



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

TÍTULO

“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA, LOJA”

MACROPROYECTO

“CARACTERIZACION 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:

Diana Carolina Ramón Montaña

DIRECTORA:

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

LOJA - ECUADOR

2018

CERTIFICACIÓN

Lcda. Carmen Ullauri

**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA FACULTAD
DE LA SALUD HUMANA DE LA UNL
DIRECTORA DE TESIS**

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado en el marco del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, todo el proceso de desarrollo del trabajo investigativo titulado: **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA, LOJA”** de autoría de la Srta. **DIANA CAROLINA RAMÓN MONTAÑO**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Loja, 8 de Octubre 2018

Atentamente:



Lcda. Carmen Alejandra Ullauri González

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo **DIANA CAROLINA RAMÓN MONTAÑO** con CI. 1105008898 declaro ser autora del presente trabajo de investigación titulada “**SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA**”.

Acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Firma:.....



Autora: Diana Carolina Ramón Montaña

Cédula: 1105008898

Fecha: Loja, 8 de Octubre del 2018

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Diana Carolina Ramón Montaña, declaro ser autora de la tesis titulada: **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA, 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 de investigación en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Nacional de Loja.

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 08 días del mes de Octubre del dos mil dieciocho, firma la autora.

Firma:.....

Autora: Diana Carolina Ramón Montaña

Cédula de identidad: 1105008898

Correo electrónico: dianacaro96@hotmail.es

Teléfono: 0959553582

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora de tesis: Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc

Tribunal de grado:

Presidenta: Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta, Mg. Sc.

Vocal: Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

Vocal: Lic. Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc.

DEDICATORIA

Con amor y cariño dedico el siguiente trabajo:

Primeramente a Dios: por guiarme y bendecirme en todo este proceso de aprendizaje, para llegar a ser un buen profesional.

A mis padres y a mis abuelitos: quienes me han brindado todo su apoyo incondicional para completar una de mis metas propuestas; por enseñarme a no caer y siempre mejorar, por todos sus buenos consejos y valores que me han conferido a través de todos estos años.

A mis hermanas: por su apoyo, consejo y aliento que me ha impulsado a cumplir este proceso.

A mis amigos: que constituyen parte de mi vida y hemos ido instruyéndonos en este transcurso de educación superior.

AGRADECIMIENTO

Quisiera expresar mi agradecimiento primeramente a Dios por llenarme de bendiciones para poder lograr esta meta. A mis padres, mis hermanas y a mis abuelitos que sin ellos no hubiera sido posible nada de esto, además de su apoyo incondicional, sus consejos y valores que me han servido para alcanzar esta meta tan anhelada. Y especialmente a mis dos mejores amigas Sthefany con la cual nos hemos ido instruyendo en esta etapa que ha culminado y formado una excelente amistad; y a Yaritza por apoyarme, aconsejarme y alentarme en todo este proceso.

A la Universidad Nacional de Loja, Facultad de la Salud Humana, Carrera de Laboratorio clínico por darme la oportunidad de estudiar y formarme para ser una buena profesional.

De igual manera a mi directora de tesis, Lic. Carmen Ullauri González primeramente por permitirme formar parte el macroproyecto el cual dirige; y por su tiempo, apoyo, comprensión y paciencia, quien con sus conocimientos me ha brindado el apoyo necesario para poder terminar con éxito este trabajo de investigación.

Índice

CARÁTULA	i
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
TÍTULO	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1 Infecciones urinarias	5
3.2. Bacterias	5
3.2.1. <i>Bacterias gramnegativas</i>	6
3.3. Enterobacterias	6
3.4. <i>Klebsiella</i>	7
3.5. Resistencia bacteriana	7
3.6. Tipos de resistencia bacteriana.....	8
3.6.1. <i>Resistencia natural</i>	8
3.6.2. <i>Resistencia adquirida</i>	8
3.7. Susceptibilidad antimicrobiana	10
3.8. Antibióticos	10
3.9. Antibióticos importantes para <i>Klebsiella</i>	11
3.9.1. <i>Nitrofurantoína</i>	11
3.9.2. Trimetropim sulfametoxasol	12
3.9.3. Cefazolin	12
3.9.4. Ciprofloxacina.....	13
3.10. Mecanismo de resistencia.....	14
3.11. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	14
3.11.1. Métodos de dilución	14
3.12. Métodos automatizados.....	15
3.13. Equipo automatizado.....	16

3.13.1. Tarjeta para gramnegativos GN	17
3.13.2. Metodología empleada para la identificación bacteriana	17
3.13.2. Técnicas analíticas de sensibilidad	17
3.14. Criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Tipos de estudio	19
4.2. Área de estudio	19
4.3. Universo	19
4.4. Muestra	19
4.5. Criterios de inclusión	19
4.6. Criterios de exclusión	19
4.7. Criterio de eliminación	20
4.8. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos:	20
4.8.1. Fase pre-analítica	20
4.8.2. Fase analítica	20
4.8.3. Fase pos- analítica	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	31
RECOMENDACIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	38

TÍTULO

Susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella spp* causante de infección de vías urinarias en usuarios del Hospital Isidro Ayora, Loja.

RESUMEN

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que conlleva a que las infecciones urinarias causadas por bacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* sean difícil de combatirlas debido a que éstas pueden desarrollar mecanismos de resistencia a una o varias familias de antibióticos. El presente estudio descriptivo de corte transversal denominado “Susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella spp* causante de infección de vías urinarias en usuarios del Hospital Isidro Ayora, Loja”; tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad antimicrobiana de esta bacteria aislada en urocultivos y analizar su distribución según sexo, edad y área de servicio. El universo fue de 591 muestras de orina con pedidos de urocultivo, 225 cumplieron los criterios de inclusión y exclusión; se identificó y determinó la susceptibilidad antimicrobiana por métodos automatizados, se realizó el tamizaje para producción de betalactamasas y confirmación fenotípica de acuerdo a los criterios de la tabla 3A y 3C del documento M100-S28 del CLSI, se aislaron 2 cepas de *Klebsiella oxytoca* y 20 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, en donde estas últimas presentaron niveles de resistencia a cefepime (57.89%), ampicilina/sulbactam (50%), nitrofurantoína (44.44%); algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* expresaron mecanismos específicos de resistencia a betalactámicos como son Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y Carbapenemasas.

Palabras claves: susceptibilidad antimicrobiana, *Klebsiella*, urocultivos, BLEE, Carbapenemasas

ABSTRACT

The bacterial resistance is a public health problem that entails that urinary infections caused by bacterium such as *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* are difficult to fight because they can develop mechanisms of resistance to one or several families of antibiotics. The present descriptive cross-sectional study called "Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella spp* causative of urinary tract infection in users of Isidro Ayora Hospital, Loja "; it has such as objective determine the antimicrobial susceptibility of this isolated bacterium in urine cultures and analyze its distribution according to sex, age and service area. The total samples was 591 urine with orders of urine culture, 225 fulfilled the inclusion and exclusion criteria; antimicrobial susceptibility was identified and determined by automated methods, the screening for beta-lactamase production and phenotypic confirmation was made according to the criteria of table 3A and 3C of document M100-S28 of the CLSI, 2 strains of *Klebsiella oxytoca* and 20 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated, where these last ones presented levels of resistance to cefepime (57.89%), ampicillin / sulbactam (50%), nitrofurantoin (44.44%); some strains of *Klebsiella pneumoniae* expressed specific mechanisms of resistance to beta-lactams such as beta-lactamases of extended-spectrum (BLEE) and Carbapenemases.

Key words: Antimicrobial Susceptibility, *Klebsiella*, urocultures, BLEE, Carbapenemases.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de vías urinarias se asocian principalmente a la invasión microbiana del aparato urinario (riñón, uréteres, vejiga, uretra), el agente biológico bacteriano que predominan son los bacilos gramnegativos los que adquieren resistencia a los antimicrobianos. El germen más frecuente es *Escherichia coli* (85%), seguido por *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* (Vallejos, López Villegas, Enríquez Guerra, y Ramírez Valverde, 2010).

Klebsiella es un bacilo gramnegativo inmóvil que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*, entre estos, *Klebsiella pneumoniae* es un representante importante no sólo por su frecuencia como causa de infecciones asociadas al cuidado de la salud y de la comunidad, sino por los mecanismos patogénicos que posee. (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Debido a que las infecciones de vías urinarias son principalmente causadas por bacterias y algunas de estas presentan resistencia a carbapenémicos como es el caso de *Klebsiella pneumoniae*, el tratamiento de esta patología se ha ido complicando cada vez más. La resistencia puede ser producida de forma natural o por mutaciones de la bacteria, según la Organización Mundial de la Salud, es uno de los mayores problemas de salud pública mundial debido a que se impide la capacidad de controlar las enfermedades infecciosas aumentando la morbi-mortalidad ya que se reduce la eficacia terapéutica amenazando el progreso de la misma, permite la transmisión de microorganismos infecciosos de un individuo a otro, aumenta los costos en la atención de salud y amenaza la seguridad sanitaria perjudicando el comercio y la economía (Organización Mundial de la Salud , 2014).

El Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del INSPI, ha manifestado que la bacteria más común en los hospitales del Ecuador es *Escherichia coli*, sin

embargo añadió que en el país la bacteria con mayor resistencia a los antibióticos es *Klebsiella pneumoniae*. Estos datos surgen del análisis de más de 40 mil casos reportados a través de la herramienta ‘Whonet’ que informa sobre los microorganismos que circulan en las diferentes áreas del hospital, así como el resultado de las pruebas de susceptibilidad para los antibióticos utilizados in vitro.

Según datos obtenidos en el 2014 se registraron unos 27 mil pacientes que presentaron bacterias resistentes, en el 2015 esa cifra aumentó a 49 mil. “El problema con estas bacterias es regional, la lucha contra la resistencia debe ser más fuerte, por ejemplo, las autoridades deben prohibir la venta libre de antibióticos, mejorar el manejo de animales en el campo e implementar medidas de control más eficientes en los hospitales” (Reyes, 2015).

Ante lo expuesto, se efectuó un estudio de tipo descriptivo y de corte transversal con la finalidad de detectar las especies de *Klebsiella* causantes de infecciones de vías urinarias, determinar su susceptibilidad y clasificar según edad, sexo y área de servicio; como parte del macroproyecto “Caracterización molecular de betalactamasas aisladas en muestras de orina procedentes de los Hospitales Isidro Ayora y SOLCA de Loja”.

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Infecciones urinarias

Las infecciones del tracto urinario (ITU) corresponden a una de las patologías infecciosas más frecuentes tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario. La infección del tracto urinario (ITU) se debe a la presencia y multiplicación de microorganismos (presencia de gran número de bacterias) en la orina; aunque se pueden hallar bacterias en la orina sin que exista infección (Pigrau, 2011).

La ITU implica el crecimiento de gérmenes en el tracto urinario, habitualmente estéril, asociado a sintomatología clínica compatible, debiendo distinguirse de la bacteriuria asintomática (BA), que no presenta síntomas ni signos de reacción inflamatoria de las vías urinarias; una infección se produce cuando las bacterias que viven dentro del intestino encuentran su camino en el tracto urinario a través de la uretra (Criollo, 2015).

En la mayoría de las ITU van acompañados de la presencia de leucocitos en orina como respuesta inflamatoria a la invasión tisular por bacterias. La determinación de una ITU se realiza mediante el cultivo de orina (urocultivo) que permite cuantificar el número de bacterias presentes en la misma; se ha estimado que la presencia de 100.000 o más bacterias/ml en orina, significa que las bacterias se están multiplicando rápidamente en el tracto urinario; el cual es un indicativo de una infección urinaria (Pigrau, 2011).

