situaciones clínicas como la toma de muestra de orina mediante aspiración suprapúbica podría considerarse como una IVU real; sin embargo, es necesario considerar que, cuando las UFC son bajas, aumentan las posibilidades de contaminación.

4.4.3. Antibiograma. Valera (Valera, 2015) en su trabajo denominado "Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos" define las características del antibiograma y el procedimiento a seguir para su realización, como se indica en este apartado, por lo que explica que para conocer la sensibilidad de una bacteria a distintos antibióticos se siembra una muestra del cultivo puro en un medio en el que conocemos la capacidad de difusión de cada una de las sustancias a analizar, este es el medio de Mueller Hinton, para la realización de la prueba en

primer lugar hay que sembrar el medio con una gran carga bacteriana que permita obtener un crecimiento en tapiz o césped a partir de un inóculo con una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. La siembra se realiza mediante un hisopo estéril que se empapa con el cultivo líquido, se descarga el hisopo realizando estrías juntas sobre la superficie de la caja procurando que no queden espacios sin cubrir, una vez sembrada la placa se eligen los antibióticos a probar.

Los antibióticos vienen impregnados en discos de papel absorbente que se sacan con pinzas metálicas esterilizadas mediante su flameo tras inmersión en alcohol, los discos se depositan en la superficie del medio de cultivo inoculado, realizando una ligera presión para que queden adheridos al mismo, la placa preparada con el inóculo y los antibióticos se invierte y se lleva a incubar durante 24 horas a 37ºC, tras este tiempo se leen los resultados midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento que aparecen alrededor de los discos de papel.

4.4.4. Técnicas para la identificación de betalactamasas. Bush y Jacoby (Bush y Jacoby, 2010) describen las técnicas para identificación de BLEE, AmpC y Carbapenemasas, así como la interpretación de los resultados para cada prueba, los mismos que se detallan a continuación en los apartados 4.4.4.1., 4.4.4.2., 4.4.4.3.

4.4.4.1. Identificación de Betalactamasas de espectro extendido.

4.4.4.1.1. Prueba de sinergia de doble disco. a) Inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. b) Situar un disco con cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam a una 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. c) Incubar a 35 ± 2ºC durante 16-20 horas.

Interpretación de resultados. 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 cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam en la zona próxima al disco con amoxicilinaácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor. b) Negativo: No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam ni presencia de "zona fantasma".

4.4.4.1.2. Prueba de discos combinados con inhibidor. a) Inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. b) Colocar un disco con ceftazidima, ceftazidima ácido clavulánico, cefotaxima, cefotaxima-ácido clavulánico, cefepima y cefepima -ácido clavulánico. c) Incubar a 35 ± 2ºC durante 16-20 horas.

Preparación de los discos con inhibidor: Preparar la solución madre de inhibidor con las concentraciones siguientes:

- Ácido clavulánico 1 mg/mL (disuelto en agua estéril).
- Cloxacilina 50 mg/mL (disuelto en agua estéril).
- Añadir 10 µL de la solución de inhibidor a los discos con cefalosporinas.
- Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

Interpretación de resultados. Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco). Los resultados se interpretan de la siguiente manera: a) Positivo: incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima, cefotaxima o cefepima en presencia de ácido clavulánico ≥5 mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico, independientemente de la presencia o ausencia de cloxacilina en el disco/tableta. 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.

4.4.4.2. Identificación de betalactamasas tipo AmpC.

4.4.4.2.1. Prueba de sinergia de doble disco. a) Inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. b) Situar un disco con cefotaxima y un disco con ceftazidima a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con cloxacilina o ácido borónico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa. c) Incubar a 35 ± 2ºC durante 16-20 horas.

Interpretación de resultados. 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 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. b) 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.

4.4.4.2.2. Prueba de discos combinados con inhibidor. a) Inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. b) Colocar un disco con ceftazidima, ceftazidimacloxacilina, cefotaxima y cefotaxima-cloxacilina. Alternativamente se pueden utilizar discos combinados de las cefalosporinas con ácido borónico. c) Incubar a 35 ± 2ºC durante 16-20 horas.

Preparación de los discos con inhibidor: Preparar la solución madre de ácido amino-fenilborónico disuelto en agua estéril o fenil-borónico disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y agua estéril o cloxacilina disuelta en agua estéril.

- Añadir el volumen adecuado de la solución de inhibidor a los discos blancos (prueba de sinergia de doble disco) o a los discos con cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg) (prueba de discos combinados) según la cantidad final por disco que se desee.
- Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

Interpretación 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: a) Positivo: incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima o cefotaxima en presencia de cloxacilina o ácido borónico ≥5 mm al de la cefalosporina correspondiente sin inhibidor. b) 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.

4.4.4.3. Identificación de carbapenemasas.

4.4.4.3.1. Prueba de sinergia de doble disco. a) Inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. b) Colocar discos con carbapenémicos (imipenem, meropenem) y un disco con inhibidor ácido borónico para descartar carbapenemasas de clase A y ácido dipicolínico o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para carbapenemasas de clase B a 1-2 cm (margen a margen). La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa. c) Incubar a 35 ± 2ºC durante 16-20 horas.

Interpretación de resultados. Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera: a) 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. b) Negativo: no ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de "zona fantasma".

4.4.4.3.2. Prueba de discos combinados con inhibidor. a) Inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. b) Colocar un disco con meropenem, meropenem+cloxacilina, meropenem+ácido borónico y meropenem+ácido dipicolínico o meropenem+EDTA. También pueden utilizarse discos con imipenem y las mismas combinaciones de inhibidores. c) Incubar a 35 ± 2ºC durante 16-20 horas.

Preparación de los discos con inhibidor:

- Preparar las soluciones madre de ácido aminofenil-borónico disuelto en agua estéril o fenilborónico disuelto en DMSO y agua estéril, cloxacilina disuelto en agua estéril, ácido dipicolínico disuelto en DMSO y agua estéril o EDTA disuelto en agua estéril.
- Añadir el volumen adecuado de la solución de inhibidor a los discos blancos (prueba de sinergia de doble disco) o a los discos con carbapenémicos (prueba de discos combinados) según la cantidad final por disco que se desee.
- Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

Interpretación 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: a) Positivo: incremento ≥5 mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico. b) Negativo: no diferencia o incremento <5 mm en el halo de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.

4.5. Identificación bacteriana mediante equipo automatizado

Según BioMérieux (BioMérieux, 2013) la identificación bacteriana mediante equipos automatizados se puede definir y realizar como se narra en los puntos 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3.

4.5.1. Fundamento. La técnica del equipo consiste en identificar un organismo mediante una metodología basada en las características de los datos y el conocimiento acerca del organismo y las reacciones que se analizan. 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.

4.5.2. Procedimiento. Prepare el inóculo a partir de un cultivo puro, según las buenas prácticas de laboratorio. En caso de cultivos mixtos es necesario otro paso de aislamiento. Se recomienda realizar una comprobación de la pureza de la placa para garantizar que se utiliza un cultivo puro para la prueba.

1. Siga uno de estos pasos:
    - Elija colonias aisladas de una placa primaria si se satisfacen los requisitos del cultivo.
    - Subcultive el organismo a analizar en el medio de agar apropiado e incúbelo adecuadamente.
2. 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.
3. Utilice un palillo o torunda estériles para transferir una cantidad suficiente de colonias morfológicamente similares al tubo con solución salina preparado en el paso 2.

4. Prepare una suspensión homogénea de organismo con una densidad equivalente a McFarland N°. 0,50 a 0,63.

   Nota: El tiempo de suspensión no debe superar los 30 minutos antes de inocular la tarjeta.
5. Coloque el tubo con la suspensión y la tarjeta para bacterias Gram negativas (Tarjeta GN) en el casete.
6. Consulte el manual del usuario apropiado para leer las instrucciones sobre la introducción de datos y la carga del casete en el instrumento.
7. Siga las instrucciones que las autoridades locales hayan fijado para la eliminación de desechos biológicos peligrosos.

4.5.3. Proceso de identificación. Como parte del proceso de identificación, el programa informático compara el conjunto de reacciones de los análisis con el conjunto de reacciones previstas de cada organismo o grupo de organismos que pueda identificarse con el producto. 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. Una coincidencia perfecta entre el patrón de reacción de la prueba y el patrón único de reacción de un solo organismo, o grupo de organismos, proporcionaría una probabilidad del 99%.

4.6. Control de calidad en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Araya, Prat y Ramírez (Araya, Prat y Ramírez, 2015) indican que el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad por difusión con discos debería considerar el control de las siguientes variables o actividades, las mismas que son descritas en los puntos 4.6.1., 4.6.2., 4.6.3., 4.6.4., 4.6.5., 4.6.6.

- Selección y mantención de las cepas de referencia.
- Características del medio de cultivo.

- Condiciones de mantención y duración de placas preparadas/comerciales.
- Concentración del inóculo bacteriano.
- Características y mantención correcta de los discos.
- Condiciones de incubación.
- Procedimiento para la ejecución del control propiamente tal: frecuencia, responsabilidades, criterios de aceptación y rechazo, registros, acciones correctivas.

4.6.1. Cepas de referencia. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda el uso de cepas del American Type Culture Collection (ATCC®) para el control de calidad interno de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Citado en Araya, Prat y Ramírez, 2015, p.4). Se debe tener en consideración que los rangos de los halos de inhibición para el control de calidad definidos por el CLSI son válidos sólo cuando se realiza el método de susceptibilidad de acuerdo a los estándares de referencia del CLSI.

4.6.1.1. Escherichia coli ATCC® 25922.

- Betalactamasa negativa.
- Se indica en el Control de Calidad Interno de agentes antimicrobianos.
- Utilizados en bacterias Gram negativas no fastidiosas.
- En Acinetobacter spp. para el control de trimethoprim-sulfametoxazol y tetraciclina.
- Control negativo en pruebas de screening y confirmatorio de BLEE.

4.6.1.2. Klebsiella pneumoniae ATCC® 700603.

- Productora de betalactamasa de espectro extendido tipo SHV-18 (BLEE).
- Control positivo de pruebas screening y confirmatorias de BLEE.

4.6.1.3. Klebsiella pneumoniae ATCC®BAA-1705

- Cepa productora de carbapenemasa tipo KPC+.
- Usada como control positivo para pruebas de screening y confirmatorio de producción de carbapenemasas (Prueba de Hodge).

4.6.1.4. Klebsiella pneumoniae ATCC® BAA-1706

- Cepa resistente a carbapenémicos por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.
- Usada como control negativo para pruebas de screening y confirmatorio de producción de carbapenemasas (Prueba de Hodge).

4.6.2. Medio de cultivo: Agar Mueller-Hinton. Debe tener una altura de 3,5 - 4,5 mm, pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Verificar ausencia de humedad antes de usar las placas. Controlar esterilidad con un 5% de las placas preparadas en la estufa de 24 a 48 horas a 35ºC.

4.6.3. Inóculo. La turbidez de la suspensión bacteriana a inocular en el medio de cultivo, debe tener una densidad correspondiente a 0,5 Mac Farland.

4.6.4. Discos de antimicrobianos. El número de discos a utilizar puede variar dependiendo del tipo de bacteria, entre un máximo de 12 discos en pacas de 150 mm o 6 discos en placas de 100mm. Utilizar sólo discos que se encuentren dentro de su periodo de vigencia. Conservarlos libres de humedad. Almacenar congelados a -20ºC.

4.6.5. Equipamiento. Los equipos utilizados deben estar incluidos en un programa de mantención preventiva y el laboratorio debe mantener registros de las mismas, así como de los eventos de reparación, calibración y mantención por los usuarios.

4.6.6. Incubación de placas y lectura. Incubar en atmósfera normal a 35 ± 2°C. Tiempo de incubación de 18 a 24 horas, dependiendo del agente bacteriano probado. La medida de punto final está dada por la lectura de los halos de inhibición. Utilizar luz reflejada con fondo oscuro. Cuantificar y registrar los halos de inhibición en milímetros.

4.7. Recomendaciones del CLSI (2017) para el control de calidad en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son:

- Atención cuidadosa al mantenimiento del organismo (ejemplo: subcultivos mínimos) el almacenamiento (-60ºC o menos) es especialmente importante para estas cepas de Control

de Calidad porque se ha documentado la pérdida espontánea del plásmido que codifica las betalactamasas. Si se almacenan a temperaturas superiores a -60ºC o si se subcultivan repetidamente, estas cepas pueden perder sus características de resistencia y los resultados de Control de Calidad pueden estar fuera de los rangos aceptables.

- Para confirmar la integridad de la cepa de Control de Calidad, probar uno de los agentes betalactámicos individuales resaltados en naranja en Tablas 4A-2 y 5A-2 del documento M100 del CLSI por difusión en disco o prueba MIC, cuando la cepa se subcultiva por primera vez de un cultivo madre congelado o liofilizado. Los resultados dentro del rango para el agente individual indican que la cepa de Control de Calidad es confiable para Control de calidad de agentes resistentes a betalactámicos. No es necesario volver a verificar la cepa Control de Calidad con un solo agente hasta que se ponga en uso un nuevo cultivo estándar congelado o liofilizado.
- ATCC es una marca registrada de American Type Culture Collection. Según la convención de ATCC, el símbolo de marca comercial se usa después de "BAA" en cada número de catálogo, junto con el nombre registrado de ATCC.
- La difusión del disco y los puntos finales MIC deben ser fáciles de leer, ya que una reducción del 80% o más en el crecimiento del medio tiene niveles aceptables de timidina.
- Puede desarrollar resistencia a los agentes antimicrobianos Betalactámicos después de repetidos subcultivos. Minimice este riesgo subcultivando desde un cultivo de reserva congelado o liofilizado al menos mensualmente o cada vez que la cepa demuestre resultados fuera del rango aceptable.

5. Materiales y Métodos

Tipo de estudio

El presente estudio fue de tipo descriptivo y de corte transversal.

Área de Estudio

El estudio se realizó en el Hospital Isidro Ayora de la ciudad de Loja, ubicado en las calles: Avenida Iberoamericana y J.J. Samaniego perteneciente al barrio El Pedestal, parroquia Sucre; de la ciudad de Loja, provincia Loja- Ecuador.

Universo

El universo estuvo conformado por 340 muestras de orina sembradas de usuarios que acudieron al laboratorio del Hospital Isidro Ayora de la ciudad de Loja a realizarse urocultivos bajo solicitud médica durante el período 21 diciembre 2016 – 30 abril 2017, dato aproximado proporcionado por el encargado del laboratorio clínico de dicha institución tomando en cuenta que llegan de 60 a 80 muestras de urocultivos mensuales.

Muestra

El presente estudio se trató de un tamizaje por lo cual se tomaron todas las muestras con pedido de urocultivo que constaron de 591 muestras de orina, a todas se les aplicó los criterios de inclusión, exclusión y eliminación quedando 381 muestras sembradas durante el período 21 diciembre 2017 – 30 abril 2018, de las cuales 225 tuvieron crecimiento bacteriano y 156 sin crecimiento bacteriano.

