



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

TÍTULO

**Enterobacterias productoras de betalactamasas
causantes de infecciones de vías urinarias en usuarios
del laboratorio clínico MEDILAB de Loja.**

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

Autora:

María de los Ángeles Ucho Torres

Directora:

Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

LOJA- ECUADOR

2018

Certificación

Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

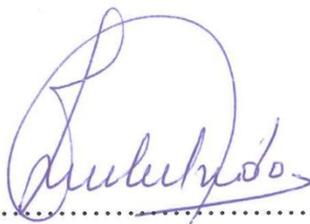
DIRECTORA DE TESIS

Certifica:

Que la presentes tesis titulada “**Enterobacterias productoras de betalactamasas causantes de infecciones de vías urinarias en usuarios del laboratorio clínico MEDILAB de Loja**”, de autoría de la Srta. María de los Ángeles Ucho Torres, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido supervisada y elaborada bajo mi dirección por lo que cumple con los requisitos establecidos por el reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja y una vez revisada autorizo su presentación ante el tribunal correspondiente.

Loja, 29 de noviembre 2018

Atentamente,



Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

Autoría

Yo, María de los Ángeles Ucho Torres, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres

Firma: _____



Cedula: 0750338956

Fecha: 29 de noviembre de 2018

Carta de autorización

Yo, María de los Ángeles Ucho Torres, declaro ser autora de la tesis titulada **“Enterobacterias productoras de betalactamasas causantes de infecciones de vías urinarias en usuarios del laboratorio clínico MEDILAB de Loja”**, como requisito para optar al 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 en su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

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

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero. Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veintinueve días del mes de noviembre del dos mil dieciocho, firma la autora.

Firma:  _____

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres

Cédula: 0750338956

Dirección: Las Pitas

Teléfono: (07) 2974 402 – 0986699521

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora de Tesis: Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

Tribunal de grado:

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

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

Vocal: Lic. Marlon Rolando Bravo Bonilla, Mg, Sc.

Dedicatoria

Con amor, cariño y todo mi esfuerzo dedico el siguiente trabajo:

Principalmente le agradezco a Dios por permitirme alcanzar una de mis metas trazadas, además de ser mi guía a lo largo de este arduo camino me ha bendecido con salud y sabiduría.

A mis amados padres; Enma y Pedro, por ser mentores en mi vida brindándome su apoyo y amor incondicional, por ser los brazos que me han acogido sin negarme un abrazo cuando más lo necesite, por enseñarme a luchar con valentía para obtener mis sueños.

A la memoria de mi hermano Danilo, que desde el cielo ha sido mi ángel protector, por interceder por mí. A mis queridos hermanos; Diana, Paola y su esposo Freddy, Juan José y David, por brindarme su cariño en los buenos y malos momentos, además de ser fundamentales en mi vida son el vivo ejemplo de apoyo e incondicionalidad.

A mis entrañables sobrinos; Sebastián, Juan, Said y Jeremías, quienes son mi mayor motivación además me iluminan con la paz de sus sonrisas y me enseñan a disfrutar la vida con las pequeñas cosas que son las más importantes.

Para culminar, este trabajo de investigación está dedicado a mi querido novio, Andy, que llevo a mi vida para impulsarme a cumplir mis sueños, brindarme su compañía y convertirse en mi refugio cada vez que me sentí débil, ayudarme a vencer cada obstáculo, por su gran amor que hizo su presencia indispensable en mi felicidad.

A mis demás familiares y amigos que han sido parte de este proceso de aprendizaje.

Ma. Ángeles Ucho Torres

Agradecimiento

Al culminar con el presente trabajo investigativo, con el mayor de los esfuerzos y dedicación tengo la satisfacción de alcanzar mi meta y el deseo de agradecer infinitamente a todos aquellos que me han brindado una mano para llegar a mi objetivo y quienes de alguna manera han sido parte del mismo:

A mi directora de tesis la Lic. Iliana Alicia Delgado Mg. Sc., por su compromiso para guiarme además de brindarme su tiempo y las instrucciones necesarias para culminar con éxitos el presente.

A la Universidad Nacional de Loja, Facultad de la Salud Humana y a la Dra. Sandra Freire por su colaboración para que pueda realizar la parte práctica de mi proyecto de tesis.

A la Carrera de Laboratorio Clínico, que me abrió sus puertas, forjándome las más sabias enseñanzas para en un futuro ejercer mi profesión de la manera más ética como Licenciada en Laboratorio Clínico.

A todos mis docentes por su vocación al bríndame sus conocimientos y enseñanzas que coadyuvaron a mi formación como profesional.

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..... | 6 |
| 4.1 Infecciones de vías urinarias..... | 6 |
| 4.1.1. Factores predisponentes..... | 6 |
| 4.2 Enterobacterias..... | 7 |
| 4.2.1. Estructura..... | 7 |
| 4.2.2. Patógenos específicos..... | 8 |
| 4.3. Mecanismo de resistencia de las Enterobacterias..... | 9 |
| 4.3.1. Producción de betalactamasas..... | 9 |
| 4.4. Diagnóstico de laboratorio..... | 12 |
| 4.4.1. Elemental y microscópico de orina (EMO)..... | 12 |
| 4.4.2. Identificación bacteriana | 13 |
| 4.4.3 Pruebas bioquímicas..... | 14 |
| 4.4.4 Antibiograma..... | 16 |
| 4.4.5 Método por difusión en disco KIRBY-BAUER..... | 17 |
| 4.4.6 Detección de BLEE por el Laboratorio | 18 |

| | |
|--|----|
| 4.5. Control de calidad..... | 20 |
| 4.5.1. Medio de cultivo..... | 20 |
| 4.5.2. Inóculo..... | 20 |
| 4.5.3. Incubación..... | 20 |
| 4.5.4. Sensidiscos..... | 20 |
| 4.5.5. Cepas ATCC (American Type Culture Collection)..... | 21 |
| 5. Materiales y métodos..... | 22 |
| 5.1 Tipo de estudio..... | 22 |
| 5.2 Área de estudio..... | 22 |
| 5.3 Universo..... | 22 |
| 5.4 Muestra..... | 22 |
| 5.5 Criterios de inclusión y exclusión..... | 23 |
| 5.6 Métodos, técnicas y procedimientos..... | 24 |
| 5.7 Plan de tabulación y análisis de resultados..... | 25 |
| 6 Resultados..... | 26 |
| 7 Discusión..... | 32 |
| 8 Conclusiones..... | 36 |
| 9 Recomendaciones..... | 37 |
| 10 Bibliografía..... | 38 |
| 11 Anexos..... | 43 |
| Anexo N°1 Autorización para la recolección de datos y muestras del laboratorio clínico MEDILAB de Loja..... | 43 |
| Anexo N°2 Cepas control: Insertos de cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 betalactamasas negativa..... | |
| Inserto de cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 positiva para SHV-18..... | 46 |
| Anexo N°3 Sistema de datos electrónico del laboratorio clínico MEDILAB de Loja..... | 48 |
| Anexo N°4 Formato de registro del laboratorio..... | 49 |

| | |
|---|-----|
| Anexo N°5 Protocolo de transporte de muestras al Centro de Diagnóstico Médico de la Universidad Nacional de Loja | 50 |
| Anexo N°6 Protocolo de activación y conservación de cepas control (KwikStick) | 52 |
| Anexo N°7 Preparación de medios de cultivo | 56 |
| Anexo N°8 Protocolo de siembra de la muestra y conteo de colonias..... | 59 |
| Anexo N°9 Protocolo de pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana. | 63 |
| Anexo N°10 Protocolo para el antibiograma mediante la técnica de Kirby Bauer..... | 73 |
| Anexo N°11 Protocolo de tamizaje para búsqueda y confirmación de producción de BLEE | 79 |
| Anexo N°12 Tabla 3A Pruebas para betactamasas de espectro extendido en <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Proteus mirabilis</i> del manual CLSI..... | 85 |
| Anexo N°13 Control de calidad de medios de cultivo, de equipos y cepas control..... | 86 |
| Anexo N°14 Eliminación de residuos en el área de microbiología..... | 94 |
| Anexo N°15 Registro de resultados | 97 |
| Anexo N°16 Registro de resultados de confirmación y producción fenotípica de betalactamasas tipo BLEE | 98 |
| Anexo N°17 Evidencia fotográfica del trabajo de campo..... | 99 |
| Anexo N°18 Certificación de haber realizado el procesamiento en el CDM..... | 102 |
| Anexo N° 19 Certificación de haber cumplido con la práctica del presente trabajo de investigación | 103 |

1. Título

Enterobacterias productoras de betalactamasas causantes de infecciones de vías urinarias en usuarios del laboratorio clínico MEDILAB de Loja.