3.2. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como *Chlamydias* y *Rickettsias*. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento. La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una

atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. El tamaño de las bacterias oscila entre las 0.5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos tipos a 10 μm (Pérez y Mota, 2008).

3.2.1. Bacterias gramnegativas

Son bacterias que tienen una capa delgada de peptidoglicano (mureína) unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido. En el lipopolisacárido, la porción de lípido está impregnada en el fosfolípido y el antígeno O polisacárido está en la superficie. El lípido se llama Lípido A y es tóxico, pero el lipopolisacárido entero se llama endotoxina. La pared de la célula tiene poros llamados porinas para el transporte de sustancias de peso molecular bajo. Entre la membrana citoplásmica y la pared celular hay un espacio periplásmico con enzimas hidrolíticas, enzimas inactivadoras de antibióticos y proteínas de transporte (Alexander, 2010).

3.3. Enterobacterias

Las *Enterobacteriaceae* son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. Esta familia comprende muchos géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más. Algunos de estos microorganismos entéricos, por ejemplo, *Escherichia coli*, son parte de la microflora normal y en forma incidental producen enfermedad, en tanto que otros, las salmonelas y las shigelas, por lo general son patógenos para el ser humano. Las *Enterobacteriaceae* son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2010).

3.4. *Klebsiella*

El género *Klebsiella* está constituido por las especies *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. granulomatis*. 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. *Klebsiella pneumoniae* forma parte de la flora habitual intestinal y de la cavidad oral. Son indol negativas, utilizan citrato como única fuente de carbono. Es capaz de causar ITU y neumonía en personas por lo demás sanas. *Klebsiella* es resistente a múltiples antibióticos, además de la resistencia natural a la ampicilina y a la carbenicilina, la adquisición creciente de plásmidos le están confiriendo de una resistencia farmacológica creciente a las cefalosporinas y a los aminoglucósidos (Puerta García y Rodriguez, 2010) (Jawetz, et al., 2010).

Klebsiella oxytoca es una bacteria gramnegativa, son redondeadas y estrechamente relacionadas con *K. pneumoniae*, de la que se distingue por ser indol positiva; y por tener ligeras diferencias en relación a los medios en que puede crecer, siendo capaz de multiplicarse en melecitosa, y no en 3-hidroxi butirato. Es una bacteria patógena que puede ocasionar infección y enfermedad en humanos (Holland y Falck , 2014).

3.5. Resistencia bacteriana

La RAM (Resistencia Antimicrobiana) es un fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Los microorganismos son inmunes a los efectos de los antimicrobianos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. La resistencia es una consecuencia del uso de los antimicrobianos, y en particular de su abuso, y surge por mutación del microorganismo o adquisición de genes de resistencia (OMS, 2016).

3.6. Tipos de resistencia bacteriana

3.6.1. Resistencia natural

Es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano; es el resultado del estado normal, genético, estructural o fisiológico normal de un microorganismo que se desarrolla en forma natural en ausencia de mecanismos de presión de selección antimicrobiana, es decir cuando no hay exposición previa a los antibióticos (Bailey y Scott, 2007).

La mayoría de cepas de *Klebsiella* presentan como resistencia natural, la producción de una β -lactamasa de espectro ampliado (BLEA). *K. pneumoniae* es naturalmente resistente a ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), carbenicilina (CAR) y ticarcilina (TIC); pueden encontrarse unos pocos aislamientos de *Klebsiella spp* con sensibilidad intermedia (6%) o incluso en forma excepcional algunos sensibles a ampicilina (3%). Un aislamiento de *Klebsiella spp* sensible a ampicilina debe ser confirmado en cuanto a su identificación bioquímica y su sensibilidad porque puede tratarse de un error. *Klebsiella oxytoca* también produce constitutivamente una β -lactamasa cromosómica clase A, que confiere un perfil similar al de SHV-1 de *K. pneumoniae* (Galas y Whonet, 2007).

3.6.2. Resistencia adquirida

Es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes, pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Pérez , 2009).

La resistencia a carbapenemes en toda la familia *Enterobacteriaceae* continúa siendo sumamente inusual e importante; por lo que si se presenta esta resistencia a carbapenemes no se debe informar sin antes haber realizado la correspondiente confirmación. La resistencia

enzimática a los carbapenemes en *Serratia marcescens* se encontró mediada por distintas carbapenemasas. IMP-1, una metaloenzima plasmídica aislada en Japón inicialmente de *P. aeruginosa*, se encontró posteriormente en aislamientos clínicos de *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*.

Las β -lactamasas SHV-1 y K1 se expresan en forma constitutiva de bajo nivel en *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, respectivamente. Estas dos enzimas, confieren una resistencia muy similar, afectando sólo a las aminopenicilinas (AMX y AMP) y a las carboxipenicilinas (CAR y TIC). La hiperproducción de SHV-1 en *K. pneumoniae* es muy poco frecuente. Cuando se produce, es debida a la existencia de varias copias del gen dentro del cromosoma o cambios en el promotor del gen que codifica para la enzima. Este último fenómeno asociado a disminución de la permeabilidad de la membrana externa puede ocasionar un aumento considerable de la CIM para ceftazidima (CAZ) y piperacilina tazobactam pero no del resto de las cefalosporinas de tercera generación o del aztreonam, pero es poco frecuente.

La diferencia principal entre SHV-1 de *K. pneumoniae* y K1 (OXY-1 y OXY-2) de *K. oxytoca* es la actividad de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE). Cuando OXY-1 u OXY-2 se hiperproducen confieren al aislamiento un fenotipo de resistencia a C3G y monobactames muy particular, son resistentes a todas la penicilinas con CIMs > 64 $\mu\text{g/ml}$, a CXM y AZT (CIMs > de 32 $\mu\text{g/ml}$) y resistentes o moderadamente resistentes a CTX y CRO (CIMs de 4 a 32 $\mu\text{g/ml}$) pero totalmente sensibles a CAZ. Tanto SHV-1 como K1 son sensibles a los inhibidores ác. clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero en los aislamientos de *K. oxytoca* que presentan hiperproducción de K1 la combinación β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa tiene muy baja actividad. La adquisición de β -lactamasas se encuentran generalmente codificadas por elementos móviles tales como plásmidos, transposones o integrones. Esto los convierte en excelentes herramientas para la diseminación de resistencias.

Las β -lactamasas tipo AMP-C que tienen codificación cromosómica en *Enterobacter spp*, *C. freundii*, *Serratia spp*, *M. morgani* y *Providencia spp*, pero que con la ayuda de transposones pudieron pasar a plásmidos y a través de estos alcanzar géneros bacterianos como *Klebsiella spp* donde no se las encuentra naturalmente. β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) TEM-1, TEM-2 y SHV-1 son las BLEA plasmídicas más comúnmente distribuidas en bacilos gramnegativos. Todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* producen cromosómica y constitutivamente bajos niveles de una BLEA (SHV-1) y los de *K. oxytoca* una BLEE (K1); cuando *K. pneumoniae* adquiere un plásmido con una BLEA, en general se eleva mucho el nivel de resistencia a amino y carboxipenicilinas (Galas y Whonet, 2007).

3.7. Susceptibilidad antimicrobiana

Es un fenómeno que se produce cuando un antibiótico afecta a un microorganismo produciendo la muerte o evitando su proliferación (sensible); o cuando el microorganismo deja de verse afectado por el antibiótico al que antes era sensible, lo que lleva a que el medicamento sea ineficiente y conduce a que persistan las infecciones (resistencia) (Organización Mundial de la Salud, 2016).

3.8. Antibióticos

Son sustancias químicas capaces de destruir a diversos microorganismos o impedir su proliferación. Casi todos son producidos a su vez, por otros microorganismos; pero en la actualidad, el hombre mejora algunos de ellos mediante técnicas químicas o incluso los sintetiza completamente en el laboratorio. El antibiótico actúa por mecanismos diferentes en función de su naturaleza y su objetivo es bloquear la proliferación de las bacterias inhibiendo alguno de los pasos de su desarrollo. Los antimicrobianos presentan diferencias marcadas en

sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, espectros antimicrobianos y mecanismos de acción (Marnet, 2016).

Un agente antimicrobiano es:

- a) Bacteriostático: inhibe la multiplicación bacteriana, pero esta se reanuda en cuanto se retira el agente.
- b) Bactericida: Mata a las bacterias. Esta es irreversible aún cuando sea retirado el agente (Fajardo, y otros, 2015).

3.9. Antibióticos importantes para *Klebsiella*

3.9.1. Nitrofurantoína

Es un antibiótico que inhibe la acetil-coenzima A bacteriana, se utiliza específicamente para el tratamiento de las infecciones urinarias producidas por gérmenes gramnegativos y por algunos grampositivos (Pigrau, 2013).

3.9.1.1. Mecanismo de acción

La nitrofurantoína inhibe la acetil-coenzima A bacteriana, interfiriendo con el metabolismo de los carbohidratos e impidiendo la formación de la pared celular. La actividad antibacteriana de la nitrofurantoína depende de la acidez de la orina. En general, es bacteriostática, pero a altas concentraciones puede ser bactericida frente a determinados microorganismos. Son sensibles a la nitrofurantoína: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter spp*, *Corynebacterium spp*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria* ,y *Staphylococcus epidermidis*. *Enterobacter spp* y *Klebsiella spp* requieren dosis más altas y algunas cepas pueden ser resistentes (Medicamentos, 2012).

3.9.2. Trimetropim sulfametoxazol

Bloquea la síntesis del ácido fólico bacteriano, tiene acción bactericida. Se usa para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario así como también en infecciones como la neumonía (Brunton , et al. 2007).

3.9.2.1. Mecanismo de acción

El trimetoprim/sulfametoxazol es generalmente bactericida actuando al inhibir enzimas secuenciales que intervienen en la síntesis del ácido fólico bacteriano. El sulfametoxazol es estructuralmente parecido al ácido p-aminobutírico (PABA) inhibiendo de forma competitiva la formación del ácido fólico a partir del PABA. Por su parte, el trimetoprim se une a la enzima dihidrofolato reductasa, lo que impide la formación del ácido tetrahidrofólico a partir del dihidrofolato. El ácido tetrahidrofólico (THF) es la forma activa del ácido fólico sin el cual la bacteria no puede sintetizar timidina, lo que conduce a una interferencia en la síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas. Al actuar mediante estos dos mecanismos diferentes, la combinación trimetoprim-sulfametoxazol es sinérgica frente a un gran número de bacterias (Galiano, 2012).

3.9.3. Cefazolin

Se usa para el tratamiento de infecciones de tracto urinario, de piel, pélvicas, respiratorias bajas, septicemia, osteoarticulares, tracto biliar y endocarditis; y para la prevención de infecciones graves producidas por bacterias, demostrado por antibiograma previamente. Pertenece a la clase de fármacos llamados antibióticos, cefalosporina de primera generación semisintética y de amplio espectro bactericida (Pigrau, 2013).