Cálculo

Se determinó el tamaño de la muestra utilizando la siguiente fórmula:

Dónde:

n= tamaño de la muestra

N= 340 muestras de orina sembradas

$Z\alpha$ = 2,33 Nivel de confianza del 99%

p: 0,5

q= 0,5

e= error seleccionado de 1% = 0.01

$$n = \frac{Z_\alpha^2 \ N \ \times p \ \times q}{e^2(N-1) \ + \ Z_\alpha^2 \times p \ \times q}$$

$$n = \frac{2{,}33^2 \ \ 340 \times 0{,}5 \ \times 0{,}5}{0{,}01^2(339) \ + \ 2{,}33^2 \ \times 0{,}5 \ \times 0{,}5}$$

$$n = \frac{5{,}4228 \times \ 340 \ \times 0.25}{0{,}0001 \times (339) + \ 5{,}4228 \times 0.25}$$

$$n = \frac{460{,}938}{0{,}0339 + \ 1{,}3557}$$

$$n = \frac{460{,}938}{1{,}3896}$$

$$n = 332$$

De acuerdo al cálculo aplicado el tamaño mínimo de la muestra es de 332 para que los resultados sean estadísticamente significativos.

Criterios de Inclusión:

1. Pacientes con solicitud de urocultivo
2. Cultivos primarios con crecimiento ≥ 1000 UFC/ml (pacientes inmunodeprimidos, síndrome uretral femenino, punción suprapúbica o renal percutánea) o ≥ 100000 UFC/ml (pacientes inmunocompetentes).

Criterios de exclusión:

1. Pacientes que hayan recibido terapia antibiótica por lo menos 7 días antes.
2. Muestras que no cumplan con los criterios de obtención y transporte.

3. Pacientes que ya hayan sido muestreados durante este estudio (no pueden haber dos muestras de un mismo paciente, genera sesgo de muestreo).

Criterios de eliminación:

1. Muestras con espermatozoides, sangre de origen menstrual o secreción vaginal.
2. Más de dos patógenos aislados.

Aspectos bioéticos.

Oficio de autorización para el desarrollo de investigación por parte del Subdirector de docencia e investigación del Hospital Isidro Ayora (Anexo 1).

Se les informó a los pacientes que participaron en el estudio el procedimiento que se iba a realizar, respondiendo a sus inquietudes, y procediendo a la firma de un formulario de consentimiento informado (Anexo 2).

En el formulario se explicó en forma detallada en qué consistía el estudio, su procedimiento, y el propósito. Con una absoluta confidencialidad de la información (Anexo 3).

Métodos, técnicas y procedimientos

- **Fase pre-analítica:**
    - Elaboración y aplicación de trípticos en el cual se indica a los médicos la manera en la que ellos deben informar a sus pacientes cómo tomar y transportar la muestra de orina al laboratorio en el caso de pacientes ambulatorios (Anexo 4), o la forma como los responsables deben hacer el traslado si es un paciente hospitalizado (Anexo 5).
    - Elaboración de protocolo de transporte de muestras (Anexo 6).
    - Elaboración de protocolos y registros de información (Anexo 7).

Control de calidad

Se consideró como control negativo, cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 BLEE (-) (Anexo 8) y como control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 BLEE (+) (Anexo 9), el control de calidad de los discos empleados para los métodos de sinergia de disco, discos combinados, fue realizado usando cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, para el método de Inactivación de carbapenémicos se utilizó como control de calidad *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 como control positivo (Anexo 10) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706 como control negativo (Anexo 11), cumpliendo satisfactoriamente con los criterios establecidos por el CLSI.

Los medios de cultivo de Mueller Hinton y Agar Sangre utilizados para la realización de las pruebas fenotípicas y la resiembra, fueron adquiridos de una casa comercial con las características del documento M100 del CLSI (Anexo 12), por lo tanto eran medios con un control de calidad ya establecido y confiable. Los controles de calidad usados se manejaron con los mismos protocolos que se elaboraron para el manejo de las muestras de la presente investigación. Los resultados obtenidos al trabajar las cepas control (Anexo 13) fueron comparados con los insertos para validar las pruebas y siempre se obtuvo las características esperadas.

- **Fase analítica:**
  - Siembra de muestras recolectadas en los medios de crecimiento bacteriano apropiados para bacterias Gram negativas provenientes del tracto urinario (Anexo 14) (Figura 1 y 2).
  - Identificación bacteriana en un equipo automatizado basada en métodos bioquímicos establecidos y sustratos que miden utilización de la fuente de carbono, actividades enzimáticas y la resistencia (Anexo 15).

- Preparación de inóculos bacterianos con una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland e inoculación de cajas de Mueller Hinton (Figura 3 y 4).
- Identificación fenotípica de betalactamasas, aplicación de control de calidad y obtención de resultados (Anexo 16) (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)

- **Fase post-analítica:**
  - Validación de resultados.
  - En la fase post-analítica los datos obtenidos de cada análisis se almacenaron en una base de datos digital en Microsoft Excel 2013 (Anexo 17) y en documentos físicos que se mantienen en la computadora y archivador del proyecto en el Centro de Diagnóstico Médico, del cual se tabuló los datos para realizar este informe de tesis de acuerdo al tema que me corresponde.

Plan de tabulación y análisis de resultados

El programa estadístico para el procesamiento y análisis de datos fue Microsoft Excel 2013, el cual permitió interpretar los resultados en tablas de distribución de frecuencia en función de los objetivos establecidos.

6. Resultados

Tabla 1.

Bacterias aisladas en urocultivos de usuarios del Hospital "Isidro Ayora"

Bacterias aisladas	Frecuencia	Porcentaje
Klebsiella pneumoniae	**20**	**9%**
Klebsiella oxytoca	**2**	**1%**
Escherichia coli	**173**	**77%**
Proteus mirabilis	**10**	**4%**
Proteus penneri	**1**	**1%**
Pseudomona aeruginosa	**3**	**1%**
Serratia marcescens	**1**	**1%**
Enterobacter cloacae	**1**	**1%**
Otros géneros	**14**	**5%**
Total	**225**	**100%**

Autor: María del Cisne Cisneros Cuenca
Fuente: Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018

Interpretación: De los 225 urocultivos positivos se encontró en 173 (77%) muestras *Escherichia coli*, seguido por 20 (9%) muestras que corresponden a *Klebsiella pneumoniae*, catalogándose a estas dos bacterias como los agentes etiológicos de mayor importancia causantes de IVU, ver tabla 1.

Tabla 2.

Tipo de betalactamasas en relación a la especie de Klebsiella en usuarios del Hospital "Isidro Ayora"

Especies de *Klebsiella*	Tipos de betalactamasas							
	BLEE		Carbapenemasas		No expresa/Negativo		Total	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Klebsiella pneumoniae	7	35%	1	5%	12	60%	20	100%
Klebsiella oxytoca	0	0%	0	0%	2	100%	2	100%

Autor: *María del Cisne Cisneros Cuenca*
Fuente: *Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018*

Interpretación: El mecanismo de resistencia hallado con mayor frecuencia por *Klebsiella pneumoniae* fue la expresión de enzimas BLEE en 7 (35%) casos y 1 (5%) *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) producida por *Klebsiella pneumoniae*, el 100% de *Klebsiella oxytoca* no expresaron enzimas contra antibióticos betalactámicos, convirtiendo a *Klebsiella pneumoniae* en una bacteria médicamente más importante al momento de encontrar el agente causal de una IVU. La betalactamasa tipo AmpC fue estudiada en una muestra presuntiva de AmpC, sin embargo el resultado obtenido fue negativo por lo tanto la variable corresponde a cero en ambas especies de *Klebsiella*, ver tabla 2.

Tabla 3.

Distribución de betalactamasas expresadas por Klebsiella spp en relación al sexo de los usuarios del Hospital "Isidro Ayora"

	Sexo					
Betalactamasas	**Masculino**		**Femenino**		**Total**	
	Frecuencia	**Porcentaje**	**Frecuencia**	**Porcentaje**	**Frecuencia**	**Porcentaje**
BLEE	**4**	**57%**	**3**	**43%**	**7**	**100%**
Carbapenemasas	**1**	**100%**	**0**	**0%**	**1**	**100%**

Autor: *María del Cisne Cisneros Cuenca*
Fuente: *Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018*

Interpretación: Las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) expresadas por *Klebsiella pneumoniae* fueron más frecuentes en pacientes del sexo masculino con 4 (57%) casos, seguidos de 3 (43%) casos en pacientes de sexo femenino. Se encontró 1 (100%) probable carbapenemasa (KPC) en un paciente de sexo masculino. Conforme el hombre envejece la proporción de IVU tiende a aumentar, y en los resultados se ve reflejado que existe un vínculo entre edad y sexo pues la mayoría son personas de sexo masculino y de edad avanzada. La betalactamasa tipo AmpC fue estudiada en una muestra presuntiva de AmpC en un paciente de sexo masculino, sin embargo el resultado obtenido fue negativo por lo tanto la variable corresponde a cero, ver tabla 3.

Tabla 4.

Distribución de betalactamasas expresadas por Klebsiella spp en relación a la edad de los usuarios del Hospital "Isidro Ayora"

Edad	Betalactamasas					
	BLEE		Carbapenemasas		Total	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Adultos (20 a 59 años)	2	100%	0	0%	2	100%
Adulto Mayor (más de 60 años)	5	83%	1	17%	6	100%

Autor: *María del Cisne Cisneros Cuenca*
Fuente: *Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018*

Interpretación: La distribución de las betalactamasas expresadas por *Klebsiella pneumoniae* en relación a la edad de los usuarios fue más amplia en adultos mayores (>60 años) correspondiendo 5 (83%) BLEE y 1 (17%) probable carbapenemasa en este grupo etario, que indica la susceptibilidad de estos pacientes de edad avanzada para adquirir bacterias oportunistas, mientras que en adultos entre 20-59 años se halló 2 (100%) BLEE. Los grupos etarios correspondientes a neonatos (cero-28 días), lactantes (29 días-24meses), niños (25 meses a 9 años), adolescentes (10-19 años) fueron parte del estudio sin embargo no existieron datos, la betalactamasa tipo AmpC fue ensayada pero no se obtuvo un resultado positivo por lo tanto no se incluyeron estas variables en la tabla de resultados, ver tabla 4.

Tabla 5.

Distribución de betalactamasas expresadas por Klebsiella spp en relación a los servicios del Hospital "Isidro Ayora"

Servicio	Betalactamasas					
	BLEE		Carbapenemasas		Total	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Consulta externa	**4**	**100%**	**0**	**0%**	**4**	**100%**
Emergencia	**2**	**100%**	**0**	**0%**	**2**	**100%**
UCI	**0**	**0%**	**1**	**100%**	**1**	**100%**
Otros	**1**	**100%**	**0**	**0%**	**1**	**100%**

Autor: *María del Cisne Cisneros Cuenca*
Fuente: *Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas 2017-2018*

Interpretación: De acuerdo a los servicios hospitalarios, Consulta externa con 4 (100%) casos fue el servicio donde se aisló con mayor frecuencia *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE, observando que existe la aparición aumentada de cepas productoras de BLEE en el ambiente ambulatorio y puede tener relación al uso irresponsable de la terapia antibiótica. En UCI se encontró 1 (100%) probable *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasas, debido a la capacidad de esta bacteria de causar infecciones nosocomiales. Los servicios de Gineco-obstetricia, Neonatología y Cirugía fueron parte del estudio sin embargo no existieron datos, la betalactamasa tipo AmpC fue ensayada pero no se obtuvo un resultado positivo por lo tanto no se incluyeron estas variables en la tabla de resultados, ver tabla 5.

7. Discusión

Durante el periodo de estudio la especie de *Klebsiella* encontrada con mayor frecuencia fue *Klebsiella pneumoniae* con un 9% (20) siendo el segundo germen con mayor frecuencia de aislamiento de los 225 urocultivos positivos, confirmado con lo que se indica en la investigación titulada "*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario" realizada en el Hospital Iván Portuondo de Cuba en el período de estudio 2011-2013 de pacientes procedentes de consulta externa y hospitalizados con urocultivos positivos, los aislamientos de bacterias más frecuentes en las muestras recibidas fue la especie *Escherichia coli* con un total de 51 aislamientos, seguida de *Klebsiella pneumoniae* con 22 aislamientos considerando a estas dos como las especies más patógenas causantes de infecciones de vías urinarias (Argüez, 2015).

De las bacterias encontradas de *Klebsiella pneumoniae*, 7 (35%) fueron BLEE positivas, en tanto que 12 (60%) *Klebsiella pneumoniae* y 2 (100%) *Klebsiella oxytoca* no expresaron betalactamasas. En comparación con un estudio realizado en Colombia durante el periodo de septiembre 2014 – marzo 2015 fueron recolectadas 652 muestras bacteriológicas provenientes de cultivos de diferentes muestras biológicas (orinas, sangre, secreciones, líquidos corporales y heces) de pacientes de ambos sexos en un centro clínico de alta complejidad en la ciudad de Santa Marta, se aislaron un total de 60 cepas de *Klebsiella pneumoniae* de las cuales 18 (100%) correspondieron a la especie *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE, de estas 3 (17%) provienen de muestras de orina de pacientes con infección urinaria (López et al., 2015). Aunque se trata de poblaciones diferentes se aprecia que este es un patógeno que causa un problema epidemiológico creciente ya que estas enzimas son una de las causantes de graves infecciones nosocomiales debido a que los genes que las codifican son transferidos de una bacteria a otra.

En una investigación realizada en 123 pacientes con infección del tracto urinario en el Hospital Militar Central de Lima de febrero-noviembre 2017 (De la Cruz, 2018), se encontró *Klebsiella* mayormente BLEE negativo con unos 10 casos (12,2%) y BLEE positivo en 2 casos (4,9%). 87 fue de sexo femenino (70,7%), de los cuales 25 tuvo BLEE positivo y 62 tuvo BLEE negativo. 36 fue de sexo masculino (29,3%), de los cuales 16 tuvo BLEE positivo y 20 tuvo BLEE negativo. En este estudio las mujeres tienen 43% (3) *Klebsiella pneumoniae* BLEE positivo y los hombres tienen 57% (4) *Klebsiella pneumoniae* BLEE positivo; se ha descubierto que la epidemiología de estas infecciones difiere entre los tipos de bacterias existiendo más infecciones por *Klebsiella spp* en el sexo masculino (Tejada et al., 2015), esto se comprueba con los resultados aquí expresados, y con la presencia de una probable KPC en un paciente de sexo masculino.