2. Resumen

La resistencia bacteriana es frecuentemente adoptada por enterobacterias que son el principal agente causal de las infecciones de vías urinarias (IVU). El presente estudio de tipo descriptivo y de corte transversal tuvo como objetivo identificar la presencia de enterobacterias causantes de infecciones de vías urinarias que hayan desarrollado resistencia a la antibioticoterapia, determinar la incidencia de las enterobacteria causante de IVU y establecer la prevalencia según los microorganismos pertenecientes a la familia enterobacteriaceae productores de betalactamasas en relación al género y la edad; categorizar las enterobacterias según cada servicio del laboratorio MEDILAB. De 172 muestras procesadas se identificaron 64 enterobacterias de las cuales el agente bacteriano mayormente aislado fue *Escherichia coli* con 68,75%, la incidencia de enterobacterias causantes de IVU fue de 37,20%. Existieron 22 cepas que presentaron mecanismos de resistencia bacteriana confirmadas como betalactamasas de espectro extendido (BLEE) siguiendo las instrucciones de la tabla 3A del manual del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) M100-S28, de las cuales el microorganismo con mayor prevalencia fue *Escherichia coli* con 72,72% (16); 10 afectaron al sexo femenino con 62,5% y 6 al sexo masculino con 37,5%; según la edad, de 16 cepas de *Escherichia coli* productora de BLEE mayor número de casos existió en adultos mayores de 65 años con 31,25%(7). Según las áreas de atención existió mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE provenientes del área de consulta externa con 95,45% que corresponde a 21 casos.

Palabras Clave: *Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), Enterobacterias, Infección de vías urinarias.*

Summary

Bacterial resistance is frequently adopted by enterobacteria which are the main causative agent of urinary tract infections (UTI). The objective of this descriptive and cross-sectional study was to identify the presence of enterobacteria causing urinary tract infections that have developed resistance to antibiotic therapy, determine the incidence of the enterobacteria causing UTI and establish the prevalence according to the microorganisms belonging to the family enterobacteriaceae producing beta-lactamases in relation to gender and age; categorize enterobacteria according to each MEDILAB laboratory service. Of 172 processed samples, 64 enterobacteria were identified, of which the bacterial agent mostly isolated was *Escherichia coli* with 68.75%, the incidence of enterobacteria causing UTI was 37.20%. There were 22 strains that showed bacterial resistance mechanisms confirmed as extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) following the instructions in Table 3A of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) manual M100-S28, of which the microorganism with the highest prevalence it was *Escherichia coli* with 72.72% (16); 10 affected the female sex with 62.5% and 6 the male sex with 37.5%; according to age, of 16 strains of ESBL-producing *Escherichia coli*, a greater number of cases existed in adults over 65 with 31.25% (7). According to the areas of attention, there was a greater frequency of ESBL-producing enterobacteria from the outpatient area with 95.45%, corresponding to 21 cases.

Key words: *Extended Spectrum Betalactamases (ESBL), Enterobacteria, Urinary tract infection (UTI).*

3. Introducción

La infección de vías urinarias (IVU) es la patología de origen infeccioso más frecuente siendo las enterobacterias las causantes del 80% de las mismas, de entre las cuales destaca como principal agente causal *Escherichia coli*, que afecta principalmente al sexo femenino debido a la longitud más corta de la uretra, el resto de infecciones son producidas por otras enterobacterias como *Proteus mirabilis* y *Klebsiella spp*, estos agentes han desarrollado mecanismos de resistencia para asegurar su supervivencia. (Alvarado, 2016).

Según la Organización Mundial de la Salud, “La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad que tienen los microorganismos de impedir que los antimicrobianos actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas”. (OMS, 2018) Esto puede atribuirse a diferentes mecanismos, sin embargo, en bacilos gramnegativos, el más frecuente es la producción de enzimas tipo betalactamasas. (García & Gándara, 2010).

Existe una clasificación molecular de las betalactamasas según Ambler (1980) y una clasificación funcional por Bush-Jacoby-Medeiros, basada en los perfiles de substratos e inhibición de las betalactamasas, este es la más utilizada ya que se puede correlacionar con las características fenotípicas del aislamiento. (Bush, 2010).

En un estudio de vigilancia realizado en Europa y Brasil durante 3 años en mujeres entre 18 a 65 años denominado “Aspectos clínicos y epidemiología de resistencia a los antimicrobianos en mujeres con cistitis: implicaciones para la terapia empírica” se concluye que la especie bacteriana más frecuentemente aislada es *Escherichia coli* con un 79,2%; entre los países europeos que estaban dentro de este estudio destaca España que según los resultados indican una prevalencia mayor del 50% de resistencia de *Escherichia coli* productoras de BLEE. (Pigrau, 2013).

Hace unos años, el agente asociado con la producción de BLEE más frecuente era *Klebsiella pneumoniae*, en la actualidad ha sido desplazado por *Escherichia coli*, mayormente producida fuera del ámbito hospitalario como causa de IVU en pacientes de atención primaria; otro aspecto epidemiológico destacable es la presencia de enterobacterias productoras de betalactamasas cromosómicas AmpC, producida por *Enterobacter aerogenes* que ha ocasionado brotes epidémicos en distintos países. (Auqui, 2016).

Tanto en BLEE y AmpC, los antibióticos carbapenémicos mantienen su actividad, sin embargo, existen actualmente betalactamasas de tipo carbapenemasas que confieren resistencia a estos antibióticos. (Oteoa, 2014). Como lo indica un estudio realizado en Colombia se evidenció la presencia de carbapenemasas de las cuales el principal agente causal fue *Klebsiella pneumoniae* (92,7%). (Pigrau, 2013).

Los usuarios y la comunidad en general desconocen la importancia que requiere las IVU por ende existe mal uso de antibióticos o automedicación lo que predispone a las enterobacterias una posible producción de mecanismos de resistencias que podría llegar a aumentar la prevalencia de betalactamasas en nuestro entorno, para poder seleccionar el tratamiento correcto evitando el aumento de fracasos terapéuticos es necesario identificar la cepa productora de betalactamasas. (Villavicencio, 2015).

Es por ello que el presente trabajo de investigación, de tipo descriptivo y de corte transversal, aporta con datos de nuestra localidad, permitiendo identificar los principales agentes causales de IVU y la presencia de enterobacterias que son productoras de enzimas betalactamasas según edad, sexo y relacionarlos con el área de servicio de procedencia de la muestra.

4. Revisión de literatura

4.1 Infecciones de vías urinarias

La infección de vías urinarias consiste en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, se produce en cualquier parte del aparato urinario, la infección que se limita a la vejiga puede ser dolorosa y molesta, sin embargo puede tener consecuencias graves si se extiende a los riñones, los síntomas y signos consisten en polaquiuria, disuria, hematuria, piuria y puede ocasionar septicemia. (Gonzalez, 2016).

4.1.1. Factores predisponentes.

Los factores predisponentes según Koneman (2018) son:

Edad. La prevalencia de las infecciones urinarias varía la edad del paciente, en recién nacidos y lactante es más común en varones con una prevalencia global de 1%, la mayoría de estas infecciones se asocian con anomalías congénitas, mientras que en niños de edad escolar mayor prevalencia existe en mujeres lo que se mantiene constante en la adultez.

Sexo. Las mujeres sexualmente activas son por mucho la población con mayor riesgo de tener una IVU debido a que el coito facilita que las bacterias provenientes de la flora perineal, se unan al epitelio urinario, otro aspecto por el cual las mujeres son más susceptibles que los hombres es la longitud más corta de la uretra.

Pacientes hospitalizados. Individuos que se encuentran en riesgo de infección urinaria son los pacientes cateterizados en forma crónica debido a que un cuerpo extraño como el catéter urinario garantiza su colonización a los 5 días de colocación, la bacteriuria asintomática resultante no es dañina por si misma pero expone al paciente a la aparición de infección sintomática como pielonefritis y sepsis urinaria.

Manejo de antibióticos. La resistencia a los antibióticos es un problema de gran importancia en la infección urinaria ya que incrementa tanto su morbilidad como los costes que genera, por lo tanto al momento de seleccionar los antibióticos en usuarios con infecciones de vías urinarias se prefiere el antibiótico menos tóxico, con menos efectos secundarios, que sea fácil de administrar y que sea económico. (Pigrau, 2013).

4.2 Enterobacterias

Son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cortos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro, cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. (Jawetz, 2010). Las enterobacterias son anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. (Mateos, 2010).

4.2.1. Estructura. Su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar formada por una membrana interna o citoplasmática que consiste en una doble capa de fosfolípidos que regulan el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas; la capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas y la membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) en la parte más externa, son un importante factor de virulencia, lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos y otras proteínas de la membrana externa, entre estas proteínas hay algunas organelas complejas que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias o pili poseen una importante función como adhesinas y los pili sexuales son estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las

bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. (Mateos, 2010).

El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A también conocido como endotoxina es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce; el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como antígeno O, este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos junto con otros factores media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal siendo capaces de sobrevivir más tiempo en sangre y causar infecciones hematógenas diseminadas. (Mateos, 2010).

4.2.2. Patógenos específicos.

Escherichia coli. Estas bacterias pueden ser móviles o inmóviles, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano, además de producir infecciones entéricas también pueden ocasionar infecciones extraintestinales como las IVU, infecciones respiratorias y del sistema nervioso central. (Mateos, 2010).

Klebsiella spp. Produce infecciones urinarias y bacteriemia con lesiones focales en pacientes débiles, estas bacterias figuran entre las 10 principales bacterias patógenas que ocasionan infecciones hospitalarias. (Jawetz, 2010).