3.9.3.1. Mecanismo de acción

Igual que otros antibióticos beta-lactámicos, la cefazolina es bactericida. Inhibe el tercer y último paso de la síntesis de la pared bacteriana, uniéndose específicamente a unas

proteínas denominadas PBPs (penicillin-binding proteins) proteínas presentes en todas las células bacterianas, aunque la afinidad hacia las mismas varía de una especie bacteriana a otra. De esta forma, la capacidad de la cefazolina hacia un determinado microorganismo depende de su capacidad para llegar y fijarse a las PBPs. Una vez fijado el antibiótico a estas proteínas, la síntesis de la pared bacteriana queda interrumpida y la bacteria experimenta la autólisis. La lisis de la bacteria se lleva a cabo gracias a determinadas enzimas (las autolisinas) y, algunos autores creen que algunos antibióticos interfieren con el inhibidor de las autolisinas que mantiene la integridad de la célula (Galiano, 2012).

3.9.4. Ciprofloxacina

La ciprofloxacina es un agente antimicrobiano de la clase de las fluoroquinolonas. Es activo frente a un amplio espectro de gérmenes gramnegativos aerobios, incluyendo patógenos entéricos.

3.9.4.1. Mecanismo de acción

Los efectos antibacterianos de la ciprofloxacina se deben a la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas. Estas topoisomerasas alteran el DNA introduciendo pliegues super helicoidales en el DNA de doble cadena, facilitando el desenrollado de las cadenas. La DNA-girasa tiene dos subunidades codificadas por el gen *gyrA*, y actúan rompiendo las cadenas del cromosoma bacteriano y luego pegándolas una vez que se ha formado la superhélice. Las quinolonas inhiben estas subunidades impidiendo la replicación y la transcripción del DNA bacteriano (Galiano, 2012).

Por lo expuesto se nota que los agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula atacada. Los antibióticos actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos. La especificidad de acción

depende de que el fármaco bloquee una enzima o sustrato no presente en las células eucariotas humanas o suficientemente distintas (Sánchez, 2007).

3.10. Mecanismo de resistencia

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano (todos los gérmenes gramnegativos son resistentes a la vancomicina). La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Este tipo de resistencia es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección (Vignoli, 2010).

3.11. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Estas pruebas sirven para medir la sensibilidad o resistencia de una cepa bacteriana.

3.11.1. Métodos de dilución

3.11.1.1. Dilución en agar

La dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. El agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración de antibiótico diferente. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Los inóculos de los distintos microorganismos se pueden aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando replicadores (Malbrán, 2012).

3.11.1.2. Concentración Inhibitoria Mínima

Es la mínima concentración de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad por dilución en caldo o agar. Es la menor

concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación. En el método de microdilución cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación con pocillos de fondo en “U” representa uno de los tubos del método de macrodilución (Malbrán, 2012).

El valor de CIM obtenido por el método de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de antibiótico necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante. La CIM real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Si por ejemplo, fueran probadas diluciones al medio y se determina una CIM de 16 $\mu\text{g/ml}$, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 $\mu\text{g/ml}$. La metodología más común para la determinación de la CIM es la que utiliza diluciones seriadas al medio (por Ej. 1, 2,4, 8,16 $\mu\text{g/ml}$, etc.). También existen otros esquemas de dilución, que utilizan unas pocas concentraciones (hasta dos), concentraciones "Breakpoint" o que agregan concentraciones entre las que se ensayan normalmente (por Ej. 4, 6, 8, 12, 16 $\mu\text{g/ml}$). Cuando se informa al clínico el resultado de la CIM, el valor debe ser acompañado por su correspondiente interpretación (por Ej. sensible, intermedio o resistente) (Malbrán, 2012).

3.12. Métodos automatizados

La identificación de bacterias patógenas aisladas de procesos infecciosos u otras fuentes como alimentos y agua y los resultados de susceptibilidad in vitro constituyen herramientas fundamentales para un manejo eficiente de estos microorganismos. Por tanto el empleo de métodos rápidos y automatizados en microbiología se hace cada vez más frecuente. Durante la última década se han desarrollado aparatos automatizados y semiautomatizados que permiten obtener resultados de identificación bacteriana y de sensibilidad en un período que oscila entre 2 y 7 h comparado a las 15-24 h que habitualmente demoran los métodos tradicionales. La rapidez en el diagnóstico y el tratamiento reduce la morbi-mortalidad así

como la propagación de la infección lo que se traduce en beneficios para el paciente, cuando se trata de muestras de origen clínico (Romeua, y otros, 2008).

A su vez, en el área medioambiental el empleo de instrumentos automatizados permite también al laboratorio de microbiología obtener resultados de identificación y antibiograma reproducibles, con rapidez y precisión, ajustándose a guías internacionales actualizadas. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por NCCLS (Romeua, y otros, 2008).

3.13. Equipo automatizado

Es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas las cuales tienen una galería de pruebas bioquímicas, enzimas y sustratos específicos. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por CLSI.

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

- Tarjeta de identificación de bacterias anaerobias corinebacterias. (ANC)
- Tarjeta de identificación de *Bacillus* (BCL)
- Tarjeta de identificación para corinebacterias (CBC)
- Tarjeta de identificación de grampositivos (GP)
- Tarjeta de identificación de gramnegativo (GN)

- Tarjeta de identificación de *Neisseria-Haemophilus* (NH)
- Tarjeta de identificación de levaduras (YST)
- Tests de sensibilidad antimicrobiana (AST)

3.13.1. Tarjeta para gramnegativos GN

La tarjeta de identificación de gramnegativos (GN) está diseñada para la identificación automatizada de los bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores clínicamente más significativos. La tarjeta de identificación GN es un producto desechable de un solo uso (Jordá, y otros, 2005).

3.13.2. Metodología empleada para la identificación bacteriana

La metodología se basa en la identificación bacteriana a través de la comparación de los resultados obtenidos por perfiles bioquímicos generados por las bacterias con una base de datos preestablecida. En las tarjetas que emplea el equipo existen pocillos los cuales a su vez contienen sustratos predeterminados, dichos sustratos serán usados por las bacterias de la muestra problema y se obtendrán reacciones específicas. El resultado de este perfil bioquímico será comparado con una base de datos con los perfiles de diferentes géneros y especies de bacteria y se podrá realizar la determinación del agente etiológico (bioMérieux, 2013).

La determinación del perfil bioquímico empleado para la identificación se realiza mediante un sistema óptico de transmitancia el que usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar las reacciones de turbiedad o el color de los productos metabólicos (bioMérieux, 2013).

3.13.2. Técnicas analíticas de sensibilidad

El sistema evalúa el patrón de crecimiento de cada organismo en presencia del antimicrobiano en relación con el crecimiento registrado en el pocillo de control. Para

determinar la CMI o un resultado cualitativo (por ejemplo, ESBL POS/NEG), se utilizan varios parámetros en función de las características de crecimiento observadas. El resultado de la CMI debe estar vinculado a una identificación de organismo con el fin de determinar una interpretación de categoría (bioMérieux, 2013).

3.14. Criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad

El instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI) reconoce tres categorías de sensibilidad a los antibióticos para las pruebas de dilución en el manual M100 año 2018:

- **Sensible:** Un microorganismo es sensible si responde a las dosis habituales del antibiótico administrado por una vía adecuada que incluye la vía oral.
- **Intermedio:** Una sensibilidad intermedia implica que la cepa puede ser inhibida por concentraciones del fármaco que se logran cuando se administran dosis parentales máximas; se puede seleccionar el antibiótico, pero se deben considerar otras opciones que puedan proporcionar un tratamiento más óptimo.
- **Resistente:** Una bacteria es resistente si no es inhibida por las concentraciones del fármaco que se pueden alcanzar y por lo tanto, el fármaco no debe ser seleccionado para el tratamiento, salvo en ciertos líquidos corporales, en los cuales pueden acumularse concentración altas del antibiótico (Koneman, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipos de estudio

El presente trabajo de investigación es un estudio de tipo descriptivo y de corte transversal.

4.2. Área de estudio

El estudio se realizó en el Hospital Isidro de Ayora de la ciudad de Loja, hospital de segundo nivel ubicado en la Avenida Iberoamericana y JJ Samaniego.

4.3. Universo

El universo estuvo representado por todos los usuarios con pedido de urocultivo del Laboratorio Clínico del Hospital Isidro Ayora, el cual fue de 591 muestras de orina.

4.4. Muestra

La muestra fue de 225 muestras de orina procesadas, en donde se excluyeron 366 muestras que no ameritaron el urocultivo, no hubo crecimiento o estuvieron contaminadas.

4.5. Criterios de inclusión

- Pacientes con solicitud de urocultivo que acudan al laboratorio clínico del Hospital Regional Isidro Ayora.
- Cultivos primarios con crecimiento $\geq 1\ 000$ UFC/ml (pacientes inmunodeprimidos, síndrome uretral femenino, punción supra púbica o renal percutánea) o $\geq 100\ 000$ UFC/ml (pacientes inmunocompetentes)
- Paciente cuya muestra fue tomada y conservada en las condiciones previamente especificadas.

4.6. Criterios de exclusión

- Pacientes que recibieron terapia antibiótica por lo menos 7 días antes.

- Muestras que no se transportaron de acuerdo a las indicaciones dadas (Anexo 1).

4.7. Criterio de eliminación

- Muestra con espermatozoides o con sangre de origen menstrual.
- Más de 2 patógenos aislados.

4.8. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos:

4.8.1. Fase pre-analítica

1. Autorización para la ejecución del trabajo de investigación por parte del coordinador de docencia e investigación del Hospital Isidro Ayora de la ciudad de Loja para ejecución del Proyecto (Anexo 2).
2. Se obtuvo la información de datos y consentimiento informado de los usuarios (Anexo 3).
3. Se difundió el Protocolo para el transporte y almacenamiento de la muestra de orina (Anexo 4).

4.8.2. Fase analítica

1. Se sembraron las muestras para el urocultivo por técnica de asa calibrada (Anexo 5).
2. Se identificaron las bacterias por método automatizado (Anexo 6).
3. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias identificadas por el método de concentración inhibitoria mínima (Anexo 7).
4. Se confirmó el mecanismo de resistencia BLEE por medio de sinergia de discos y discos combinados a las cepas que tuvieron los siguientes puntos de corte ceftazidime >16, ceftriaxona >4 (Anexo 8).
5. Se confirmó el mecanismo de resistencia carbapenemasas por medio de discos combinados, sinergia de discos e inactivación de carbapenémicos para las cepas que tuvieron los siguientes puntos de corte: meropenem o imipenem >1 (Anexo 9).

6. Se realizó el control de calidad interno con cepas ATCC 25922 (control negativo) y ATCC 700603 (control positivo) para BLEE; las cepas BAA1705 (control positivo) y BAA1706 (control negativo) (Anexo10).
7. El control de calidad externo se realizó mediante el envío de cepas al INSPI (Anexo 11).

4.8.3. Fase pos- analítica

1. Se realizó la recolección de datos de los resultados de la determinación de susceptibilidad de todas las muestras procesadas usando un registro de datos de laboratorio; los resultados fueron cuantificados usando el programa Microsoft Excel representados en tablas e interpretaciones de las mismas (Anexo 12).
2. Evidencia fotográfica (Anexo 13).

RESULTADOS

Luego de realizada la investigación referente a “Susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella spp* causantes de infección de vías urinarias en usuarios del Hospital Isidro Ayora, Loja”, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla N° 1.

