



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

TÍTULO

**“DETERMINACIÓN DE BETALACTAMASAS AmpC y
CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS EN
MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES QUE ASISTEN AL
HOSPITAL ISIDRO AYORA”**

MACROPROYECTO:

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

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN
LABORATORIO CLÍNICO

AUTORA:

Gina Stéfany Barrionuevo Sarango

DIRECTORA:

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

LOJA-ECUADOR

2018

CERTIFICACIÓN

Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado en el marco del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, todo el proceso de desarrollo del trabajo investigativo titulado: **“DETERMINACIÓN DE BETALACTAMASAS AmpC y CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES QUE ASISTEN AL HOSPITAL ISIDRO AYORA”** de autoría de la Srta. **GINA STÉFANY BARRIONUEVO SARANGO**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Loja, 14 de noviembre del 2018

Atentamente:



.....
Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Gina Stéfany Barrionuevo Sarango, declaro ser autora del presente trabajo de tesis, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

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

Autora: Gina Stéfany Barrionuevo Sarango

Firma: _____



Cédula: 1104688930

Fecha: 14 de noviembre del 2018

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Gina Stefany Barrionuevo Sarango, autora de la tesis titulada: “**DETERMINACIÓN DE BETALACTAMASAS AmpC y CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES QUE ASISTEN AL HOSPITAL ISIDRO AYORA**”, como requisito para optar 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 catorce días del mes de noviembre del dos mil dieciocho, firma la autora.

Firma:

Autora: Gina Stefany Barrionuevo Sarango

Cédula de identidad: 1104688930

Correo electrónico: gina.barrionuevo@unl.edu.ec

Celular: 0982882093

DATOS COMPLEMENTARIOS:

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

Tribunal de Grado:

Presidente: Lcda. María de Cisne Loján González, Mg. Sc.

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

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

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a Dios, quien ha cuidado de mí siempre y ha sabido guiarme por el camino del bien.

A mis padres Julio y María, a quienes amo desde siempre; me han estado apoyando en cada paso de la vida, enseñándome a luchar siempre por mis sueños y a no darme por vencida.

A mis hermanas Karina y Mónica, con quienes he compartido muchos momentos buenos y malos, pero que a pesar de todo siempre han estado ahí para animarme, a quienes también amo.

A mi querido esposo Marvin, quien me ha motivado a seguir adelante, a quien desde el momento en que llegó a mi vida me ha enseñado con su humildad a reconocer cuando me equivoco y a no desanimarme por las circunstancias, quien siempre está ahí para regalarme una sonrisa en los momentos de desesperación.

Gina Stéfany Barrionuevo Sarango

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, me gustaría agradecer a Dios por permitirme culminar una etapa más en mi vida.

A toda mi familia por ser quienes me han apoyado de una u otra manera en cada momento y en cada una de las decisiones de vida.

A la Universidad Nacional de Loja, a cada uno de los docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico que han estado presentes durante mi formación, quienes han sabido entregar una parte de su conocimiento, enseñanzas y métodos para entender los procesos a veces complejos que se dan durante el estudio.

Al personal del Hospital Isidro Ayora, quienes me permitieron realizar el muestreo de la investigación.

A la licenciada Carmen Ullauri por haberme dado la oportunidad de formar parte del macroproyecto el cual ella dirige y por transmitirme su entusiasmo por la investigación y, sobre todo, por el cariño y la dedicación con la que nos enseña.

A mi directora de tesis, la Dra. Sandra Freire, por haber confiado en mí, por su tiempo, apoyo y guía en la dirección de este trabajo.

A las licenciadas Glenda Rodríguez, Magdalena Villacis e Ilena Delgado, por su constante disponibilidad para ayudarme, así como por sus consejos y sugerencias.

A mi estimado amigo Bryan quien ha estado ahí desde el colegio apoyándome, a mis nuevas amigas quienes me han dado su cariño, paciencia y escucha en cada una de las reuniones, de manera especial a Mercedes y Gladys por su tiempo y estar siempre ahí para las personas que las necesitamos.

ÍNDICE

CARÁTULA	i
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE	vii
1. Título	1
2. Resumen.....	2
Summary	3
3. Introducción	4
4. Revisión de literatura	7
4.1 Infección de Vías urinarias	7
4.2 Etiología.....	7
4.3 Las bacterias	8
4.4 Enterobacterias.....	8
4.5 Tratamiento.....	9
4.5.1 Antibióticos Betalactámicos.....	9
Cefalosporinas.....	10
Carbapenémicos..	12
4.6 Resistencia bacteriana.....	13
4.7 Etiología de la resistencia según	13
4.8 Epidemiología.....	14
4.9 Mecanismos de resistencia a antibióticos	15

4.9.1 Betalactamasas.....	16
4.9.1.1 Principales tipos de betalactamasas en enterobacterias.....	17
4.9.1.2 Betalactamasas AmpC.....	18
4.9.1.3 Carbapenemasas.....	20
4.10 Métodos de determinación de betalactamasas tipo AmpC y Carbapenemasas	22
4.10.1 Métodos de determinación de betalactamasas AmpC	23
4.10.2 Métodos de determinación de betalactamasas tipo carbapenemasas	23
4.11 Control de calidad en las pruebas de susceptibilidad	25
5. Materiales y Métodos.....	27
6. Resultados	33
7. Discusión.....	38
8. Conclusiones	41
9. Recomendaciones	42
10. Bibliografía	43
11. Anexos	48
Anexo 1. Solicitud de supervisión para el desarrollo de la investigación.....	48
Anexo 2. Trípticos informativos para la recolección de la muestra de orina.....	49
Anexo 3 Formato del consentimiento informado	52
Anexo 4. Formulario para obtención de información de cada paciente.....	53
Anexo 5. Protocolo de Recepción de muestras	54
Anexo 6. Protocolo para transporte de muestra al centro de diagnóstico de la UNL	57
Anexo 7. Protocolo de siembra de Urocultivos.....	60
Anexo 8. Protocolo de Identificación bacteriana en el equipo automatizado	65
Anexo 9. Registro de laboratorio para la selección de cepas de enterobacterias identificadas como sospechosas de producción de betalactamasas AmpC y Carbapenemasas	69

Anexo 10. Protocolo para Determinación fenotípica de betalactamasas AmpC.....	70
Anexo 11. Protocolo para determinación de Carbapenemasas	75
Anexo 12. Control de calidad interno	85
Anexo 13. Control de calidad externo.....	89
Anexo 14. Formato de los registros de los resultados obtenidos	91
Anexo 15. Evidencia Fotográfica.....	93
Anexo 16. Certificado de traducción del Resumen.....	96

1.Título

DETERMINACIÓN DE BETALACTAMASAS AMPC Y CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES QUE ASISTEN AL HOSPITAL ISIDRO AYORA.

2. Resumen

La resistencia antimicrobiana es una realidad actual, las *Enterobacteriaceae* son una de las familias bacterianas que presentan con mayor frecuencia resistencia a múltiples antibióticos, algunas son productoras de enzimas que confieren resistencia incluso a los dotados de mayor espectro de actividad, por lo que se propuso el presente estudio denominado “Determinación de betalactamasas AmpC y carbapenemasas en enterobacterias aisladas en muestras de orina de pacientes que asisten al Hospital Isidro Ayora”. El estudio tuvo un enfoque cuali-cuantitativo de tipo descriptivo y transversal, cuyos objetivos fueron identificar Betalactamasas de tipo AmpC y Carbapenemasas en cepas aisladas de enterobacterias de muestras de orina y relacionar los resultados según sexo, edad y procedencia en pacientes hospitalarios y ambulatorios. La muestra estuvo conformada por cepas de enterobacterias aisladas de 250 muestras, de las cuales 7 (2,8%) presentaron betalactamasas AmpC y carbapenemasas. Al relacionar los resultados obtenidos, la producción de AmpC se da en igual frecuencia en el sexo masculino y en el femenino con 1 (14,3%), únicamente en adultos mayores, cuyos pacientes son ambulatorios; mientras que la producción de carbapenemasas se da mayoritariamente en el sexo masculino con 4 (57,1%) que en el sexo femenino con 1 (14,3%), sólo en adultos mayores, cuyos pacientes en su mayoría 3 (42,8%) son hospitalizados y en menor frecuencia 2 (28,6%) son ambulatorios. Con estos resultados se ha observado que todavía no es muy frecuente este tipo de betalactamasas en nuestra provincia, pero el hecho de su presencia ya es una alerta importante.

PALABRAS CLAVES: *Enterobacteriaceae*, betalactamasas AmpC, carbapenemasas.

Summary

Antimicrobial resistance is a current reality, the Enterobacteriaceae are one of the bacterial families that most frequently exhibit resistance to multiple antibiotics, some are producers of enzymes that confer resistance even to those endowed with a greater spectrum of activity, Therefore, the present study entitled "Determination of AmpC beta-lactamases and carbapenemases in enterobacteria isolated in urine samples from patients attending the Isidro Ayora Hospital" was proposed. The study had a qualitative and quantitative approach of descriptive and transversal type, whose objectives were to identify Betalactamasas of type AmpC and Carbapenemasas in isolated strains of Enterobacteriaceae of urine samples and to relate the results according to sex, age and origin in hospital and ambulatory patients. The sample consisted of strains of enterobacteria isolated from 250 samples, of which 7 (2.8%) presented beta-lactamases AmpC and carbapenemasas. When relating the obtained results, the production of AmpC occurs in the same frequency in the male sex and in the female with 1 (14.3%), only in older adults, whose patients are ambulatory; while the production of carbapenemasas occurs mainly in males with 4 (57.1%) than in females with 1 (14.3%), only in older adults, whose patients mostly 3 (42.8%). %) are hospitalized and less frequently 2 (28.6%) are ambulatory. With these results it has been observed that this type of beta-lactamases is not very frequent in our province, but the fact of its presence is already an important warning.

KEYWORDS: *Enterobacteriaceae*, beta-lactamases AmpC, carbapenemases.

3. Introducción

En los últimos años se ha producido un aumento rápido en la presencia de bacterias multirresistentes, en las cuales dentro de ellas están las enterobacterias productoras de betalactamasas de tipo AmpC y carbapenemasas. La familia de las enterobacterias constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas que poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas además de otros factores de virulencia, en general lo que contribuye a la resistencia bacteriana es el uso indiscriminado de antimicrobianos, la hospitalización que expone a los pacientes al uso de antibióticos y riesgo de colonización por gérmenes multirresistentes, otros factores son la automedicación y llevar un tratamiento sin respetar las indicaciones del médico (Puerta y Mateos, 2010, pág. 3426).

Las betalactamasas tipo AmpC o cefalosporinasas, son serinbetalactamasas; que en la mayoría de la familia *Enterobacteriaceae*, son clínicamente significativas ya que se caracterizan por conferir resistencia a una gran variedad de antibióticos betalactámicos como las penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación incluyendo cefamicinas y en menor medida las de tercera generación, pero no son capaces de conferir resistencia a las cefalosporinas de cuarta generación ni a los carbapenémicos. Las Betalactamasas AmpC pueden ser cromosómicas (cAmpC) o plasmídicas (pAmpC) (Martínez, 2009, págs. 79-80).

Las betalactamasas AmpC cromosómicas se han descrito en una gran variedad de la familia *Enterobacteriaceae*, ya que las expresan de manera natural como en el caso de *Enterobacter spp*, *Providencia spp*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Acinobacter baumannii*, *Shigella spp* y organismos como *Pseudomona aeruginosa*. Mientras que a las betalactamasas AmpC plasmídicas, tienen aún mucho más importancia clínica y epidemiológica, y las expresan enterobacterias como: *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca*, *Proteus mirabilis*, y *Salmonella spp*. La *Escherichia coli* posee betalactamasas AmpC tanto plasmídicas como cromosómicas (Chalán, 2014, pág. 20).

Moreno (2013) manifiesta que: Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las betalactamasas, tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros betalactámicos, y además presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de betalactamasas disponibles; pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles (pág. 602).

Las opciones durante el tratamiento de infecciones causadas por Enterobacterias que expresan este tipo de betalactamasas son limitadas, en especial las plasmídicas porque pueden dar lugar a fracasos terapéuticos en el tratamiento con betalactámicos y se asocian a una gran resistencia a múltiples fármacos, además las AmpC plasmídicas pueden transferirse o diseminarse en el ambiente nosocomial como en la comunidad (Álvarez, 2017, págs. 25-26).

En el caso de infecciones en vías urinarias, según (González, 2015) la *E. coli* contribuye a casi 90% de las primeras infecciones urinarias en mujeres jóvenes, entre otras *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*.

Seral, Gude y Castillo(2012) expresan que, las pAmpC han sido descritas en todo el mundo, pero no se dispone de datos exactos de prevalencia debido principalmente a la falta de un método estandarizado para su detección, existiendo diferentes rangos de prevalencia según el tipo de enzima y la localización geográfica, es así que: En Asia, en un estudio realizado por el grupo de Yoo et al., durante 2008 y 2009 se observó que el 3,1% de *E. coli* y el 39,1% de *K. pneumoniae* eran productores de DHA-1, CMY-2 y CMY-6, poniendo de manifiesto la presencia de este mecanismo de resistencia fuera del entorno hospitalario; En América del norte, en el 2005, Hanson et al., estudiaron la prevalencia de pAmpC en pacientes no hospitalizados encontrando una prevalencia global en *E. coli* y *K. pneumoniae* del 0,6% y 0,5%, respectivamente (págs. 14-15).

En Europa: Navarro, Pascual y Rodríguez (2009) mencionan que en un estudio realizado en España, encontraron una prevalencia de 0.64% de pAmpC y 0.04% de carbapenemasas.

En un estudio de vigilancia en Norteamérica entre 2012 y 2013, la incidencia de aislamientos de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, en la orina o en un sitio estéril fue de 2.93 casos por cada 100,000 personas por año; aproximadamente la mitad de los aislamientos presentados poseían la betalactamasa KPC; Las carbapenemasas de clase D, son especialmente problemáticas en Europa, pero también se han recuperado de centros médicos en Asia oriental, Oriente Medio, Australia, América del Sur y los Estados Unidos (Quale y Spelman, 2018).

En Latinoamérica en el 2011 se reportó la resistencia a carbapenémicos en Guatemala en dos aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*; en el 2012, en Colombia, se presenta un nuevo brote por el mismo agente en seis pacientes hospitalizados; y en Paraguay en noviembre de ese año, se notificó el hallazgo de carbapenemasa tipo NDM en aislamientos de *A. baumannii* en pacientes hospitalizados (Organización Panamericana de la Salud, 2012).