Enterobacter spp. Estas bacterias fermentan lactosa, pueden contener cápsulas que producen colonias mucoides, son móviles, suelen colonizar a los pacientes hospitalizados en particular a los tratados con antibióticos, la mayor parte de las cepas poseen una betalactamasa cromosómica denominada AmpC que las vuelven intrínsecamente resistentes a la ampicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generaciones (C1G) (C2G), las mutantes suelen producir en exceso betalactamasa que confiere resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (C3G). (Mateos, 2010).

Serratia spp. Se trata de gérmenes oportunistas, móviles que fermentan la lactosa con lentitud o no la fermentan, entre las infecciones nosocomiales provoca el 2% de las IVU, el tratamiento antibiótico es complicado por la frecuencia elevada de resistencia a múltiples fármacos como aminoglucósidos y penicilinas; las infecciones se pueden tratar con C3G. (Jawetz, 2010).

Proteus spp, Providencia spp y Morganella spp. Estos géneros son lactosas negativas, móviles, producen fenilalaninodesaminasa, existen varias especies de *Proteus*, pero *P. mirabilis* y *P. vulgaris* representan la inmensa mayoría de los aislados clínicos ya que ambos producen ureasa, el último es indol positivo y producen ácido sulfhídrico (H₂S), se diferencian de los bacilos enterobacterianos típicos al expresar fimbrias y flagelos para dar bastones muy alargados con miles de flagelos que translocan con rapidez a través de la superficie de placas de agar, algunas especies como: *Providencia stuartii* se aísla rara vez, excepto a partir de la orina de enfermos en residencias o en ancianos con catéteres urinarios insertados durante largo plazo; *Morganella morganii* es el único miembro de su género, es un aislado nosocomial poco común, en general de orina o heridas; *Proteus spp.* Es causa de IVU, de modo ocasional en huéspedes sanos y con mucha frecuencia en aquellos con catéteres, anomalías anatómicas o funcionales del tracto urinario. (Mateos, 2010).

Citrobacter spp. Puede causar infecciones urinarias y septicemia. (Jawetz, 2010).

4.3. Mecanismo de resistencia de las Enterobacterias

4.3.1. Producción de betalactamasas. En las bacterias gramnegativas el mecanismo de resistencia a los betalactámicos más común e importante es la producción de betalactamasas, enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico haciendo que el antibiótico pierda su capacidad para unirse a las proteínas de unión a la penicilina y su acción bactericida. (CLSI,

2018). Las betalactamasas se clasifican según los sustratos sobre los que actúan, las sustancias capaces de inhibirlas y la similitud en sus secuencias de aminoácidos.

Las clasificaciones más utilizadas son las de Ambler y la de Bush-Jacoby-Medeiros; según Ambler (1980) distingue cuatro clases de betalactamasas en función de sus secuencias aminoacídicas, las de las clases A, C y D son serina β -lactamasas y las de clase B metalobetalactamasas dependientes de zinc.

Por su parte, la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros separa las β -lactamasas en función de su perfil hidrolítico y de sus inhibidores y distingue cuatro categorías y múltiples subgrupos, dentro del grupo 2 (penicilinasas sensibles al ácido clavulánico) se encuentra el subgrupo 2be, que engloba a más de 200 betalactamasas de espectro extendido derivadas de TEM (enzimas que codifica el gen blaTEM), de SHV (enzimas que codifica el gen blaSHV) o del tipo CTX-M (enzima con actividad sobre contra la cefotaxima), que se caracterizan por generar un distinto nivel de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, recuperable en presencia del ácido clavulánico. (Bush, 2010)

Se describen a continuación los siguientes mecanismos, debido a su importancia e implicación clínica.

Betalactamasa tipo AMPC en enterobacterias. Son enzimas con serinas en el sitio activo y funcionan principalmente como cefalosporinasas, la primera enzima reportada con capacidad de hidrolizar la penicilina fue una betalactamasa tipo AmpC en *Escherichia coli*, estas enzimas según la clasificación estructural de Ambler están dentro de las serinbetalactamasas y de acuerdo a la clasificación funcional de Bush pertenecen al Grupo 1. (Ambler, 1980).

Según el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA, 2011) estas betalactamasas se caracterizan en su mayoría por:

- Son resistentes a inhibidores (ac. clavulánico, sulbactam y tazobactam).
- Son activas sobre aztreonam, cefamicinas (como cefoxitina) y C1G, C2G y en menor medida a C3G. Las cefalosporinas de cuarta generación (C4G) son las más estables.
- Son inhibidas por aztreonam, cloxacilina, oxacilina y ácido borónico.

La producción de AmpC puede ser constitutiva o inducible, siendo los niveles de producción dependientes del grado de expresión del gen *blaAmpC* que cuando lo hace de forma constitutiva, en niveles basales normales, confiere un fenotipo de resistencia natural o salvaje característico de la especie bacteriana o puede hacerlo a unos niveles muy superiores al basal, produciendo cantidades elevadas de AmpC. (Cercenado & Cantón, 2011).

Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico, los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan corresponsencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. (Cercenado & Cantón, 2011).

La mayoría de BLEE pertenece a la clase molecular A de Ambler. (Ambler, 1980). Entre ellas se encuentran las TEM y SHV, derivadas de betalactamasas con menor espectro de hidrólisis, la familia CTX-M, procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera spp.* (Bush, 2010). Otras BLEE pertenecientes a la clase A, aunque del subgrupo 2ber son las betalactamasas CMT (complex mutant TEM), como la TEM-50 que combinan una cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oximino-cefalosporinas, algunas enzimas de la familia OXA (enzimas que hidrolizan

la oxacilina) que pertenecen a la clase D de Ambler y grupo funcional 2de, son también betalactamasas de espectro extendido. (CLSI, 2018).

Betalactamasa tipo carbapenemasa en enterobacterias. Las carbapenemasas representan la familia más versátil de betalactamasas, el mecanismo implicado es la producción de betalactamasas capaces de hidrolizar las penicilinas, en la mayoría de los casos cefalosporinas, y varios grados de carbapenémicos y monobactámicos (estos últimos no son hidrolizados por metalobetalactamasas). (CLSI, 2018). Otro grupo importante de carbapenemasas son las de clase A, dentro de las cuales las que tienen mayor importancia epidemiológica son las denominadas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) son de naturaleza plasmídica asociadas al trasposón Tn4401. Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas KPC hidrolizan de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, no se inhiben por el ácido clavulánico, pero sí por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para su reconocimiento fenotípico. (INCIENSA, 2011)

4.4. Diagnóstico de laboratorio

4.4.1. Elemental y microscópico de orina (EMO). El EMO es un examen físico y/o químico el cual comprende un componente macroscópico que incluye una serie de pruebas para determinar diversos parámetros y sustancias secretadas en la orina, se realiza mediante reacciones enzimáticas impregnadas en una tirilla que posee zonas reactivas, entre ellas nitritos, leucocitos, glucosa etc. (Cercenado & Cantón, 2011).

Otro componente del EMO es el análisis microscópico del sedimento de orina, se busca principalmente la presencia de células, cilindros, cristales, este examen nos permite evaluar las infecciones del tracto urinario, luego de realizar un examen microscópico de orina y obtener resultados como nitritos positivo, bacterias +++ se considera como altamente

sospechoso y se procede a realizar la identificación bacteriana mediante el urocultivo. (Delgado, 2011).

4.4.2. Identificación bacteriana

4.4.2.1 Urocultivo. El cultivo de orina sigue siendo la técnica imprescindible y de elección para el diagnóstico de la infección del tracto urinario, pero debe reunir una serie de condiciones para que las bacterias crezcan adecuadamente, las cuales son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad, nutrientes y factores de crecimiento necesarios además debe estar exento de todo microorganismo contaminante. (Preparadores de Oposición para la enseñanza, 2010).

Medios de cultivo. Existen numerosos medios de cultivos para sembrar una muestra de orina pero la elección del medio de cultivo debe contemplar la opción que permita la recuperación de la mayoría de los patógenos con el menor costo posible, algunas guías para el cultivo de enterobacterias en orina proponen el uso de agar MacConkey, agar sangre y agar Eosina azul de metileno (E.M.B), donde las bacterias se multiplican durante al menos 18-24 horas para poder visualizar e identificar correctamente y continuar con las pruebas bioquímicas. (Horacio, 2007).

4.4.2.2 Siembra. Debe realizarse de forma semicuantitativa usando asas calibradas de 0,01 o 0,001 mL, con el fin de obtener información sobre el número de Unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del microorganismo presente en la muestra, además proporciona colonias bien aisladas para su identificación y pruebas de sensibilidad antibiótica. (Horacio, 2007).

Según Gómez (2017) la lectura de cultivo en UFC/ml se realiza así:

- Menos de 1.000 o 10.000 UFC, se informará: “Menos de 1.000 ó 10.000 UFC/ml”.
- De 10.000 a 100.000 UFC.