Bacterias aisladas en urocultivo de usuarios del Hospital Isidro Ayora Loja

Bacteria Aislada	Frecuencia	Porcentaje %
<i>Escherichia coli</i>	173	76,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	8,9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0,89
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0,89
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	1,79
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	1	0,44
<i>Staphylococcus species</i>	1	0,44
<i>Enterobacter</i>	1	0,44
<i>Proteus mirabilis</i>	10	4,44
<i>Proteus penneri</i>	1	0,44
<i>Streptococcus uberis</i>	1	0,44
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,44
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0,44
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0,89
<i>Kocuna varians</i>	1	0,44
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	3	1,34
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,44
TOTAL	225	100,00

Autor: Diana Ramón Montaña

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

Interpretación:

De las 225 muestras procesadas, se establece que 20 corresponden a *Klebsiella pneumoniae* y 2 a *Klebsiella oxytoca*, lo que significa que en un 8,9% y 0,89% respectivamente actúan como bacterias causantes de infecciones en vías urinarias.

Del estudio realizado por Echeverri y Cataño (2010), referente al tema, nos indica que:

Klebsiella pneumoniae fue el tercer microorganismo aislado de sangre (9%) y el segundo a partir de orina (9%) en los servicios hospitalarios que aportaron datos. Los pacientes hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos son los que tienen mayor riesgo de desarrollar infección por este germen (p.241).

Tabla N° 2.

Susceptibilidad antimicrobiana de Klebsiella pneumoniae aisladas en urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora, Diciembre 2017- Abril 2018

Susceptibilidad Antimicrobiana de <i>Klebsiella pneumoniae</i>								
Antibióticos	Sensible		Intermedio		Resistente		Total	Porcentaje %
	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %		
Amikacina	17	85			3	15	20	100
Ampicilina/sulbactam	7	35	3	15	10	50	20	100
Cefepime	8	42,10			11	57,9	19	100
Ceftazidime	10	50			10	50	20	100
Ceftriaxona	10	50			10	50	20	100
Ciprofloxacina	11	55			9	45	20	100
Gentamicina	12	60	2	10	6	30	20	100
Meropenem	10	90,9			1	9,1	11	100
Nitrofurantoína	6	33,33	4	22,22	8	44,45	18	100
Norfloxacina					2	100	2	100
Trimetropín sulfametoxazol	6	42,87			8	57,13	14	100
Amoxicilina/ácido clavulánico	7	35	3	15	10	50	20	100

Autor: Diana Ramón Montaña

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

Interpretación:

De las muestras procesadas de urocultivos de *Klebsiella pneumoniae* se observa mayor resistencia a ampicilina / sulbactam, ceftazidime, ceftriaxona, y nitrofurantoína, con porcentajes significativos superiores al 44% respecto a las muestras analizadas. La diferencia del total de los antibióticos ensayados se debe a que según la procedencia de la muestra se cambia la tarjeta que debe ser probada.

Mayorga (2015), en un restudio realizado respecto al tema, señala que:

El agente etiológico *Klebsiella spp* mostró resistencia a TMS (43,33%), ceftazidime (40%), nitrofurantoína (34.48%), amoxicilina/ ácido clavulánico (37.93%), ceftriaxona (80%), cefotaxima y cefoxitima (100%). *Klebsiella spp* presentó mejor sensibilidad solamente a gentamicina (88,89%) e imipenem (100%) (p. 42).

Tabla N° 3.

Susceptibilidad antimicrobiana de Klebsiella oxytoca aisladas en urocultivos de usuarios del Hospital Isidro Ayora, Diciembre 2017-Abril 2018.

Antibióticos	Susceptibilidad Antimicrobiana de <i>Klebsiella oxytoca</i>						Total	Porcentaje %
	Sensible		Intermedio		Resistente			
	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %		
Amikacina	2	100					2	100
Ampicilina/sulbactam	1	50,00	1	50,00			2	100
Cefepime	2	100					2	100
Ceftazidime	2	100					2	100
Ceftriaxona	2	100					2	100
Ciprofloxacina	2	100					2	100
Gentamicina	2	100					2	100
Nitrofurantoína	1	100					1	100
Trimetropín sulfametoxazol	2	100					2	100

Autor: Diana Ramón Montaña

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

Interpretación:

De todas las muestras procesadas de urocultivos, *Klebsiella oxytoca* mostró mayor sensibilidad a los antibióticos: amikacina, cefepime, ceftazidime, ceftriaxona, ciprofloxacina, trimetropín sulfametoxazol y gentamicina, en un porcentaje del 100% de las muestras procesadas, sin embargo, no presenta ningún tipo de resistencia respecto a los antibióticos utilizados en el estudio. La diferencia del total de los antibióticos ensayados se debe a que según la procedencia de la muestra se cambia la tarjeta que debe ser probada.

Ferreira et al. (2005), en el estudio referente a “ Infección urinaria durante el embarazo, perfil de resistencia bacteriana al tratamiento en el Hospital General de Neiva, Colombia” nos indica que de la investigación efectuada en 50 pacientes, 45 presentaron urocultivos positivos; donde *Escherichia coli* fue el germen aislado con mayor frecuencia (64%), seguido por *Klebsiella pneumoniae* (11%), *Enterobacter cloacae* (7%), *Klebsiella oxytoca* (4%) y otros gérmenes (14%). *Klebsiella oxytoca* presentó sensibilidad a trimetropín sulfametoxazol, amikacina, gentamicina, nitrofurantoína, imipenem y Meropenem; y se observó resistencia a ampicilina con un porcentaje del 100%.

Tabla N°4.

Mecanismos de resistencia identificados en Klebsiella pneumoniae

Mecanismos de resistencia identificados en <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Frecuencia	Porcentaje %
BLEE	7	35
Carbapenemasas	1	5
No produjeron mecanismos de resistencia	12	60
TOTAL	20	100

Autor: Diana Ramón Montaña

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

Interpretación:

De las 20 muestras de *Klebsiella pneumoniae*, 7 expresan mecanismos de resistencia donde cuyo mecanismo se expresa con mayor frecuencia es BLEE con un 35%. No se especifican mecanismos de resistencia de *Klebsiella oxytoca* porque no se detectaron en el laboratorio.

Según Velásquez, et. al. (2013):

Los carbapenemes son a la fecha los betalactámicos con el espectro de actividad más amplio. En países latinoamericanos, *Klebsiella pneumoniae* son productoras de BLEE hasta en un 34,6%. En el Perú, en un estudio realizado en nueve hospitales limeños, y que incluyó al Hospital Nacional Arzobispo Loayza (HNAL), se encontró que el 75,1% de las *Klebsiella* aisladas durante los años 2008-2009 eran productoras de BLEE.

Tabla N°5.

Klebsiella pneumoniae productoras de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas según sexo, Diciembre 2017-Abril 2018

<i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas según sexo				
Sexo	BLEE		CARBAPENEMASAS	
	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %
Femenino	3	42,86	0	0
Masculino	4	57,14	1	100
TOTAL	7	100	1	100

Autor: Diana Ramón Montaña

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

Interpretación:

Los mecanismos de resistencia betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas se presentan con mayor frecuencia en hombres.

Tabla N°6.

***Klebsiella pneumoniae* productoras de mecanismos de resistencia (BLEE) y carbapenemasas según edad, Diciembre 2017-Abril 2018.**

<i>Klebsiella pneumoniae</i> de mecanismos de resistencia según edad				
Edad	BLEE		CARBAPENEMASAS	
	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %
Adultos (20 a 59 años)	2	28,58	0	0
Adulto Mayor (más de 60 años)	5	71,42	1	100
TOTAL	7	100	1	100

Autor: Diana Ramón Montaña

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

Interpretación: Los mecanismos de resistencia betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas se presentan con mayor frecuencia en adultos mayores de 60 años o más, con un porcentaje de 71,42% y 100% respectivamente del total de muestras analizadas. En el estudio referente a “Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido”, realizado por Escalante, et al. (2013), los pacientes en estudio estuvieron conformados por hombres y mujeres, la mayor parte de ellos eran de 60 años o más (69,5%), donde cincuenta y uno pacientes presentaron urocultivos positivos para bacterias productoras de BLEE; y se logró confirmar la presencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE en 61 % y 39 % respectivamente.

En definitiva, se confirma que el mecanismo de resistencia (BLEE), según los dos estudios realizados, la incidencia es mayor en adultos mayores (personas de más de 60 años).

Tabla N°7.

Distribución de Klebsiella pneumoniae productora de mecanismos de resistencia BLEE y carbapenemasas según área de servicio, Diciembre 2017-Abril 2018.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de mecanismos de resistencia según área de servicio				
ÁREA DE SERVICIO	BLEE		CARBAPENEMASAS	
	Frecuencia	Frecuencia %	Frecuencia	Porcentaje %
Consulta externa	3	42,85	0	0
Emergencia	3	42,85	0	0
Hospitalización	1	14,30	1	100
TOTAL	7	100	1	100

Autor: Diana Ramón Montaña

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

Interpretación: Los mecanismos de resistencia betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se presenta con igual frecuencia en consulta externa y emergencia con un 42,85%; mientras que las carbapenemasas se presenta solo en el área de hospitalización.

Según Echeverri y Cataño (2010), referido al tema:

Así mismo, los pacientes hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos (UCI) fueron los que presentaron mayor riesgo de desarrollar infección por *K. pneumoniae*; esta bacteria fue la primera causa de infecciones en dichos pacientes con una prevalencia del 14,8%. Para el año 2008, se encontró que los aislamientos de *K.pneumoniae* resistente, productora de BLEE en UCI fueron el 22,3% y en servicios distintos a UCI, el 20,1% (p. 242).

DISCUSIÓN

Las infecciones de vías urinarias se definen como la invasión, multiplicación y colonización del tracto urinario causada en su mayor parte por microorganismos de origen intestinal, como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* y otras Enterobacterias que pueden llegar a las vías urinarias y producir infección, son un problema de salud pública debido a la resistencia o multirresistencia adquirida de varias bacterias (García, 2013; Merino, 2015).

La presente investigación se realizó en un total de 591 muestras con pedidos de urocultivos de usuarios del Hospital General Isidro Ayora durante el período Diciembre 2017-Abril 2018, del crecimiento bacteriano de 225 muestras de orina según criterios de inclusión se obtuvo el aislamiento de *Klebsiella oxytoca* en 2 muestras y de *Klebsiella pneumoniae* en 20 muestras, donde el 50% de estas últimas tiene un perfil de susceptibilidad variable, provenientes de adultos mayores de consulta externa.

En un estudio realizado en un Centro de Atención de Primer Nivel en Pereira, Colombia en el periodo 2010 - 2011 al evaluar las bacterias aisladas en urocultivos, resultados de sensibilidad y resistencia de antibiogramas; se evidenció la resistencia en las bacterias aisladas bajo parámetros de Clinical and Laboratory Standards Institute mediante método manual de difusión de disco Kirby-Bauer con sensidiscos Beckton Dickinson Diagnostics. Los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Enterococcus sp*. El perfil de sensibilidad de los antibióticos para *Klebsiella spp* mostró que la mayor sensibilidad estaba dada para norfloxacin, ciprofloxacina, gentamicina, nitrofurantoina, ceftriaxona y ceftazidina con rangos entre 100,0 % y 83,3 % de sensibilidad, mientras que las resistencias más elevadas se presentaron para piperacilina/tazobactam, ampicilina, amoxicilina y amoxicilina/clavulanato con tasas que varían entre 50,0 % y 86,7 % (Machado & Murillo, 2011).