En nuestra provincia no hay suficientes estudios con respecto a este tipo de estudio en enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC y carbapenemasas aisladas de muestras de orina, por ello, debido al poco conocimiento sobre este tema, he visto la necesidad de realizar este estudio investigativo que tuvo como objetivos identificar las betalactamasas de tipo AmpC y carbapenemasas en cepas aisladas de enterobacterias de muestras de orina, y relacionar los resultados según el sexo, edad y procedencia en pacientes hospitalarios y ambulatorios del Hospital Isidro Ayora, cuyo enfoque fue cuali-cuantitativo, y formó parte del macroproyecto denominado “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS DE MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA LOJA 2017”.

4. Revisión de literatura

4.1 Infección de Vías urinarias

Es la presencia de microorganismos patogénicos en el tracto urinario incluyendo uretra, vejiga, riñón o próstata. El factor más importante involucrado, es la obstrucción del flujo urinario normal o la presencia de un cuerpo extraño (sondaje vesical). Dada su alta incidencia y el empleo de antibióticos que suponen las infecciones del tracto urinario, tienen gran relevancia socioeconómica y generación de resistencias antibióticas (González, 2015; Mateos, 2010, págs. 1-2)

En la actualidad, están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia bacteriana que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro la capacidad del personal de la salud para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad, muertes, y la prolongación de la enfermedad, lo que significa que sin antimicrobianos eficaces para prevenir y tratar las infecciones, las intervenciones como cirugías, trasplantes, quimioterapia, el tratamiento de la diabetes se convertirán en procedimientos de muy alto riesgo (OMS, 2017).

4.2 Etiología

En un artículo se describe que los principales agentes uropatógenos de las infecciones del tracto urinario representan bacterias Gram negativas de origen intestinal y algunas también provienen de infecciones intrahospitalarias en pacientes inmunodeprimidos, asociadas a malformaciones congénitas de las vías urinarias e instrumentación urológica entre otros factores predisponentes. Otros microorganismos como levaduras, virus, protozoos y parásitos causan las infecciones pero con menos frecuencia (Puñales, Monzote, Torres y Hernández, 2012, págs. 621-622)

4.3 Las bacterias

Son microorganismos unicelulares que se reproducen mediante fisión binaria, y que presentan tres formas básicas si se observan al microscopio: las esféricas o cocos (algunos reciben otro nombre, por ser achatados “cocobacilos”), las alargadas o bacilos y las bacterias curvadas o espirilos, las bacterias se observan macroscopicamente cuando se encuentran en grupos, denominados colonias. Además pueden diferenciarse por medio de la tinción de Gram, por su capacidad para retener un colorante básico (violeta cristal) después de su fijación y decoloración con alcohol, y se dividen en grampositivas (conservan el colorante, a causa de su pared celular gruesa de peptido glucano y ácidos teicocicos) y gramnegativas (que se decoloran con el alcohol y después se colorean de rojo con safranina, debido su capa fina de peptidoglucano y una membrana externa adicional que contiene lipopolisacárido) (Vargas, 2014, págs. 1-2; López, et al., 2014, pág. 3).

4.4 Enterobacterias

La familia de las enterobacterias constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas, son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, y poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Su nombre es dado debido a la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes propagados, encontrándose universalmente en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (Mateos, 2010, pág. 1).

Las especies más importantes para la salud humana son *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* y *Citrobacter spp*, cuando las enterobacterias acceden a otros lugares del cuerpo humano, producen una infección que puede ocasionar enfermedad, las más frecuentes son las

infecciones urinarias y las infecciones respiratorias, con menor frecuencia se producen infecciones de localización quirúrgica, así como infecciones de catéteres o de otros dispositivos intravasculares. Actualmente puede observarse un incremento de dos nuevos mecanismos de resistencia: las cefalosporinas mediadas por plásmidos y las carbapenemasas (Consellería de Sanidade y el Servicio Gallego de Salud, 2017; Ferran Navarro, 2009, pág. 3).

4.5 Tratamiento

4.5.1 Antibióticos Betalactámicos. (Jawets, 2011, pág. 340; Gudiol, 2009, pág. 116)

manifiestan que: los betalactámicos son la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica, son inhibidores selectivos de la síntesis de la pared celular bacteriana y, por lo tanto, son activos contra las bacterias en proliferación, ésta inhibición es una de las diversas actividades de estos fármacos y es la que mejor se conoce, su paso inicial en la acción farmacológica consiste en enlazar al fármaco a los receptores celulares, algunas de las cuales son enzimas de transpeptidación.

Los diversos receptores tienen distintas afinidades por los fármacos y cada una intermedia un efecto distinto, por otra parte los betalactámicos son compuestos de acción bactericida lenta, presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico, su espectro se ha ido ampliando durante años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones.

4.5.2 Clasificación y estructura química. Gudiol (2009) afirma que “la presencia del anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, además, éste determina su mecanismo de acción, la escasa toxicidad directa y el principal mecanismo

de resistencia (las betalactamasas) de esta familia de antibióticos”. Pero para que el betalactámico sea activo, debe estar unido a otros anillos.

La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto a las características de este esqueleto formado por los 2 anillos, modifica las propiedades del compuesto resultante dando lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas. Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas (pág. 117).

Cefalosporinas. Las cefalosporinas son un grupo grande de antibióticos derivados de algunos hongos del género *Cephalosporium*, cuya estructura química básica es un anillo betalactámico con un núcleo de ácido 7-aminocefalosporánico, las cefalosporinas naturales poseen actividad antibacteriana reducida, pero al anillo se le pueden agregar cadenas laterales que originan diversos compuestos con variaciones en su espectro de actividad bacteriana y en sus propiedades físico-químicas.

Estos medicamentos se ligan de manera covalente e inhiben las enzimas traspeptidasas que participan en el último paso de la formación del peptidoglicano rígido. A las cefalosporinas se las ha agrupado en cuatro generaciones, de acuerdo con su actividad antimicrobiana. Esa clasificación tiene gran utilidad práctica, pues las sustancias que conforman una misma generación, tienen propiedades similares (Jawets, 2011, pág. 358; Arguedas, 2010, pág. 35).

Las cefamicinas son similares a las cefalosporinas pero se derivan de los actinomicetos y tienen un grupo metoxi en el ácido 7-aminocefalosporánico (Mendoza, 2007, pág. 1).

Clasificación, según (Arguedas, 2010, pág. 35; Rodríguez, Tolón y López, 2013, págs. 2-3) se clasifican en:

- a) **Cefalosporinas de primera generación.** Son muy activas contra los cocos gram positivos y moderadamente activas contra algunos bacilos gramnegativos, principalmente *E.coli*, *Proteus* y *Klebsiella*.
- b) **Cefalosporinas de segunda generación.** Tienen una cobertura extendida contra bacilos gramnegativos como *E. coli*, *Klebsiella* y otras enterobacterias incluidos *Klebsiella* y *Proteus* pero no *P. aeruginosa*. Cefaclor es la más sensible a las betalactamasas. Cefoxitina inhibe a muchas enterobacterias productoras de betalactamasas (pero no a las especies de *Enterobacter* o *Citrobacter*). Las cefamicinas se clasifican dentro de esta generación porque tienen un espectro de actividad similar.
- c) **Cefalosporinas de tercera generación.** Son muy activas contra los bacilos gramnegativos y muy resistentes a la acción de las betalactamasas de amplio espectro. Donde las cefalosporinas de segunda generación tienden a fracasar contra *P. aeruginosa*, la ceftazidima o la cefoperazona triunfan también son activas contra *P. Aeruginosa.*, tienen mayor actividad contra *Neisseria* y enterobacterias, incluyendo *Citrobacter sp*, *Serratia marcescens* y *Providencia sp*.
- d) **Cefalosporinas de cuarta generación.** A diferencia de las de tercera generación tienen mayor actividad contra los cocos gram positivos, similar contra gram negativos productores de betalactamasas plasmídicas clásicas (*Eschericchia coli*, *Proteus. mirabilis*, *Klesbsiella. pneumoniae* y *Salmonella spp.*), su actividad es limitada frente a anaerobios, y superior frente a *Pseudomona aeruginosa*.

Carbapenémicos. (Moreno, 2013, págs.599-600; Letourneau, 2018) manifiestan que son antibióticos betalactámicos semisintéticos, desarrollados a partir de la tienamicina (producto del metabolismo del microorganismo *Streptomyces cattleya*), generalmente resistentes a la mayoría de las betalactamasas plasmídicas y cromosómicas, y dotados de mayor espectro de actividad que abarca: Organismos gramnegativos (incluidos los productores de betalactamasas de espectro extendido, anaerobios, y organismos gram positivos).

Es por ello que son imprescindibles en el tratamiento donde se sospecha de un patógeno multirresistente. Su mecanismo de acción consiste en inhabilitar la síntesis de la pared bacteriana durante la transpeptidación (debido a la elevada afinidad por las enzimas que participan en el ensamblaje del peptidoglucano) y su eficacia disminuye cuando la bacteria produce mecanismos de resistencia para evadir su efecto.

Carbapenémicos más utilizados:

a) Imipenem. Posee buena actividad contra numerosos bacilos gramnegativos, es resistente a los betalactámicos pero es inactivado por las deshidropeptidasas en los túbulos renales, por lo que se requiere la administración conjunta de cilastatina (un inhibidor específico de esta deshidropeptidasa). Está indicado en las infecciones causadas por microorganismos que son resistentes a otros fármacos, pero las especies de *Pseudomona* desarrollan resistencia con rapidez a este antibiótico (Jawets, 2011, pág. 361).

b) Meropenem. Es similar al imipenem en cuanto a sus características farmacológicas y espectro antimicrobiano, pero es estable para la deshidropeptidasa (Letourneau, Combinación de inhibidores de beta-lactamasa, carbapenémicos y monobactamas, 2018).

- c) **Ertapenem.** Se usa para el tratamiento de infecciones complicadas que no son causadas por microorganismos patógenos hospitalarios. Es activo contra la mayoría de *Enterobacteriaceae* y anaerobios, pero menos activo que los otros carbapenémicos para *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y bacterias Gram positivas, particularmente enterococos y neumococos resistentes a la penicilina (Letourneau, 2018; Jawets, 2011, pág. 361).
- d) **Doripenem.** Tiene actividad contra los bacilos gramnegativos no fermentadores de glucosa, es más activo contra *P. aeruginosa* que el imipenem, pero es igual de activo que el meropenem, aunque Letourneau (2018) manifiesta que “parece tener una actividad in vitro más potente que el meropenem”. En general ha demostrado eficacia clínica en el tratamiento de infecciones urinarias complicadas (Jawets, 2011, pág. 361; Letourneau, 2018).

4.6 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se produce cuando las bacterias sufren cambios al verse expuestas a los antibióticos, sin presentar efecto sobre ellos, originándose así los microorganismos ultrarresistentes, en los cuales, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas. Están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial poniendo en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad, la prolongación de la enfermedad y las muertes (OMS, 2018).

4.7 Etiología de la resistencia según (OMS, 2017; Alós, 2015)

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas o mutaciones, estas mutaciones y el

intercambio horizontal de genes son propiedades universales de las bacterias que han ocurrido durante millones de años como parte de la evolución. Alós (2015) manifiesta que “La frecuencia de mutaciones que originan resistencia a antibióticos varía según el antibiótico y la bacteria, dichas mutaciones se dan con mayor frecuencia en bacterias deficientes en el sistema de reparación del ADN (hipermutadoras)” pág. 694.

El proceso de la resistencia se ve acelerado por el mal uso y el abuso de los antimicrobianos, tanto en personas como en animales, y es frecuente que se administren sin supervisión de un profesional. Como ejemplos de uso incorrecto se pueden citar su administración para tratar infecciones víricas (como resfriados o gripe), su uso como estimulantes del crecimiento de animales o para prevenir enfermedades en animales sanos.

Las bacterias resistentes pueden transmitirse de persona a persona o entre las personas y los animales, inclusive a través de la alimentación de origen animal. El mal control de las infecciones, las condiciones sanitarias deficientes y la manipulación inadecuada de los alimentos fomentan la propagación de la resistencia a los antimicrobianos.

4.8 Epidemiología

La OMS (2017) indica que la resistencia a los antibióticos afecta a todos los países, es así que la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* al tratamiento utilizado como último recurso (los carbapenémicos) se ha propagado a todas las regiones del mundo. *K. pneumoniae* es una importante causa de infecciones nosocomiales, como la neumonía, la sepsis o las infecciones de los recién nacidos y los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. Debido a la resistencia, en algunos países los antibióticos carbapenémicos ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*. La resistencia de *Escherichia coli* a las fluoroquinolonas está muy generalizada. En Europa en 2007 se calcularon 400.000 infecciones por bacterias multirresistentes y 25.000 muertes atribuibles.

En Estados Unidos las bacterias multirresistentes infectan a unos 2 millones de personas al año, de las que al menos 23.000 mueren, en el país mencionado se ha descrito un 8.5% de AmpC plasmídicas en *K. pneumoniae*, 6.9% en *K. oxytoca* y 4 % en *E. coli*. En realidad, se desconoce aún cuál es la prevalencia y la relevancia clínica y epidemiológica de estas variantes de AmpC (Navarro, Pascual y Rodríguez, 2009, págs. 2-3).

En el 2015 la situación epidemiológica de enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE) empeoró, especialmente con la rápida propagación de carbapenem-hidrólisis de oxacilinas-48 (OXA-48) y Enterobacterias productoras de metalobal- matasa de Nueva Delhi (NDM), en los cuales 13/38 países informaron de una propagación interregional o de una situación endémica para CPE (Albiger, 2015, pág. 1).

En Latinoamérica el 2011, el Centro Nacional de Enlace para el Reglamento Sanitario Internacional en Guatemala, emitió una alerta epidemiológica por el aislamiento de dos cepas multirresistentes de carbapenemasas tipo Nueva Delhi metalobetalactamasa en el país. El problema de la resistencia bacteriana ha traspasado las fronteras de la literatura médica y ha llegado a los medios de información general de todo el mundo (OPS, 2011, pág. 2).

4.9 Mecanismos de resistencia a antibióticos según (Letourneau, Antibióticos betalactámicos: mecanismos de acción y resistencia y efectos adversos, 2018).