- Un patógeno sin células epiteliales: informar microorganismo, número de colonias, antibiograma y valorar clínicamente.
 - Dos patógenos: informar microorganismos, número de colonias y solicitar nueva muestra.
 - Más de dos patógenos: informar “Cultivo mixto, probable contaminación”.
- Mayor a 100.000 ó más UFC:
 - Uno o dos patógenos: informar identificación más antibiograma
 - Más de dos especies: informar “cultivo mixto, probable contaminación”.

Características microscópicas. La tinción de Gram es, a menudo, la primera y única herramienta de la que nos servimos para hacer un diagnóstico provisional en el proceso de identificación de la mayoría de las bacterias. (Gomez, 2017). Permite hacer diferenciaciones taxonómicas grampositivas, de color violeta azulado, y gramnegativas, de color granate o rojo-rosado, según se comporten ante esta tinción. (López, 2012).

Características macroscópicas. La morfología de las colonias es fundamental para la diferenciación de los microorganismos, *Escherichia coli* y la mayor parte de las otras bacterias entéricas forman colonias circulares, convexas y lisas con bordes distintivos, algunas cepas producen hemólisis en agar sangre, las colonias de *Enterobacter* son similares pero un poco más mucoides y las colonias de *Klebsiella* son grandes, muy mucoides, tienden a experimentar coalescencia con la incubación prolongada. (Gomez, 2017).

4.4.3 Pruebas bioquímicas. Estas pruebas se basan en reacciones enzimáticas cromogénicas que nos pueden orientar a las técnicas adicionales necesarias para hacer una identificación definitiva, ya que, permiten determinar las características metabólicas de la bacteria. (Armori, 2010).

Las principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación bacterias gramnegativas son:

Urea. Determina la habilidad de un microorganismo de hidrolizar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa, la alcalinización del medio por el hidróxido de amonio hace virar el indicador de pH, es decir producen un cambio de color rojo-rosado en el medio. (Armori, 2010).

Citrato. Determina la capacidad de un germen de utilizar el citrato y sales inorgánicas de amonio como única fuente de carbono y nitrógeno para metabolismo y crecimiento, el desarrollo bacteriano provoca un viraje del indicador de pH del verde al azul lo que indica la presencia de productos alcalinos, si se utiliza carbono del citrato de sodio también se extrae hidrogeno del fosfato de amonio contenido en el medio y se libera amoníaco. (Calvo & Cantón, 2011).

Lisina. Esta prueba permite detectar la producción de la lisina descarboxilasa ya que algunos microorganismos son capaces de provocar la descarboxilación de los aminoácidos por inducción de enzimas específicas, de este modo si el microorganismo produce lisina descarboxilasa, la acción de esta enzima sobre la lisina dará lugar a la cadaverina lo que provocará un cambio de pH hacia la alcalinidad dando un color morado que sobrepasa la acidez debida a la glucosa, así pues, un fondo amarillo indica que no se produce lisina descarboxilasa y un color morado que si es producida.(Calvo & Cantón, 2011).

TSI (triple azúcar hierro). Este medio se utiliza para determinar la capacidad de los bacilos gramnegativos para fermentar lactosa, sacarosa y glucosa, así como para determinar su capacidad de producir H₂S y gas. (Preparadores de Oposicion para la enseñanza, 2010).

SIM. Es un medio semisólido en donde se observan la movilidad, la producción de ácido sulfhídrico y la producción de indol. (Calvo & Cantón, 2011).

4.4.4 Antibiograma. Una vez que se ha determinado que un cultivo es significativo se debe realizar el antibiograma, esta es una técnica que permite estudiar in vitro la actividad de un determinado microorganismo frente a uno o varios antibióticos, traduciendo en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. (Gamazo, 2013).

La sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico se puede determinar:

Modo cuantitativo. Determinando el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) definido como la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo, también es posible calcular el valor de la concentración mínima bactericida (CMB) que es la menor concentración de antimicrobiano capaz de eliminar un inóculo microbiano determinado (muerte celular). (Jawetz, 2010).

Modo cualitativo. Indicando la categoría de susceptibilidad según (CLSI, 2018):

- Es susceptible cuando el microorganismo es inhibido por las concentraciones alcanzadas por el agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada es usada para el sitio de la infección.
- Es intermedio cuando el microorganismo presenta una CMI del agente antimicrobiano cercana a los niveles de antibiótico usualmente alcanzando en sangre o tejidos y para los cuales la respuesta puede ser más baja que para los aislamientos susceptibles, esta categoría implica la eficacia clínica en sitios del cuerpo donde el fármaco es concentrado fisiológicamente o cuando se puede utilizar una dosis más alta de lo normal.
- Es resistente cuando el aislamiento no es inhibido por las concentraciones séricas del antimicrobiano normalmente alcanzadas a dosis normales.

- No es susceptible cuando el microorganismo solamente tiene la categoría de interpretación de susceptible, debido a la ausencia o rara ocurrencia de resistencia, además los aislamientos que tienen CMI por encima o un diámetro de la zona debajo de los valores indicados para el punto de corte como susceptible, se deben reportar “no susceptible”.

Existen varios métodos para la detección de susceptibilidad antimicrobiana, algunos son: método de microdilución en caldo, difusión en disco, agar dilución, E test, etc. (CLSI, 2018).

4.4.5 Método por difusión en disco KIRBY-BAUER. Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable, que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido, partiendo de una muestra clínica, se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio. (CLSI, 2018).

Fundamento. El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Muller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos, tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración, transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano, para interpretación de la prueba se basa en la correlación entre el diámetro de la zona de inhibición (mm) con la CMI ($\mu\text{g/mL}$) para cada antimicrobiano y microorganismo. (Taroco, 2010).

En el antibiograma de difusión en disco es importante establecer un orden adecuado en la colocación de los antibióticos, especialmente en los betalactámicos, que permita evidenciar

interacciones entre ellos características de distintos mecanismos; por ejemplo la amoxicilina-ácido clavulánico al lado de C3G para la identificación presuntiva de BLEE o la cefoxitina o imipenem y las C3G para detectar la inducción de la resistencia condicionada por las enzimas AmpC. (INCIENSA, 2011).

Medio de cultivo. Se utiliza el medio de Muller-Hinton, es el más apropiado para las pruebas de sensibilidad dado que muestran buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, son adecuados para la mayoría de las bacterias patógenas en lo que a requerimientos nutricionales se refiere y existen suficientes datos recopilados que avalan su uso en las pruebas de sensibilidad. (Bernal R. & Guzmán, 1984).

A pesar de estas cualidades, algunos parámetros del medio se deben controlar en cada lote de uso, como el pH, la humedad, los efectos de timina o timidina, y la profundidad de las placas de agar. (Díaz & Miranda, 2015).

4.4.6 Detección de BLEE por el Laboratorio. La detección rápida de la resistencia a los antimicrobianos es una prioridad en los laboratorios de microbiología clínica, su conocimiento ayuda a la elección del antibiótico más adecuado para el tratamiento de la infección, la detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica, esto viene condicionado por la cantidad de enzima producida por la bacteria y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia. (Calvo & Cantón, 2011).

Su detección se basa en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las C3G, C4G y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos que pone en manifiesto el incremento de la CMI o una disminución de los halos de inhibición cuando se realiza la técnica de difusión con discos, otra de las características de estas enzimas es que son inhibidas por el ácido clavulánico y que no presentan actividad hidrolítica frente a

la cefoxitina, por lo que las cepas aparecen en el antibiograma como sensibles a este antimicrobiano. (Cercenado & Cantón, 2011). Se debe realizar la prueba estándar de difusión por disco de acuerdo con las recomendaciones del CLSI utilizando las condiciones de prueba y contenido de disco, especificadas para enterobacteriaceae. (CLSI, 2018).

4.4.6.1 Pruebas fenotípicas confirmatorias de BLEE. Se han desarrollado diversas pruebas fenotípicas para la detección de BLEE, pero la mayoría se basan en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico. (INCIENSA, 2011).

Técnica de difusión con disco. Se incuba la cepa en presencia de C3G (ceftazidima-CAZ y cefotaxima-CTX) y C4G (cefepima-FEP) al lado de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC). (INCIENSA, 2011). En esta técnica la presencia de una BLEE se sospecha no solo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico (efecto huevo) producido entre las cefalosporinas de espectro ampliado o los monobactámicos y el ácido clavulánico, cuando previamente se han situado de forma estratégica los discos. (Calvo & Cantón, 2011).

Técnica de discos combinados. Se incuba la cepa en presencia de C3G (CAZ y CTX), en presencia y ausencia de un inhibidor de betalactamasa como ácido clavulánico (CLV) (CAZ+CLV y CTX+CLV), se interpreta como positiva para BLEE cuando existe una diferencia ≥ 5 mm del halo de inhibición para la cefalosporina con inhibidor en comparación al halo de inhibición de la cefalosporina sola. (INCIENSA, 2011).

Todas estas pruebas fenotípicas de detección de BLEE requieren como mínimo 48 horas desde que el producto patológico llega al laboratorio, que es el tiempo necesario para el aislamiento de la bacteria mediante cultivo y antibiograma. (Calvo & Cantón, 2011).