En otro estudio realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez en pacientes pediátricos. Se estudiaron 457 pacientes, de los cuales 217 (47.48%) fueron niñas y 240 (52.52%) niños. El patógeno aislado con más frecuencia fue *E. coli* (312 pacientes, 68.3%); en segundo lugar se consideraron tanto *E. faecalis* como *E. faecium* (42, 9.7%). Estos patógenos, junto con *K. pneumoniae* (40, 8.7%), representaron el 86.2% de todos los aislamientos recolectados. En *K. pneumoniae* la mitad de las cepas (44%) mostraron el patrón de resistencia de BLEE. La resistencia de *K. pneumoniae* a los fármacos utilizados para el tratamiento convencional fue de más del 62% para TMP/SXT, y una de cada 10 a ciprofloxacina. La resistencia a cefalosporinas fue del 14% (cefepima) al 47% (ceftriaxona). No se mostró resistencia a imipenem ni a meropenem. (López Martínez y otros, 2014).

De los aspectos mas relevantes de este estudio destaca que, *Klebsiella oxytoca* no presentó resistencia alguna; mientras que *Klebsiella pneumoniae*, amikacina, ceftriaxona, gentamicina, ceftazidime, cefepime, cirpofloxacina y trimetropin sulfametoxazol fueron efectivos, sin embargo, en 7 casos se observaron dos mecanismos de resistencia (BLEE y Carbapenemasas), mientras que en un estudio ralizado por Echeverría y Cataño, *K. pneumoniae* es su alta resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, principalmente por la producción de beta-lactamasas, enzimas que hidrolizan dichos medicamentos, entre las cuales las de mayor interés son las beta-lactamasas deespectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas. Para el año 2008, se encontró que los aislamientos de *K.pneumoniae resistente*, productora de BLEE en UCI fueron el 22,3% y en servicios distintos a UCI, el 20,1%, sin embargo, en el presente estudio se observa que, el mecanismo de resistencia Blee se muestra mayormente en consulta externa y emergencia; mientras que las carabapenemasas se presentan en hospitalización.

CONCLUSIONES

- Se concluye que respecto a la susceptibilidad antimicrobiana: la bacteria *Klebsiella pneumoniae* presentó mayor resistencia a los antibióticos ceftazidime, nitrofurantoína, ceftriaxona y ampicilina/sulbactam con un porcentaje mayor al 40%.
- Se evidencia que la bacteria *Klebsiella oxytoca* presentó sensibilidad a los antibióticos: amikacina, cefepime, ceftazidime, ceftriaxona, trimetropín sulfametoxazol, ciprofloxacina y gentamicina, en un porcentaje del 100% de las muestras procesadas.
- De acuerdo a los mecanismos de resistencia BLEE y carbapenemasas que presenta *Klebsiella pneumoniae*, se concluye que de acuerdo al sexo, ésta se presenta mayormente en hombres con un 42,86% y 100% respectivamente; referente a la edad la mayor incidencia es en los adultos mayores con 71,42% en casos de BLEE y 100% en carbapenemasas; respecto al área de servicio el mayor porcentaje se encontró en pacientes de comunidad: consulta externa y emergencia.

RECOMENDACIONES

- A los profesionales de salud y docentes, realizar campañas de concienciación sobre el uso correcto de los antibióticos y la automedicación en la población, para evitar el desarrollo de mecanismos de multiresistencia, situación que provoca un gran problema de salud pública generando complicaciones posteriores en los pacientes.
- Realizar estudios periódicos respecto a los mecanismos de resistencia que presenta la bacteria *Klebsiella pneumoniae* en los establecimientos de salud, para evitar la propagación de los mismos y con ellos establecer procesos de capacitación orientados a evitar la automedicación de antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, H. (2010). *Gram Positivos y Negativos*. Obtenido de <https://bit.ly/2OVJiUZ>
- Argüez, A., Rodríguez, A. y Rojas, N. (2015). Obtenido de <http://bit.ly/2CNpKuH>
- Bailey y Scott. (2007). *Diagnostico microbiologico* (12a. ed.). Buenos Aires-Bogata- Caracas-Madrid - Mexico: Medica Panamericana.
- bioMérieux (2013). *VITEK 2- technology*. 514740-1ES1.
- Brunton L., Lazo, J. y Parker, K. (2007). Goodman E Gilman las bases farmacologicas de la terapéutica (Undécima ed.). Mexico: McGrawHill.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. M100, 28th Edición. ISBN 9701057392.
- Criollo, A. (2015). Obtenido de <http://bit.ly/2OX5ON2>
- Dubelco, D. (2013). *Preparaores de oposicion para la enseñanza*. Obtenido de <http://bit.ly/2DaxZSu>
- Escalante, J., Síme, A. y Díaz, C. (2013). Características clínicas y epidemiológicas en pacientes con infección intrahospitalaria por bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Epidemiología*, 17(1).
- Fajardo, E., Sinchi, J., Pena, S., Campoverde, V., Cruz, Y., y Auquilla, P. (2015). *Corazón de médico*. Obtenido de <http://bit.ly/2z7YuUf>
- Ferreira, F., Olaya, S., Zúñiga, P. y Angulo, M. (2005). *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 56(3).
- Galas, M. y Whonet, R. (2007). *Servicio ANTIMICROBIANOS*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Obtenido de <http://bit.ly/2ORwajs>
- Galiano, A. (2012). *NITROFURANTOINA EN VADEMECUM*. Obtenido de <http://bit.ly/2z6bWI6>
- GERMEN, G. (s.f.). Obtenido de www.grupogermen.org/pdf/klebsiella.pdf.
- Holland, K., y Falck, S. (2014). *Healthline*. Obtenido de <http://bit.ly/2RkotPB>
- INSPI. (2016). *INSPI*. Obtenido de <http://bit.ly/2RlxCHI>
- Jawetz, Melnick, y Adelberg. (2010). *Microbiología Médica*.(25° ed). México, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Jordá, L., Vila, A., Lanza, A., Bonvehi, P., Nazar, J., Mikietuk, A., Smayevsky, J. (2005). *Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad*

- antimicrobiana. Obtenido de Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana: <http://bit.ly/2yG3YpC>
- Koneman, E. (2015). Diagnóstico Microbiológico (Sexta ed.). Madrid: editorial médica panamericana.
- Lopardo, H. (2015). Obtenido de <http://bit.ly/2Pqo6pf>
- López, M., Calderón, E., Olivar, V., Parra, I., Alcázar, V., Castellanos, M., y Garza, A. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de infección de vías urinarias bajas en un hospital pediátrico.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain J., Moro M. y Portolés A. (2008). Velázquez Farmacología Básica y Clínica (18a ed.). Buenos Aires-Madrid: Editorial medica panamericana.
- Machado, J., y Murillo, M. (2011). Scielo. Obtenido de <http://bit.ly/2Odwkzw>
- Malbrán, C. (2012). Obtenido de <http://bit.ly/2RmMDt0>
- Marnet, D. (2016). Salud. Obtenido de <http://bit.ly/2O6ynCx>
- Mayorga, F. (2015). UNAN Obtenido de <http://bit.ly/2OamnQo>
- Medicamentos, C. (2012). VADEMECUM. Obtenido de <http://bit.ly/2RkWM9g>
- Murray, R. (2013). Microbiología Médica. (Sexta ed) Barcelona, España: Elsevier España, S.L.
- Organización mundial de la salud. (2014). Obtenido de <http://bit.ly/2RmIyFc>
- Organización Mundial de la Salud. (2014). Obtenido de <http://bit.ly/2Q0v5IT>
- Organización Mundial de la Salud (2016). Obtenido de <http://bit.ly/2JrEpNv>
- Organización Mundial de la Salud (2016). Obtenido de <http://bit.ly/2RfzTUS>
- Orrego, P., Henao, C., y Cardona, J. (2014). Scielo. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-24482014000400008
- Perez y Robles (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista Médica, 4(3), 186-191.
- Pérez, D. (2009). Obtenido de <http://bit.ly/2zeFinA>
- Picazo, J. (2001). Procedimientos en microbiología Clínica. Obtenido de Metodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos: <http://bit.ly/2PX7BxX>
- Pigrau, C. (2011). Obtenido de <http://bit.ly/2COQ1c7>

- Pírez, M. y Mota, M. (2008). Obtenido de <http://bit.ly/2RqCueT>
- Puerta, G. y Rodriguez, M. (2010). Obtenido de <http://bit.ly/2Od9Qvp>
- Reyes, J. (2015). Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública . Obtenido de <http://bit.ly/2Pue1Yu>
- Rodríguez, T. (2013). *Diagnóstico de enteroparasitosis humana* Obtenido de <http://bit.ly/2Ayip0r>
- Romeua, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., y Eslava, C. (2008). CNIC. Obtenido de <http://bit.ly/2Oaeivr>
- Sánchez, J. (2007). Jano. Obtenido de <http://bit.ly/2OVXvBj>
- Santambrosio, I. (2009). Universidad Tecnológica Nacional. Obtenido de <http://bit.ly/2OcVR8U>
- Seija, V. (s.f.). Obtenido de <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20grupos%20de%20antibi%F3ticos.pdf>
- SEIMC. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*. Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <http://bit.ly/2CMmmA0>
- SEIMC. (2015). *Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes*. Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <http://bit.ly/2zjwzAT>
- Vallejos, C., López, M., Enríquez, M. y Ramírez, B. (2010). Medigraphic. Obtenido de <http://bit.ly/2qfxPk4>
- Velásquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo, Y., Sacsquispe, R. y Fernández, N. (2013). Rev Soc Peru Med Interna, 26(4), 192-6.
- Vignoli, V. (2010). Obtenido de <http://bit.ly/2EPnVA0>
- Whonet. (2016). Protocolo de trabajo red Whonet Argentina. XVII Taller WHONETArgentina. Obtenido de: <https://bit.ly/2xQtQ1I>.

ANEXOS

ANEXO 1.

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, continúe orinando directamente dentro del frasco hasta llenar aproximadamente la mitad. Cerrar el frasco anotar el nombre y apellidos del paciente. Evitar tocar el interior del recipiente



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

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 bebé:

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



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



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



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO



INDICACIONES PARA RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE ORINA

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

TOMA DE MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES HOSPITALIZADOS

A. ORINA OBTENIDA A TRAVÉS DE CATETERISMO TRANSURETRAL

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

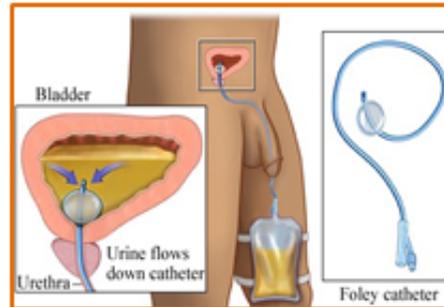


FRASCO ESTÉRIL

B. ORINA OBTENIDA A TRAVÉS DE SONDA VESICAL.

Realizar desinfección del cono de la sonda con alcohol al 70% o solución yodada. No enviar orina que ha estado depositada en la bolsa 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~~ 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 2. AUTORIZACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



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 BETA LACTAMASAS 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 3.

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

RECOLECCIÓN DE DATOS

Hospital			Servicio		
Edad			Género		
Profesión			Procedencia		
Tipo de muestra			Hospitalizado	Si	No
Sondas, catéteres	Si	No	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?		

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 de SOLCA.

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

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

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

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 4.

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	Protocolo para el transporte de la muestra de orina	CÓDIGO: PB04 REVISIÓN: 01 Ed: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 1/4
---	---	--

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 T. , 2013).

Objetivo

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

Alcance

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

Responsables:

- ESTUDIANTES: transporte de muestras.
- DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.