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos por medio de los siguientes mecanismos:

a) Disminución de la penetración en el sitio objetivo: La membrana externa de los bacilos gramnegativos proporciona una barrera eficaz para la penetración de betalactámicos en sus proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) diana en la membrana plasmática bacteriana. La barrera de permeabilidad de la membrana externa es un factor principal en la resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a muchos betalactámicos.

- b) Alteración del sitio objetivo:** Los sitios diana para los antibióticos betalactámicos son los PBP en la membrana, pero las alteraciones en las PBP pueden influir en su unión con los betalactámicos y, por lo tanto, la sensibilidad de las células bacterianas alteradas a la inhibición por estos antibióticos. Tal mecanismo es responsable de la resistencia a la penicilina en los neumococos, a la oxacilina en los estafilococos y las bacterias con resistencia intrínseca creciente a los betalactámicos, como gonococos, enterococos y *Haemophilus influenzae*.
- c) Inactivación por una enzima bacteriana.** La producción de betalactamasas es un mecanismo importante de resistencia a los antibióticos betalactámicos en aislados clínicos. Su producción puede estar codificada dentro del cromosoma bacteriano (característica de una especie entera) o los genes pueden adquirirse en un plásmido (característicos de una cepa individual en lugar de la especie). Las bacterias pueden sintetizar las betalactamasas constitutivamente (como para muchas enzimas mediadas por plásmidos) o la síntesis puede ser inducible en presencia de antibiótico (como para muchas enzimas cromosómicas).

4.9.1 Betalactamasas.

Son enzimas producidas por bacterias que abren el anillo betalactámico de los betalactámicos, inactivando el antibiótico. Las enzimas específicas para las penicilinas son las penicilinasas, para las cefalosporinas son las cefalosporinasas y para los carbapenémicos son las carbapenemasas (Muñoz, 2018).

La producción de betalactamasas puede ser inducible (la producción de betalactamasas inicia sólo en presencia de un betalactámico, debido a que la acción de los agentes antimicrobianos en la pared celular activa un mecanismo genético en cascada que inicia la producción de betalactamasas, pero la producción cesa ante la ausencia de

los agentes antimicrobianos en la pared celular o a su alrededor) o constitutiva (aquellas que la bacteria produce en forma continua, como por ejemplo la enzima cromosómica SHV-1 de *K. Pneumoniae* que interviene en la resistencia a la ampicilina y ticarcilina) (Susana Martín, 2012, pág. 100).

4.9.1.1 Principales tipos de betalactamasas en enterobacterias según (S.Martín,

T.Martín y Liso, 2012, págs. 101-102). Para la clasificación molecular, Ambler se basa en la estructura molecular de las betalactamasas y su secuencia de aminoácidos, reconociendo así cuatro tipos moleculares designados:

Clase A. Penicilinasas, en general hidrolizan todos los betalactámicos, y están principalmente las enzimas de tipo KPC, IMI y GES, puede ser inhibido total o parcialmente por el ácido borónico y el ácido clavulánico.

Clase B. Llamadas también Metallo-betalactamasas (MBL), las más importantes de esta clase son las de tipo VIM, IMP y NDM. Requieren zinc para la hidrólisis eficiente de los betalactámicos, como resultado, las MBL pueden ser inhibidas por EDTA (un quelante de iones) e hidrolizan fuertemente a todas los betalactámicos a excepción del aztreonam, además no son inhibidos por inhibidores de betalactamasa tales como tazobactam, clavulanato, sulbactam y avibactam.

Clase C. Cefalosporinasas o betalactamasas usualmente tipo cromosomal AmpC propia de la mayoría de enterobacterias que pueden localizarse también en plásmidos y se caracterizan por un amplio espectro de hidrólisis. Son resistentes a cefalosporinas, aztreonam, e inhibidores de betalactamasas.

Clase D. Las oxacilinasas o betalactamasas plasmidial tipo OXA, debido a su capacidad preferencial para hidrolizar la oxacilina. Se afectan de forma variable por los inhibidores de betalactamasa, clavulanato, sulbactam o tazobactam, no afectan a los monobactámicos, producen alto nivel de resistencia a la temocilina y presentan una baja eficiencia hidrolítica frente cefalosporinas de tercera y de cuarta generación y frente a los carbapenemicos.

Las clases A,C y D son enzimas que incluyen betalactamasas con serina en su sitio activo, mientras que la clase B son enzimas que comprenden metaloenzimas en los cuales requieren iones bivalentes (Zinc²⁺) para la hidrólisis de los betalactámicos en el sitio activo o parte de este (Molin, 2016, págs. 26-27).

Las AmpC y carbapenemasas se corresponden a los siguientes tipos de betalactamasas:

4.9.1.2 Betalactamasas AmpC. Son enzimas mediadas por plásmidos, pertenecen a la clase C de la clasificación estructural de Ambler. Estas enzimas se caracterizan por ser resistentes a la combinación de un betalactámico con inhibidores de betalactamasas, con la posible excepción de piperacilina-tazobactam (Seral, et al., 2012, pág. 1).

En la mayoría de la familia *Enterobacteriaceae* las betalactamasas tipo AmpC son clínicamente significativas ya que confieren resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación incluyendo cefamicinas (cefoxitina y cefotetan) y en menor medida las de tercera generación, pero no son capaces de conferir resistencia a las cefalosporinas de cuarta generación ni a los carbapenémicos. El Aztreonam, la cloxacilina y el ácido borónico tienen la propiedad de inhibir las betalactamasas tipo AmpC pero no son afectadas por los inhibidores de las betalactamasas como el clavulanato, sulbactam y tazobactam (Álvarez, 2017, pág. 25).

López, Torres y Prada (2015) afirman que las que expresan el gen AmpC se encuentran en el cromosoma bacteriano y su expresión es de bajo nivel e inducible como respuesta a la exposición a ciertos betalactámicos, está regulada por un operon amp que requiere la presencia de betalactámicos con al menos cinco genes (ampC, ampR, ampD, ampG, ampE) y está íntimamente relacionado con el reciclaje del peptidoglicano (pág. 196).

(Martínez, 2009, pág. 80) manifiesta que las Betalactamasas de este tipo pueden ser cromosómicas (cAmpC) o plasmídicas (pAmpC):

a) *AmpC cromosómicas inducibles.* Se producen a bajos niveles de manera natural y aumentan su síntesis en presencia de inductores (betalactámicos), pueden derreprimirse, perdiendo así la característica de inducción. Entre algunas bacterias productoras: *Enterobacter spp.*, *M. morgani*, *Providencia spp.* *P. aeruginosa*, entre otras.

b) *AmpC cromosómicas no inducibles (constitutivas).* Su expresión es a niveles bajos sin mostrar resistencia, pero cuando están hiperproducidas pueden conferir resistencia a todos los betalactámicos a excepción de cefalosporinas de 4ta generación y carbapenémicos. Su representante productora es *E. coli*.

c) *AmpC plasmídicas inducibles y AmpC plasmídicas no inducibles (constitutivas).* La evidencia molecular sugiere que derivan de los genes ampC cromosómicos que naturalmente poseen las enterobacterias arriba mencionadas, además han sido detectadas tanto en aislados intrahospitalarios como en comunitarios. Los genes ampC mediados por plásmidos han sido encontrados en bacterias como *Salmonella spp.*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* que naturalmente no poseen estos genes; las enzimas AmpC plasmídicas confieren resistencia a varios betalactámicos

incluyendo penicilinas, oxyminocefalosporinas, cefamicinas y, de manera variable, al aztreonam, excepto la AmpC plasmídica tipo ACC-1 debido a que no confiere resistencia a cefamicinas. El nivel de expresión de ciertas AmpC plásmidicas inducibles es mucho mayor en comparación con las AmpC cromosómicas inducibles.

Este tipo de betalactamasas AmpC pueden causar fracasos terapéuticos, similares a los descritos en infecciones causadas por aislados hiperproductores de AmpC cromosómica inducible (selección de mutantes con desrepresión estable) en tratamientos con betalactámicos (Calvo, Cantón, Fernández, Mirelis y Navarro , 2011).

Pequeñas diferencias en la secuencia aminoacídica de estas enzimas han dado lugar a 6 familias: CIT (incluye los grupos CMY y LAT), DHA, ACC, FOX, MOX, EBC (incluye ACT y MIR) (Seral, et al., 2012, pág. 2).

4.9.1.3 Carbapenemasas. Son betalactamasas hidrolizantes de carbapenemicos que confieren resistencia a un amplio espectro de sustratos betalactámicos, incluidos los carbapenemicos. Este mecanismo es distinto de otros mecanismos de resistencia, como permeabilidad alterada debido a mutaciones porin, aunque los patrones de susceptibilidad para aislados con una carbapenemasa y aquellos con mutaciones porin pueden ser idénticos (Quale y Spelman, 2018).

Éstas representan la familia de betalactamasas más versátil, con un amplio espectro. Aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los betalactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores de los betalactámicos (Peña, 2016).

Quale y Spelman (2018) clasifican las carbapenemasas de la siguiente manera:

a) Betalactamasas de clase A con actividad carbapenemasas: Pueden codificarse en cromosomas o plásmidos. Las enzimas codificadas cromosómicamente incluyen *SME* (enzima *Serratia marcescens*), NMC (no metalloenzima carbapenemasa) e IMI (imipenem-hidrolizante) betalactamasas, mientras que las codificadas por plásmidos incluyen KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) y GES (espectro extendido de Guayana). GES se ha descrito en *Pseudomonas aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

KPC es la carbapenemasa de clase A más importante, ya que residen en plásmidos transmisibles y confieren resistencia a la mayoría de los betalactámicos. Se han identificado varias variantes diferentes de enzimas KPC, es así que algunas hidrolizan los betalactámicos a diferentes velocidades, lo que puede contribuir a diferentes perfiles de susceptibilidad en las bacterias productoras de KPC cuando se prueban in vitro, además puede transmitirse desde *Klebsiella* a otros géneros, incluidos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Serratia* y *Enterobacter spp.*

b) Las betalactamasas de clase B: La primera (MBL) fue IMP-1, luego se identificaron grupos adicionales de MBL adquiridas: IMP, VIM, GIM, SPM y SIM. Hay una serie de variantes dentro de cada grupo de MBL (por ejemplo, hay más de 50 variantes de IMP).

Hay MBL de dos tipos: las naturales que se codifican cromosómicamente, y las adquiridas que consisten en genes codificados en integrones que residen en plásmidos grandes que son transferibles entre especies y géneros.

Nueva Delhi metallo-betalactamasa (NDM-1), es un nuevo gen MBL que llevan aislados de *Enterobacteriaceae*, descrito por primera vez en *K.pneumoniae*, pero también se ha identificado en *E. coli* y *Enterobacter cloacae*, así como no

Enterobacteriaceae (incluyendo *Acinetobacter*), este gen se encuentra en un elemento genético muy móvil, y el patrón de propagación parece ser más complejo e impredecible que el del gen que codifica KPC. En general, las bacterias que contienen NDM-1 han resultado susceptibles a colistina o tigeciclina, aunque dicha susceptibilidad puede ser de corta duración.

c) Las betalactamasas de clase D: Se han identificado carbapenemasas de OXA en *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacteriaceae* (especialmente *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*).

En el grupo OXA heterogéneo (que incluye más de 100 enzimas), se han identificado seis subgrupos con diversos grados de actividad hidrolizante de carbapenémicos: OXA-23, OXA-24 / OXA40, OXA-48, OXA-58, OXA-143 (se transportan en plásmidos transmisibles) y OXA-51 (está codificado cromosómicamente). Si bien la mayoría de los aislamientos de *A. baumannii* que poseen una carbapenemasa de tipo OXA-23, -24/40 o -58 son resistentes a los carbapenémicos, las *enterobacteriaceae* con enzimas de tipo OXA-48 tienen una susceptibilidad variable a estos agentes. La expresión de un elemento de inserción del promotor (ISAbal) en OXA-23 y OXA-51 probablemente contribuye a la resistencia a carbapenémicos.

4.10 Métodos de determinación de betalactamasas tipo AmpC y Carbapenemasas

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo continúa siendo el método diagnóstico de elección, pues permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos (pruebas de susceptibilidad) y

facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos (Fernández, García, Saéz y Valdezate, 2011, pág. 602).

4.10.1 Métodos de determinación de betalactamasas AmpC

Método de aproximación de discos. Es aplicable a betalactamasas AmpC inducibles, la técnica consiste en realizar un antibiograma convencional, para luego colocar un disco de cefoxitina o cualquier otro antimicrobiano inductor a una distancia de 27mm centro-centro de un disco de cefamandol, ceftazidima, ceftriaxona o cefotaxima (antimicrobiano sustrato, revelador o testigo). Si se observa un halo de inhibición cortado del antimicrobiano significa que el microorganismo produce una betalactamasa inducible (Martínez, 2009, pág. 30).

Técnica de sinergia de doble disco. Consiste en inocular una placa de agar Mueller-Hinton con la cepa a evaluar y colocar en el centro un disco de ácido fenil borónico y un disco de cloxacilina. Seguidamente disponer a ambos lados de cada uno de ellos, discos de cefotaxime y ceftazidime a una distancia centro-centro de 18-20mm centro centro. Después de incubar, si se observa un aumento del halo de inhibición de las cefalosporinas adyacente a la cloxacilina, o al disco de ácido fenil borónico, se interpreta como prueba positiva para la producción de AmpC y es indicativo (cepa productora de AmpC) (Navarro, 2013, págs. 2,13).

4.10.2 Métodos de determinación de betalactamasas tipo carbapenemasas

Inactivación de carbapenemicos. Prat (2016) maniesta que, este ensayo se basa en la sensibilidad al meropenem (MER) que muestran las cepas de enterobacterias. Sólo se requiere recolectar con un asa de 10 µL de el aislado previamente cultivado en agar

Mueller-Hinton (MHA) incubada durante 24 horas, y resuspender en en 2 ml de TSB, agregarle un disco de meropenem, e incubar por 4 horas a 35°C, para cuando el tiempo esté cerca de terminar se prepara la cepa *E.coli* ATCC® 25922 a 0,5 MacFarland(MF) y se inocula una placa MHA. Posteriormente se retira con un asa el disco de meropenem del TSB de la cepa en estudio secando el exceso de líquido y se lo coloca en la placa inoculada, luego se incuba a 35°C toda la noche (pág. 19).

Se debe usar control positivo *K. pneumoniae* ATCC® BAA 1705 y control negativo *K. pneumoniae* ATCC® BAA 1706. Para la interpretación se basa en la presencia de halo de inhibición (negativo para carbapenemasas) debido a que el meropenem en el disco no se hidroliza e inhiben el crecimiento de la cepa bacteriana, o ausencia de halo (positivo para carbapenemasas) debido a que el meropenem en el disco se hidroliza y no hay inhibición o inhibición limitada del crecimiento de la cepa bacteriana (pág. 19).