Al agrupar las muestras por edad, el grupo etario mayormente afectado en el que las enterobacterias expresaron BLEE fueron los adultos mayores, personas mayores a 60 años con 83% (5), hay resultados diferentes en el estudio "Caracterización clínico y epidemiológica en pacientes con infección por Enterobacteriaceae productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en Tegucigalpa, Honduras" de junio-agosto del año 2013 (Pineda et al., 2017) en el que la etapa de vida de mayor frecuencia en el que se aisló enterobacterias productoras de BLEE fue adultos con un 38% seguido por adultos mayores con un 20%. Sin embargo hay que tener en cuenta que *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista que afecta sobre todo a personas en las edades extremas de la vida.

En un estudio en un Centro particular de salud en Perú en el periodo marzo-agosto de 2012 (Tejada et al., 2015) en pacientes de consulta externa y hospitalizados se aislaron enterobacterias productoras de BLEE en donde *Klebsiella spp*. tuvo 20% de frecuencia, las cepas fueron halladas predominantemente en las muestras de pacientes ambulatorios (91.5%) frente a los bacilos en muestras de pacientes hospitalizados (8.5%). En la presente

investigación la mayoría de los casos también fueron del servicio de Consulta Externa con 4 casos (100%). De esta manera, se evidencia una alta prevalencia de este tipo de infecciones en consultas externas, lo que permitiría una mayor transferencia de material genético que amplía la prevalencia de BLEE entre microorganismos infecciosos.

La resistencia a los carbapenémicos es poco común, y en este estudio se lo evidenció, sin embargo existió una muestra de *Klebsiella pneumoniae* resistente a todos los antibióticos ensayados en el antibiograma, y en la confirmación fenotípica de una posible carbapenemasa dio positivo en los métodos realizados para esto, sinergia de discos, discos combinados con inhibidor y la inactivación de carbapenemasas. *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC representa un patógeno emergente con elevada capacidad de diseminación nosocomial y como afirmación de esto vemos que este caso se situó en el servicio de la Unidad de Cuidados intensivos en un paciente de sexo masculino y de edad avanzada (98 años), ya que precisamente aquellos en ser más susceptibles a adquirirla son personas con internación prolongada como aquellos que están en UCI y son pacientes críticos, otro factor de riesgo es la edad avanzada, en contraste con un estudio realizado en Argentina en un Hospital Universitario de Buenos Aires (Echavarría et al., 2017) que durante un período de un año en el 2015 se documentaron 27 casos de infección por KPC, los servicios de los pacientes en el momento del diagnóstico de infección por KPC fueron: sala de cirugía general: 8, clínica médica: 6, UCI: 5, sala de emergencia: 4 y otros: 4. Todos los casos tuvieron contacto previo con pacientes con colonización de KPC, por lo que hubo un brote significativo en dicho Hospital y para lo cual tomaron medidas como el aumento de la limpieza ambiental, cultivos de vigilancia, precauciones de contacto y uso prudente de antimicrobianos.

En la presente investigación no existió aislamientos de *Klebsiella spp* productora de betalactamasas tipo AmpC. En un estudio que contó con 325 urocultivos realizados entre

septiembre y diciembre de 2012 en el servicio de microbiología de un laboratorio privado de la ciudad de Lima, Perú (Galván, Agapito, Bravo, Lagos y Tamariz, 2016), 53 fueron confirmados como productores de BLEE, y una muestra presuntiva de AmpC al ser procesada con los métodos fenotípicos para la determinación de AmpC fue negativa en un 100%.

Se estima que este estudio puede proporcionar información epidemiológica y clínica relevante en los pacientes infectados por bacterias productoras de BLEE, Carbapenemasas o AmpC haciendo identificar más rápidamente a los pacientes en riesgo. Así mismo, teniendo en cuenta la falta de estudios relacionados con el tema, esta investigación puede servir de base para posteriores trabajos.

8. Conclusiones

- Se identificó dos especies de bacterias del género *Klebsiella: Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca,* únicamente *Klebsiella pneumoniae* fue productora de betalactamasas.
- Los tipos de betalactamasas que expresó *Klebsiella pneumoniae* fueron BLEE y una probable Carbapenemasa. *Klebsiella oxytoca* no presentó ningún mecanismo de resistencia.
- La distribución de *Klebsiella pneumoniae* BLEE positivas en los pacientes del Hospital "Isidro Ayora" fue mayor en el sexo masculino, para carbapenemasas existió mayor frecuencia en hombres. La edad con más proporción de *Klebsiella pneumoniae* BLEE positiva fueron los adultos mayores, la edad en la que una bacteria causante de IVU expresó una probable KPC fue en adultos mayores, en los demás grupos etarios no se encontraron *Klebsiella spp* causantes de infecciones de vías urinarias. El tipo de servicio hospitalario que obtuvo la mayor presencia de BLEE fue el área de consulta externa. El servicio en el que se identificó fenotípicamente la enzima KPC fue UCI.

9. Recomendaciones

- A los participantes del Proyecto "Caracterización molecular de betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y SOLCA de Loja" del cual es parte la presente investigación, realizar la identificación genotípica a las cepas productoras de betalactamasas de los usuarios para que estos datos puedan ser distribuidos a los pacientes participantes del estudio.
- Al jefe del Laboratorio Clínico del Hospital Isidro Ayora hacer la respectiva comunicación de los resultados fenotípicos a los usuarios que brindaron su consentimiento para la realización de los análisis a los cuales fueron sometidas sus muestras cumpliendo con el acuerdo al que se llegó entre ambas partes y al departamento de estadística de dicha institución para que los resultados de esta investigación se encuentren disponibles como datos epidemiológicos para la población.
- Se recomienda a los analistas y todos aquellos profesionales que realizan cultivos y antibiogramas de la ciudad de Loja, conozcan a través de estos resultados los gérmenes locales y los patrones de resistencia a antimicrobianos que estos presentan para brindarle así la mejor opción analítica a sus usuarios.

10. Bibliografía

Abarca, G. y Herrera, L. (2011). Betalactamasas su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista médica del Hospital Nacional de niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 1-2. Recuperado de: https://bit.ly/2MQEtLm

Araya, I., Prat, S. y Ramírez, V. (2015). Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología. *Instituto de Salud Pública Ministerio de Salud de Chile*, 3-9. Recuperado de: https://bit.ly/2M2xwSg

Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M. y Torres, C. (2011). *Deteccion Fenotipica de Mecanismos de Resistencia en Gram Negativos*. Recuperado de: https://bit.ly/2NXxZqQ

Argüez, R. (2015). *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en pacientes con infección del tracto urinario. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*, 1-2. Recuperado de: https://bit.ly/2wNnsI4

Bou, G., Chávez, F., Oliver, A. y Jesús, O. (2015). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Recuperado de: https://bit.ly/2CoioiH

Bush, K. y Jacoby, G. (2010). Updated Functional Classification of βLactamases. *Antimicrobl Agents Chemother*, 969-976. doi: 10.1128 / AAC.01009-09

Calderón, E., Casanova, G., Galindo, A., Gutiérrez, P., Landa, S., Moreno, S., Rodríguez, F., Simón, L., Vázquez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Scielo*, 1665. Recuperado de: https://bit.ly/2JIIGen

Cantón, R., Alós, J., Baquero, F., Calvo, J., Campos, J., Castillo, J., Cercenado, E., Domínguez, M., Liñares, J., López, L., Marco, F., Mirelis, B., Morosini, M., Navarro, F., Oliver, A., Pérez, E., Torres, C. (2007). Recomendaciones para la selección de

antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad in vitro con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enfermedades infecciosas de microbiología clínica*. doi: 10.1157/13106965

Cantón, R., Morosoni, M., De la Maza, O. y De la Pedrosa, E. (2008). IRT and CTM betalactamases and inhibitor resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 53-62. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01849.x

Carmeli, Y., Akova, M., Cornaglia, G., Daikos, G., Garau, J., Harbarth, S., Rossolini, G., Souli, M., Giamarellou, H. (2010). Controlling the spread of carbapenemase-producing Gramnegatives: therapeutic approach and infection control. *Clinical Microbiology and Infection*, 102-111. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03115.x

Casellos, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina. *Revista Panamericana de la salud*, 2-4. Recuperado: https://bit.ly/2NTMXxS

CLSI. (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Recuperado de: https://bit.ly/2NSmtge

Cortés, A., Rivera, C., Montalegre, A., Heinz, K., Puentes, N. y Bayona, M. (2011). Resistencia antibiótica de los gérmenes productores de infección urinaria en el servicio de pediatría del HUHMP. *Revista Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana*, 17-21. doi: 10.25054/rfs.v3i2.71

De la Cruz, C. (2018). Factores asociados a la presencia de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes con infección del tracto urinario en el Hospital Militar Central de febrero-noviembre de 2017. *Repositorio Universidad Ricardo Palma*, 26-37. Recuperado de: https://bit.ly/2NSzK8C

De María, V. (2017). Guía práctica para la estandarización del procesamiento y examen de las muestras de orina. *Biorad*, 11-15. Recuperado de: https://bit.ly/2sH34WW

Díaz, Á. y Hernández, R. (2008). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicentrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 503-510. doi: 10.1016/j.eimc.2008.09.006

Díaz, K. y López, K. (2015). Caracterización molecular mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infecciones urinarias intrahospitalarias. *Repositorio Dspace*, 10-11. doi: 10.24265/horizmed

Echavarría, G., Guevara, D., Bertona, E., De Paulis, A., Predari, S. y Benchetrit, G. (2017). Colonización por Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo KPC en un hospital universitario. *Medicina (Buenos Aires)*, 25- 50. Recuperado de: https://bit.ly/2MP6HGx

Echeverri, L. y Cataño, J. (2010). Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: *IATREIA*, 240-249. Recuperado de: https://bit.ly/2PIJYZv

Echeverría, J., Sarmiento, E. y Osores, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *SCIELO Perú*, 1-2. Recuperado de: https://bit.ly/2CplV07

EUCAST. (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. *Europe Society of clinical microbiology and infectious diseases*, 4. Recuperado de: https://bit.ly/2wORgEh

García, T., Castillo, A. y Salazar, D. (2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Revista Cubana Salud Pública*, 40. Recuperado de: https://bit.ly/2Q9ArM4

González, A., Nieves, B., Solorzano, M., Cruz, J., Puig, J. y Moreno, M. (2013). Caracterización de cepas de Klebsiella pneumoniae productora de betalactamasa de

expectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Revista Chilena Infectol*, 374 - 380. doi: 10.4067/S0716-10182013000400004

González, E. (2015). *Infecciones del Tracto Urinario.* Recuperado de: https://bit.ly/2oAAROS

Grabe, M., Bjerklund, T. y Botto, H. (2010). Guía clínica sobre las infecciones urológicas. *European Association of Urology* , 1296-1298. Recuperado de: https://bit.ly/2Cpjj23

Guamán, J. (2013). Resistencia bacteriana por producción de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias en pacientes del Hospital Vicente Corral Moscoso. *NN*, 10-20. Recuperado de: https://bit.ly/2NTXtoQ

Hirsch, E., y Tam, V. (2010). Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*, 1119-1125. doi: 10.1093/jac/dkq108

Iñíguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Goméz, D., y Maldonado, L. (2012). *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC:2 primer reporte en el Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 39-41. Recuperado de: https://bit.ly/2PGO3xm

Jacoby, G. (2009). AmpC betalactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 161-182. doi: 10.1128/CMR.00036-08.

Jawetz. (2010). *Microbiología Médica.* México, DF: McGraw-Hill Companies.

Keren, I. (2012). Klebsiella oxytoca. *Microbial Biorealm*, 2-4. Recuperado de: https://bit.ly/2M4PlQz

Lifshitz, A., Arredondo, J., Amábile, A., & Pacheco, C. (2010). Diagnóstico y tratamiento antibacteriano de infección de vías urinarias. *Guías mappa*, 13-14. Recuperado de: https://bit.ly/2CsDRa8

Livermore, D. (2008). Defining an extended-spectrum βlactamase. *Clin Microbiol Infect*, 3-10. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01857.x

Lopardo, D. (2015). Recuperado de: https://bit.ly/2oGpgy4

López, M., Barcenilla, G., y Amaya, R. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*, 5-8. Recuperado de: https://bit.ly/2wO7Cgk

López, M., Guete, C., y Ospina, J. (2015). Detección de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en un centro clínico de alta complejidad en Santa Marta Colombia. *Revista Biosalud*, 63-70. doi: 10.17151/biosa.2015.14.2.6

Maza, C., y Clavijo, M. (2016). Detección de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas aisladas de muestras de orina de pacientes con infección del tracto urinario del Hospital Vicente Corral Moscoso. *Universidad de Cuenca*, 60-61. Recuperado de: https://bit.ly/2NVut06

Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C., Gniadkowski, M., Malamou, E., Martinez, L., Navarro, F., Nordmann, P., Peixe, L., Pournaras, S., Rossolini, G., Tsakris, A., Vatopoulos, A., Cantón, R. (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*, 112-122. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x

Morejón, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista cubana de Medicina*, 2-6. Recuperado de: https://bit.ly/2M47yxT

Moreno, C., González, R. y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios . *Revista de otorrinolaringología*, 185-192. doi: 10.4067/S0718-48162009000200014

Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica.* España: Elsevier.

Navarro, F., Calvo, J. C. y Fernandez, F. M. (2011). Detección Fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gram negativos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica,* 24-34. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.011

OMS. (2015). Resistencia antibacteriana. *Paho*. Recuperado de: https://bit.ly/2oNyHvK

Peña, A. (2013). Perfil etiológico y susceptibilidad antimicrobiana del primer episodio de infección urinaria febril. *Revista chilena de infectología*, 716-1018. doi: 10.4067/S0716-10182013000500002

Pineda, L., Herrera, M. y Rivera, M. (2017). Caracterización clínico y epidemiológica en pacientes con infección por Enterobacteriacea productoras de BLEE. *Revista de Ciencias*, 20-30. doi: 10.5377/rct.v0i20.5495

Podschun, R., & Ullmann, U. (2010). Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *American Society for Microbiology*, 20-24. Recuperado de: https://bit.ly/2wOpfM5

Puertas, A. y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10-31. Recuperado de: https://bit.ly/YoWnYb

Rocaro, D. (2016). Agentes etiológicos de infecciones urinarias en adultos mayores de un centro de salud del estado Carabobo, Venezuela. *Scielo*, 1-4. Recuperado de: https://bit.ly/2MVSgQT

Rodriguez, T. (2013). *Cursep*. Recuperado de: https://bit.ly/2Q5umjQ

Romero, S., Salazar, M., Morales, M. y Rojas, M. (2011). Presencia de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas de casos de infección nosocomial. *Ciencia Ergo*, 5. Recuperado de: https://bit.ly/2M4HH8Q

Ryan, K. y Ray, C. (2004). *Sherris Medical Microbiology.* Mexico: McGraw Hill.