Materiales:

- Cooler hermético
- Medio de transporte Stuart
- Medios de cultivo Agar Sangre

Procedimiento:

Transporte en el Hospital Isidro Ayora:

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.

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.

Transporte del Hospital SOLCA:

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.

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.

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.

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.

Observaciones

- Debe ser transportada por personal capacitado en recipientes de material sólido, impermeable y de fácil limpieza.
- El contenedor debe tener papel absorbente en el fondo para eventuales derrames

Referencias bibliográficas

Rodríguez, T. (2013). *Diagnóstico de enteroparasitosis humana* Obtenido de <http://bit.ly/2Ayip0r>

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

ANEXO 5.

“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	Siembra de muestra y conteo de colonias	CÓDIGO: PB03 REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA: PÁGINA: 1/3
--	---	--	--

Introducción

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

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

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

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

Cuando se obtienen dos recuentos sucesivos con más de 100 000 colonias por ml., la probabilidad de infección es de 80%, cifra que se eleva a 95% si el mismo resultado se logra en tres recuentos sucesivos.

Por lo general, las muestras contaminadas tienden a mostrar cuentas inferiores a 10 000 colonias/ml. Cuando el recuento revela valores intermedios, entre 10 000 y 100 000

colonias/ml, el examen debe repetirse. Conviene advertir que pueden pasar inadvertidas infecciones urinarias verdaderas, si no se toman en cuenta cuentas inferiores a 100 000 colonias por ml, ya que existen diversos factores que pueden explicar recuentos bajos en infecciones urinarias verdaderas, diuresis acentuada, obstrucción uretral, infecciones crónicas e infecciones por cocos grampositivos. (Lopardo, 2015).

Objetivo

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

Alcance

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

Responsables:

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

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

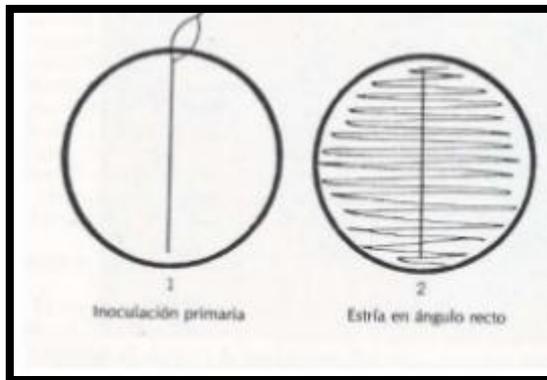
- Muestra a estudiar

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 10 000 colonias por ml.
 - ❖ Entre 10 000 y 100 000 colonias por ml.
 - ❖ Más de (>) 100 000 colonias por ml.

Observaciones

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

Referencias bibliográficas

Lopardo, H. (2015). Obtenido de <http://bit.ly/2Pqo6pf>

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

ANEXO 6.

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK.	CÓDIGO: PB04 REVISIÓN: 01 Ed: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 1/4
---	---	--

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 gramnegativos (GN) VITEK® 2 está diseñada para ser utilizada con VITEK® 2 Systems para la identificación automatizada de los bacilos gramnegativos 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)

Objetivo:

- 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.

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.

Responsables:

- ESTUDIANTES: aplicación del procedimiento, registro de resultados.
- DOCENTES/INVESTIGADORES: validación.
- COLABORADORES: aplicación procedimiento, validación de datos y llenado de registros.

Materiales:

- Tarjeta de identificación bacteriana que viene con el equipo.
- Solución salina estéril (NaCl acuoso al 0,45 a 0,50 %, con un pH de 4,5 a 7,0).
- Tubos de ensayo desechables de plástico transparente (poliestireno) limpios de 12 x 75 mm.
- Medio de cultivo apropiado (Mack Conkey)
- Bastoncillos o torundas estériles.
- Dispensador de solución salina de volumen ajustable.
- Asas desechables.
- Tubos de ensayo con solución salina ya dispensada (NaCl acuoso al 0,45 – 0,50 %, con un pH de 4,5 a 7,0).

Procedimientos

- Prepare el inóculo a partir de un cultivo puro (muestra sembrada en agar Mack Conkey), según las buenas prácticas de laboratorio.
- 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.
- 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.
- 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.

- Coloque el tubo con la suspensión y la tarjeta en donde corresponde en el equipo de acuerdo al manual de usuario.
- Eliminar correctamente los desechos biológicos peligrosos y todo el material utilizado como corresponda, ya sea en desechos comunes, cortopunzantes o especiales.
- 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.
- 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.
- Se obtiene la identificación y resultados a ser interpretados por quien corresponda (bioMérieux, 2013).

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.

Referencias bibliográficas

bioMérieux (2013). *VITEK 2- technology*. 514740-1ES1.

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

ANEXO 7. PROTOCOLO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Nombre: Determinación de la CMI mediante la técnica de microdilución

Concepto: se utiliza test de sensibilidad antimicrobiana para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) la cual indica la concentración necesaria de un antimicrobiano para inhibir el organismo infeccioso en el lugar de la infección.

Objetivo: Determinar la concentración inhibitoria mínima de *Klebsiella spp.*

Materiales

- Solución salina estéril
- Asas, bastoncillos o torundas estériles
- Medio de cultivo Muller-Hinton en caldo
- Cepas control de *Escherichia coli* 25922
- Micropipetas para dispensar volúmenes de 100 a 1000 ul
- Puntas de pipeta desechables
- Tubos de ensayo
- Tapas de tubos de ensayo

Procedimiento:

1. Elegir una colonias aislada de una placa primaria si se satisfacen los requisitos del cultivo
2. Subcultivar el organismo a analizar en el medio de agar apropiado e incúbelo adecuadamente
3. Transferir asépticamente 3,0 mL de solución salina estéril en un tubo de ensayo de plástico transparente
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 2
5. Prepare una suspensión homogénea de organismo con una densidad equivalente al patrón McFarland.
6. Para una dilución automática: Colocar el tubo de suspensión preparado en el paso 3 en el casete con o sin una tarjeta de identificación. En la posición siguiente del casete, coloque un tubo vacío y una tarjeta AST, estas tarjetas pueden contener algunos antimicrobianos que no han demostrado ser eficaces para el tratamiento de infecciones debido a todos los organismos que pueden ser analizados .El instrumento realiza automáticamente la dilución de la suspensión bacteriana para obtener un inóculo adecuado para la tarjeta de sensibilidad.

Observaciones

- Verificar el nivel de la solución salina después del llenado. Si una tarjeta se ha llenado incorrectamente, por el nivel de solución salina en el tubo no cargar la tarjeta.
- Seguir las instrucciones para la eliminación de los desechos biológicos peligrosos.

Referencias bibliográficas

bioMérieux (2013). *VITEK 2- technology*. 514740-1ES1.

ELABORADO POR: Diana Ramón Montaña	REVISADO Y APROBADO POR: Lcda. Carmen Ullauri
--	---

ANEXO 8.

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BLEE</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 01 Ed: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 1/6</p>
---	--	---

INTRODUCCIÓN

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

OBJETIVOS:

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

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 ≥ 1 ug/ml de ceftazidime, aztreonam o ceftriaxona.

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.

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:

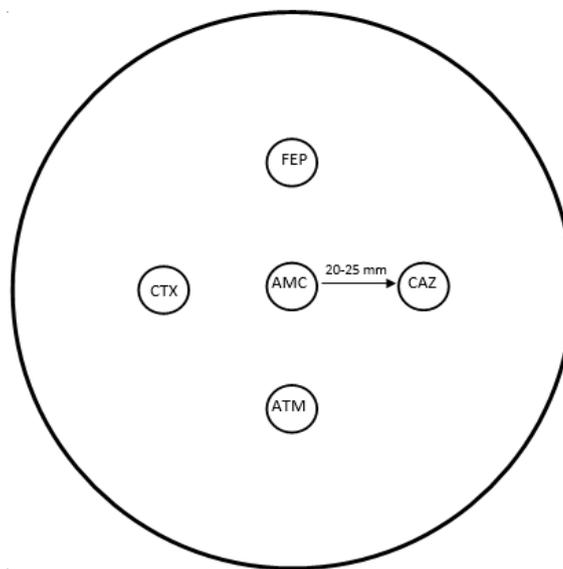
- ✓ Ceftazidime 30 ug
- ✓ Ceftazidime + Ác. Clavulánico 30/10 ug
- ✓ Cefotaxime
- ✓ Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug

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.

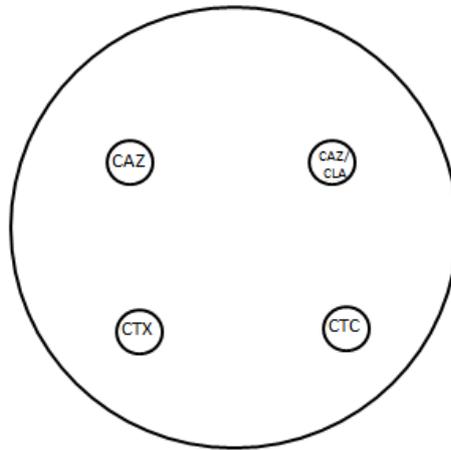


9. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C y se realiza la lectura dentro de las 16-20 horas siguientes.
10. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.

-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 35°C +/- 2°C y se realiza la lectura dentro de las 10 a 18 horas.
11. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.

OBSERVACIONES:

Reporte:

Para todas las cepas productoras de ESBL confirmadas:

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

Discos combinados:

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

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

a) Positivo. Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime, cefotaxime o cefepime en presencia de ácido clavulánico ≥ 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	de 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".

Referencias bibliográficas:

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100, 28th Edición. ISBN 9701057392.

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

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

ANEXO 9.

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS</p>	<p>CÓDIGO: PB06 REVISIÓN: 01 Ed: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 1/12</p>
---	--	--

1. Introducción:

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

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

2. Objetivos:

- Identificar por el método de sinergia de discos y discos combinados la presencia de enzimas carbapenemasas en bacterias gramnegativas aisladas de muestras de orina.
- Detectar por el método de inactivación de carbapenémicos y colorimétrico la presencia de enzimas carbapenemasas en bacterias gramnegativas 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 ≥ 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; ≥ 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:

5.1. 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 (...)
- Incubadora
- Guardián

5.2. 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 /ácido borónico(10/600 µg)
- Disco con Meropenem/EDTA (10/1000 µg)
- Disco con Meropenem/cloxacilina (10/500-750 µg)
- Incubadora
- Guardián

5.3. Materiales para el método colorimétrico (carba NP test):

De acuerdo al kit CarbaNP

5.4. Materiales para el método inactivación de carbapenemasas:

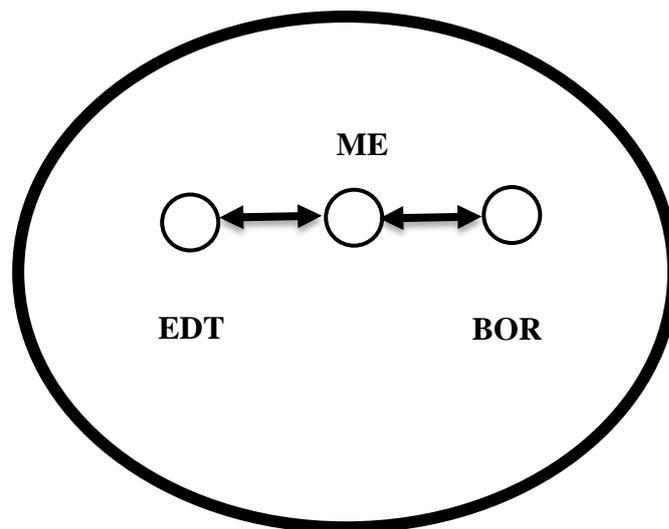
- TSB (alícuotas de 2 ml)
- Discos Meropenem (10 µg)
- Asas de inoculación (1-uL o 10-µL).
- Solución salina esteril
- Placas agar Mueller Hinton.(MHA)
- Cepa *E. coli* (ATCC 25922).
- Tubos Eppendorf

6. Procedimiento:

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

- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con 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 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo.
- Finalmente, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.
- Dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos.
- Esterilizar una pinza a la llama de la lámpara de alcohol.
- Tomar con la pinza estéril el disco de Meropenem y colocarlo en la superficie del agar ya inoculado.