Prueba de sinergia de discos. Es un método en el que se determinan los halos de inhibición del desarrollo bacteriano obtenidos con cada carbapenemico sólo y con la combinación de cada carbapenemico con ácido fenilborónico (APB), con amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y con ambos a la vez. Se utiliza una distancia de 2 cm entre los discos del inhibidor y el carbapenem, se observa si hay sinergia de APB o AMC con imipenem(IMI) o meropenem (MER) (Nicola, Nievas y Smayevsky, 2012, pág. 297).

Prueba de discos combinados. Se determinan los halos de inhibición del desarrollo bacteriano obtenidos con cada carbapenemico solo y con la combinación de discos inhibidores y con ambos a la vez. Para ello se sigue el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos, se coloca un disco con meropenem, meropenem+cloxacilina, meropenem+ácido borónico y meropenem+EDTA. También pueden utilizarse discos con imipenem y las mismas combinaciones de

inhibidores, luego de la incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas, se observa si el incremento ≥ 5 mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico la prueba es positiva, y es negativo si no hay diferencia o incremento < 5 mm en el halo de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.

En resumen, el ácido borónico inhibe las carbapenemasas de clase A, y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) inhiben las carbapenemasas de clase B, pero es muy importante la distancia a la que deben quedar los discos para que sea posible observar el efecto de sinergia (Calvo, et al., 2011, pág. 19; Nicola, et al., 2012, pág. 297)).

4.11 Control de calidad en las pruebas de susceptibilidad

El Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá (2010) manifiesta que el laboratorio de microbiología cumple funciones muy importantes, como el reporte de la susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos de importancia en la salud, por ello es importante realizar el control de calidad interno y externo para garantizar que los resultados obtenidos son confiables. El control de calidad son el conjunto de acciones que se aplican durante el desarrollo de las pruebas para asegurar que se estas se realizan de manera correcta.

Control de calidad externo. Se debe realizar la evaluación externa del desempeño, con la finalidad de medir la capacidad del laboratorio para identificar un microorganismo desconocido, pruebas utilizadas para el diagnóstico etiológico y sensibilidad a los antibióticos.

Este tipo de control abarca diferentes procesos mediante los cuales se ejerce algún tipo de evaluación de la calidad de los resultados, gracias a la intervención de una organización ajena al laboratorio.

Control de calidad interno. Consiste en supervisar diariamente los procedimientos y cada una de las pruebas realizadas en el laboratorio para cumplir con los requisitos de calidad, lo cual incluye la utilización de controles positivos y negativos en las pruebas. Entre los factores que se debe controlar están:

- **Medio de cultivo:** Se utiliza Agar Mueller Hinton que está avalado de acuerdo a los criterios de CLSI. El medio debe tener una profundidad de 4mm, debe tener un pH entre 7.2 y 7.4. (un pH bajo puede bajar la potencia de aminoglicosidos y macrólidos mientras que otros agentes antimicrobianos pueden parecer tener mayor actividad como las tetraciclinas, si el pH es alto se observa el efecto contrario); y la concentración de cationes (la variación de ellos afectará los resultados con aminoglicósidos, tetraciclina y colistina, un contenido excesivo reducirá la zona de inhibición, mientras que un escaso contenido, puede dar un inaceptable aumento en el tamaño de la zona).
- **Inóculo:** Se debe utilizar un inóculo con una turbidez al 0.5 de la escala de McFarland, la misma que debe conservarse a temperatura ambiente y en oscuridad.
- **Sensidiscos:** Se deben almacenar a -8°C ó en congelación a -14°C hasta su uso, sobre todo en antibióticos que son lábiles como son los betalactámicos, imipenem, cefaclor y combinaciones con el ácido clavulánico; se debe sacar los discos 2 horas antes de su uso para ambientarlos, utilizar discos con fecha de expiración adecuada (págs. 64-66).
- **Cepas ATCC:** Estas cepas de referencia han sido seleccionadas con base en su susceptibilidad ó resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y a su confiabilidad en los métodos de referencia, estas cepas deben almacenarse en forma adecuada para preservar sus características y tener registro de su origen, número de copia y almacenamiento (para largo plazo, se recomienda utilizar un medio estabilizador apropiado, como caldo de soya tripticasa con 15- 20% de glicerol a temperatura de -20°C o menos) (Araya I. , Prat S., y Ramírez V., 2015).

5. Materiales y Métodos

Tipo de estudio:

El presente estudio tuvo un enfoque cuali-cuantitativo de tipo descriptivo y transversal.

Área:

El área de estudio correspondió al Hospital general Isidro Ayora ubicado en la ciudad de Loja, en las calles av. Universitaria entre José Félix de Valdivieso e Imbabura, el mismo que corresponde al nivel II en el sistema público de salud, cuenta con los servicios en las áreas básicas para brindar atención a usuarios ambulatorios y hospitalizados.

Universo:

El universo estuvo conformado por 732 muestras de orina de pacientes ambulatorios y hospitalizados que acudieron al hospital Isidro Ayora al servicio de laboratorio clínico con pedido de urocultivo, durante el periodo 21 de diciembre del 2017– 21 de mayo del 2018.

Se excluyeron 250 muestras que no ameritaron, 185 muestras que no crecieron a las 48 horas de incubación, 3 muestras en las cuales se aisló cepas de *Cándida albicans*, 13 muestras contaminadas, 7 muestras de pacientes que no quisieron participar, 1 muestra rechazada en el laboratorio, 4 muestras con < 100000 UFC, y 19 muestras con aislamiento de otras bacterias.

Muestra:

Cepas de enterobacterias aisladas de 250 muestras de orina (que cumplen con los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el anexo 5) de pacientes provenientes de diferentes áreas del hospital Isidro Ayora, durante el periodo 21 de diciembre 2017– 21 de mayo 2018.

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

$$n = \frac{N \times Z_a^2 \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z_a^2 \times p \times q}$$

En donde:

N = tamaño de la población

Z = nivel de confianza (95% = 1.96)

p = probabilidad de éxito (probabilidad que se conoce) (0,5)

q = probabilidad de fracaso (probabilidad que no se conoce) (0,5)

d = precisión (error máximo admisible en términos de proporción) 6% = 0,06

n = muestra (?)

Desarrollo:

$$n = \frac{3924 \times (1.96)^2 \times 0,5 \times 0,5}{(0,06)^2 \times (3924 - 1) + (1.96)^2 \times 0,5 \times 0,5}$$

$$n = \frac{3924 \times 3,84 \times 0,25}{0,0036 \times 3923 + 3,84 \times 0,25}$$

$$n = \frac{3767,04}{14,12 + 0,96}$$

$$n = \frac{3767,04}{15,08}$$

n = 249,80 tamaño de la muestra a obtener.

Fase Pre-Analítica:

1. Solicitud de supervisión para el desarrollo de la investigación (Anexo 1).
2. Entrega de trípticos informativos para la recolección de la muestra de orina (Anexo 2).
3. Obtención del consentimiento informado de cada paciente. Formato (Anexo 3).
4. Obtención de información de cada paciente, formulario (Anexo 4).
5. Recepción de muestras, protocolo (Anexo 5).
6. Transporte de muestra al centro de diagnóstico de la UNL, protocolo (Anexo 6).

Fase Analítica:

Objetivo 1: Identificar Betalactamasas de tipo AmpC y Carbapenemasas en cepas aisladas de enterobacterias de muestras de orina.

7. Siembra de muestra y conteo de colonias, protocolo (Anexo 7).
8. Identificación bacteriana en el equipo automatizado, protocolo (Anexo 8).
9. Selección de cepas de enterobacterias identificadas como sospechosas de producción de Betalactamasas AmpC y Carbapenemasas, registro (Anexo 9).
10. Determinación fenotípica de Betalactamasas AmpC, protocolo (Anexo 10).
 - Método de Sinergia de discos.
 - Método de aproximación de discos (antagonismo).
11. Determinación fenotípica de Carbapenemasas, protocolo (Anexo 11)
 - Sinergia de discos.
 - Discos combinados.
 - Inactivación de carbapenémicos.
12. Realización del control de calidad interno utilizando cepas de control ATCC: *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 (control positivo), *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706 (control

negativo), y *Escherichia Coli* ATCC 25922 (cepa sensible a carbapenemicos), insertos (Anexo 12).

13. Realización del control de calidad externo mediante la derivación de las cepas bacterianas al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI para la confirmación de la identificación y resistencia (Anexo 13).

Fase post- analítica (Validación):

Objetivo 2: Relacionar los resultados de producción de Betalactamasas AmpC y Carbapenemasas según sexo, edad y procedencia en pacientes hospitalarios y ambulatorios.

14. Registro de los resultados obtenidos, formato (Anexo 14).
15. Evidencia Fotográfica (Anexo 15).

Técnicas e Instrumentos de recolección de datos:

Para la recolección de datos se consideró la fuente de información primaria que son los pacientes que acuden al Hospital Isidro Ayora, a quienes se les aplicó una breve encuesta, cuyo instrumento fue un formulario (Anexo 3).

Uso que se dará a los resultados de la investigación:

Los resultados obtenidos se han utilizado para cumplir los objetivos establecidos de la investigación, los mismos sirvieron para establecer la prevalencia de betalactamasas AmpC y carbapenemasas en muestras de orina de pacientes que acudieron al hospital Isidro Ayora, en la ciudad de Loja, además por ser parte del macroproyecto "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA" serán adjuntados al mismo.

Consideraciones éticas:

Para el desarrollo de la investigación, previamente se obtuvo la autorización del subdirector de docencia e investigación del hospital Isidro Ayora para el desarrollo de la investigación en la institución (anexo 1), posteriormente se obtuvo el consentimiento de cada paciente que posiblemente era parte del grupo de estudio (anexo 3), el mismo que debe estar firmado; y la información de los pacientes fue manejada con total confidencialidad, salvaguardando su privacidad, derechos y dignidad.

Control de calidad:

Los protocolos, procedimientos y técnicas fueron desarrollados asegurando la calidad de los resultados. El control de calidad de la presente investigación se realizó siguiendo directrices especificadas en el documento “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M100.

Se utilizó agar sangre para el aislamiento primario en el hospital Isidro Ayora, medios de transporte Stuart para llevar el aislamiento al Centro de Diagnóstico Médico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, para la recuperación de las cepas nuevamente se empleó agar sangre, y para las pruebas de determinación fenotípica de betalatasas se usó agar Mueller Hinton, todos ellos fueron adquiridos de una casa comercial, asegurando así las características idóneas de los medios según especificaciones del documento antes mencionado.

Se realizó un control con cada nuevo lote de reactivo para la determinación fenotípica de Carbapenemasas, con las cepas: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705(control positivo), *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (control negativo) y *Escherichia Coli* ATCC 25922 (cepa sensible a carbapenémicos), los resultados obtenidos se los comparó con los insertos para

validar las pruebas cumpliendo con satisfacción las características y criterios establecidos en el documento.

Tabulación, análisis y presentación de los datos:

Se tabuló los resultados del instrumento de recolección de datos de los 250 participantes con aislamiento de enterobacterias, se analizaron los resultados en el marco de la revisión bibliográfica, y se los representa en tablas estadísticas en función de los objetivos establecidos.

6. Resultados

Tabla N° 1

Enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC y Carbapenemasas en cepas aisladas de enterobacterias de muestras de orina de pacientes que acudieron al Hospital “Isidro Ayora”.

Tipo de resistencia	Frecuencia	Porcentaje
Enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC o Carbapenemasas.	7	2,8%
Enterobacterias que presentan betalactamasas de otro tipo o no presentan.	243	97,2%
Total	250	100%

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

Elaboración: Gina Stefany Barrionuevo Sarango.

Interpretación: Se puede observar que de las enterobacterias aisladas en las muestras de orina, son productoras de betalactamasas AmpC y carbapenemasas 7 muestras que representan el 2,8% del total de enterobacterias.

Tabla N° 2

Distribución de betalactamasas AmpC y Carbapenemasas en cepas aisladas de enterobacterias en muestras de orina de pacientes que acudieron al Hospital “Isidro Ayora”.

Enterobacteria	AmpC		Carbapenemasa		Total	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	1	14,3 %	---	---	1	14,3%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	14,3 %	4	57,1 %	5	71,4%
<i>Citrobacter freundii</i>	---	---	1	14,3%	1	14,3%
Total	2	28,6	5	71,4	7	100%

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

Elaboración: Gina Stefany Barrionuevo Sarango.

Interpretación: Se puede observar que de las enterobacterias aisladas en las muestras de orina, sólo son productoras de betalactamasas: Mayormente *Klebsiella pneumoniae* que expresa en un 14,3% betalactamasas AmpC y en un 57,1% carbapenemasas, *Escherichia coli* que expresó en un 14,3% betalactamasas AmpC, y *Citrobacter freundii* expresó carbapenemasas en un 14,3%.

Tabla N° 3

Distribución de enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC y Carbapenemasas en relación al sexo de los usuarios del Hospital “Isidro Ayora”.

Indicador (Sexo)	AmpC		Carbapenemasas		TOTAL Pacientes	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	1	14,3 %	4	57,1 %	5	71,4%
Femenino	1	14,3 %	1	14,3%	2	28,6%
Total	2	28,6%	5	71,4%	7	100%

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

Elaboración: Gina Stefany Barrionuevo Sarango

Interpretación: Se puede observar que la producción de betalactamasas AmpC se dio en igual porcentaje tanto en pacientes del sexo masculino como en el femenino con un 14,3% cada uno, que representan a 1 muestra; mientras que la producción de carbapenemasas fue más frecuente en pacientes del sexo masculino con 5 muestras que reflejan el 57,1% del total. Manifiestan Capozzi, Mobili, Kornett y Perdomo (2018) que esto puede ser en el caso de los hombres, debido a la hipertrofia prostática por la obstrucción uretral, y en las mujeres posmenopáusicas por la deficiencia de estrógenos y la condición anatómica de presentar menor longitud de la uretra y su proximidad al ano, lo que aumenta el riesgo de infección por enterobacterias; para ambos sexos la presencia de procesos comórbidos que se asocian con vejiga neurogénica es probablemente el mayor factor predisponente para la aparición de ITU.