Santambrosio, E. (2009). *Universidad Tecnologica Nacional* . Recuperado de: https://bit.ly/2nK6Dve

SEIMC. (2015). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Recuperado de: https://bit.ly/2CrSB9i

Tafur, J., Torres, J. y Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Centro Internacional de Investigaciones médicas*, 217-219. Recuperado: https://bit.ly/2s82QqK

Tejada, P., Huarcaya, J., Melgarejo, G., Gonzales, L., Cahuana, J., Pari, R., Bohorquez, H., Chacaltana, J. (2015). Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Scielo Perú*, 25-60. doi: 10.15381/anales.v76i2.11143

Valera, R. (2015). Casos Microbiología clínica. *UMH*, 20-25.

Velásquez, J. (2013). Klebsiella pneumoniae resistente a los carbapenemes. *Rev Soc Peru Med Interna*, 193-196. Recuperado de: https://bit.ly/2MSO8kx

Vignoli, R., & Seija, V. (2010). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas de bacteriología y virología médica*, 650-651. Recuperado de: https://bit.ly/2Q3H2Ie

11. Anexos

ANEXO 1

OFICIO DE AUTORIZACIÓN PARA DESARROLLO DE PROYECTO

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. Lcdo. 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 Lcda. 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 Alfredo Pacheco Montoya
SUBDIRECTOR DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENER MUESTRA DE ORINA QUE SE SOMETERÁ A ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MOLECULAR PARA AISLAR BETALACTAMASAS EN EL HOSPITAL SOLCA DE LOJA Y HOSPITAL ISIDRO AYORA

Historia Clínica…….. Número de cédula…….

Fecha: …… Hora:…….

APELLIDO PATERNO	**APELLIDO MATERNO**	**NOMBRES**	
ESTADO CIVIL	**NACIONALIDAD**	**DOMICILIO**	**EDAD**

¿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 del Hospital “Isidro Ayora” o 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 crecieran 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.

EFECTOS 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.

Nombre del paciente	**Firma del paciente**

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

Nombre completo del paciente	**Cédula de ciudadanía**	**Nombre del investigador**

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.

Nombre completo del paciente	**Cédula de ciudadanía**	**Nombre del investigador**

ANEXO 3

FORMULARIO

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 SOLCA LOJA Y HOSPITAL ISIDRO AYORA

Hospital			Servicio			
Edad			Género			
Profesión			Procedencia			
Tipo de muestra			Hospitalizado	Si	No	
Sondas, catéteres			Hora de llegada al laboratorio			
Hora de la toma de muestra						
¿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 4

TRÍPTICOS PACIENTES CONSULTA EXTERNA

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 transladar 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

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

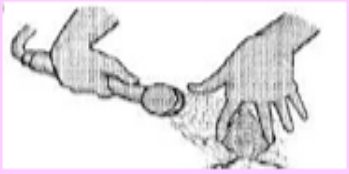
MUJERES

- ✓ Recoger la primera orina de la mañana, 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

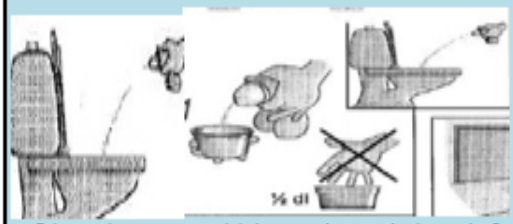
- ✓ Recoger la primera orina de la mañana, en caso de emergencia con una retención mínima de 4 horas.
- ✓ Utilizar frasco estéril de tapón de rosca

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, continué 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 5

TRÍPTICO PACIENTES HOSPITALIZADOS

TOMA DE MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES HOSPITALIZADOS

A. ORINA OBTENIDA A TRAVÉS DE CATETERISMO TRANSURETRAL

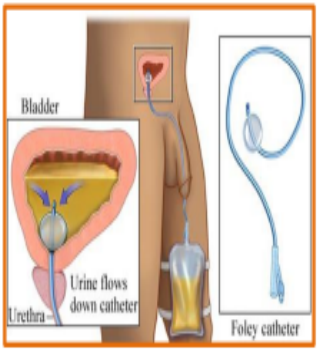
TÉCNICA DE RECOLECCIÓN: Realizar higiene de genitales con guantes no estériles. Eliminar la primera porción de orina obtenida, colectar la siguiente porción de orina (5-10 mL) en el frasco estéril, retirar la sonda y tapar el frasco

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 colectora.*

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 6

PROTOCOLO DE TRANSPORTE DE MUESTRA

1. Introducción

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 (Rodríguez, 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 de 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 un resistencia BLEE, procedemos a tomar un medio de 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.

6.2 Transporte del Hospital SOLCA:

6.2.1 Luego de la recepción de las muestra a cada una se la sembrara en un medio de cultivo Agar Sangre previamente rotulado con el código del paciente.

6.2.2 Los medios se guardaran en el cooler hermético y serán transportados al Hospital Isidro Ayora para ser analizado en el Equipo VITEK 2 para la identificación de la bacteria.

6.2.3 En el caso de que el urocultivo nos dé como resultado sospechoso resistencia de BLEE procedemos a tomar un medio de transporte Stuart retiramos el hisopo y recolectamos dos colonias representativas del cultivo para llevar a confirmar BLEE.

6.2.4 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

ELABORADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
Andrea del Cisne Quezada López	Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta

ANEXO 7

FORMATO DE REGISTRO DE LABORATORIO HOSPITAL ISIDRO AYORA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 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 IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	CÓDIGO: RG001 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 22-11-2017 PÁGINA: 1/1

FORMATO DE REGISTRO DE LABORATORIO

FECHA DD/MM/AA	CODIGO	PROVENIENCIA							SEXO		EDAD	BACTERIA AISLADA	PERFIL DE SUSEPTIBILIDAD																		OTRO	OBSERVACIONES
		Consulta externa	Hospitalización						Masculino	Femenino			AN	AM	SAM	CF	FEP	CTX	CAZ	CRO	CXM	CIP	ETP	ESB	FOS	GM	MEM	FT	NOR	SXT		
			EME	UCI	GIN	NEO	CRG	OTROS																								

EME: Emergencia; **UCI**: unidad de cuidados intensivos; **GIN**: ginecología; **NEO:** neonatología; **CRG**: Cirugía.; **S:** sensible; **R:** resistente; **AN:** amikacina; **AM:** ampicilina; **SAM:** ampicilina/sulbactam; **CF**: cefalotina; **FEP:** cefepime; **CTX:** cefotaxime; **CAZ:** ceftazidime; **CRO:** ceftriaxona; **CXM:**cefuroxime; **CIP:** criprofloxacina; **ETP:** ertapenem; **ESB:** ESBL; **FOS:** fosfomicina; **GM:** gentamicina; **MEM:** meropenem: **FT:** nitrofurantoina; **NOR:**norfloxacina; **SXT:** Trimetropim/ sulfametoxazol.

Nota:

- **Presuntivas de expresar BLEE:** Que tengan una CMI de ≥ a 1 ug/ml de ceftazidime, aztreonam o ceftriaxona.
- **Presuntivas de expresar AmpC:** Que tengan disminución de sensibilidad o resistencia a cefotaxima con una CIM ≥ 1 ug / ml y la R a cefoxitina, son resistentes también a los inhibidores de betalactamasas.
  - **Presuntivas de expresar carbapenemasas:** En el caso de Enterobacterias: CMI de ≥ a 1 ug/ml para meropenem, ≥ 2 ug/ml de imipenem. En el caso de Acinetobacter una CIM de ≥ 4 ug/ ml para imipenem
  - En el caso de Pseudomona aeruginosa se usarán puntos de corte de ceftazidime ≥16 ug/ml, ≥ a 1 ug/ml para meropenem, ≥2 ug/ml de imipenem.

ANEXO 8

INSERTO CEPA ESCHERICHIA COLI ATCC 25922

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Escherichia coli **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

Performance

Macroscopic Features:	Medium:
2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Gram negative straight rod	Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF	Other Features/ Challenges: Results
See attached ID System results document.	(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

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.

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.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative®

(*) 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.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

MEDIBAC-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

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)	**High consistency:** 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)	**Low consistency:** 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)	**No consistency:** 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-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

ANEXO 9

INSERTO CEPA KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC 700603

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae **Catalog Number:** 0784 **Lot Number:** 784-49 **Reference Number:** ATCC® 700603™* **Purity:** Pure **Passage from Reference:** 3	**Expiration Date:** 2018/10/31 **Release Information:** **Quality Control Technologist:** Tracy A Blenker **Release Date:** 2016/12/6

Performance

Macroscopic Features:	Medium:
Two colony types possible: Large, circular, convex, entire edge, gray, glistening. Large, circular, convex, entire edge, cream / off white, mucoid, glistening.	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Gram negative short, plump, straight rod.	Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF	Other Features/ Challenges: Results
See attached ID System results document.	(1) Oxidase (Kovacs): negative (1) Ceftazidime (30 mcg - Disk Susceptibility): 10 - 18 mm (1) Ceftazidime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): >/=5 mm CAZ zone (1) Cefotaxime (30 mcg - Disk Susceptibility): 17 - 25 mm (1) Cefotaxime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): >/= 3 mm CTX zone

Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE

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.

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.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative

(*) 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.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

A2LA ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

MEDIBAC-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

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	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A – C)

Category	Description
A	**Species Consistency:** 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	**Genus Consistency:** 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	**No Consistency:** 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
F8(++) (A)	784-49	Klebsiella pneumoniae	2.184

Comments:

N/A

MEDIBAC-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

ANEXO 10

INSERTO CEPA KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC BAA 1705

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications **Microorganism Name:** Klebsiella pneumoniae **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

Performance

Macroscopic Features:	**Medium:**
Large, circular, convex, entire edge, light gray, glistening and mucoid. A second type that is flatter and less mucoid may be seen.	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Short, broad, straight, gram negative bacilli with rounded ends.	Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF	**Other Features/ Challenges: Results**
See attached ID System results document.	(1) Oxidase (Kovacs): negative Modified Hodge Test: positive

Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE

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.

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.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative

(*) 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.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

MEDIBAC-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

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)	**High consistency:** 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)	**Low consistency:** 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)	**No consistency:** 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	Klebsiella pneumoniae	2.36

Comments:

N/A

MEDIBAC-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

ANEXO 11

INSERTO CEPA KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC BAA 1706

Microbiologics®

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications	
Microorganism Name: Klebsiella pneumoniae **Catalog Number:** 01006 **Lot Number:** 1006-20 **Reference Number:** ATCC® BAA-1706™* **Purity:** Pure **Passage from Reference:** 3	**Expiration Date:** 2019/1/31 **Release Information:** **Quality Control Technologist:** Carol J Stanoch **Release Date:** 2017/3/23

Performance

Macroscopic Features:	Medium:
Large (size may vary), circular, convex, entire edge, pale gray, glistening and mucoid.	SBAP
Microscopic Features:	**Method:**
Gram negative straight bacilli from coccobacillary to long forms present.	Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF	Other Features/ Challenges: Results
See attached ID System results document.	(1) Oxidase (Kovacs): negative Modified Hodge Test: negative

Amanda Kuperus
Quality Control Manager
AUTHORIZED SIGNATURE

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.

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.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

ATCC Licensed Derivative *

(*) 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.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

ACCREDITED
TESTING CERT #2655.01

MEDIBAC-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

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)	**High consistency:** 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)	**Low consistency:** 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)	**No consistency:** 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	Klebsiella pneumoniae	2.45

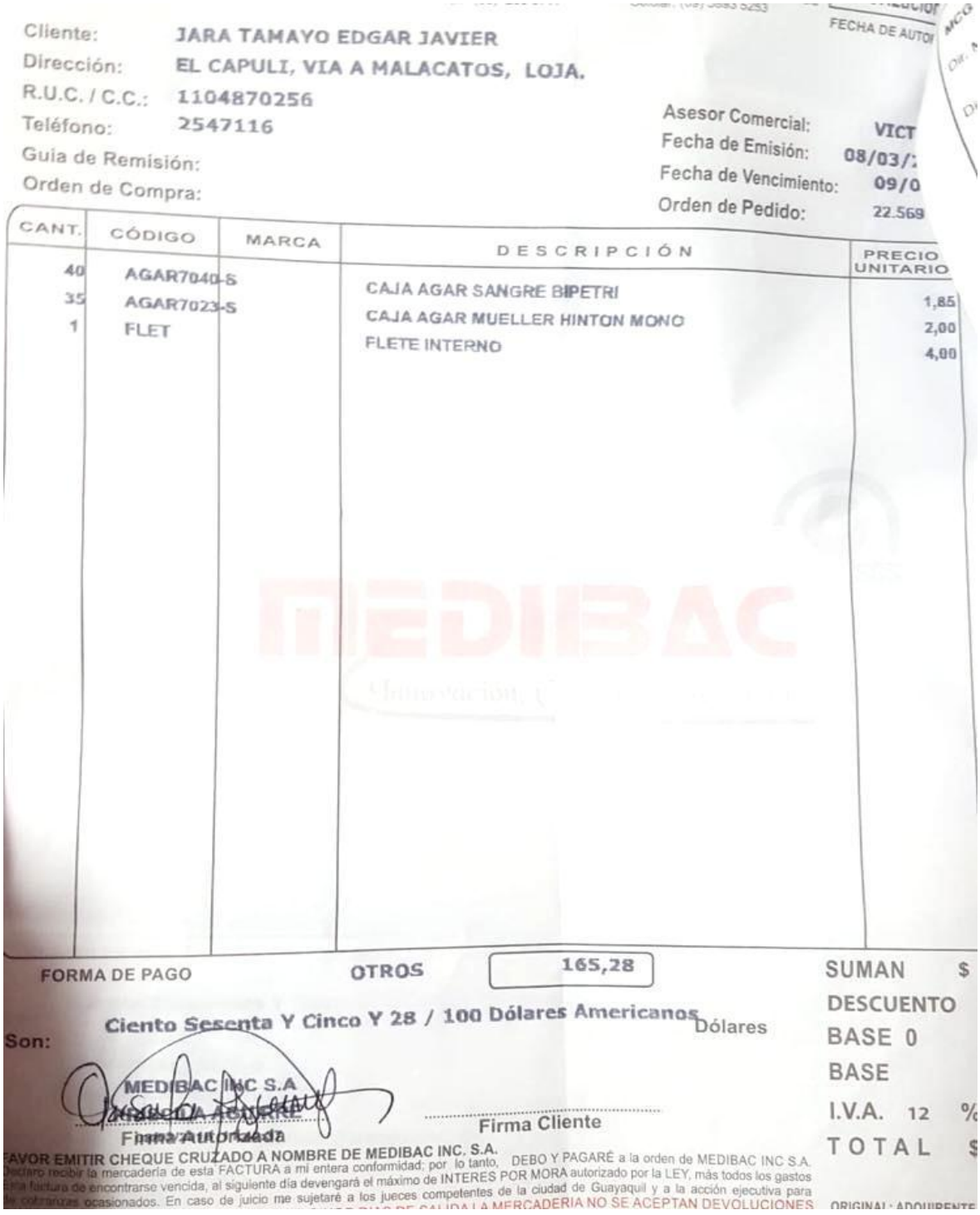
Comments:

N/A

MEDIBAC-INC S.A.
Distribuidor para el Ecuador de
MICROBIOLOGICS
Registro Sanitario AD-541-04-13

ANEXO 12

FACTURA DE LA COMPRA DE MEDIOS MUELLER HINTON Y SANGRE EN CAJAS PREPARADOS



Cliente: JARA TAMAYO EDGAR JAVIER
Dirección: EL CAPULI, VIA A MALACATOS, LOJA.
R.U.C. / C.C.: 1104870256
Teléfono: 2547116
Guia de Remisión:
Orden de Compra:

FECHA DE AUTOR

Asesor Comercial: VICT
Fecha de Emisión: 08/03/:
Fecha de Vencimiento: 09/0
Orden de Pedido: 22.569

CANT.	CÓDIGO	MARCA	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO
40	AGAR7040-S		CAJA AGAR SANGRE BIPETRI	1,85
35	AGAR7023-S		CAJA AGAR MUELLER HINTON MONO	2,00
1	FLET		FLETE INTERNO	4,00

FORMA DE PAGO OTROS 165,28

SUMAN $
DESCUENTO
BASE 0
BASE
I.V.A. 12 %
TOTAL $

Son: Ciento Sesenta Y Cinco Y 28 / 100 Dólares Americanos Dólares

MEDIBAC INC S.A
Firma Autorizada

Firma Cliente

FAVOR EMITIR CHEQUE CRUZADO A NOMBRE DE MEDIBAC INC. S.A.
Declaro recibir la mercadería de esta FACTURA a mi entera conformidad; por lo tanto, DEBO Y PAGARÉ a la orden de MEDIBAC INC S.A.
esta factura de encontrarse vencida, al siguiente día devengará el máximo de INTERES POR MORA autorizado por la LEY, más todos los gastos
de cobranzas ocasionados. En caso de juicio me sujetaré a los jueces competentes de la ciudad de Guayaquil y a la acción ejecutiva para
LA MERCADERIA NO SE ACEPTAN DEVOLUCIONES

ORIGINAL: ADQUIRENTE

FACTURA DE LA COMPRA DE CEPAS BACTERIANAS PARA CONTROL DE CALIDAD

MEDIBAC
1991
IMPORTADOR - DISTRIBUIDOR
Proveedor Integral para Laboratorio
www.medibac.com medibac@medibac.com
ESTABLECIDOS EN 1991
Documento Categorizado: NO

MEDIBAC- INC S.A.
MATRIZ
Guayaquil : Enrique Ortega Moreira (Av. Las Aguas) 1111 y Laureles (Urdesa Central)
Teléfonos: (04) 288 1414 - 238 8597 - 288 1887
Celular: (09) 8574 8298
SUCURSAL MULTIPLE GUAYAQUIL
Víctor Emilio Estrada # 916 e Ilanes (Urdesa Central)
Telfs. (04) 454 8929 - 463 2714 - 460 2699 - 461 2989
SUCURSAL QUITO
Av. República de El Salvador N34-399 e Irlanda. (La Carolina).
Edificio Rosanía, Planta Baja, Oficinas 4 y 5
Teléfonos: (02) 226 1478 - 246 6316
SUCURSAL PORTOVIEJO
Ciudadela Los Mangos calle Elías Cedeño E./ Bolívar Avila y Manuel Andrade, Piso 1. Telf.: (05) 256 5182 Celular: (09) 5893 5253

R.U.C. 0992401494001
FACTURA
001-001- 000053616
Autorización S.R.I. 1121363800
FECHA DE AUTORIZACIÓN: 1/ SEPTIEMBRE/2017

Cliente: CELLY CAMPOVERDE TAYRON ALBERTO
Dirección: SECTOR CELI-ROMAN, BENJAMIN PEREIRA Y ALFRED(
R.U.C. / C.C.: 1105704165
Teléfono: 2584360
Guia de Remisión:
Orden de Compra:
Asesor Comercial: VICTOR V
Fecha de Emisión: 31/10/2017
Fecha de Vencimiento: 01/11/2017
Orden de Pedido: 19.648

CANT.	CÓDIGO	MARCA	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1	0335P-S		E.COLI ATCC 25922 (DUOPACK)	135,00	135,00
1	01006P-S		K. PNEUMONIAE ATCC BAA-1706	165,00	165,00
1	01005P-S		K. PNEUMONIAE ATCC BAA-1705	165,00	165,00
1	0784P-S		K. PNEUMONIAE ATCC 700603	145,00	145,00

MEDÍBAC
Innovación, Calidad y Servicio

MA DE PAGO OTROS 683,20

Seiscientos Ochenta Y Tres Y 20 / 100 Dólares Americano
Dólares

SUMAN	$	610,00
DESCUENTO		
BASE 0		0,00
BASE		610,00
I.V.A. 12	%	73,20
TOTAL	$	683,20

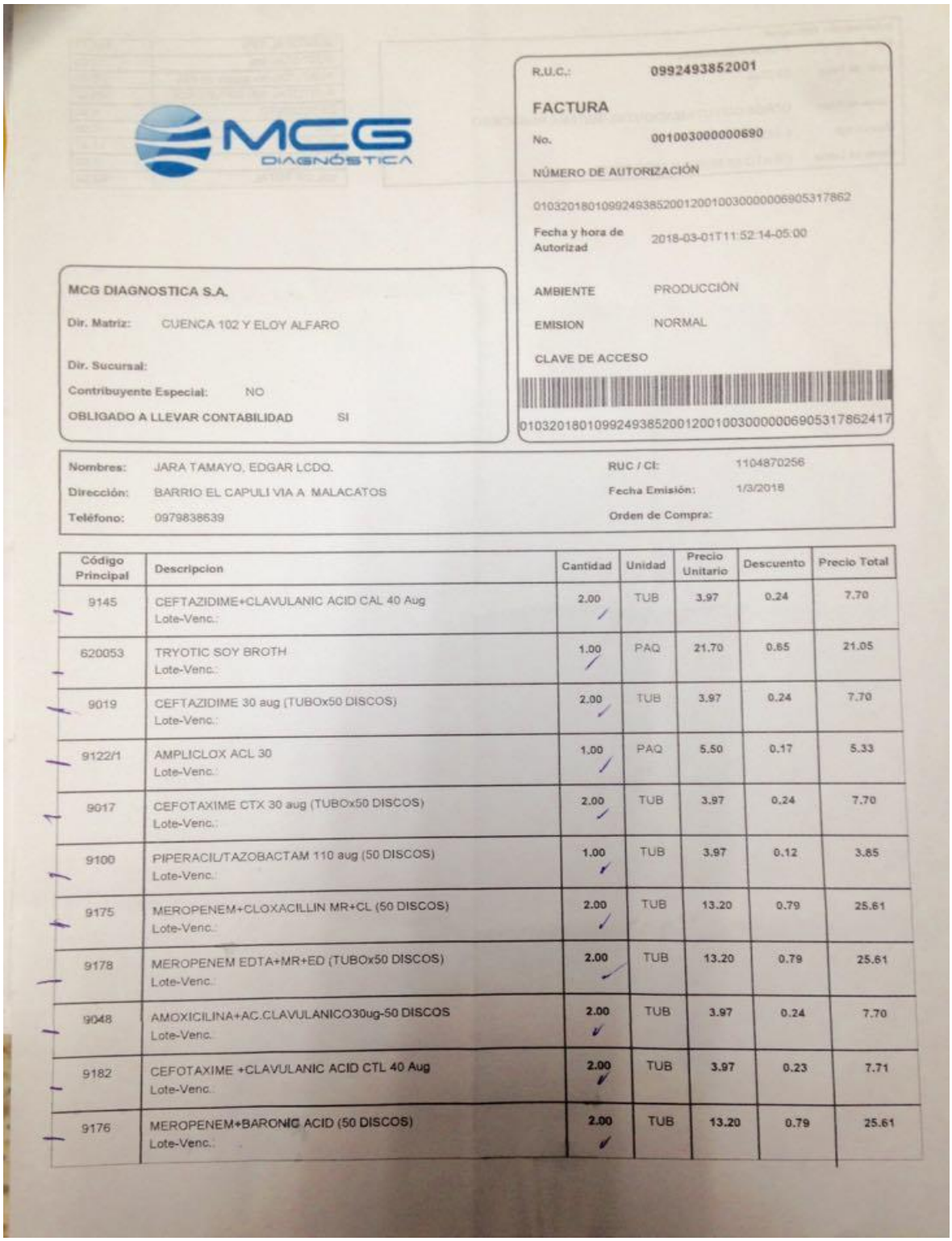
MEDIBAC INC S.A
PRISCILA AGUIRRE
Firma Autorizada

Firma Cliente

HEQUE CRUZADO A NOMBRE DE MEDIBAC INC. S.A.
cadería de esta FACTURA a mi entera conformidad; por lo tanto, DEBO Y PAGARÉ a la orden de MEDIBAC INC S.A.
rarse vencida, al siguiente día devengará el máximo de INTERES POR MORA autorizado por la LEY, más todos los gastos
dos. En caso de juicio me sujetaré a los jueces competentes de la ciudad de Guayaquil y a la acción ejecutiva para
y domicilio. PASADO LOS CINCO DIAS DE SALIDA LA MERCADERIA NO SE ACEPTAN DEVOLUCIONES
O DE COBRO AL CANCELAR ESTA FACTURA

ORIGINAL: ADQUIRENTE // COPIA 1: EMISOR COPIA

FACTURA DE LA COMPRA DE DISCOS DE ANTIBIÓTICOS



MCG DIAGNÓSTICA

R.U.C.: 0992493852001

FACTURA

No. 001003000000690

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN

0103201801099249385200120010030000006905317862

Fecha y hora de Autorizad: 2018-03-01T11:52:14-05:00

AMBIENTE: PRODUCCIÓN

EMISION: NORMAL

CLAVE DE ACCESO

0103201801099249385200120010030000006905317862417

MCG DIAGNOSTICA S.A.

Dir. Matriz: CUENCA 102 Y ELOY ALFARO

Dir. Sucursal:

Contribuyente Especial: NO

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD SI

Nombres: JARA TAMAYO, EDGAR LCDO.

Dirección: BARRIO EL CAPULI VIA A MALACATOS

Teléfono: 0979838639

RUC / CI: 1104870256

Fecha Emisión: 1/3/2018

Orden de Compra:

Código Principal	Descripcion	Cantidad	Unidad	Precio Unitario	Descuento	Precio Total
9145	CEFTAZIDIME+CLAVULANIC ACID CAL 40 Aug Lote-Venc.:	2.00	TUB	3.97	0.24	7.70
620053	TRYOTIC SOY BROTH Lote-Venc.:	1.00	PAQ	21.70	0.65	21.05
9019	CEFTAZIDIME 30 aug (TUBOx50 DISCOS) Lote-Venc.:	2.00	TUB	3.97	0.24	7.70
9122/1	AMPLICLOX ACL 30 Lote-Venc.:	1.00	PAQ	5.50	0.17	5.33
9017	CEFOTAXIME CTX 30 aug (TUBOx50 DISCOS) Lote-Venc.:	2.00	TUB	3.97	0.24	7.70
9100	PIPERACIL/TAZOBACTAM 110 aug (50 DISCOS) Lote-Venc.:	1.00	TUB	3.97	0.12	3.85
9175	MEROPENEM+CLOXACILLIN MR+CL (50 DISCOS) Lote-Venc.:	2.00	TUB	13.20	0.79	25.61
9178	MEROPENEM EDTA+MR+ED (TUBOx50 DISCOS) Lote-Venc.:	2.00	TUB	13.20	0.79	25.61
9048	AMOXICILINA+AC.CLAVULANICO30ug-50 DISCOS Lote-Venc.:	2.00	TUB	3.97	0.24	7.70
9182	CEFOTAXIME +CLAVULANIC ACID CTL 40 Aug Lote-Venc.:	2.00	TUB	3.97	0.23	7.71
9176	MEROPENEM+BARONIC ACID (50 DISCOS) Lote-Venc.:	2.00	TUB	13.20	0.79	25.61

ANEXO 13

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS CEPAS DE CONTROL DE CALIDAD, COMPARACIÓN POSITIVA CON EL INSERTO

Siembra de cepas control en agar sangre, lunes 5 de febrero de 2018

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

- LOT: 784-49-7
- REF: 0784P
- Fecha de expiración: 2018-10-31
- Nº de alícuotas: 12

Escherichia coli ATCC 25922

- LOT: 335-219-6
- REF: 0335 P
- Fecha de expiración: 2018-11-30
- Nº de alícuotas: 12

Resultados del cultivo, martes 6 de febrero de 2018

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

- Características microscópicas: Bacilos cortos Gram negativos
- Características Macroscópicas: Se observan dos tipos de colonias
    - Largas, circulares, convexas, grises, brillantes, bordes enteros.
    - Largas, circulares, convexas, bordes enteros, cremas, mucoide, brillante

Escherichia coli ATCC 25922

- Características microscópicas: Bacilos cortos Gram negativos

- Características macroscópicas: Se observan dos tipos de colonias
    - Grises, beta hemolíticas, circular, convexa, brillantes, borde ligeramente erosivo y liso.
    - Largas, irregulares, convexas, bordes erosivos y ásperos.

Resultados de la susceptibilidad de discos, miércoles 7 de febrero de 2018

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

- Prueba de discos combinados con inhibidor:
    - CAZ: 20mm CZC: 24mm
    - CTX: 34mm CTC: 40mm
- Prueba de sinergia de discos:
    - FOX: 16mm
    - Inhibición de crecimiento

Escherichia coli ATCC 25922

- Inhibición de crecimiento, el mismo se observa solo en los bordes de los discos probados CAZ, CTX, ATM, FOX, SAM, CZC, CTC.

ANEXO 14

PROTOCOLO DE SIEMBRA DE UROCULTIVOS

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 las siembra a 37º 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 100000 UFC/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 10000 UFC/ml. Cuando el recuento revela valores intermedios, entre 10000 y 100000 UFC/ml, el examen debe repetirse. Conviene advertir que pueden pasar inadvertidas infecciones urinarias verdaderas, si no se toman en cuenta cuentas inferiores a 100000 UFC/ml, ya que existen diversos factores que pueden explicar recuentos bajos en infecciones urinarias verdaderas, diuresis acentuada, obstrucción uretral, infecciones crónicas e infecciones por cocos Gram positivos (Lopardo, 2015).