4.5. Control de calidad

La determinación y reporte de la susceptibilidad antimicrobiana en los microorganismos de importancia en salud pública es una de las principales funciones del laboratorio de microbiología clínica, por esta razón es muy importante que el laboratorio cuente con un control de calidad interno y externo que garantice la calidad de los procedimientos y confiabilidad de los resultados informados a los pacientes. (Taroco, 2010).

4.5.1. Medio de cultivo

Se recomienda el uso de agar Mueller Hinton debe tener una profundidad de 4mm altamente reproducible, bajo en inhibidores que afectan la tetraciclina, sulfonamidas y trimetoprim sulfametoxazol, que permita el crecimiento de microorganismos no fastidiosos.(CLSI, 2010).

4.5.2. Inóculo

Se debe utilizar un inóculo con una turbidez al 0.5 de la escala de McFarland, debe conservarse a temperatura ambiente y en oscuridad, se puede realizar mediante suspensión directa ó método de crecimiento. (CLSI, 2010).

4.5.3. Incubación

La temperatura ideal es 35°C. (CLSI, 2010).

4.5.4. Sensidiscos

Según el CLSI (2010):

- Los discos 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.
- Sacar los discos 2 horas antes de su uso para equilibrar su temperatura al ambiente.

- Utilizar discos con fecha de expiración adecuada.
- Almacenarlos con desecante.

4.5.5. Cepas ATCC (American Type Culture Collection)

Estas cepas de referencia ATCC se seleccionan en base a su susceptibilidad o resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y a la confiabilidad en los métodos de referencia, de acuerdo a la prueba de susceptibilidad y al agente antimicrobiano se selecciona la cepa ATCC. (CLSI, 2018). Para enterobacterias productoras de betalactamasas se seleccionó la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como control positivo de SHV-18, para el control de betalactamasa negativa se usó *Escherichia coli* ATCC 25922. (Díaz & Miranda, 2015).

5. Materiales y métodos

5.1 Tipo de estudio

La presente investigación fue de tipo descriptivo y de corte transversal.

5.2 Área de estudio

El estudio se realizó en el área de bacteriología del laboratorio clínico MEDILAB mismo que se encuentra en la ciudad de Loja, ubicado en la calle Manuel Montero y Alfredo Mora esquina.

5.3 Universo

El universo estuvo conformado por 276 enterobacterias que fueron procesadas en el laboratorio clínico MEDILAB en el año 2017 lo que corresponde a 69 enterobacterias procesadas en 3 meses del mismo año.

5.4 Muestra

La muestra estuvo conformada por 172 urocultivos recibidos en el periodo Marzo-Mayo del 2018 de los cuales 64 fueron enterobacterias y cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión.

Datos:

N= tamaño de la muestra (276 enterobacterias fueron procesadas en el año 2017 lo que corresponde a 69 enterobacterias procesadas en 3 meses del mismo año)

Z_{2a}= nivel de confianza del 95% (1.96)

P: 0.5

q: 0.5

e: error seleccionado de 3% = 0.03

Fórmula y desarrollo<:

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

$$n = \frac{1.96^2 69 x 0.5 x 0.5}{0.03^2 (69 - 1) + 1.96^2 x 0.5 x 0.5}$$

$$n = \frac{3.8416 x 69 x 0.25}{0.0009 x (68) + 3.8416 x 0.25}$$

$$n = \frac{66,2676}{0.0621 + 0.9604}$$

$$n = \frac{66,2676}{1.0225}$$

$$n = 64 //$$

5.5 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Pacientes que asisten al laboratorio clínico MEDILAB con solicitud de urocultivo, durante el periodo Marzo a Mayo del 2018.
- 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

- Muestras mal recolectadas, que no ingresen en frascos estériles.

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

5.6 Métodos, técnicas y procedimientos

Fase pre analítica

- Autorización por parte del responsable del laboratorio clínico MEDILAB de Loja para trabajar con los datos y muestras. (Anexo 1)
- Adquisición de cepas control; *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Anexo 2)
- Obtención de la información de las muestras de los pacientes mediante el sistema de datos electrónico del laboratorio clínico MEDILAB de Loja. (Anexo 3)
- Formato de registro del laboratorio, con el código, procedencia de las muestras y edad del paciente. (Anexo 4)
- Transporte de cepas desde el laboratorio clínico MEDILAB hacia el Centro de Diagnóstico Médico de la Universidad Nacional de Loja. (Anexo 5)

Fase analítica

- Activación y conservación de cepas control. (Anexo 6)
- Preparación de medios de cultivo: agar MacConkey, agar E.M.B y Muller Hinton. (Anexo 7)
- Siembra de muestras con pedido de urocultivo. (Anexo 8)
- Pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana. (Anexo 9)
- Antibiograma mediante la técnica de Kirby Bauer, usando la suspensión directa de colonias para realizar el inóculo. (Anexo 10)

- Tamizaje para búsqueda y confirmación de producción de BLEE. (Anexo 11)
- Tabla 3A Pruebas para betactamasas de espectro extendido en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* del manual del CLSI M100-S28. (Anexo 12)
- Control de calidad de medios de cultivo, de equipos, de cepas control ATCC: para el control positivo de SHV-18 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y para el control negativo de betalactamasas *Escherichia Coli* ATCC 25922. (Anexo 13)

Fase post analítica

- Eliminación de desechos (Anexo 14)
- Registro de resultados obtenidos según edad, género, y el área de servicio proveniente para la tabulación, análisis e interpretación de datos. (Anexo 15)
- Registro de resultados de confirmación y producción fenotípica de betalactamasas tipo BLEE (Anexo 16)
- Evidencias fotográfica del trabajo de campo (Anexo 16)
- Certificación de haber realizado el procesamiento en el CDM por parte de la encargada, la Ing. María Jiménez. (Anexo 17)
- Certificación de haber cumplido con la práctica del presente trabajo de investigación por parte de la Dra. Sandra Freire. (Anexo 18)

5.7 Plan de tabulación y análisis de resultados

Los resultados obtenidos son presentados mediante tablas y representaciones graficas creadas en Excel 2013, lo que facilitan la comprensión, nos aportan con datos epidemiológicos reales y actuales de nuestra localidad.

6 Resultados

Tabla N° 1

Microorganismos bacterianos causantes de IVU de pacientes que acuden al laboratorio clínico MEDILAB de Loja en el periodo Marzo a Mayo del 2018

| | Bacterias | Frecuencia | Porcentaje |
|------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| Positivos | <i>Escherichia coli</i> | 44 | 68,75% |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 6 | 9,38% |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 5 | 7,81% |
| | <i>Proteus vulgaris</i> | 4 | 6,25% |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 3 | 4,69% |
| | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 2 | 3,13% |
| Total | | 64 | 100 |

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres.

Fuente: Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas Marzo a Mayo 2018.

Interpretación

Se identificaron 64 enterobacterias de las cuales la más frecuente fue *Escherichia coli* con el 68,75% que corresponde a 44 cepas aisladas. Los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía consultada, que indica que el principal agente causal de IVU es *Escherichia coli* (Auqui, 2016).

Resultado N° 2

Incidencia de enterobacterias aisladas en muestras de pacientes con IVU que asistieron al laboratorio clínico MEDILAB, en el periodo Marzo-Mayo del 2018

Para determinar la incidencia se aplicó la siguiente fórmula

$$IA = \frac{N^{\circ} \text{ de eventos nuevos}}{N^{\circ} \text{ de individuos susceptibles}} \times 100$$

Datos:

N° de enterobacterias aisladas= 64

N° de pacientes con pedido de urocultivo = 172

IA=?

Desarrollo de la fórmula:

$$IA = \frac{N^{\circ} \text{ de eventos nuevos}}{N^{\circ} \text{ de individuos susceptibles}} \times 100$$

$$IA = \frac{64}{172} \times 100$$

$$IA = 0,37 \times 100$$

$$IA = 37,20\%$$

Interpretación

La incidencia de enterobacterias aisladas fue de 37,20% que corresponde a 64 cepas, del total de pacientes con riesgo a desarrollar IVU durante el periodo Marzo-Mayo 2018, lo que nos indica una incidencia relativamente menor en relación al año anterior, donde fue de 40,11% que corresponde a 69 cepas aisladas en el 2017.

Tabla N° 3

Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas según cada microorganismo, en urocultivos positivos de pacientes que asisten al laboratorio clínico MEDILAB de Loja en el periodo Marzo a Mayo del 2018.

| Enterobacterias | Frecuencia | % |
|----------------------------------|------------|-------------|
| Productoras de betalactamasas | 22 | 34,37 % |
| No productoras de betalactamasas | 42 | 65,63 % |
| Total | 64 | 100% |

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres.

Fuente: Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas Marzo a Mayo 2018.

La prevalencia se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ existente casos}}{N^{\circ} \text{ de la poblacion total}} \times 100$$

| Productoras de betalactamasas | Frecuencia | Prevalencia |
|-------------------------------|------------|-------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 16 | 72,72% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 3 | 13,64% |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2 | 9,09% |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 4,55% |
| Total | 22 | 100% |

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres.

Fuente: Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas Marzo a Mayo 2018.