Tabla N° 4

Distribución de enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC y Carbapenemas en relación a la edad de los usuarios del Hospital “Isidro Ayora”

Indicador (Grupo etario)	AmpC		Carbapenemas		TOTAL Pacientes	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Adulto Mayor (más de 60 años)	2	28,6%	5	71,4%	7	100 %

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

Elaboración: Gina Stefany Barrionuevo Sarango

Interpretación:

Según el grupo etario se puede observar que sólo en los adultos mayores (más de 60 años) se presentaron los 7 casos con crecimiento de cepas de enterobacterias productoras de las betalactamasas en estudio, que equivale al 100%, es así que presentaron betalactamasas de tipo AmpC 2 muestras que representan al 28,6%, y presentaron carbapenemas el 71,4% restante que equivale a 5 muestras. Como lo indica Capozzi, et al. (2018), una de las etapas en las cuales estas infecciones se presentan con mayor frecuencia son en los adultos mayores, ya que estos tienen mayor susceptibilidad a las infecciones debido a los cambios fisiológicos asociados a la edad.

Tabla N° 5

Distribución de enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC y Carbapenemas en relación al lugar de procedencia en el Hospital “Isidro Ayora”

Indicador (Lugar de procedencia)	AmpC		Carbapenemas		TOTAL Pacientes	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Pacientes ambulatorios (Consulta externa y Emergencia)	2	28,6%	2	28,6%	4	57,2%
Pacientes hospitalizados (Cirugía, Unidad de cuidados intensivos y Otros)	---	---	3	42,8%	3	42,8%
TOTAL	2	28,6%	5	71,4%	7	100%

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

Elaboración: Gina Stefany Barrionuevo Sarango

Interpretación:

Según el lugar de procedencia se puede observar que es más frecuente la producción de estos tipos de betalactamasas en pacientes ambulatorios, pero específicamente las carbapenemasas se expresaron con mayor frecuencia en pacientes hospitalizados, mientras que sólo en pacientes ambulatorios se expresaron las betalactamasas AmpC. Como lo indica Quale y Spelman (2018), entre los factores de riesgo para la colonización de carbapenemasas se incluyen ventilación mecánica, catéteres y estado funcional pobre o enfermedad grave, por otra parte Alós (2015) manifiesta que se han publicado pruebas de que hay el intercambio de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias ambientales y patógenas de humanos.

7. Discusión

“La resistencia antimicrobiana se ha identificado como un problema importante de salud pública a nivel mundial razón por la cual se requiere de un seguimiento clínico y epidemiológico de las cepas por los programas de vigilancia y control de infecciones hospitalarias” manifiestan (Vargas, Segura, Bettin y Díez, 2015).

Luego del estudio realizado de las 732 muestras pertenecientes al macroproyecto denominado “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA”, como se detalla en la tabla 1 de enterobacterias aisladas de las muestras de orina, se ha podido recolectar 250 casos durante el período de estudio que concierne desde el 21 de diciembre del 2017 hasta el 21 de mayo del 2018 en el Hospital Isidro Ayora, obteniendo 7 muestras con aislamiento de enterobacterias productoras de betalactamasas que representa el 2,8% de todas las enterobacterias. En la tabla 2 se indicó que de las enterobacterias productoras de estas betalactamasas, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* presentan AmpC con n=1 (14,3%) cada una, y las carbapenemasas se presentan en mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* con n=4 (51,7%) y en menor frecuencia en *Citrobacter freundii* con n=1 (14,3%).

Seral, et al. (2012) manifiestan que en un estudio multicéntrico realizado en España, las betalactamasas pAmpC se presentan en *E. coli* el 0,57%, el 0,25% en *K. pneumoniae*, y el 0,43% en *P. mirabilis*, lo que se asemeja en cuanto al orden de producción un poco a los resultados obtenidos en esta investigación realizada, variando en los porcentajes y el tipo de enfoque.

Al relacionar los resultados obtenidos se concluye que, la producción de AmpC se da en una frecuencia de $n=2$ (28,6%), tanto en hombres como en mujeres con $n=1$ (14,3%), únicamente en adultos mayores, cuyos pacientes son ambulatorios (de las áreas de consulta externa y emergencia); Lo que no concuerda con el estudio realizado por (Álvarez, 2017), cuyo universo fueron 46 muestras y de los cuales sólo trabajó con *Escherichia Coli*, el estudio se desarrolló en la ciudad de Ambato donde la frecuencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas tipo AmpC fue de 5% afectando en la mayoría al sexo femenino entre la edad de 51 a 60 años. Otro estudio realizado por (Alvarado, 2014) en el Hospital del Día y Clínica de la Maternidad Julia Esther González, de la ciudad de Loja, utilizó 259 muestras de diferentes fluidos, de los cuales presentó betalactamasas tipo AmpC en un 47%, lo cual tampoco concuerda con esos resultados, posiblemente por el tiempo de estudio o por los tipos de fluidos estudiados.

Seral, et al.(2012) además menciona que la prevalencia de pAmpC entre diferentes estudios difiere considerablemente de una zona geográfica a otra, de la especie estudiada y del periodo de tiempo, y que posiblemente pueden influir los diferentes criterios de selección utilizados en cada estudio.

En el presente estudio, la producción de betalactamasas tipo carbapenemasas se da en una frecuencia de $n=5$ (71,4%), mayormente en hombres con $n=4$ (57,1%) que en mujeres con $n=1$ (14,3%), únicamente en adultos mayores, cuyos pacientes en su mayoría $n=3$ (42,8%) son hospitalizados (de las áreas de cirugía, unidad de cuidados intensivos y otros) y en menor frecuencia $n=2$ (28,6%) son ambulatorios (de las áreas de consulta externa y emergencia). En el estudio mencionado antes, realizado por (Alvarado, 2014) no se identificó la presencia de carbapenemasas, lo que posiblemente tiene que ver con la multirresistencia que van adquiriendo las bacterias. (Guh, 2015) manifiestan que en un estudio de vigilancia realizado en

siete comunidades en EE.UU entre 2012 y 2013, la incidencia de aislamientos de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos en la orina o en un sitio estéril fue de 2.93 casos por cada 100,000 personas por año, aproximadamente la mitad de los aislamientos presentados poseían la betalactamasa KPC, lo que en ese tiempo era poco.

Pero como lo indican Quale y Spelman (2018), muchas carbapenemasas residen en elementos genéticos móviles, como transposones o plásmidos, y tienen el potencial de transmisión generalizada a otros aislados y géneros de bacterias, y como las enterobacterias pueden albergar genes que codifican la carbapenemasa, entonces pueden propagarse de persona a persona; es por ello que deben realizarse estudios constantemente en cada ciudad para poder tener control de estas infecciones causadas por enterobacterias productoras de betalactamasas.

8. Conclusiones

1. Luego del desarrollo de esta investigación, se aduce que únicamente las enterobacterias productoras de betalactamasas AmpC y carbapenemasas fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*.
2. Se ha detectado betalactamasas AmpC en estas enterobacterias usando los métodos de sinergia de discos y aproximación de discos; relacionando los resultados, se concluyó que se presentan en igual frecuencia tanto en el sexo masculino como en el femenino, únicamente en adultos mayores (más de 60 años), y siendo todos pacientes ambulatorios.
3. Se identificó betalactamasas tipo carbapenemasas usando los métodos de sinergia de discos, discos combinados, e inactivación de carbapenémicos; concluyendo que se expresan con más frecuencia en el sexo masculino, únicamente en adultos mayores (más de 60 años), y siendo el mayor porcentaje pacientes hospitalarios.

9. Recomendaciones

Con los resultados antes expuestos y de acuerdo a lo sucedido durante y posterior al procesamiento y elaboración de este documento, se recomienda lo siguiente:

1. A los profesionales de la salud implementar un programa de Vigilancia Epidemiológica en control de infecciones que requieran el uso de antibióticos betalactámicos, específicamente cefalosporinas y carbapenémicos, además de solicitar la identificación de Betalactamasas tipo AmpC y carbapenemasas en las muestras de orina de pacientes que se sospeche la presencia de estas bacterias, por la importancia clínica, ya que muchas betalactamasas de estos tipos están asociadas a fracasos terapéuticos.
2. A la Facultad de la salud Humana de la UNL y la dirección de la carrera de laboratorio Clínico, fortalecer la línea de investigación en el campo de la microbiología para establecer un perfil epidemiológico de la incidencia y prevalencia de Betalactamasas tipo AmpC y carbapenemasas para contar con datos de multirresistencia en la población de la zona 7.
3. A los servicios de salud, profesionales y docentes, realizar un proyecto para la aplicación de medidas preventivas, dirigido a los productores ganaderos, a la comunidad farmacéutica y a la población en general sobre los antibióticos, con respecto a la venta sin receta médica, la automedicación, o los riesgos que implican el no cumplir todo el tratamiento según las indicaciones del médico, para así evitar el desarrollo de mecanismos de multirresistencia, situación que provoca un gran problema de salud pública generando grandes costos económicos institucionales como al paciente.

10. Bibliografía

- Albiger, Glasner , Struelens, Grundmann y Monnet. (2015, mayo). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries. *eurosurveillance*, 20(45). From <https://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V20N45/art21300.pdf>
- Alós, J. (2015, diciembre). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10). doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004
- Alvarado, C. (2014). *Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes del Hospital del Día y Clínica Maternidad Julia Esther González durante el periodo agosto-noviembre 2013*. Trabajo de fin de titulación, Universidad Técnica Particular de Loja, Área Biológica, Loja. Retrieved octubre, 2018 from <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/9193/1/Cecilia%20Yajaira%20Alvarado%20Pullaguari.pdf>
- Álvarez, D. (2017, octubre). Determinación de betalactamasas de espectro extendido tipo Ampc en cepas de Escherichia Coli y su relación con la resistencia antimicrobiana. *Repositorio de la universidad técnica de Ambato*. Retrieved septiembre, 2018 from <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26482/2/TESIS%20FINAL%20UNIVERSIDAD%20T%C3%89CNICA%20DE%20AMBATO%20%281%29.pdf>
- Araya I. , Prat S., y Ramírez V. (2015). *Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología*. Documento técnico para el laboratorio clínico, Instituto de Salud pública, Departamento Laboratorio Biomédico nacional y de referencia. Retrieved octubre, 2018 from http://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendacion_Contro_Calidad_Bacteriologia.pdf
- Arguedas, D. J. (2010, septiembre). Retrieved agosto, 2018 from ACTUALIZACIÓN EN FARMACOTERAPIA: <https://cefalosporinas.files.wordpress.com/2010/09/cefalosporinas.pdf>
- Calvo, Cantón, Fernández, Mirelis y Navarro . (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos*. Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Micobiologia , Barcelona. Retrieved abril, 2018 from <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-deteccion-fenotipica-mecanismos-resistencia-microorganismos-S0213005X11001546>
- Capozzi E., Mobili D., Kornett A. y Perdomo M. (2018, junio). Agentes etiológicos de infecciones urinarias en adultos mayores de un centro de salud del estado Carabobo, Venezuela. *Kasmera*, 44(1). Retrieved octubre, 2018 from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222016000100006

- Chalán, L. (2014). *Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes hospitalizados del Hospital "Manuel Ygnacio Monteros" durante el período octubre-noviembre 2013*. Trabajo de fin de titulación, Universidad técnica particular de Loja, Área biológica, Loja. Retrieved diciembre, 2017 from <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10604/1/Chalan%20Cabrera%20Lucia%20Alexandra.pdf>
- Consellería de Sanidade y el Servicio Gallego de Salud. (2017). FOLLA QUINCENAL DE INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE GALICIA. *Xunta de Galicia*, 7. Retrieved julio, 2017 from <http://www.sergas.es/Saude-publica/Enterobacterias-productoras-de-carbapenemasas?idioma=es>
- Díaz, E. C. (2010, enero-febrero). Modelación molecular de antibióticos betalactámicos. *MediSur*, 8 (1). Retrieved marzo, 2018 from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2010000100004
- Fernández, García, Saéz y Valdezate. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Elsevier*, 29(8). Retrieved mayo, 2018 from <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X11001571>
- González, E. (2015, mayo 29). *Nefrología al Día*. Retrieved febrero, 2018 from <http://www.revistanefrologia.com/es-monografias-nefrologia-dia-articulo-infecciones-tracto-urinario-4>
- Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá. (2010). *Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20*. Manual, Secretaria distrital de salud, Bogotá. Retrieved octubre, 2018 from http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf
- Gudiol, C. S. (2009, febrero). Antibióticos betalactámicos. *elsevier*, 27(2). Retrieved marzo, 2018 from <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-antibioticos-betalactamicos-S0213005X08000323>
- Guh, B. M. (2015). *Epidemiología de las enterobacterias resistentes a carbapenem en 7 comunidades de EE. UU.* (D. C. Hooper, Editor) Retrieved octubre, 2018 from UpToDate: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-carbapenemase-producing-gram-negative-bacilli/abstract/49>
- Jawets, M. y. (2011). *Microbiología Medica* (25 ed.). (J. G. José Rafael, Trans.) México : McGRAW-HILL INTERAMERICANA. Retrieved febrero, 2018 from http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smff.com.pdf
- Letourneau, M. A. (2018, abril 5). *UpToDate*, 24.0. (D. Hooper, Editor) Retrieved septiembre 01, 2018 from https://www.uptodate.com/contents/combination-beta-lactamase-inhibitors-carbapenems-and-monobactams?search=carbapenemicos&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H3