2. Objetivo

2.1. 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 de 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
- Lápiz graso
- Guantes

Sustancias y reactivos

- Muestra a estudiar

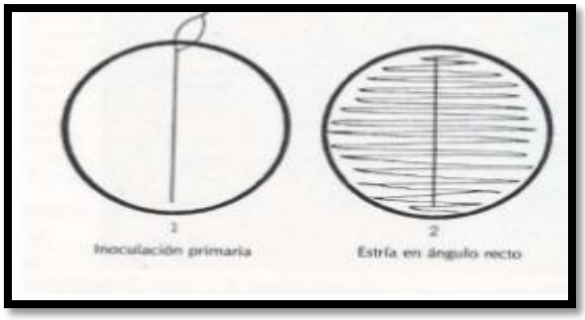
6. Procedimiento

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.
- Los resultados del estudio cuantitativo se informan de la siguiente manera:
    - No hubo desarrollo microbiano.
    - Menos (<) de 10000 UFC/ml.
    - Entre 10000 y 100000 UFC/ml.
    - Más de (>) 100000 UFC/ml.

7. Observaciones

7.1. La siembra debe realizarse de la orina sin centrifugar con un asa calibrada, lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo microbiano.

7.2. Marcar las cajas antes de empezar a trabajar.

7.3. No hablar durante la siembra.

7.4. Flamear el asa antes de realizar la serie de estrías y enfriar en una orilla.

7.5. 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/ApunteIII-UROCULTIVO.pdf

ELABORADO POR:	REVISADO Y APROBADO:
María de los Ángeles Ucho.	Dra. Sandra Freire Cuesta.

ANEXO 15

PROTOCOLO PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

1. Introducción

VITEK® 2 Systems identifica un organismo mediante una metodología basada en las características de los datos y el conocimiento acerca del organismo y las reacciones que se analizan. 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) se usa como referencia basal para los pocillos de análisis de descarboxilasa. Se obtienen resultados finales en aproximadamente 10 horas o menos. (BioMérieux, 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 y SOLCA de 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 (MacConkey)

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).

6. Procedimientos

6.1 Prepare el inóculo a partir de un cultivo puro (muestra sembrada en agar MacConkey), 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 (BioMérieux, 2013).

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

ELABORADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
Glenda Maribel Morocho Sofía Soria Jumbo	Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta

ANEXO 16

PROTOCOLOS PARA DETERMINACIÓN DE BETALACTAMASAS

PROTOCOLO IDENTIFICACIÓN DE BETALACTAMAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

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, monobactámicos, sin embargo, no afectan a carbepenémicos. 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.

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 y SOLCA de Loja" y se realizarán a todas las cepas bacterianas presuntivas de expresar betalactamasas, aquellas que tengan una CMI de ≥ a 1 ug/ml de ceftazidime, aztreonam o ceftriaxona.

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 BLEE

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

5. Materiales

- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Tubos de Ensayo con 3 ml de suero fisiológico estéril
- ✓ Agar Mueller – Hinton
- ✓ Densitómetro
- ✓ Cultivo de bacterias
- ✓ Gasas
- ✓ Gradilla
- ✓ Pinzas metálicas
- ✓ Lámpara de alcohol
- ✓ Contenedores para desechar materiales cortopunzantes, especiales, comunes e infecciosos.
- ✓ Cabina de seguridad biológica
- ✓ Incubadora de 35°C

Sinergia de discos:

- ✓ Cefotaxime
- ✓ Ceftazidime
- ✓ Cefepime
- ✓ Aztreonam
- ✓ Amoxicilina-ácido clavulánico

Discos combinados:

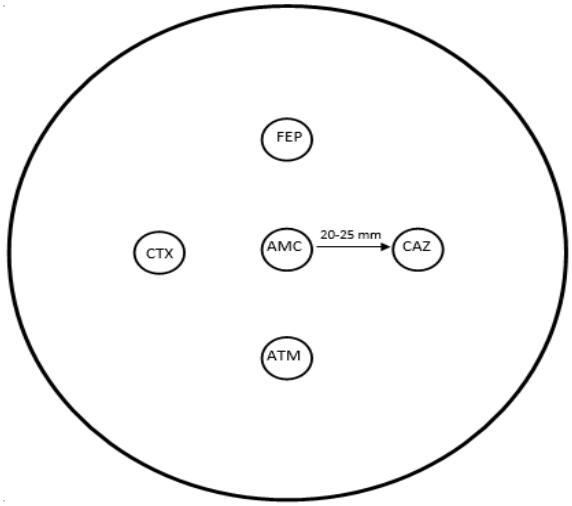
- ✓ Ceftazidime 30 ug
- ✓ Ceftazidime + Ác. Clavulánico 30/10 ug
- ✓ Cefotaxime
- ✓ Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug

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

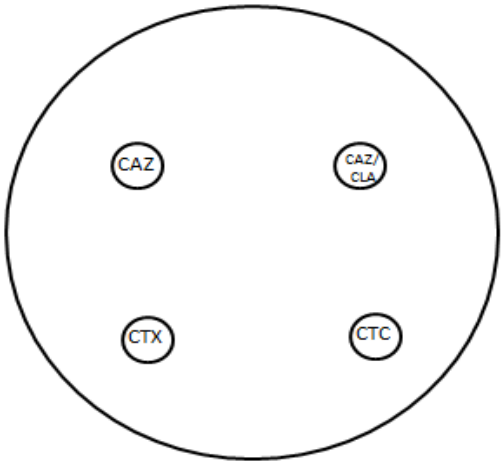


9. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35ºC y se realiza la lectura dentro de las 16-20 horas siguientes.
10. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.

- **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.
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 Ceftazidime 30 ug, Ceftazidime + Ác.Clavulánico 30/10 ug, Cefotaxime, Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug.



10. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35ºC ± 2ºC 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 BLEE 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 ≥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:

Mecanismo de resistencia	CTX	CTX+CLA	CTX+CLO	
BLEE	CTX+CLA o	≥ 5 mm	-	-
	CTX+CLA+CLO	-	< 4 mm	≥ 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"

8. Referencias bibliográficas

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

SEIMC. (2015). *Procedimientos en Microbiología Clínica.*

ELABORADO POR:	**REVISADO Y APROBADO POR:**
• Edgar Jara • Diana Ramón • Sthefany Torres	Lcda. Carmen Ullauri

PROTOCOLO IDENTIFICACIÓN DE AmpC

1. Introducción o fundamento

Betalactamasas Amp C: 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 Amp C 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 de discos.

2. Objetivo

Detectar por el método de sinergia 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 R a cefoxitina, son resistentes también a los inhibidores de betalactamasas.

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 Amp Cp

Estudiantes: Tamizaje de cepas probables productoras de enzimas Amp Cp y procesamiento.

5. Materiales

- Cefotaxima (30 ug)
- Ceftazidima (30 ug)
- Cefoxitina (30 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

6. Procedimiento

6.1 Prueba de sinergia de doble discos

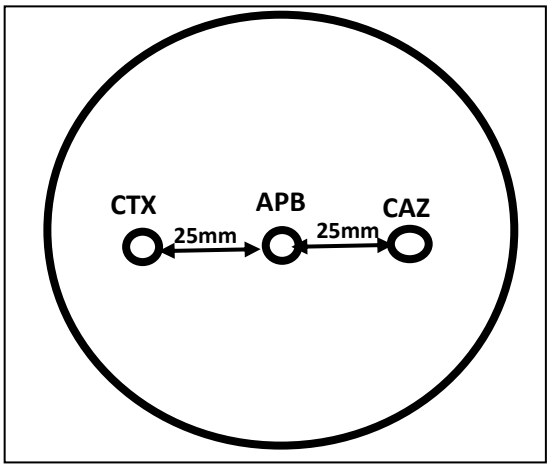
6.1.1 Rotular con el número de muestra un tubo con 3 ml de suero fisiológico o agua destilada estéril por cada cepa en cultivo puro al que se le vaya a realizar la determinación.

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 fenil borónico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

6.1.5 Incubar de 35-37ºC durante 16-20 horas (Ardanuy, Cercenado, Morosini, & Torres, 2011).

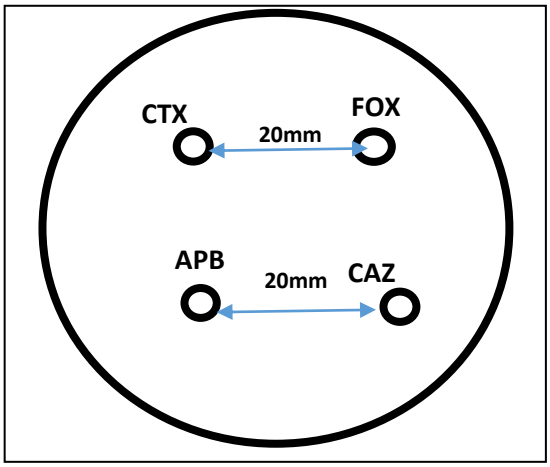


6.2 Prueba de aproximación de discos (antagonismo)

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 35-37ºC 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.

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.

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.

- 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

ELABORADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
- Atancuri Evelyn - Cisneros María - Ontaneda Alex - Barrionuevo Gina	Lic. Carmen Ullauri

PROTOCOLO IDENTIFICACIÓN DE CARBAPENEMASAS

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 serinbetalactamasas 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 e inactivación de carbapenémicos.

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 y SOLCA de Loja" y se realizarán a todas las cepas bacterianas presuntivas de expresar carbapenemasas, aquellas que tengan una CMI de ≥ a 1 ug/ml para meropenem, ≥ 2 ug/ml de imipenem para Enterobacterias; en el caso de Acinetobacter una CIM de ≥ 4 ug/ml para imipenem y en el caso de Pseudomona aeruginosa se usarán puntos de corte de ceftazidime ≥ 16 ug/ml; ≥ a 1 ug/ml para meropenem, ≥ 2 ug/ml de imipenem.

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 Fenilborónico (400 µg)
- Incubadora
- Guardián

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

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

- Densitómetro
- Lámpara de alcohol
- Pinza metálica
- Disco Meropenem (10 µg)
- Disco de Meropenem /àcido borònico(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:

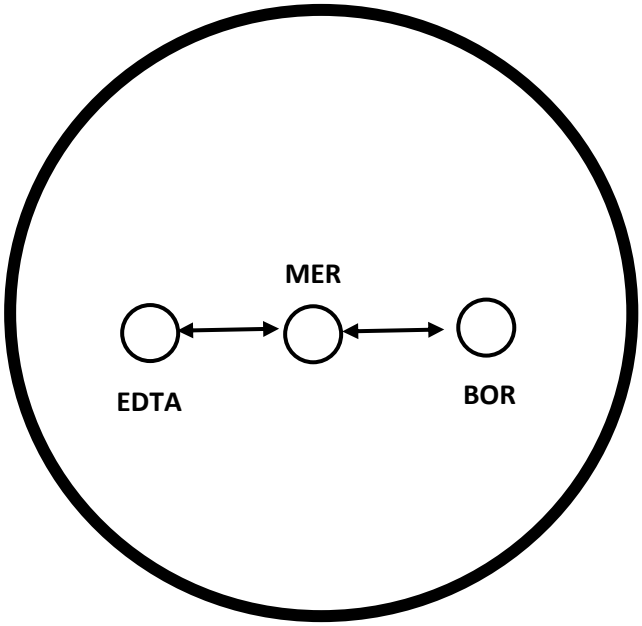
- TSB (alícuotas de 2 ml)
- Discos Meropenem (10 µg)
- Asas de inoculación (1-uL o 10-µL).
- Solución salina esteril
- Placas agar Mueller Hinton.(MHA)
- Cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922).
- Tubos Eppendorf

5. Procedimiento

5.1.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 Muller-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

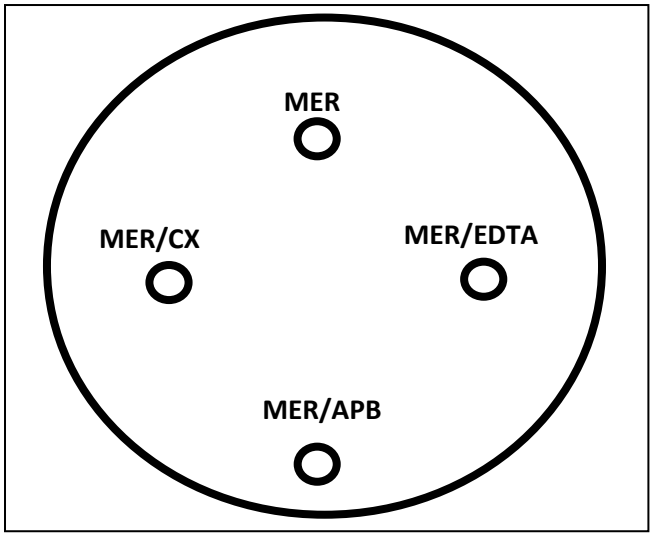
- Ajustar la turbidez de la suspensión en el densitómetro al 0,5 McFarland.
- Sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, elimine el exceso de líquido presionando firmemente contra las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido.
- Inocular antes de 15 minutos después 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 60º con referencia al plano horizontal 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 ± 2 °C, durante 16-20 horas.
- Realizar el protocolo con las cepas control positivo y negativo.



5.2.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 Muller-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 60º con referencia al plano horizontal 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 ± 2 °C, durante 16-20 horas.



5.3. Procedimiento para el método inactivación de carbapenemasas:

- Rotular los tubos Eppendorf para cada aislamiento a ensayar, y emulsionar bacterias (1 μL) 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 µg a cada tubo Eppendorf usando pinzas estériles, y asegurarse que todo el disco esté sumergido en la suspensión.
- Incubar a 35 ± 2 ° C en atmosfera ambiental durante 4 horas ± 15 minutos.
- Después de completar la incubación de la suspensión, preparar la suspensión 0.5 de McFarland (usando el método directo) de *Escherichia 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 una 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 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 *Escherichia 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°C ± 2°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.

6. Observaciones

6.1. Interpretación de resultados para el método de sinergia de doble disco:

Se reportara 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

Resultado	**Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia**
Sinergia carbapenémico- ácido borónico	**Carbapenemasa de Clase A Serincarbapenemas:** KPC, SME, NMC-A, IMI, PER, GES, SFO, SFC, IB **y/o Hiperproducción de AmpC**
Sinergia carbapenémico-ácido dipicolínico o Sinergia carbapenémico-EDTA	**Carbapenemasa de Clase B Metalo β-lactamasas:** VIM, GIM, SIM, NDM, IMP y SPM.

***Fuente**: SEIMC 2011*

- **Negativo:** No ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de "zona fantasma".

6.1.1. 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), monobactámicos y carbapenémicos independientemente de la sensibilidad in vitro**.** Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): amoxicilina/clavulánico, piperacilina-tazobactam, y agentes no betalactámicos.

- **MBL:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas la generaciones), monobactámicos y carbapenémicos independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): monobactámicos, piperacilina-tazobactam, y agentes no betalactámicos.

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

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

6.2.1. 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 ≥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:

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

***Fuente**: CLSI 2017*

6.2.2. 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.

6.3.Reporte de resultados para el método inactivación de carbapenemasas.