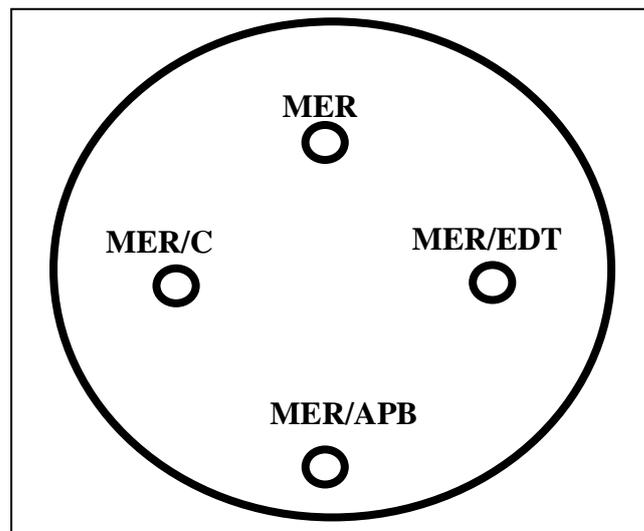
- Nuevamente se esteriliza la pinza y se toma un disco con inhibidor EDTA y se lo coloca a una distancia de 1 o 2 cm (margen a margen) del disco de Meropenem.
- Repetir la esterilización de la pinza y realizar el mismo proceso para colocar el disco con inhibidor que contiene ácido fenilborónico.
- Incubar a temperatura de 35 ± 2 °C, durante 16-20 horas.
- Realizar el protocolo con las cepas control positivo y negativo.



6.2. Procedimiento para el método de discos combinados con inhibidor

- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con 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.
- Sumergir un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, elimine el exceso de líquido presionando firmemente contra las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido.
- Inocular antes de 15 minutos después de haber ajustado la suspensión.
- Tomar la caja de Petri por la base e inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril.
- Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución homogénea del inóculo.
- Finalmente, se debe estriar el hisopo por el borde del agar.

- Dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos.
- Esterilizar una pinza a la llama de la lámpara de alcohol.
- Tomar con la pinza estéril el disco de Meropenem y colocarlo en la superficie del agar ya inoculado.
- Repetir la esterilización de la pinza y se toma un disco de meropenem/cloxacilina, meropenem/ácido fenilborónico y meropenem/EDTA
- Incubar a temperatura de 35 ± 2 °C, durante 16-20 horas.



6.3. Procedimiento para el método colorimétrico (carba NP test):

Según el Kit

6.4. Procedimiento para el método inactivación de carbapenemasas:

- Rotular los tubos Eppendorf para cada aislamiento a ensayar, y emulsionar bacterias (1 μ L) de una placa de agar sangre con cultivo puro de la bacteria problema (se necesita cultivo fresco) en 2 ml de TSB y vórtexear por 10-15 segundos.
- Agregar un disco meropenem de 10 μ g 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 \pm 15 minutos.
- Después de completar la incubación de la suspensión, preparar la suspensión 0.5 de McFarland (usando el método directo) de *E. coli* ATCC 25922 en solución salina estéril.

- Inocular una placa MHA con la suspensión preparada, antes de los 15 minutos y dejar reposar 5 minutos antes de colocar los discos de meropenem.
- Sacar el tubo Eppendorf de la incubadora, remover el disco de meropenem usando 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 *E. coli* ATCC 25922 susceptible a meropenem. Capacidad de las cajas: 4 discos en una placa MHA de 100 mm.
- Invertir e incubar las placas MHA a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el aire ambiente durante 18-24 horas, después de la incubación, medir las zonas de inhibición como para el método rutinario de difusión de disco.
- Realizar el protocolo con las cepas control positivo y negativo.

7. Observaciones:

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

Se 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 Metallo 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”.

7.1.1. Reporte de resultados:

- **SME/NMC:** No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (1ra y 2da generación) y carbapenems independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad):

amoxicilina/clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, y monobactames (demostrar ausencia de BLEE asociada) y agentes no betalactámicos.

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

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

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

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

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

Fuente: CLSI 2017

7.2.2. Limitaciones del procedimiento:

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

7.3. Reporte de resultados para el método colorimétrico (carba NP test):

SEGÚN el kit

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

7.4.1. Interpretación de resultados:

- **Carbapenemasa positiva:** Halo de 6-15 mm o presencia de colonias intrahalo en una zona de 16-18 mm. Si el aislado de prueba produce carbapenemasa, el meropenem del disco se hidrolizará y no habrá inhibición o inhibición limitada del crecimiento de la *E. coli* ATCC 25922 susceptible a meropenem.
- **Carbapenemasa negativa:** Halos igual o mayores a 19 mm. Si el aislado de prueba no produce carbapenemasa, el meropenem del disco no se hidrolizará e inhibirá el crecimiento de *E. coli* susceptible a meropenem ATCC 25922.
- **Indeterminado:** Zona 16-18 mm. La presencia o ausencia de una carbapenemasa no se puede confirmar por este método.

7.4.2. Reporte de resultados:

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

8. Referencias bibliográficas:

- CLSI. (2009). Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. USA.
- CLSI, (2018). Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (27^a ed.) Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100.

- SEIMC. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*. Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Obtenido de <http://bit.ly/2CMmmA0>
- SEIMC. (2015). *Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes*. Obtenido de Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <http://bit.ly/2zjwzAT>

ELABORADO POR: Tayron Celly Gina Barrionuevo	REVISADO Y APROBADO POR: Lcda. Carmen Ullauri
---	---

ANEXO 10. CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE BLEE Y CARBAPENEMASAS

CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE CARBAPENEMASAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS

CÓDIGO: 9503
REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1
FECHA:
PÁGINA: 1/1

FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS 03-09-2018

CARBAPENEMASAS

Código de Muestra	Microorganismo identificado	Sinergia de discos		Discos combinados						Inactivación				
		MM APB EDL	Control de calidad	APB	MM/ APB	EDL	MM/ EDTA	CLO	MM/ CLO	Incorporación de resultado	Control de calidad	Resultado	Control de calidad	
BAA 1705	K. pneumoniae	Pos Neg	APB EDTA		27mm		20 mm		21 mm		PH= 27mm			Positivo No hay cambio

SIGNIFICADO DE SIGLAS:
MM = Meropenem
OXA = Oxacilina
APB = Acido Fenilborónico
EDL = EDTA
CLO = Cloxacilina
MM/CLO = Meropenem / Cloxacilina
MM/APB = Meropenem / Acido Fenilborónico
MM/EDTA = Meropenem / EDL

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

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
Sinergia de discos:
Positivo: Ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) e presencia de una "zona fantasma" entre el carbapenémico y el inhibidor. Sinergia MM/APB identifica Carbapenemasas de Clase A y/o Hiperproducción de AmpC. Sinergia MM/EDTA identifica carbapenemasas de Clase B.
Negativo: No ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de "zona fantasma".
Método directo o colorimétrico:
Positivo: Un resultado positivo del CARBA-AP indicará inequívocamente cepa productora de carbapenemasas, presentando un cambio de coloración de rojo/naranja a amarillo.
Negativo: No se evidencia cambio de coloración.
Discos combinados:
Positivo: Incremento de halo de inhibición ≥5 del carbapenémico con inhibidor con respecto al Carbapenémico.
Negativo: No hay incremento de halo de inhibición ≥5 del carbapenémico con inhibidor con respecto al carbapenémico.

Cepa BAA 1705 (control positivo).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS

REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1
FECHA:
PÁGINA: 1/1

FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS 03-09-2018

CARBAPENEMASAS

Código de Muestra	Microorganismo identificado	Sinergia de discos		Discos combinados						Inactivación				
		MM APB EDL	Control de calidad	APB	MM/ APB	EDL	MM/ EDTA	CLO	MM/ CLO	Incorporación de resultado	Control de calidad	Resultado	Control de calidad	
BAA 1706	K. pneumoniae	Neg Neg	APB EDTA		21 mm		23 mm		30 mm		PH= 31 mm			Positivo No hay cambio

SIGNIFICADO DE SIGLAS:
MM = Meropenem
OXA = Oxacilina
APB = Acido Fenilborónico
EDL = EDTA
CLO = Cloxacilina
MM/CLO = Meropenem / Cloxacilina
MM/APB = Meropenem / Acido Fenilborónico
MM/EDTA = Meropenem / EDL

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

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
Sinergia de discos:
Positivo: Ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) e presencia de una "zona fantasma" entre el carbapenémico y el inhibidor. Sinergia MM/APB identifica Carbapenemasas de Clase A y/o Hiperproducción de AmpC. Sinergia MM/EDTA identifica carbapenemasas de Clase B.
Negativo: No ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de "zona fantasma".
Método directo o colorimétrico:
Positivo: Un resultado positivo del CARBA-AP indicará inequívocamente cepa productora de carbapenemasas, presentando un cambio de coloración de rojo/naranja a amarillo.
Negativo: No se evidencia cambio de coloración.
Discos combinados:
Positivo: Incremento de halo de inhibición ≥5 del carbapenémico con inhibidor con respecto al Carbapenémico.
Negativo: No hay incremento de halo de inhibición ≥5 del carbapenémico con inhibidor con respecto al carbapenémico.

Cepa BAA 1706 (control negativo).

CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE BLEE

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

Fecha: ___/___/___

FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS

Código de muestra	Organismo identificado	BLEE					Discos combinados			
		Sinergia de discos		Control de calidad	CAZ	CAZ/CLA	Resultado/positivo	CTX	CTX/CLA	Resultado/positivo
		Control de calidad	CRO FEP AMC CAZ ATM							
25922	E. coli	Neg			38 mm	34 mm		40 mm	42 mm	
700603	K. pneumoniae	Pos	FEP=42mm FOX=31mm		10 mm	26 mm				
69547	E. coli	Pos	FOX=30mm ATM: 21mm		18 mm	35 mm				
69541	E. coli	Pos	FOX=6mm ATM: 18mm	ATM: 18mm	14 mm	31 mm				
69400	E. coli	Pos	FEP=16mm FOX=23mm		16 mm	27 mm		13 mm	28 mm	
69863	E. coli	Pos	FOX=32mm ATM: 24mm		32 mm	40 mm				
71204	E. coli	Pos	FOX=31mm ATM: 14mm		6 mm	35 mm				
69753	K. pneumoniae	Pos	FOX=33mm ATM: 6mm		10 mm	33 mm				
69854	E. coli	Pos	FOX=33mm ATM: 10mm		14 mm	34 mm				

SIGNIFICADO DE SIGLAS:

CHD: Ceftriaxone
 FEP: Cefepime
 AMC: Amoxicilina
 CAZ: Ceftazidime
 ATM: Aztreonam
 CTX: Cefotaxime
 CAZ/CLA: ceftazidime/ claritromicina
 CTX/CLA: cefotaxime/ claritromicina

Obtención y expresión de resultados

Prueba de Sinergia de Discos:

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

Prueba de Discos combinados:

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

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

Cepa ATCC 25922 (control negativo) y cepa ATCC 700603 (control positivo).