Interpretación: Las enterobacterias productoras de betalactamasas fueron 22 que corresponde a 34,47% del total de enterobacterias aisladas, que en su totalidad fueron confirmadas como BLEE según la tabla 3A del manual del CLSI M100-S28. De las cuales la prevalencia de *Escherichia coli* fue 72,72% perteneciente a 16 casos, seguido por *Klebsiella pneumoniae* (3) con prevalencia de 13,64%.

Tabla N° 4

Enterobacterias productoras de betalactamasas en relación al género; en el laboratorio clínico MEDILAB de Loja; Marzo-Mayo 2018.

| Enterobacterias productoras de BLEE | Sexo | | Total | |
|--|----------|-----------|--------|------|
| | Femenino | Masculino | | |
| <i>Escherichia coli</i> | N° | 10 | 6 | 16 |
| | % | 62,50% | 37,50% | 100% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | N° | 1 | 2 | 3 |
| | % | 33,34% | 66,70% | 100% |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | N° | 1 | 1 | 2 |
| | % | 50,00% | 50,00% | 100% |
| <i>Proteus mirabilis</i> | N° | 1 | | 1 |
| | % | 100% | | 100% |

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres.

Fuente: Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas Marzo a Mayo 2018.

Interpretación

Según las especies de enterobacterias productoras de BLEE, de 16 cepas de *Escherichia coli*, 10 afectaron al género femenino con 62,50% y 6 afectaron al género masculino con 37,50%. El sexo femenino es más susceptible a contraer IVU, de acuerdo con la bibliografía consultada esto es debido a las condiciones fisiológicas que presentan; ya que la longitud del meato urinario es más corto en relación al sexo masculino. (Jawets, 201).

Tabla N° 5

Enterobacterias productoras de betalactamasas en relación a la edad; en el laboratorio clínico MEDILAB de Loja; Marzo-Mayo 2018.

| Enterobacterias productoras de BLEE | | Edad | | | | Total |
|-------------------------------------|----|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|-------|
| | | Niños (0-10 años) | Joven (25-34 años) | Adulto (35-64 años) | Adulto mayor (>64 años) | |
| <i>Escherichia coli</i> | N° | 1 | 3 | 5 | 7 | 16 |
| | % | 6,25% | 18,75% | 31,25% | 43,75% | 100% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | N° | | | | 3 | 3 |
| | % | | | | 100% | 100% |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | N° | | | | 2 | 2 |
| | % | | | | 100% | 100% |
| <i>Proteus mirabilis</i> | N° | | | 1 | | 1 |
| | % | | | 100% | | 100% |

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres.

Fuente: Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas Marzo a Mayo 2018.

Interpretación

Según el microorganismo productor de BLEE de 16 cepas de *Escherichia coli* 1 afecto a niños de 0 a 10 años con el 6,25%; 3 casos afectaron a jóvenes de 25 a 34 años con el 18,75%; 5 casos afectaron a adultos de 35 a 64 años con 31,25% y 7 casos existieron en adultos mayores de 64 años con 43,75%, siendo este el grupo etario mayormente afectado.

Tabla N° 6

Enterobacterias productoras de BLEE según el servicio de atención del laboratorio clínico MEDILAB de Loja; Marzo-Mayo 2018.

| Servicio de atención | N° | % | Enterobacterias productoras de BLEE | Frecuencia | % |
|----------------------|-----------|-------------|-------------------------------------|------------|-------------|
| Consulta externa | 21 | 95,45% | <i>Escherichia coli</i> | 16 | 72,72% |
| | | | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2 | 9,09% |
| | | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2 | 9,09% |
| | | | <i>Poteus mirabilis</i> | 1 | 4,55% |
| Hospitalización | 1 | 4,55% | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 4,55% |
| Total | 22 | 100% | | 22 | 100% |

Autora: María de los Ángeles Ucho Torres.

Fuente: Hoja de Registro de Datos de las muestras procesadas Marzo a Mayo 2018.

Interpretación:

Según las áreas de atención del laboratorio clínico MEDILAB de Loja existió mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE provenientes del área de consulta externa con 95,45% que corresponde a 21 casos, de las cuales la bacteria que más se aisló fue *Escherichia coli* con 72,72% de 16 casos a diferencia del área de hospitalización donde se aisló 1 caso que corresponde al 4,55% causado por *Klebsiella pneumoniae*.

7 Discusión

Las IVU habitualmente son causadas por enterobacterias que llegan a las vías urinarias y producen la infección, principalmente por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, estos microorganismos desarrollan diferentes mecanismos de resistencia, los cuales se han clasificado según varios criterios pero el más frecuente es la producción de BLEE que confiere resistencia a las cefalosporinas C1G, C2G y C3G. (Quizhpe, 2014).

Los resultados del presente estudio fueron: de 172 muestras de pacientes que acudieron al laboratorio clínico MEDILAB de Loja; durante el periodo Marzo-Mayo 2018, se suscitó el crecimiento bacteriano en 64 cepas según los criterios de inclusión y exclusión, de las cuales fue mayormente aislada *Escherichia coli* con 68,75% presente en 44 casos. La incidencia de enterobacterias causante de IVU fue de 37,20% que corresponde a 64 urocultivos de los cuales 22 fueron cepas productoras de BLEE realizadas por el método de difusión siguiendo las especificaciones del manual del CLSI M100-S28, causadas con mayor prevalencia por *Escherichia coli* productora de BLEE con 72,72% perteneciente a 16 casos de las cuales el 62,50% afecto al sexo femenino (10) y el 37,50% al sexo masculino (6). Según la edad, el mayor número se produjo en adultos mayores de 65 años con 31,25%(7) causado por *Escherichia coli* productora de BLEE y según las áreas de atención existió mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE provenientes del área de consulta externa con 95,45% que corresponde a 21 casos, de las cuales la bacteria que más se aisló fue *Escherichia coli* (16).

Una investigación en Perú realizada por Paul Tejada, et al., denominada “Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional” se obtuvo que de 3149 muestras la incidencia de enterobacterias causantes de IVU fue 81,9%, la prevalencia de cultivos positivos para bacterias productoras de BLEE fue 29,4% (928) de

las cuales mayormente fueron producidas por *Escherichia coli* 72,4% (672), según el sexo, el 70,9% fueron de mujeres (660). El tipo de servicio hospitalario que obtuvo mayor presencia fueron los servicios críticos con 208,90% (105) donde se aisló con más frecuencia *Klebsiella pneumoniae*. Datos diferentes al presente estudio ya que los pacientes que más frecuente presentaron IVU causada por *Escherichia coli* provenían del área de consulta externa con el 72,72% esto puede ser debido a que como lo indican registros epidemiológicos *Klebsiella pneumoniae* es el agente causal que se desarrolla con más frecuencia en pacientes hospitalizados.

Un estudio realizado por Villavicencio (2015) denominado “*Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora” de un total de 233 urocultivos de usuarios provenientes de consulta externa, del crecimiento bacteriano de 70 muestras, se obtuvo el aislamiento de *Escherichia coli* con el 80 % (56), de las cuales 8 cepas correspondientes al 14,29% fueron productoras de BLEE. Todos los aislamientos realizados de *Escherichia coli* productora de BLEE fueron provenientes de usuarios del género femenino, afectando con mayor porcentaje a la edad comprendida entre los 32 años en adelante. Datos diferentes al presente estudio donde se produjo el crecimiento de 64 enterobacterias con una incidencia de 37,20% de las cuales el principal agente causal fue *Escherichia coli* con 68,75%(44), de las 64 enterobacterias aisladas, 22 fueron productoras de BLEE que con mayor prevalencia fue aislado *Escherichia coli* con 72.72% perteneciente a 16 casos afectando principalmente al sexo femenino con el 62,50% (10) producidos por *Escherichia coli* productora de BLEE, que afectó principalmente al grupo de adultos mayores de 64 años con una prevalencia de 31,25% (7). A pesar de que la muestra es similar y que se usó la técnica de difusión de disco para confirmación de BLEE en ambos estudios, existe una notable diferencia que puede ser causa de los criterios de clasificación de los grupos etarias o debido a que en dicho estudio solo se

tomaron en cuenta las muestras que provenían del área de consulta externa, lo que nos indica que en la actualidad ha existido una disminución relativa de producción de BLEE causada por *Escherichia coli*.

Un estudio hecho por Rafael Méndez, et al. denominado “Caracterización clínica de infecciones de vías urinarias producidas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en Duitama (Colombia), durante 2010-2015” se llevó a cabo en 2 instituciones prestadoras de salud a partir de los aislamientos de patógenos BLEE asociados a IVU. Se obtuvo un registro de 169 pacientes de los cuales el agente más aislado fue *Escherichia coli* con 94,7% productor de BLEE, en pacientes mayores de 65 años con 62% (55); el 59,2% eran de género femenino (100) y el 73,6% provenían del área de consulta externa, datos relativamente similares a pesar de que el área de estudio y el periodo de muestreo fueron más amplios que el presente estudio además aquellos pacientes tenían un cuadro recurrente o al menos habían sido hospitalizados en el último año a causa de IVU, lo que nos indica que en Colombia existe una menor producción de betalactamasas causada por *Escherichia coli*.