- Letourneau, M. A. (2018, julio 26). *UpToDate*. (MD. David C Hooper, Editor) Retrieved septiembre 02, 2018 from https://www.uptodate.com/contents/beta-lactam-antibiotics-mechanisms-of-action-and-resistance-and-adverse-effects?search=resistencia%20a%20los%20antibioticos&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2#H3
- López, Hernández, Colín, Ortega, Cerón y Franco. (2014, enero-marzo). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *medigraphic*, 3(1), 12. Retrieved junio, 2018 from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invis/ir-2014/ir141b.pdf>
- López, Torres y Prada. (2015, julio). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Scielo*. Retrieved septiembre, 2018 from <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v18n1/v18n1a18.pdf>
- Martín S., Martín T. y Liso. (2012, agosto). *microred*. Retrieved 2017 from <https://microred.files.wordpress.com/2012/08/beta-lactamasas-para-leer-e-interpretar.pdf>
- Martínez, D. (2009). *Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica*. Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Departamento de Bioanálisis., Cumaná. Retrieved febrero, 2018 from https://www.researchgate.net/publication/262447017_Betalactamasas_tipo_AmpC_Generalidades_y_metodos_para_deteccion_fenotipica
- Mateos, A. P. (2010). *facmed*. Retrieved marzo, 2018 from http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
- Mendoza, N. (2007). Cefalosporinas. *Revista de la facultad de medicina de la UNAM*, 50(5). Retrieved agosto, 2018 from <http://www.journals.unam.mx/index.php/rfm/article/view/12996/12314>
- Molin, C. (2016). Detección Fenotípica de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. *scielo*, 25(31). Retrieved agosto, 2018 from <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v14n1/v14n1a05.pdf>
- Moreno, K. (2013). Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA* LXX(608). Retrieved 2017 from <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>
- Muñoz, L. S. (2018, febrero 12). *UpToDate*. (D. Hooper, Editor) Retrieved septiembre, 2018 from https://www.uptodate.com/contents/extended-spectrum-beta-lactamases?search=betalactamasa&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H2
- Navarro, F. (2013). *INFECCIÓN URINARIA POR ENTEROBACTERIAS PORTADORAS DE BETA-LACTAMASA AMPC PLASMÍDICA INDUCIBLE. CASO 583*. Universitat Autònoma de Barcelona, Servicio de Microbiología, Barcelona. Retrieved noviembre, 2017 from http://www.f-soria.es/admfsoria/casos/img/caso_583.pdf

- Navarro, Pascual y Rodríguez. (2009). Retrieved marzo, 2018 from <https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/geiras/dcscientificos/estudiosyensayos/geih-eye-2009-ProtocoloCefamicinasasy carbapenemasasREIPI.pdf>
- Nicola, Nieves y Smayevsky. (2012, octubre). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Redalyc. Revista Argentina de Microbiología*, 44. Retrieved diciembre, 2017 from <http://www.redalyc.org/html/2130/213025174010/>
- OMS. (2017, octubre). Nota descriptiva. *Resistencia a los antimicrobianos*, 1-2. Retrieved mayo, 2018 from <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- OMS. (2018, febrero 15). *Organización mundial de la salud*. (c. d. prensa, Producer) Retrieved marzo, 2018 from <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
- OPS. (2011, noviembre 22). *paho.org*. Retrieved febrero, 2018 from <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/22-noviembre-2011-carbapenemasas-americas1.pdf>
- Organización Panamericana de la Salud. (2012, diciembre). *Epidemiological Alert: Nosocomial transmission of NDM-Type multiresistant bacteria*. Retrieved noviembre, 2018 from [paho.org: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/19-December-2012-Carbapenemasas1.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/19-December-2012-Carbapenemasas1.pdf)
- Paredes A. y Lopez D. (2014). *Protocolo de control de calidad interna y externa en el laboratorio clínico*. protocolo, Empresa Social del Estado- Pasto Salud, Subgerencia de Salud e Investigación, Pasto. Retrieved octubre, 2018 from <https://www.pastosaludese.gov.co/images/subgerencia%20de%20salud/DocEstandarizadosRes%20499%20de%20Nov-2014/L.CLINICO/PROTOCOLOCONTROLCALIDADINYEXTESTAN.pdf>
- Peña, I. (2016). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Departamento de Medicina , Madrid. Retrieved noviembre, 2017 from <https://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>
- Prat, S. (2016). *RECOMENDACIONES PARA DETECCIÓN CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS Y PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO, Ministerio de salud Pública de Chile, Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia, Santiago. Retrieved septiembre, 2018 from <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20detecci%C3%B3n%20carbapenemasas%20en%20enterobacterias%20y%20pseudomonas%20aeruginosa.pdf>
- Puerta y Mateos. (2010). *Enterobacterias*. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Unidad de Enfermedades Infecciosas, Albacete. Retrieved noviembre, 2017 from http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf

- Puñales, Monzote, Torres y Hernández. (2012, enero 28). Etiología bacteriana de la infección urinaria en niños. *Scielo*, 28(4), 621-622. Retrieved agosto 26, 2018 from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252012000400006
- Quale y Spelman. (2018, agosto). Visión general de los bacilos gramnegativos productores de carbapenemasa. In D. H. Bloom (Ed.), *Uptodate*. Retrieved septiembre, 2018 from https://www.uptodate.com/contents/overview-of-carbapenemase-producing-gram-negative-bacilli?search=clasificacion%20de%20carbapenemasas&source=search_result&selectedTitle=1~30&usage_type=default&display_rank=1
- Rodríguez, Tolón y López. (2013). Antibióticos cefalosporánicos: Actualidades y perspectivas. *Revista CENIC*, 44(1). Retrieved agosto, 2018 from <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/antibi%C3%B3ticos-cefalospor%C3%A1nicos-actualidades-y-perspectivas>
- Shaikh, N. y Hoberman, A. (2018, marzo 30). *up toDate*. (E. M. Matto., Editor) Retrieved octubre, 2018 from https://www.uptodate.com/contents/urinary-tract-infections-in-children-epidemiology-and-risk-factors?search=bacterias%20causantes%20de%20infeccion%20de%20vias%20urinarias%20epidemiologia&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2#H2
- Seral, Gude y Castillo. (2012). *Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas*. Universidad de Zaragoza, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Zaragoza. Retrieved septiembre, 2018 from <http://seq.es/wp-content/uploads/2012/06/seral.pdf>
- Vargas, Segura, Bettin y Díez. (2015, septiembre). β -lactamasas AmpC en bacilos Gram negativos aislados en una clínica de tercer nivel. *Laboratorio Actual*(46), 11-19. Retrieved octubre, 2018 from http://www.abj.org.co/images/revistas/vol_46/Pg%2011-19%20CE%20B2-lactamasas%20AmpC%20en%20bacilos%20Gram.pdf
- Vargas, T. (2014). MORFOLOGIA BACTERIANA. *Revista de Actualización Clínica*, 49, 1-2. Retrieved agosto, 2018 from http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a02.pdf

11. Anexos

Anexo 1

Solicitud de supervisión para el desarrollo de la investigación.



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

Loja, 15 de junio de 2017

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

ASUNTO: AUTORIZANDO DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN.

De mi consideración:

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

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

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

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



1/1

NOTA: Por ser parte del macroproyecto, el oficio será utilizado para poder desarrollar todos los procedimientos microbiológicos en el Hospital Isidro Ayora.

Anexo 2

Trípticos informativos para la recolección de la muestra de orina

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

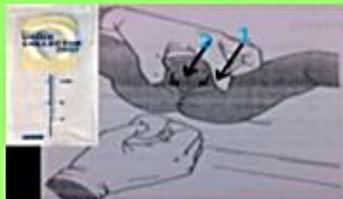
- ✓ Retirar el pañal del lactante y lavar bien el área genital con jabón y agua y séquela.
- ✓ No utilizar desinfectantes.

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

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



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



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



**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LOJA**

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO



**INDICACIONES PARA
RECOLECCIÓN DE
MUESTRA DE ORINA**

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

MUJERES

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

Antes de la recolección:

Lavarse las manos con agua y jabón



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



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



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

HOMBRES

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

Antes de la recolección:

Lavarse las manos con agua y jabón



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



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



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

TOMA DE MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES HOSPITALIZADOS

A. ORINA OBTENIDA A TRAVÉS DE CATETERISMO TRANSURETRAL

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

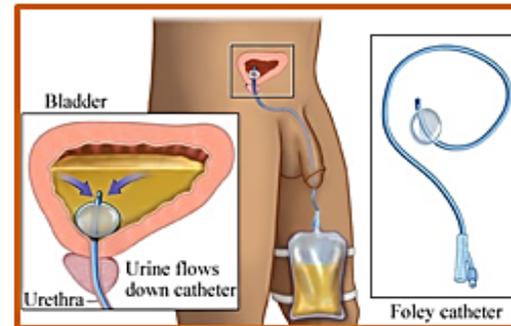


FRASCO ESTÉRIL

B. ORINA OBTENIDA A TRAVÉS DE SONDA VESICAL

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

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



C. PACIENTES SIN CONTROL DE ESFÍNTER

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

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



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

Anexo 3

Formato del consentimiento informado

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

Historia Clínica:

Número de cédula:

Fecha:

Hora:

APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
ESTADO CIVIL	NACIONALIDAD	DOMICILIO	EDAD

¿EN QUÉ CONSISTE?

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

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

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

BENEFICIOS DEL ESTUDIO:

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

EFFECTOS Y RIESGOS:

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

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRA

Fecha:

Hora:

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

Nombre del paciente	Firma del paciente
----------------------------	---------------------------

Firma del responsable de la investigación

NEGATIVA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha:

Hora:

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

NOTA: Por ser parte del macroproyecto, el consentimiento será aplicado a cada paciente que llegue con pedido de urocultivo, por lo que da constancia de su consentimiento a formar parte de cada procedimiento que implica la investigación.

Anexo 4

Formulario para obtención de información de cada paciente



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

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

Hospital		Servicio			
Edad		Género			
Profesión		Procedencia			
Tipo de muestra		Hospitalizado	Si	No	
Sondas, catéteres	Si				
	Especifique				
Hora de la toma de muestra		Hora de llegada al laboratorio			
¿Consume antibióticos con regularidad?	Si	No	¿Por qué?		
¿Consume pollo, huevos o leche?	Si	No	¿Por qué?		
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?		

Nota: Por ser parte del macroproyecto se realizará toda la encuesta que nos permitirá obtener varia información de cada paciente, pero para mi proyecto utilizaré sólo los datos pertinentes.

Anexo 5

Protocolo de Recepción de muestras

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p> <p>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR D BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.</p>	<p style="text-align: center;">Recepción de la muestra</p>	<p>CÓDIGO: PB01 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 1/3</p>
---	---	--	--

1. INTRODUCCIÓN:

El método de recolección de las muestras de orina, puesto que una correcta técnica dependerá la eficacia del resultado obtenido, en especial cuando se necesita evaluar la presencia de infecciones en las vías urinarias. La correcta recolección de muestras de orina requiere las condiciones pre-analíticas del paciente necesarias para cumplir con una muestra adecuada para análisis microbiológico; una muestra deficientemente recogida puede ser motivo de confusión al momento de aislar el agente etiológico.

2. OBJETIVO:

Identificar las correctas condiciones pre-analíticas para la toma de muestra de orina para análisis microbiológico en usuarios que acuden a los Hospitales Isidro Ayora y Solca de Loja.

3. ALCANCE:

Este procedimiento deberá ser aplicado por el personal técnico del laboratorio clínico del Hospital Isidro Ayora y Solca encargado de la recepción de muestras, asegurando de esta manera la calidad de la muestra destinada para urocultivo.

4. MATERIALES:

Tríptico informativo con instrucciones de toma de muestra en pacientes hospitalizados y ambulatorios.

 <p style="text-align: center;"> UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO CARACTERIZACIÓN MOLECULAR D BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA. </p>	Recepción de la muestra	CÓDIGO: PB01 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 2/3
--	------------------------------------	--

5. PROCEDIMIENTO:

Recomendaciones a los pacientes:

- No tomar diuréticos
- No tomar antibióticos 7 días antes del examen
- No tener el período
- No tener relaciones sexuales antes de tomar la muestra
- Mínimo 3 horas de retención urinaria
- Lavar con agua y jabón los genitales y secarlos con toalla limpia
- Transportar la muestra, bien cerrada, en hielo al laboratorio.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con solicitud de urocultivo.
- Cultivos primarios con crecimiento $\geq 1\ 000$ UFC/ml (pacientes inmunodeprimidos, síndrome uretral femenino, punción suprapúbica o renal percutánea) o $\geq 100\ 000$ UFC/ml (pacientes inmunocompetentes).

Criterios de exclusión:

- Pacientes que hayan recibido terapia antibiótica por lo menos 7 días antes.
- Muestras que no vengan en hielo.
- Pacientes que ya hayan sido muestreados durante este estudio (no puede haber dos muestras de un mismo paciente, genera sesgo de muestreo).

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO CARACTERIZACIÓN MOLECULAR D BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DE LOS HOSPITALES ISIDRO AYORA Y SOLCA DE LOJA.</p>	<p style="text-align: center;">Recepción de la muestra</p>	<p>CÓDIGO: PB01 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 3/3</p>
---	--	--	--

Criterios de eliminación:

- Muestras con espermatozoides, con sangre de origen menstrual o secreción vaginal.
- Más de dos patógenos aislados
- El personal de salud debe instruir al paciente respecto a la técnica adecuada para recolectar la muestra.

6. OBSERVACIONES:

- La muestra ideal es la de la mañana debido a que la cuenta bacteriana es mayor. Se requiere de 3 a 5ml de orina en un frasco estéril
- Las muestras para urocultivo no se toman de bolsas recolectoras de orina que forman parte de un sistema de drenaje a través de una sonda.
- Se lleva la muestra al laboratorio y se examina lo más pronto posible.
- Las muestras deben de obtenerse antes de la administración de cualquier antibiótico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Merida, J., & Moreno, E. (2014). *Manual para tecnico superior de Laboratorio Clinico y Biomedico*
- Rodríguez, M. (2012). Manual de procedimientos para toma de muestras. Obtenido de:
<http://www.diresacallao.gob.pe/wdiresa/documentos/laboratorio/ManualTomaMuestrasDIRESA2012.pdf>

Anexo 6

Protocolo para transporte de muestra al centro de diagnóstico de la UNL

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

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	Transporte de muestras al Laboratorio de la Facultad de la Salud Humana: CDM	CÓDIGO: PB02 REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA: PÁGINA: 1/3
---	---	--	--

1. INTRODUCCION:

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

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

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

2. OBJETIVO:

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

3. ALCANCE:

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Transporte de muestras al Laboratorio de la Facultad de la Salud Humana: CDM</p>	<p>CÓDIGO: PB02 REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA: PÁGINA: 2/3</p>
--	---	--

4. RESPONSABLES:

4.1. ESTUDIANTES: transporte de muestras.

4.2. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.

5. MATERIALES:

5.1. Cooler hermético

5.2. Medio de transporte Stuart

5.3. Medios de cultivo Agar Sangre

6. PROCEDIMIENTO:

6.1. Transporte en el Hospital Isidro Ayora:

6.1.1. Una vez analizada la muestra e identificado el germen, y en el caso de que el equipo reporte una resistencia BLEE, procedemos a tomar un medio de transporte Stuart, retiramos el hisopo y recolectamos dos colonias representativas del cultivo para llevar a confirmar BLEE.