ANEXO 11. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)
LABORATORIO TERCEROS PAÍSES

FORMULARIO DE ENVÍO DE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES A LOS ANTIMICROBIANOS

Código: F-RAM-001
Edición: 03
Fecha de Aprobación: 29/12/2017

Macro-Proceso: Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica y Referencia Nacional

Proceso Interno: Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos

Origen Remitente: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Hora de aislamiento: 01-02-2018

Institucional: Carmen Ullauri

Fecha de envío: 07-03-2018

Responsable de envío: Carmen Ullauri

Número Telefónico: 0994392263

DATOS DEL PACIENTE:

Nombres y Apellidos: Acaro Saenz Carlos Joaquín

Edad: 95

Género: Femenino Masculino

Fecha de ingreso al servicio: -

Ci: 1100166387

HC: -

Hospitalización / Servicio: UCI

Ambulatorio: **Emergencia:** **UCI:**

Terapia Antimicrobiana: -

Diagnóstico del Paciente: -

TIPO DE DERIVACIÓN:

Identificación de Cepa Confirmación Resistencia / Mecanismo

DATOS DE LA CEPA:

Género: Klebsiella

Especie: pneumoniae

Código Laboratorio: -

Tipo de muestra: Orinal

Mecanismo de resistencia inferido: carbapenemasas KPC

MEDIOS DE TRANSPORTE: Stuart Agar Nutritivo

Antibiótico	Concentración	Halo en mm	Antibiótico	Concentración	Halo en mm	Antibiótico	Concentración	Halo en mm
AMIKACINA	30 ug		CLINDAMICINA	2 ug		OXACILINA	1 ug	
AMOXICILINA	30 ug		COLISTIN	10 ug		PIP/TAZ	100/10 ug	
AMOX/CLAVULANATO	20/10 ug		CTX/CLA	30/10 ug		RIFAMPICINA	5 ug	
AMP/SULBACTAM	10/10 ug	6 mm	ERITROMICINA	15 ug		SULF/TRIME	23.75/1.25 ug	
AMPICILINA	10 ug		ERTAPENEM	10 ug		TEICOPLANINA	30 ug	
AMREONAM	30 ug	6 mm	ESTREPTOMICINA	300 ug		TETRACICLINA	30 ug	
AMAZ/CLA	30/10 ug		FOSFOMICINA	200 ug		TIGECICLINA	15 ug	
AMIFLOXACINA	30 ug		GENTAMICINA	120 ug		VANCOMICINA	30 ug	
AMIFLOXACINA	30 ug		GENTAMICINA	10 ug				
AMIFLOXACINA	30 ug	6 mm	IMPENEM	10 ug	6 mm			
AMIFLOXACINA	30 ug		LEVOFLOXACINA	6 ug				
AMIFLOXACINA	30 ug	6 mm	LINEZOLID	30 ug				
AMIFLOXACINA	30 ug		MEROPEM	10 ug	6 mm			
AMIFLOXACINA	30 ug		NITROFURANTOINA	300 ug				
AMIFLOXACINA	30 ug		NORFLOXACINA	10 ug				
AMIFLOXACINA	5 ug	6 mm						

NOTA: Favor adjuntar hoja de equipo automatizado. Favor llenar todos los datos solicitados.

Contactos en caso de inquietudes: Quito: Mtr. José Eduardo Villacís / jvillacis@inspi.gob.ec / 02 250 9625

Guayaquil: Bq. Evelyn Cruz Vargas Arroyo / evargas@inspi.gob.ec / 04 226 2281 ext. 217

Cuenca: Espc. Nadia Patricia Villavicencio Apolo / nvillavicencio@inspi.gob.ec / 07 410 9301

Horario de recepción de cepa: 08h00 a 16h00.

Entregado por:	Recibido por:	Revisado por:
Responsable Externo de la Entrega de Cepa	Analista	Analista
<i>[Firma]</i>	Firma	Firma
Fecha: 07-03-2018	Fecha: <input type="text"/> Hora: <input type="text"/>	Fecha: <input type="text"/>

DD. INSPI:

Página

Muestra de *Klebsiella pneumoniae* con mecanismo de resistencia tipo Carbapenemasa.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA INSPI

"Dr. Leopoldo Izquieta Perez"
 CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS
 ranregionaustro@inspi.gob.ec

Origen = UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 Responsable = Carlos Joaquín
 Responsable = Acaro Saez
 Laboratorio = 001
 Clínica paciente = 1100166287

Fecha de recepción = 8-mar-2018
 Código INSPI = UNL065-0318RAM-C
 Tipo de muestra = Orina
 Microorganismo recibido = *Klebsiella pneumoniae*
 Motivo de la solicitud = Confirmar Resistencia

Pruebas microbiológicas
 Microorganismo = *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae*

	Crecimiento INSPI - RA			Crecimiento INSPI - RA	
Clindamicina	R	6 mm	Cefotaxima	R	13 mm
Clotrimazol	R	6 mm	Ceftazidima	R	6 mm
Colistina	R	6 mm	Ciprofloxacina	R	6 mm
Cefepima/Sulfametoxazol	R	6 mm	Ampicilina/Sulbactam	R	6 mm
Colistina	R	8 mm	Meropenem	R	6 mm
Colistina	R	13 mm	Piperacilina/Tazobactam	R	7 mm
Colistina	R	8 mm	Amicacina	I	15 mm
Colistina	S	20 mm	Ertapenem	R	6 mm
Colistina	R	6 mm			

Metodología de identificación: Manual
 Metodología de sensibilidad: Difusión de disco
 Metodología de interpretación: CLSI+EUCAST
 Resultado de la prueba: Positivo
 Mecanismo de resistencia: Positivo
 Mecanismo de resistencia: Positivo
 Mecanismo de resistencia: SI
 Mecanismo de resistencia: Positivo
 Mecanismo de resistencia: Negativo
 Mecanismo de resistencia: Negativo
 Mecanismo de resistencia: Negativo
 Mecanismo de resistencia: Microorganismo productor de carbapenemasa tipo KPC.
 Considerar el uso de terapia combinada.
 Favor Mantener la Vigilancia al microorganismo
 Nadia Villavicencio/ José Villacís Documento firmado electrónicamente

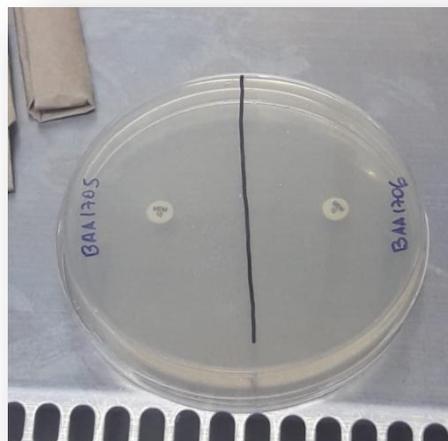
INFORMACIÓN ADICIONAL

Hoja de confirmación enviada por el INSPI de la muestra de *Klebsiella pneumoniae* con mecanismo de resistencia Carbapenemasa.

ANEXO 13. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA



Comprobación del crecimiento normal del control positivo BAA 1705



Sembrado de las cepas controles BAA 1705 (control positivo) y BAA 1706 (control negativo)

PARAMETROS	RESULTADOS	UNIDADES	VALORES DE REFERENCIA
<p>Paciente: SALINAS ROMERO, JENNY DEL CARMEN ** 108602 **</p> <p>Etab: 26 Fecha de Ingreso: 09/07/2018 13:20:30</p> <p>Sexo: Mujer Fecha de Ingreso: 04/02/2018 11:20:22</p> <p>Cédula: 1102600077 Origen: HOSPITAL UAJCEN</p> <p>Médico(Dr./Dra.): MEDICO GENERAL Servicio: UCI</p>			
<p>TESTONES: BAZILO 0-10-2000</p> <p>FILAMENTOS: MICROSIS...</p> <p>LOGIA YANA CARRON 12:47:21 08/07/2018</p> <p>BACTERIOLOGIA</p> <p>CULTIVO DE URINA (SINOCULTIVO) DIA: YOMARA OCHOA BYE 12:54:42 19/07/2018</p> <p>Mayor a 100.000 UFC/ml. Cuentas con CERN PRODUCTIVA DE BLT.</p>			
	Valencia	CM	
AMBIACINA (AK)	S	<= 2	
AMPICINA	R	8	
CEFTAZOLAM (ZAM)	R	8	
CEFEPIME (PEP)	R	7	
CEFTAZIDIMA (CAZ)	R	8	
CEFTRIAXONA	R	<= 4	
CEPROLOXACINA	R	<= 4	
GENTAMICINA (GN)	S	<= 2	
MEROPENEM	S	<= 0,25	
NITROFRANTOINA (F)	S	<= 16	
TRIMETOPRIM	R	<= 16	
SULFAMETOXAZOLE	R	<= 16	

Resultados de análisis de laboratorio del Hospital Isidro Ayora.

ANEXO 14.

Tlga. Yaritza Pogo P.

**TLGA. SECRETARIADO EJECUTIVO TRILINGUE
CERTIFICADA EN SUFICIENCIA DE INGLES POR FINE TUNED ENGLISH**

CERTIFICA:

Que he realizado la traducción de español a Inglés del artículo científico y resumen derivado de la tesis: **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA, LOJA”.**

De la autoría de la Señorita: *Diana Carolina Ramón Montaña*, portadora de la cédula de identidad número 1105008898, egresada de la carrera Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, la misma que se encuentra bajo la dirección de la Lic. Carmen Alejandra Ullauri González.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando al interesado hacer uso del presente en lo que estime conveniente.

Loja, 31 de octubre del 2018.



Tlga. Yaritza Pogo P.

**TLGA. SECRETARIADO EJECUTIVO TRILINGUE
CERTIFICADA EN SUFICIENCIA DE INGLES POR FINE TUNED ENGLISH**

ANEXO 15.



HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA
Laboratorio Clínico

Loja, 26 de Octubre del 2018

Lcdo. Ángel Luzón Ramírez
**SUBDIRECCIÓN DE GESTIÓN DE APOYO DIAGNÓSTICO Y TERAPEÚTICO DEL HOSPITAL
GENERAL ISIDRO AYORA DE LA CIUDAD DE LOJA**

CERTIFICO:

Que la Srta. DIANA CAROLINA RAMÓN MONTAÑO con C.I. 1105008898, realizó en el Hospital General Isidro Ayora de la ciudad de Loja, el proyecto de investigación "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *KLEBSIELLA SPP* CAUSANTES DE INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA, LOJA", el cual se realizó dentro del proyecto de investigación denominado "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS DE MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA LOJA 2017".

Es todo lo que puedo certificar en honor a la verdad, y autorizo al interesado hacer uso del presente para lo que estime conveniente.


Lcdo. Ángel Luzón Ramírez


Lic. Angel Luzón R.
SUBDIRECTOR DE ESPECIALIDADES DE APOYO
DIAGNÓSTICO Y TERAPEÚTICO

**SUBDIRECCIÓN DE GESTIÓN DE APOYO DIAGNÓSTICO Y TERAPEÚTICO DEL HOSPITAL
GENERAL ISIDRO AYORA DE LA CIUDAD DE LOJA**