En una investigación realizada por Velázquez, et al. (2017) En Paraguay, denominada “Resultados de urocultivos en adultos realizados por el laboratorio de microbiología del Hospital de Clínicas - San Lorenzo de enero del 2015 a agosto de 2016 y métodos de estudio de las infecciones urinarias disponibles en la institución” se obtuvo que de 25671 muestras procesadas de pacientes ambulatorios, solamente 579 muestras fueron positivas, representando el 2,3% del total de las orinas examinadas. De los pacientes del sexo masculino el 32% (56) presentó IVU con *Escherichia coli* mientras que el 60% (153) de los pacientes del sexo femenino presentaron IVU con dicho germen. La producción de BLEE se detectaron en 8,9% de las *Escherichia Coli* estudiadas y en una proporción del 17,5% en el caso de la

Klebsiella pneumoniae, se evidencio la presencia de Carbapenemasas en un 12,5% de los urocultivos de hombres con *Klebsiella pneumoniae* y en el 2,8% de las mujeres con el mismo germen datos diferentes al presente estudio ya que la incidencia de enterobacterias causante de IVU fue de 37,20% que corresponde a 64 urocultivos de los cuales 22 fueron cepas productoras de BLEE realizadas por el método de difusión siguiendo las especificaciones del manual del CLSI M100-S28, causadas con mayor prevalencia por *Escherichia coli* productora de BLEE con 72.72%(16) y no se obtuvo resistencia tipo carbapenemasas, esto puede ser debido a dicho estudio se realizó mediante método automático VITEK el cual requiere menor entrenamiento técnico y resulta en una mayor productividad, además este estudio tuvo una muestra mucho más amplia y fue realizada durante un año en un hospital con más demanda de atención al cliente.

8 Conclusiones

- Los principales agentes causales de IVU pertenecientes a la familia enterobacteriaceae fueron: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter agglomerans*.
- La incidencia de enterobacterias aisladas fue de 37,20% que corresponde a 64 cepas, del total de pacientes con riesgo a desarrollar IVU durante el periodo Marzo-Mayo 2018.
- De 22 cepas productoras de betalactamasas, todas confirmadas como BLEE según el manual del CLSI M100-S28, la mayor prevalencia según los microorganismos pertenecientes a la familia enterobacteriaceae fue causada por *Escherichia coli* con 72,72% (16), *Klebsiella pneumoniae* con 13,64% (3), *Klebsiella oxytoca* 9,09% (2) y *Proteus mirabilis* 4,55% (1).
- En relación al sexo, de 16 cepas aisladas de *Escherichia coli* productora de BLEE 10 afectaron con mayor frecuencia al sexo femenino con 62,50%. De 3 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, con mayor frecuencia afectaron al género masculino con 66,67%. (2)
- En relación a la edad de 16 cepas de *Escherichia coli* mayor frecuencia existió en 7 en adultos mayores de 64 años con 43,75% (7). De 3 cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* afectaron a adultos mayores de 64 años con 100%.
- Existió mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE provenientes del área de consulta externa con 95,45% que corresponde a 21 casos, de las cuales la bacteria que más se aisló fue *Escherichia coli* con 72,72% de 16 casos a diferencia del área de hospitalización donde se aisló 1 caso que corresponde al 4,55% causado por *Klebsiella pneumoniae*.

9 Recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda:

1. Estandarizar el protocolo establecido en el manual del CLSI M100 S-28, para que tanto el personal que trabaja en la institución, como los estudiantes que realizan investigación de este tipo adopten el mismo proceso de tamizaje y confirmación de betalactamasas.
2. Debido a que la resistencia bacteriana es un problema multicausal pero en gran porcentaje ocasionado por la falta de información de los pacientes, por ello sería necesario realizar campañas de educación sobre el correcto uso de antibióticos, para dar a conocer a la población las consecuencias que trae consigo la automedicación y el uso indiscriminado de antibióticos ya que esta falta de información podría provocar la aparición de cepas multirresistentes a los medicamentos.
3. Promover la capacitación del personal de salud para lograr resaltar la importancia de la correcta toma de muestras microbiológicas, su procesamiento y la eliminación para evitar la diseminación de bacterias multiresistentes

10 Bibliografía

- Alvarado, X. (2016). Factores clínicos asociados a multirresistencia bacteriana en el hospital de especialidades de las fuerzas armadas N.1 en el período enero-septiembre 2015 (Licenciatura). Universidad central del Ecuador
- Ambler. (1980). *The structure of β -lactamases*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036):321-31.
- Amorín, B. *Bacilos gramnegativos: Aspectos prácticos* [Ebook] (p. 1). Obtenido de <http://n9.cl/p8et>
- Azuero, L. (2013). Sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* en pacientes con infecciones de vías urinarias que acuden al hospital IESS en el periodo de diciembre 2012-febrero-2013. *Licenciatura*. Universidad nacional de Loja.
- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3-4), 112. doi:10.7705/biomedica.v4i3-4.189.
- Boyle, F., Morris, D., et al. (2009). First Report of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Isolated from Poultry in Ireland. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 54(1), 551-553. doi:10.1128/aac.00916-09.
- Díaz, M., Hernández, J., et al. (2009). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(9), 503-510. doi:10.1016/j.eimc.2008.09.006,
- Britania. (2011). *Agar motilidad SIM: Britania*. Obtenido de: <http://n9.cl/98J>.

- Britania. (2011). *Agar Sangre: Laboratorio Britania*. Obtenido de: <http://n9.cl/Ykma>
- Britania. (2011). *Agar Simmons Citrato: Britania*. Obtenido de: <http://n9.cl/u4YX>
- Britania. (2011). *Agar Simmons Citrato: Britania*. Obtenido de: <http://n9.cl/u4YX>
- Britania. (2011). *Agar Urea Christensen: Britania*. Obtenido de: <http://n9.cl/tTH>
- Britania. (2011). *Cerebro Corazón Infusión Agar: Britania*. Obtenido de: <http://n9.cl/LmQ>
- Britania. (2011). *E.M.B: Britania Lab*. Obtenido de <http://n9.cl/3Ep>
- Britania. (2011). *T.S.I: Britania Laboratorio*. Obtenido de: <http://n9.cl/hY9>
- Britanialab. (2011). *Agar MacConkey: Laboratorio Britania*. Obtenido de: <http://n9.cl/n9k>
- Bush, K. (1989). Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), 259-263. doi:10.1128/aac.33.3.259
- Calvo, J., y Cantón, R. (2011). *Procedimientos en Microbiología Clínica* (Capítulo 38 pp 2-20). España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- CLSI. (2010). *Manual de Actualización en resistencia Bacteriana Y Normas CLSI M100-S20 2010: Vigilancia de Salud Publica*. Obtenido de Vigilancia de Salud Publica: <http://n9.cl/7YyP>
- CLSI. (2018). *Manual de Actualización en resistencia Bacteriana Y Normas CLSI M100-S20 2010: Vigilancia de Salud Publica*. Obtenido de Vigilancia de Salud Publica
- Delgado, L., (2011). *Análisis de una muestra de orina por el laboratorio: Libros de Laboratorio*. Obtenido de: <http://n9.cl/TB7K>

- Díaz, I., & Miranda, S. (2015). Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión en disco (pp. 10-20). Chile: Ingrid Araya. Obtenido de: <http://n9.cl/415>
- Quizhpe, D., (2014). ReAct. *Accion frente a la resistencia bacteriana*. Obtenido de: <http://n9.cl/J4P>
- Koneman, E. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Gamazo de la Rasilla, C., Gómez, S., y Peiro, A. (2013). *Microbiología basada en la experimentación* (pp. 82-92). Barcelona: Elsevier España.
- García, C. S., de la Gándara, M. P., & García, F. J. C. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 12–18. doi:10.1016/s0213-005x(10)70003-3
- Gomez, M. (2018). *Urocultivo: Academia. Edu*. Obtenido de: <http://n9.cl/asjJ>
- Gonzalez, E. M. (2016). Infecciones de tracto urinario. *Nefrología digital: ELSEIVER*. Obtenido de: <https://bit.ly/2q5lnDK>
- Horacio, L. (2007). *Urocultivo: Britanialab.com*. Obtenido de: <http://n9.cl/9I8>
- Huanca, F. (2014). Prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro ampliado ampliado (BLEE) en urocultivos y coprocultivos de pacientes Hospital Eduardo Eguía. *Ecorfan*, 316-138.
- INCIENSA. (2011). *Mecanismos de resistencia a los antibióticos de importancia clínica en enterobacterias* (pp. 3-13). Costa Rica: Marcelo Galas. Obtenido de <http://n9.cl/7vD>
- Jawetz, E., (2010). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Nueva York: McGraw Hill Medical.