6.3.1. 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 *Escherichia coli* ATCC 25922 susceptible a meropenem.
- **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 inhibira el crecimiento de *Escherichia 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.

6.3.2. Reporte de resultados:

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

7. Referencias bibliográficas

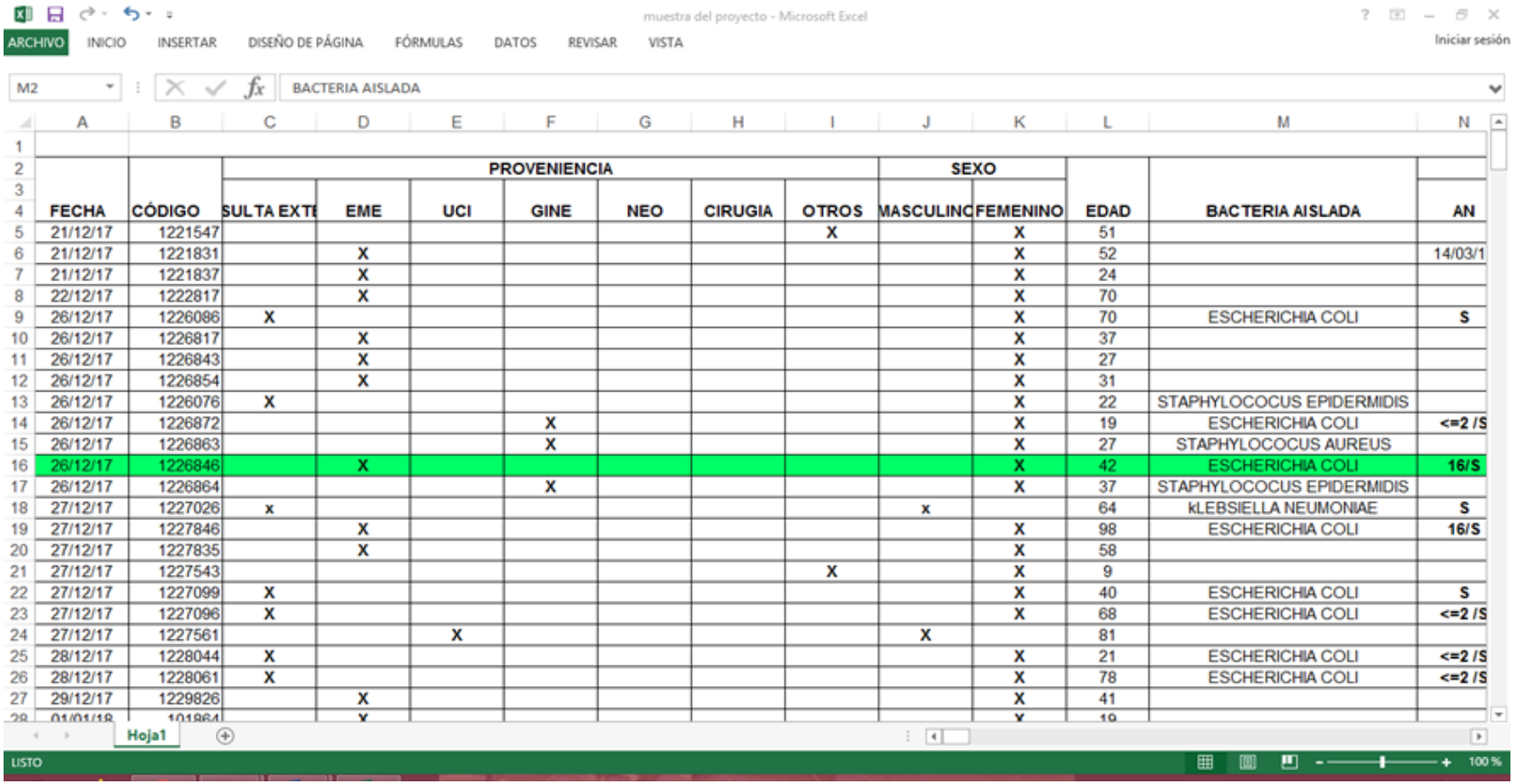
CLSI. (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Recuperado de: https://bit.ly/2NSmtge

Cercenado, E., & Cantón, R. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos.* Obtenido de https://bit.ly/2MnBmWt

SEIMC. (2015). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Recuperado de: https://bit.ly/2CrSB9i

ANEXO 17

BASE DE DATOS DIGITAL



			PROVENIENCIA						SEXO				
FECHA	CÓDIGO	SULTA EXTE	EME	UCI	GINE	NEO	CIRUGIA	OTROS	MASCULINO	FEMENINO	EDAD	BACTERIA AISLADA	AN
21/12/17	1221547							X		X	51		
21/12/17	1221831		X							X	52		14/03/1
21/12/17	1221837		X							X	24		
22/12/17	1222817		X							X	70		
26/12/17	1226086	X								X	70	ESCHERICHIA COLI	S
26/12/17	1226817		X							X	37		
26/12/17	1226843		X							X	27		
26/12/17	1226854		X							X	31		
26/12/17	1226076	X								X	22	STAPHYLOCOCUS EPIDERMIDIS	
26/12/17	1226872				X					X	19	ESCHERICHIA COLI	<=2 /S
26/12/17	1226863				X					X	27	STAPHYLOCOCUS AUREUS	
26/12/17	1226846		X							X	42	ESCHERICHIA COLI	16/S
26/12/17	1226864				X					X	37	STAPHYLOCOCUS EPIDERMIDIS	
27/12/17	1227026	x							x		64	kLEBSIELLA NEUMONIAE	S
27/12/17	1227846		X							X	98	ESCHERICHIA COLI	16/S
27/12/17	1227835		X							X	58		
27/12/17	1227543							X		X	9		
27/12/17	1227099	X								X	40	ESCHERICHIA COLI	S
27/12/17	1227096	X								X	68	ESCHERICHIA COLI	<=2 /S
27/12/17	1227561			X					X		81		
28/12/17	1228044	X								X	21	ESCHERICHIA COLI	<=2 /S
28/12/17	1228061	X								X	78	ESCHERICHIA COLI	<=2 /S
29/12/17	1229826		X							X	41		

ANEXO 18

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA

A **B**

Figura 1. A. Rotulando las cajas de agar sangre utilizadas para la recuperación de cepas bacterianas. B. Resiembra de muestras presuntivas de betalactamasas.

A **B**

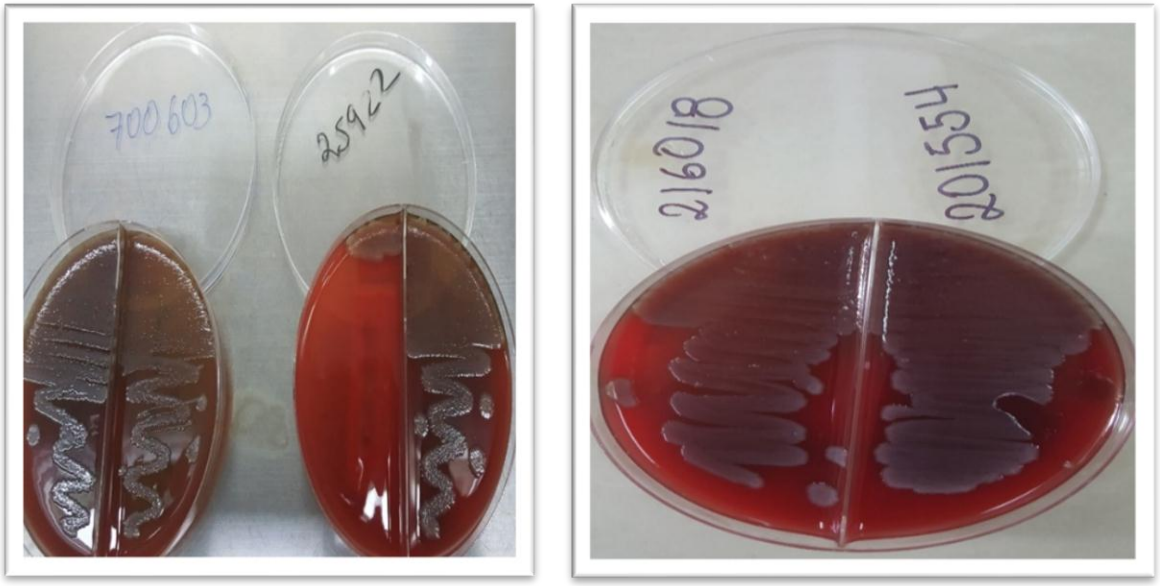


Figura 2. A. Recuperación de cepa control negativa E. coli ATCC 25922 y cepa control positiva K. pneumoniae ATCC 700603 en agar sangre. B. Recuperación de muestras problema.

A **B**

Figura 3. A. Preparación de inóculo bacteriano. B. Siembra de inóculo en Mueller Hinton.

A **B**

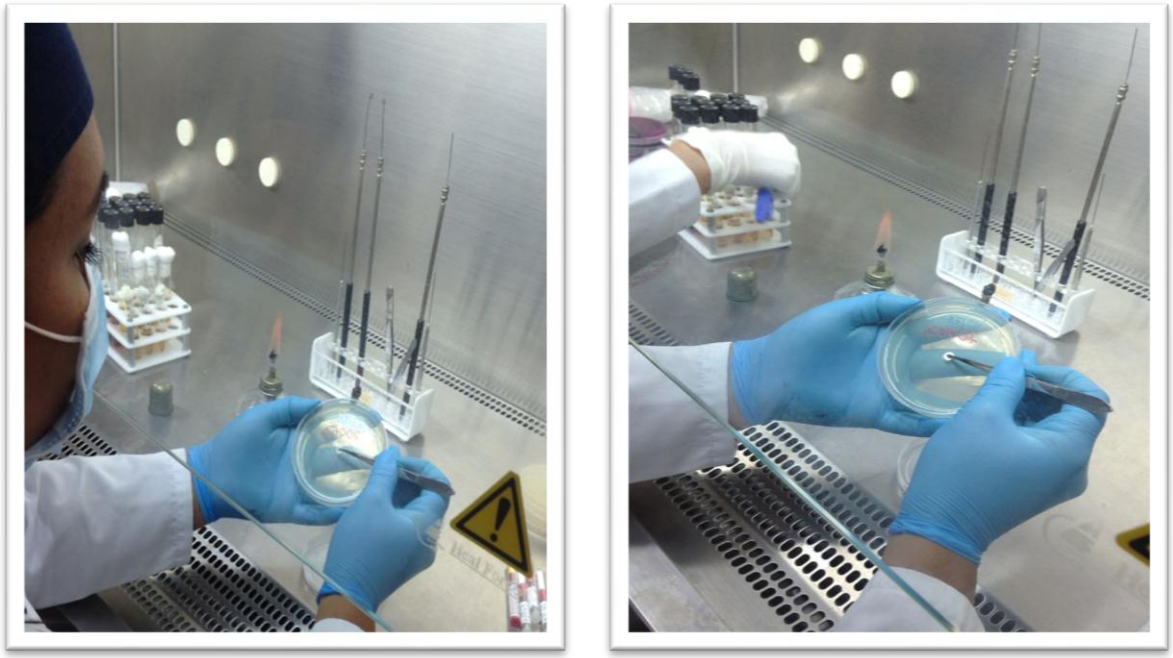


Figura 4. A y B. Situando los discos para realizar las pruebas fenotípicas para la investigación de betalactamasas.

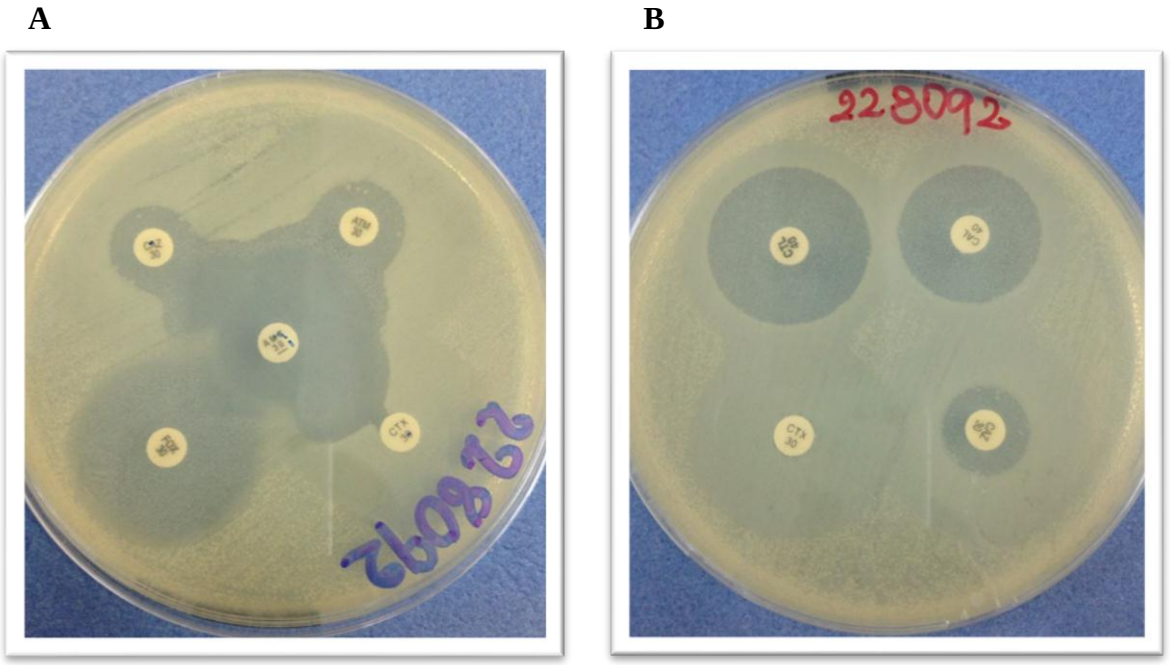


Figura 5. A. Prueba positiva de BLEE por el método de sinergia de discos, se observa ampliación del halo de inhibición en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico. B. Discos combinados con inhibidor Positivo, vemos un incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime, cefotaxime en presencia de ácido clavulánico ≥5 mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico.