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

6.2 Transporte del Hospital SOLCA:

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

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	Transporte de muestras al Laboratorio de la Facultad de la Salud Humana: CDM	CÓDIGO: PB02 REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA: PÁGINA: 3/3
---	---	--	--

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

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

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

7. OBSERVACIONES

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

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

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

Anexo 7

Protocolo de siembra de Urocultivos

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Siembra de muestra y conteo de colonias</p>	<p>CÓDIGO: PB03 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 1/5</p>
---	--	--

1. Introducción

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

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

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

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

 <p align="center">UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p align="center">Siembra de muestra y conteo de colonias</p>	<p>CÓDIGO: PB03 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 2/5</p>
---	--	---

Para el conteo de colonias se usan varios métodos cuantitativos, en este caso utilizaremos el método de asa calibrada, el cual consiste contar el número de colonias desarrolladas después de incubar las siembras 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 0000 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 Gram positivos (Lopardo, 2015).

2. Objetivo

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

3. Alcance

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

“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: 3/5
---	---	--	--

4. Responsables:

4.1. ESTUDIANTES: elaboración del procedimiento.

4.2. DOCENTES/INVESTIGADORES: validación del procedimiento.

4.3. COLABORADORES INSTITUCIONES PARTICIPANTES: aplicación del procedimiento de acuerdo a protocolos de los laboratorios de las instituciones participantes.

5. Materiales:

Equipos:

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

Instrumentos:

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

Insumos:

- Cajas Petri con medio de cultivo elaborado
- Lápiz graso
- Guantes

Sustancias y reactivos:

- Muestra a estudiar

6. Procedimiento:

Para realizar un cultivo bacteriano es necesario:

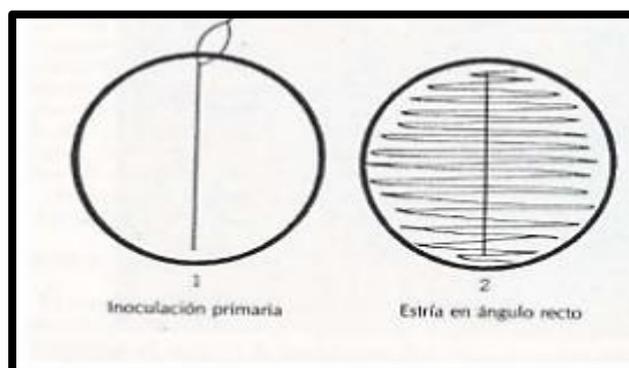
1. Tomar el asa calibrada e introducirla al fuego para que se esterilice, dejar enfriar unos segundos y tomar la muestra que se va a estudiar,
2. La orina se mezcla bien, no se centrifuga.

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p align="center">Siembra de muestra y conteo de colonias</p>	<p>CÓDIGO: PB03 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 4/5</p>
--	--	--

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.

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p align="center">Siembra de muestra y conteo de colonias</p>	<p>CÓDIGO: PB03 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: PÁGINA: 5/5</p>
--	--	---

7. Observaciones:

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

8. Bibliografía:

Lopardo, D. H. (26 de Enero de 2015). Obtenido de BritaniaLab.com:

<http://www.laensenadacorp.com/documentos/ApunteIII-UROCULTIVO.pdf>

Anexo 8

Protocolo de Identificación bacteriana en el equipo automatizado

CARACTERIZACION 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	Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK.	CÓDIGO: PB04 REVISIÓN: 01 Edición: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 1/4
---	---	---

1. INTRODUCCIÓN:

VITEK® 2 Systems identifica un organismo mediante una metodología basada en las características de los datos y el conocimiento acerca del organismo y las reacciones que se analizan. Se han recogido datos suficientes de cepas conocidas como para estimar las reacciones típicas de las especies solicitadas a un juego de perfiles bioquímicos discriminantes. Si no se reconoce un patrón de identificación único, se presenta una lista de organismos posibles o se determina que la cepa está fuera del alcance de la base de datos. El informe de laboratorio impreso contiene sugerencias de los tests complementarios necesarios para completar la identificación. Si los tests no son suficientes para completar la identificación, deberán consultarse las referencias y la bibliografía microbiológica estándar.

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

La tarjeta GN se basa en métodos bioquímicos establecidos (1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25) y sustratos recientemente desarrollados para medir la utilización de la fuente de carbono, las actividades enzimáticas y la resistencia. Existen 47 tests bioquímicos y un pocillo de control negativo. El pocillo Control negativo de descarboxilasa (pocillo 52) se usa como referencia basal para los pocillos de análisis de descarboxilasa. Se obtienen resultados finales en aproximadamente 10 horas o menos (bioMérieux, 2013).

**CARACTERIZACION 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	Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK.	CÓDIGO: PB04 REVISIÓN: 01 Edición: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 2/4
---	---	---	---

2. OBJETIVO:

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

3. ALCANCE:

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

4. RESPONSABLES:

4.1 ESTUDIANTES: aplicación del procedimiento, registro de resultados.

4.2 DOCENTES/INVESTIGADORES: validación.

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

5. MATERIALES:

5.1 Tarjeta de identificación bacteriana que viene con el equipo.

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

5.3 Tubos de ensayo desechables de plástico transparente (poliestireno) limpios de 12x75mm.

5.4 Medio de cultivo apropiado (Mack Conkey).

5.5 Bastoncillos o torundas estériles.

5.6 Dispensador de solución salina de volumen ajustable

5.7 Asas desechables.

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

**CARACTERIZACION 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	Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK.	CÓDIGO: PB04 REVISIÓN: 01 Edición: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 3/4
---	---	--	---

6. PROCEDIMIENTOS:

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

**CARACTERIZACION 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	Identificación bacteriana en el equipo automatizado VITEK.	CÓDIGO: PB04 REVISIÓN: 01 Edición: 01 FECHA: 10-11-2017 PAGINA: 4/4
---	---	--	---

6.8 Se calcula un valor cuantitativo (el porcentaje de probabilidad), que representa el nivel de comparación entre las reacciones observadas y las reacciones habituales de cada organismo.

6.9 Se obtiene la identificación y resultados a ser interpretados por quien corresponda (bioMérieux, 2013).

7. OBSERVACIONES:

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

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- ✓ bioMérieux. (2013). *VITEK*. Obtenido de file:///C:/Users/User/Downloads/514740-1ES1-VITEK_2_Systems_Product_Information_b04.pdf

Anexo 10

Protocolo para Determinación fenotípica de betalactamasas AmpC

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 170/5</p>
---	--	---

1. INTRODUCCIÓN O FUNDAMENTO:

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

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

2. OBJETIVO:

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

3. ALCANCE:

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

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p align="center">IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 2/5</p>
--	--	---

4. RESPONSABLES:

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

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

5. MATERIALES

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

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Prueba de sinergia de doble discos

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

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

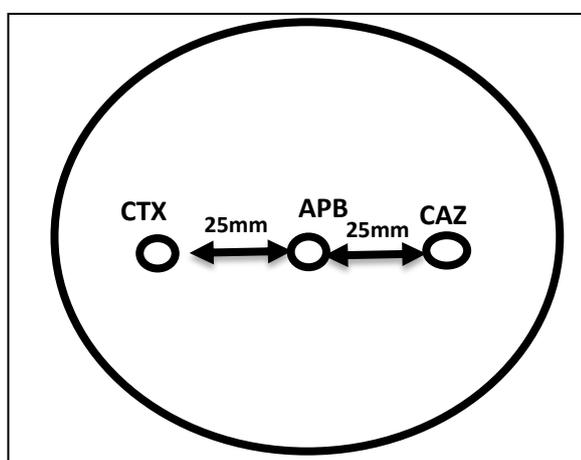
 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p align="center">IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 3/5</p>
---	--	---

6.1.2 Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de suero fisiológico con una colonia del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 MacFarland, ajustar si es necesario.

6.1.3 Impregnar un hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.

6.1.4 Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías situar un disco con cefotaxima y un disco con ceftazidima a una distancia de 20 - 25 mm (centro a centro) de un disco con ácido borónico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

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



6.2 Prueba de aproximación de discos (antagonismo)

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

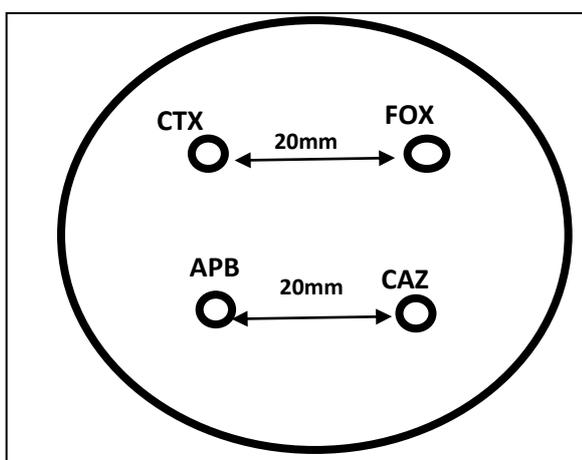
6.2.2 Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías situar en la parte superior un disco con cefotaxima y un disco con cefoxitina a una distancia de 20 mm (borde a

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

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p align="center">IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 4/5</p>
---	--	---

borde), y en la parte inferior un disco con ácido fenil borónico y un disco con ceftazidima a una distancia de 20 mm (borde a borde). La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

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



Consideraciones:

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

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

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

 <p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE AmpC</p>	<p>CÓDIGO: PB07 REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 07/11/2017 PÁGINA: 5/5</p>
--	---	--

7. OBSERVACIONES:

7.1 La interpretación de los resultados de la prueba de sinergia de doble discos se realizará de la siguiente manera: Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición.

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

El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpCp.

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

7.2 La interpretación de los resultados de aproximación de discos (antagonismo) se realizará de la siguiente manera: Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición.

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

El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpCp.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ✓ Ardanuy, C., Cercenado, E., Morosini, M., & Torres, C. (2011). *Deteccion Fenotipica de Mecanismos de Resistencia en Gram Negativos* . Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia39.pdf>
- ✓ Bou, G., Chávez, F., Oliver, A., & Jesús, O. (2015). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Obtenido de <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>

Anexo 11

Protocolo para determinación de Carbapenemasas

“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	Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.	Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página: 1/10
---	---	---	--

1. Introducción:

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

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

2. Objetivos:

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

3. Alcance:

Estos métodos serán aplicados como parte del proyecto de investigación titulado: “Caracterización molecular de Betalactamasas aisladas de muestras de orina procedentes del Hospital Isidro Ayora 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.

“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</p>	<p>Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.</p>	<p>Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página: 2/10</p>
---	---	--

4. Responsables:

Docente(s)/ Investigador(es): Indicaciones, procesamiento y validación de resultados.

Reporte y entrega de resultados a Coordinador de los laboratorios participantes

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

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

5. Materiales:

4.1 Materiales para el método de sinergia de doble disco:

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

4.2 Materiales para el método de discos combinados con inhibidor:

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

“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	Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.	Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página: 3/10
---	---	---	--

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

4.3 Materiales para el método inactivación de carbapenémicos:

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

6. Procedimientos:

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

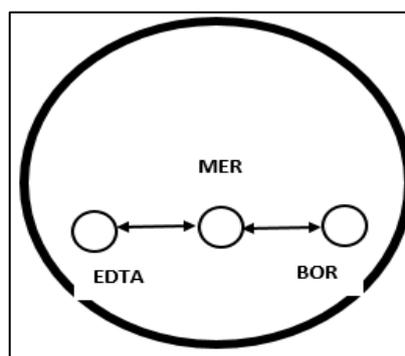
- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con Muller-Hinton.
- Tomar con un hisopo estéril de 2 a 3 colonias de un cultivo puro de la muestra problema.
- Transferir las colonias al tubo de ensayo que contiene la solución salina estéril 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

“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	Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.	Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página:4/10
---	---	---	---

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 fenil borónico.
- Incubar a temperatura de 35 ± 2 °C, durante 16-20 horas.
- Realizar el protocolo con las cepas control positivo y negativo.



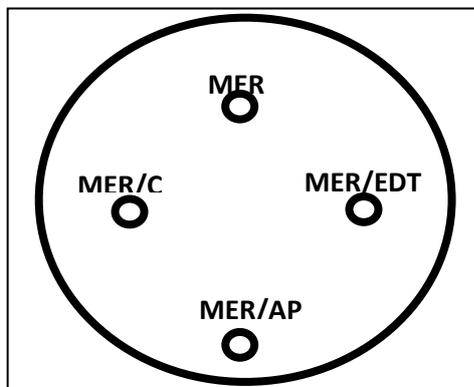
	<p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana</p>	<p>Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.</p>	<p>Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página:5/10</p>
---	---	---	--

b. Procedimiento para el método de discos combinados con inhibidor:

- Rotular con el código correspondiente el tubo de ensayo con suero fisiológico estéril y la caja de Petri con Muller-Hinton.
- Tomar con un hisopo estéril de 2 a 3 colonias de un cultivo puro de la muestra problema.
- Transferir las colonias al tubo de ensayo que contiene la solución salina estéril y suspender las colonias en esta solución
- Ajustar la turbidez de la suspensión en el densitómetro al 0,5 McFarland.
- Sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada, elimine el exceso de líquido presionando firmemente contra las paredes internas del tubo por encima del nivel del líquido.
- Inocular antes de 15 minutos después de haber ajustado la suspensión.
- Tomar la caja de Petri por la base e inocular la superficie seca de una placa de agar Mueller-Hinton estriando con el hisopo toda la superficie del agar estéril.
- Repetir este procedimiento estriando dos veces más el hisopo, rotando la placa aproximadamente 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 fenil borónico y meropenem/EDTA
- Incubar a temperatura de 35 ± 2 °C, durante 16-20 horas.

“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	Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.	Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página:6/10
---	---	---	---



c. Procedimiento para el método inactivación de carbapenémicos:

- 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

“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	Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.	Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página:7/10

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:

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

Se reportará el resultado de la siguiente manera:

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

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

Fuente: SEIMC 2011

	<p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana</p>	<p>Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.</p>	<p>Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página:8/10</p>
---	---	---	--

Reporte de resultados:

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

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

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

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 de 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.

“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	Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.	Código: PB-06 Revisión:1 Edición: 1 Fecha: Página:9/10
---	---	---	---

Los resultados positivos se interpretan según la tabla siguiente:

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

Fuente: CLSI 2017

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.

c. Reporte de resultados para el método inactivación de carbapenémicos.

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.

“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</p>	<p>Nombre del protocolo: Identificación fenotípica de carbapenemasas.</p>	<p>Código: PB-06 Revisión: 1 Edición: 1 Fecha: Página:10/10</p>
---	---	---	---

- **Indeterminado:** Zona 16-18 mm. La presencia o ausencia de una carbapenemasa no se puede confirmar por este método.