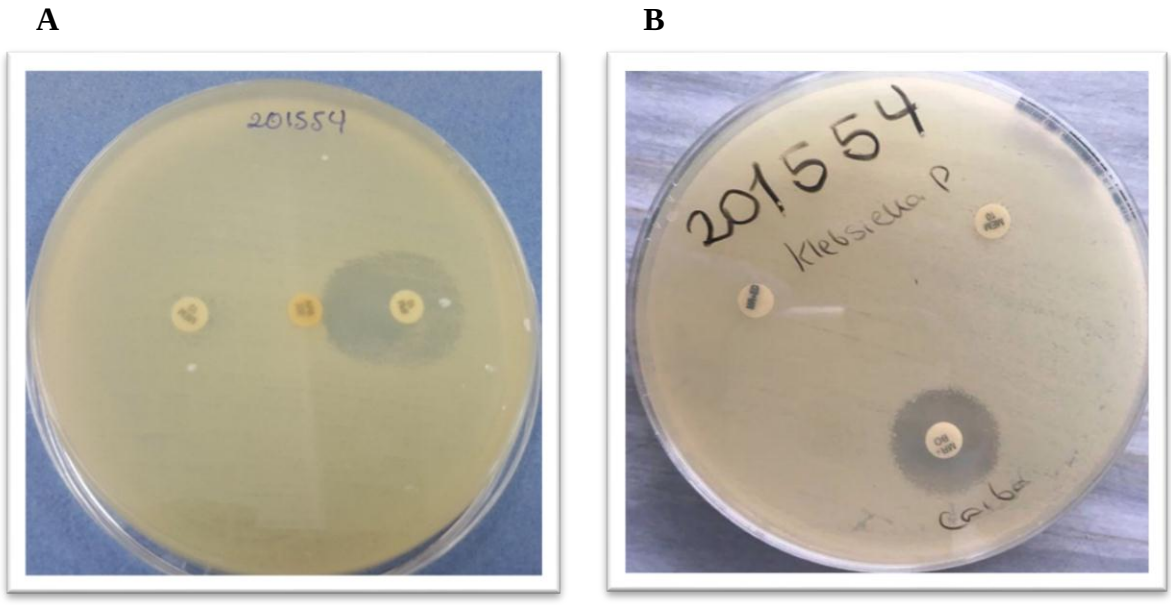


Figura 6. A. Sinergia de discos positiva con APB. Discos ensayados imipenem y meropenem. Carbapenemasa positiva. B. Método de discos combinados con inhibidor, se observa aumento del halo ≥4 mm en MR+BO y halo <5 en MR+ED, indica carbapenemasa tipo KPC.

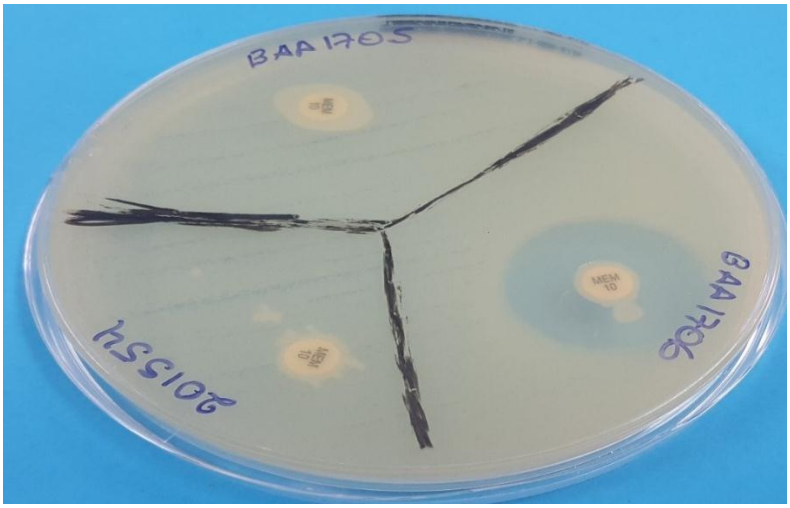


Figura 7. Método de Inactivación de Carbapenemasas, con resultado de carbapenemasa positiva en la muestra problema y en el control positivo ATCC BAA 1705, ya que no hay inhibición del crecimiento de la E. coli ATCC 25922 susceptible a meropenem, se observa un exceso de colonias alrededor del disco de meropenem. Y resultado negativo en el control negativo ATCC BAA 1706 con halo mayor a 19 mm.

A **B**

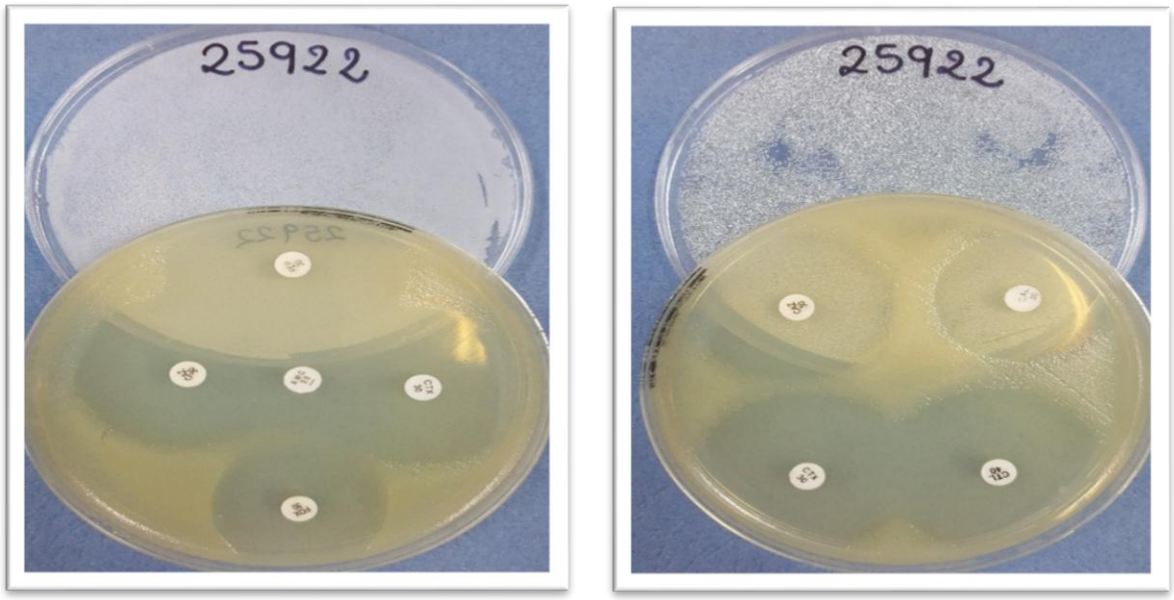


Figura 8. Control Negativo Cepa ATCC 25922, identificación fenotípica de BLEE. A. Método de Sinergia de discos en el que no hay ampliación de la zona de inhibición. B. Método de Discos combinados con inhibidor, no hay incremento ≥5 mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con ácido clavulánico respecto a los de las cefalosporinas correspondientes sin ácido clavulánico.

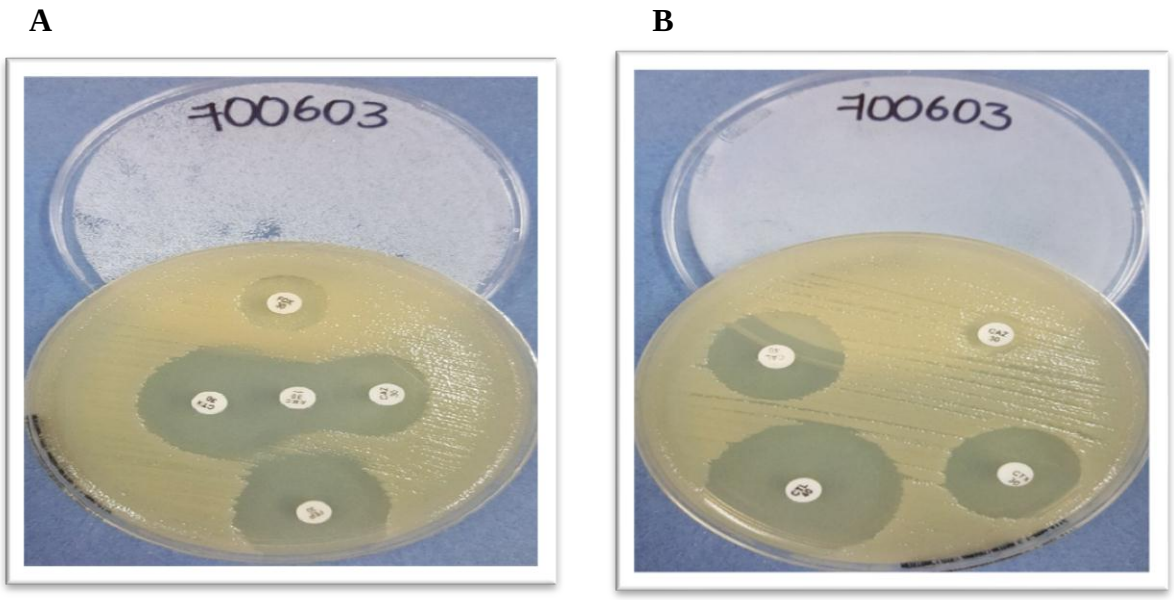


Figura 9. Control Positivo Cepa ATCC 700603, identificación fenotípica de BLEE. A. Método de Sinergia de discos, hay ampliación del halo de inhibición en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico. B. Método de discos combinados con inhibidor, hay un incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime, cefotaxime en presencia de ácido clavulánico ≥5 mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico.

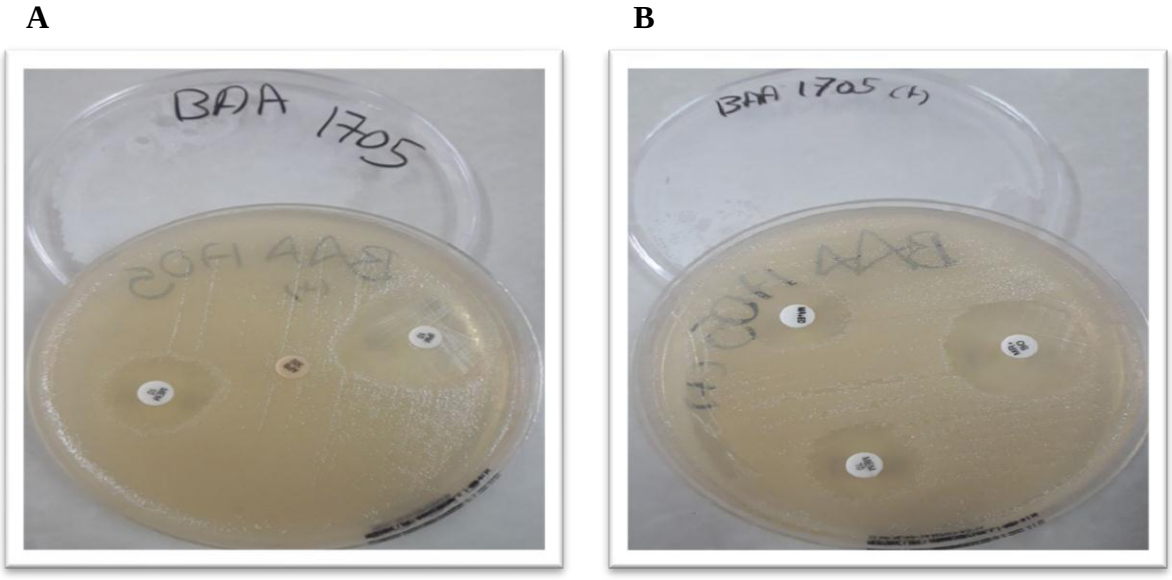


Figura 10. Control positivo ATCC BAA 1705 para test confirmatorios de carbapenemasas. A. Método de sinergia de discos con ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor en este caso APB. B. Método de discos combinados con inhibidor en el que hay incremento ≥5 mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico solo.

A **B**

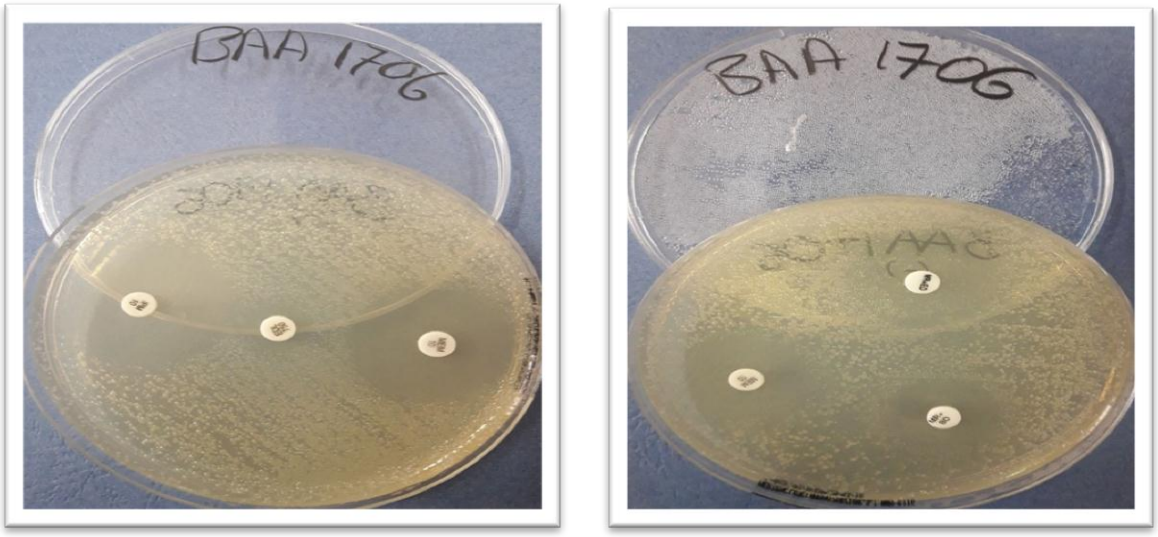


Figura 11. Control negativo ATCC BAA 1706 para test confirmatorios de carbapenemasas. A. Método de sinergia de discos en el que no se observa ampliación del halo de inhibición del carbapenémico. B. Método de discos combinados con inhibidor sin diferencia o incremento <5 mm en el halo de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.

ANEXO 19

THE CANADIAN HOUSE CENTER

Aprende el Inglés de verdad...!

"Make today so awesome, yesterday gets jealous."

THE CANADIAN HOUSE CENTER

El que suscribe, en representación del **THE CANADIAN HOUSE CENTER** con **RUC Nº 1191756777001,** el cual está aprobado por el **Ministerio de Educación del Ecuador** según resolución ministerial **Nº 320 – 15** y con registro **Nº SETEC-OCR-00001757** de la **Secretaría Técnica del Sistema Nacional de Cualificaciones Profesionales**.

CERTIFICA.-

Que el resumen de tesis titulada **"Klebsiella spp productora de betalactamasas aisladas de urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora de Loja"**, realizada por la **Srta. CISNEROS CUENCA MARIA DEL CISNE,** con número de cédula, 1106021882, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA,** ha sido debidamente traducido por el Lic. Ross Sampayo, Director Académico de nuestra prestigiosa entidad especializada en la buena enseñanza del idioma inglés.

Se expide el presente documento, de acuerdo a la ley, para los fines necesarios.

Loja, 23 Agosto del 2018

ROYAL INTERNATIONAL LANGUAGE ACADEMY LTDA.
RUC 1191756777001

LIC. ROSS SAMPAYO
DIRECTOR ACADÉMICO
THE CANADIAN HOUSE CENTER