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

Anexo 12

Control de calidad interno

20/02/2017

E. coli ATCC 25922.

LOT 335-219-6.

REF 0335 P.

Nº. Alicuotas 10.

Resultados.

-Colonias, grises, Redondas, bordes irregulares, convexas.

ATM: 40mm; CAZ 32mm; FOX 28mm; CTX 46mm.

CAZ: 29mm CTX/42mm

05/03/2018

K. pneumoniae BAA-1705

Lote 1005-22-3

Ref 01005 P

Características de la colonia en Agar sangre:

colonias circulares, convexas, cremosas, grises, grandes

Características de la colonia en Muller Hinton:

circular, convexa, cremosa, mucóide.

Alicuotas: 22

05/03/2018

K. pneumoniae BAA-1706

Lote 1006-20-4

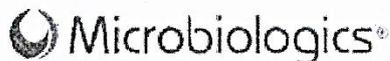
Ref 01006 P

06/03/2018.

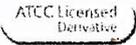
Escaso crecimiento, se realiza pase. (06/03/2018).

Insertos de las cepas control

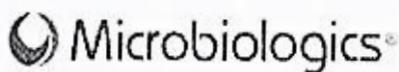
Control positivo para carbapenemasas



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

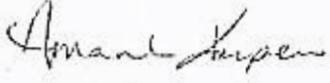
Specifications Microorganism Name: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Catalog Number: 01005 Lot Number: 1005-22 Reference Number: ATCC® BAA-1705™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2019/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L Bowman Release Date: 2017/7/17
Performance	
Macroscopic Features: Large, circular, convex, entire edge, light gray, glistening and mucoid. A SBAP second type that is flatter and less mucoid may be seen.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Short, broad, straight, gram negative bacilli with rounded ends.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Modified Hodge Test: positive <div style="text-align: center;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>
<small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small>	
<small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small>	
<small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small>	
<small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small>	
	<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small>
 <small>TESTING CERT #2635.01</small>	<small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small>
MEDIBAC-INC S.A. Distribuidor para el Ecuador de MICROBIOLOGICS Registro Sanitario AD-541-04-13	

Control negativo para carbapenemasas



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

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

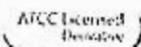
Performance	
Macroscopic Features: Large (size may vary), circular, convex, entire edge, pale gray, glistening and mucoid.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram negative straight bacilli from coccobacillary to long forms present.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Modified Hodge Test: negative
	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The lot number(s) of the lot number appearing on the product label and packaging slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Distributor, Entomex, the ATCC Licensed Electronic work unit, and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiology, Inc. It is required to use these trademarks and to use products derived from ATCC's cultures.

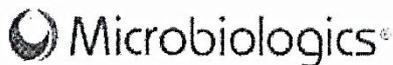
(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



TESTING CERT #2655.01

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

Cepa sensible a carbapenémicos



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-219 Reference Number: ATCC® 25922™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/11/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/1/23
--	--

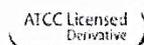
Performance	
Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram negative straight rod	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm
	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologies, Inc. as licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

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



TESTING CERT #2655.01

MEDIBAC-INCSA.

Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICS

Registro Sanitario AD-541-04-13

Anexo 13

Control de calidad externo

Registro enviado al INSPI

Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) Dr. Leopoldo Izquierdo Pérez	FORMULARIO DE ENVÍO DE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES A LOS ANTIMICROBIANOS		Código:	F-RAM-001
			Edición:	03
	Macro-Proceso: Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica y Referencia Nacional	Proceso Interno: Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos	Fecha de Aprobación:	29/12/2017

Institución Remitente: Universidad Nacional de Loja Fecha de envío: 29/05/2018
 Fecha / Hora de aislamiento: 28/05/2018 Responsable de envío: Lic. Carmen Ullauri
 Correo Institucional: carmen.ullauri@unl.edu.ec Número Telefónico: 0794799963

DATOS DEL PACIENTE:

Nombres y Apellidos: [Redacted] CI: [Redacted]
 Edad: 45 Género: Femenino Masculino Fecha de ingreso al servicio: 18/05/2018 HC: [Redacted]
 Hospitalización / Servicio: [Redacted] Terapia Antimicrobiana: [Redacted]
 Ambulatorio Emergencia UCI Diagnóstico del Paciente: [Redacted]

MOTIVO DE DERIVACIÓN:

Identificación de Cepa Confirmación Resistencia / Mecanismo Otro: [Redacted]

DATOS DE LA CEPA:

Género: Klebsiella Especie: Pneumoniae Código Laboratorio: 545870 Tipo de muestra: CINA
 Mecanismo de resistencia inferido: Carbapenemasas
 MEDIOS DE TRANSPORTE: Stuart Agar Nitrítico Otro: [Redacted]

Antibiótico	Concentración	Halo en mm	Antibiótico	Concentración	Halo en mm	Antibiótico	Concentración	Halo en mm
AC. NAL	30 ug		CLINDAMICINA	2 ug		OXACILINA	1 ug	
AMIKACINA	30 ug	≥ 64	COLISTIN	10 ug		PIP/TAZ	100/10 ug	
AMO/CLA	20/10 ug		CTX/CLA	30/10 ug		RIFAMPICINA	5 ug	
AMP/SULB	10/10 ug	≥ 32	ERITROMICINA	15 ug		SULF/TRIME	23.75/1.25 ug	≥ 320
AMPICILINA	10 ug		ERTAPENEM	10 ug		TEICOPLANINA	30 ug	
AZTREONAM	30 ug		ESTREPTOMICINA	300 ug		TETRACICLINA	30 ug	
CAZ/CLA	30/10 ug		FOSFOMICINA	200 ug		TIGECICLINA	15 ug	
CEFACLOR	30 ug		GENTAMICINA	120 ug	≥ 16	VANCOMICINA	30 ug	
CEFAZOLINA	30 ug		GENTAMICINA	10 ug				
CEFEPIME	30 ug	≥ 64	IMIPENEM	10 ug				
CEFOTAXIMA	30 ug	≥ 64	LEVOFLOXACINA	6 ug				
CEFTAZIDIMA	30 ug	≥ 64	LINEZOLID	30 ug				
CEFTRIAXONA	30 ug	≥ 64	MEROPENEM	10 ug	≥ 16			
CEFUROXIMA	30 ug		NITROFURANTOINA	300 ug	≥ 512			
CIPROFLOXACIN	5 ug	≥ 4	NORFLOXACINA	10 ug	≥ 16			

NOTA: Favor adjuntar hoja de equipo automatizado.

Favor llenar todos los datos solicitados.

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

Guayaquil: Bq. Evelin Cruz Vargas Arroyo / evargas@inspi.gob.ec / 04 228 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
Firma: <u>[Firma]</u>	Firma: <u>[Redacted]</u>	Firma: <u>[Redacted]</u>
Fecha: <u>[Redacted]</u>	Fecha: <u>[Redacted]</u> Hora: <u>[Redacted]</u>	Fecha: <u>[Redacted]</u>

COD. INSPI:

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO	FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS	CÓDIGO: RG004 REVISIÓN: 1 EDICIÓN: 1 FECHA: PÁGINA: 1/1
---	---	---	---

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS AISLADAS EN MUESTRAS DE ORINA PROCEDENTES DEL HOSPITALES ISIDRO AYORA DE LOJA
FORMATO DE CONFIRMACIÓN DE PRODUCCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS

CARBAPENEMASAS

Fecha: __/__/__

Código de Muestra	Microorganismo identificado	Sinergia de discos		Discos combinados								Método directo		Inactivación	
		MM APB EDL	Control de calidad	APB	MM/ APB	EDL	MM/ EDL	CLO	MM/ CLO	Interpretación de resultado	Control de calidad	Resultado	Control de calidad	Resultado	Control de calidad

SIGNIFICADO DE SIGLAS:

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

REPORTE:

- Sinergia de discos, e inactivación se reportará como POS** (Positivo)/ **NEG** (Negativo).
- Discos combinados se reportará la medida del Halo de inhibición en mm.**
- Inactivación de carbapenemicos: POS** (Positivo)/ **NEG** (Negativo).

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Sinergia de discos:

Positivo: Ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” entre el carbapenémico y el inhibidor. Sinergia MM/AFP 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”.

Discos combinados

Positivo: Incremento de halo de inhibición ≥ 5 del carbapenémico con inhibidor con respecto el Carbapenémico

Negativo: No hay incremento de halo de inhibición ≥ 5 del carbapenémico con inhibidor con respecto el carbapenémico.

Inactivación de carbapenemasas:

Positivo: Zona 6-15 mm o presencia de colonias dentro de una zona de 16-18 mm.

Negativo: Zona de 19 mm.

Anexo 15

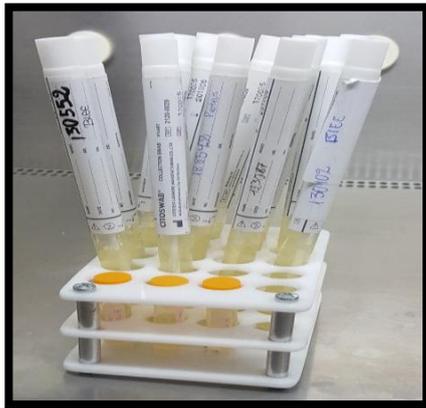
Evidencia Fotográfica



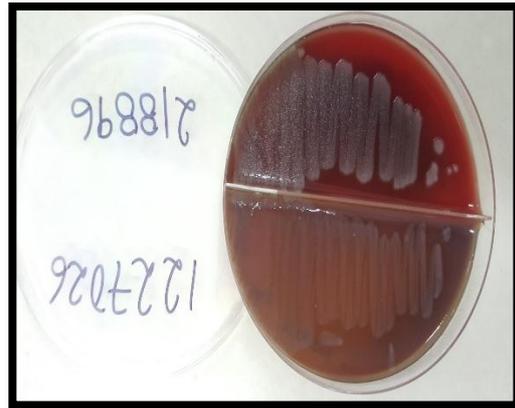
Fotografía 1. Exposición y socialización del macroproyecto en el Hospital Isidro Ayora.



Fotografía 2. Identificación bacteriana en el equipo automatizado.



Fotografía 3. Medios stuart utilizados para el transporte de cepas desde el hospital.



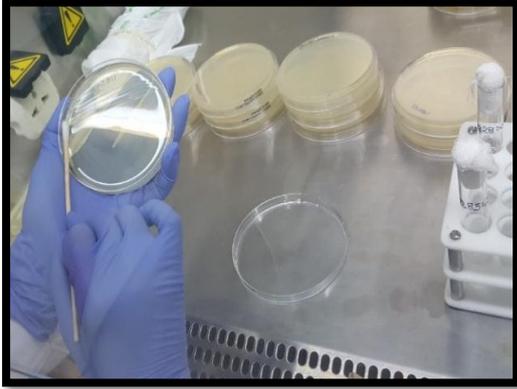
Fotografía 4. Recuperación de las cepas transportadas



Fotografía 5. Conservación de las cepas en caldo de soya tripticasa y glicerina.



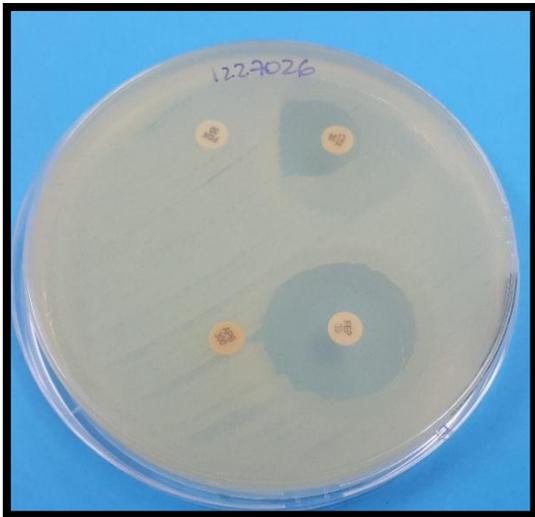
Fotografía 6. Preparación de la suspensión de las muestras problema a 0,5 MacFarland.



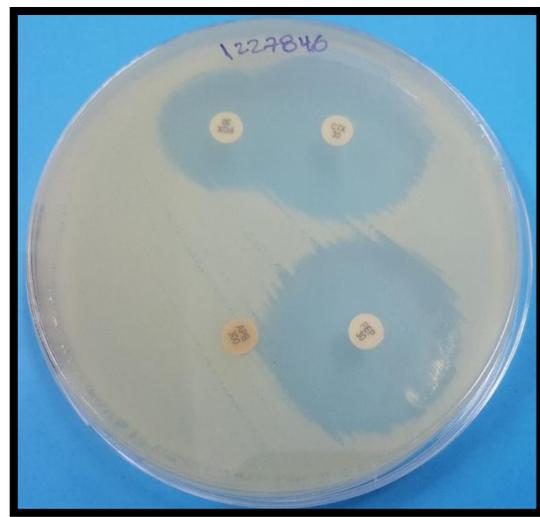
Fotografía 7. Siembra de la suspensión bacteriana en el agar Mueller Hinton.



Fotografía 8. Desarrollo de los métodos fenotípicos para la determinación de AmpC y carbapenemasas.



Fotografía 9. Determinación de AmpC por el método de aproximación de discos(antagonismo).



Fotografía 10. Determinación de AmpC por el método de sinergia de doble disco.



Fotografía 11. Determinación de carbapenemasas por el método de sinergia de doble disco.



Fotografía 12. Determinación de carbapenemasas por el método de discos combinados con inhibidor.



Fotografía 13. Determinación de carbapenemasas por el metodo de inactivación de carbapenémicos.



Fotografía14. Lectura de cada una de las muestras

Anexo 16

Certificado de traducción del Resumen

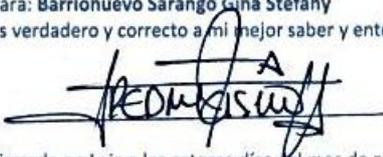
Yo, Freddy Castillo H., profesor de WEI English Institute (FORMAR Cía. Ltda.);

Certifico:

Que tengo el conocimiento y dominio de los idiomas español e inglés y que las traducciones de los siguientes:

RESUMEN DE TESIS

para: **Barrionuevo Sarango Gina Stefany**
es verdadero y correcto a mi mejor saber y entender.



Firmado en Loja a los catorce días del mes de noviembre de 2018.


Formar
CENTRO DE CAPACITACION PROFESIONAL