- López, H. (2012). *Técnicas de Identificación: Media Axon*. Obtenido de: <http://n9.cl/Yg>
- Machado-Alba, J., & Murillo-Muñoz, M. (2012). Evaluación de sensibilidad antibiótica en urocultivos de pacientes en primer nivel de atención en salud de Pereira. *Revista de Salud Pública*, 14(4), 710-719. doi: 10.15446/rsap
- Mateos, R. e. (2010). *Facmed.unam: Enfermedades Infecciosas III*. doi: Medicine. 2010;10(51):3426-31
- Méndez-Fandiño., Yardany Rafael., et al (2017). Caracterización clínica de infecciones de vías urinarias producidas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en Duitama (Colombia), durante 2010-2015. *Infectio*, 21(1), 15-18. <https://dx.doi.org/10.22354/in.v21i1.636>
- OMS. (2018). La resistencia a los antimicrobianos: *Organizacion mundial de la salud*. Obtenido de: <http://n9.cl/Xiqk>
- Oteo, J., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., et al (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(10), 666–670. doi:10.1016/j.eimc.2014.02.011
- Oxoid Microbiology Products. (2018). Muller Hinton CM0337: *Thermo Scientific*. Obtenido de: <http://n9.cl/CizV>
- Pigrau, C. (2013). Infeccion del Tracto Urinario: *Seimc.ORG Salvat Innovacion y Calidad*. Obtenido de: <http://n9.cl/haqJ>
- Preparadores de oposiciones para la enseñanza. (2010). *Procedimientos de identificación bacteriana* (pp. 5-13). Madrid. Obtenido de <http://n9.cl/iV6>

- Rodríguez, A. (2016). *Resistencia bacteriana en urocultivos, en pacientes del área de hospitalización del hospital un canto a la vida "Padre Carolo", en el periodo comprendido entre enero 2012 a diciembre 2013*". Licenciatura. Universidad central del Ecuador.
- Seimc. (2010). *Metodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología: Seimc.ORG*. Obtenido de: <http://n9.cl/wUzn>
- Taroco. (2010). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiotica. En Taroco, Seija, & Vignoli, *Temas de bacteriología y virología médica* (págs. 36: 663-671).
- Tejada-Llacsá, Paul J, Huarcaya, Jury M, Melgarejo, Giannina C, Gonzales, Lida F, Cahuana, Judith, Pari, Rosa M, Bohorquez, Hector L, & Chacaltana, Jesús. (2015). Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de la Facultad de Medicina*, 76(2), 161-166. <https://dx.doi.org/10.15381/anales.v76i2.11143>
- Velázquez, G, Lird, G, Melgarejo, L, Walder, A, Chírigo, C, & Santa Cruz, F. (2017). Resultados de urocultivos en adultos realizados por el laboratorio de microbiología del Hospital de Clínicas - San Lorenzo de enero del 2015 a agosto de 2016 y métodos de estudio de las infecciones urinarias disponibles en la institución. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, 50(2), 51-66. Obenido de: [https://dx.doi.org/10.18004/anales/2017.050\(02\)51-06](https://dx.doi.org/10.18004/anales/2017.050(02)51-06)
- Villavicencio, P. (2015). *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora (Licenciatura). Universidad nacional de Loja.
- Zurita, J. (2018). Resistencia bacteriana en Ecuador. *Panama Infection*, S:41-44.

11 Anexos



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 1

Autorización para la recolección de datos y muestras del laboratorio clínico MEDILAB de Loja.



Loja, 10 de Marzo del 2018

Dra. Sandra Freire
 RESPONSABLE DE LABORATORIO CLÍNICO MEDILAB DE LOJA.

Por medio del presente, autorizo el permiso correspondiente para la obtención de datos y muestras con solicitud de urocultivos a la Srta. María de los Ángeles Ucho Torres, portadora de la cédula de identidad número 0750338956, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, para la realización del proyecto titulado "Enterobacterias productoras de betalactamasas causantes de infecciones de vías urinarias en usuarios del laboratorio clínico MEDILAB de Loja.", previo a la obtención del título de licenciado en Laboratorio Clínico; cabe recalcar que los datos obtenidos serán tratados cuidadosamente, guardando la confidencialidad correspondiente.

Atentamente.


 CEVASCOP S. A.
 RUC: 1191710149001
 DIR: MANUEL MONTEROS Y ALFREDO MORA ESQ.
 TELEF. 2580515 - 2581404


 Dra. Sandra Freire

Responsable de Laboratorio Clínico MEDILAB de Loja.


 Dra. Sandra Freire Guesta
 PATÓLOGA CLÍNICA
 DIRECTOR LABORATORIO CLÍNICO

ATENCIÓN  24 HORAS

Laboratorio: Manuel Montero y Alfredo Mora esq. • Telf. 2581 404 / 2580 515
 Clínica: Rocafuerte 15-22 y Sucre. • Telf. 2587 636 / 2577 056
 Correo: medilabloja@hotmail.com • Loja - Ecuador
 Próximamente estaremos atendiendo en nuestro nuevo local ubicado en la Av. Eugenio Espejo y Shuaras

www.medilab.com.ec



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLINICO

Anexo N° 2

Cepas control: Insertos de cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 betalactamasas negativa

| | |
|--|--|
| Microbiologics | |
| Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release | |
| Specifications Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-219 Reference Number: ATCC® 25922™ Purity: Pure Passage from Reference: 3 | Expiration Date: 2018/11/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/1/23 |
| 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 Microscopic Features: Gram negative straight rod | Medium: SBAP 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 | |
| <small>Disclaimer: The last digit(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.</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> | |
| | (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative logo mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. and is licensed to other trademarks and to sell products derived from ATCC's cultures. |
| | (1) 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 AD 541-04-13 |
| © 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC:266 | |

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

| Range | Interpretation | Symbols | Color |
|-------------|-------------------------------------|---------|--------|
| 2.00 - 3.00 | High-confidence identification | (+++) | green |
| 1.70 - 1.99 | Low-confidence identification | (+) | yellow |
| 0.00 - 1.69 | No Organism Identification Possible | (-) | red |

Meaning of Consistency Categories (A - C)

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

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

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

Comments:

closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment

MEDIBAC-INC S.A.

Distribuidor para el Ecuador de

MICROBIOLOGICS

Registro Sanitario AD-641.04-13



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Inserto de cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 positiva para SHV-18

| | |
|---|--|
| Microbiologics | |
| Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release | |
| <p>Specifications Microorganism Name: <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> Catalog Number: 0784 Lot Number: 784-19 Reference Number: ATCC® 700603™ Purity: Pure Passage from Reference: 3</p> | <p>Expiration Date: 2018/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A. Blanker Release Date: 2016/12/6</p> |
| <p>Macroscopic Features: Two colony types possible: Large, circular, convex, entire edge, gray, glistening. Large, circular, convex, entire edge, cream / off white, mucoid, glistening.</p> <p>Microscopic Features: Gram negative short, plump, straight rod.</p> | <p style="text-align: center;">Performance</p> <p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p> |
| <p>ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.</p> | <p>Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs) negative (1) Cefazidime (30 mcg - Disk Susceptibility): 10 - 18 mm (1) Cefazidime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): >= 5 mm CAZ zone (1) Cefotaxime (30 mcg - Disk Susceptibility): 17 - 25 mm (1) Cefotaxime/Clavulanic acid (30/10 mcg - Disk Susceptibility): >= 3 mm CTX zone</p> |
| <p style="text-align: center;">Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE</p> | |
| <p>Disclaimer: The lot number of the lot number appearing on the product label and packaging are merely a packaging level number. The lot number displayed on the package is the actual date of manufacture.</p> <p>Note for Users: Although the Microbiology uses many conventional tests, the unique environment of the disk, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazardously information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> | |
| <p>ATCC Licensed Product</p> <p>TESTING CERT #2655.01</p> | <p style="font-size: small;"> (1) The ATCC Licensed Derivative Entities, the ATCC Licensed Derivative and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Manassas, VA, Inc. licensed to the licensee and used to sell products derived from ATCC's collection. (2) These Microbiology products are NOT FOR SALE TO THE PUBLIC. </p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: large;"> MEDIBAC-INCSA Distribuidor para el Ecuador de MICROBIOLOGICS Registro Sanitario AD-647-04-13 </p> |

Bruker Daitonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

| Range | Description | Symbols | Color |
|-----------------|--|---------|--------|
| 2.300 ... 3.000 | highly probable species identification | (+++) | green |
| 2.000 ... 2.299 | secure genus identification, probable species identification | (++) | green |
| 1.700 ... 1.999 | probable genus identification | (+) | yellow |
| 0.000 ... 1.699 | not reliable identification | (-) | red |

Meaning of Consistency Categories (A - C)

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

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

| Analyte Name | Analyte ID | Organism (best match) | Score Value |
|--------------|------------|-----------------------|-------------|
| FB(++) (A) | 784-49 | Klebsiella pneumoniae | 2.184 |

Comments:

N/A

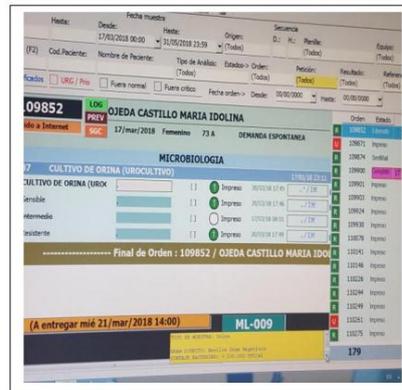
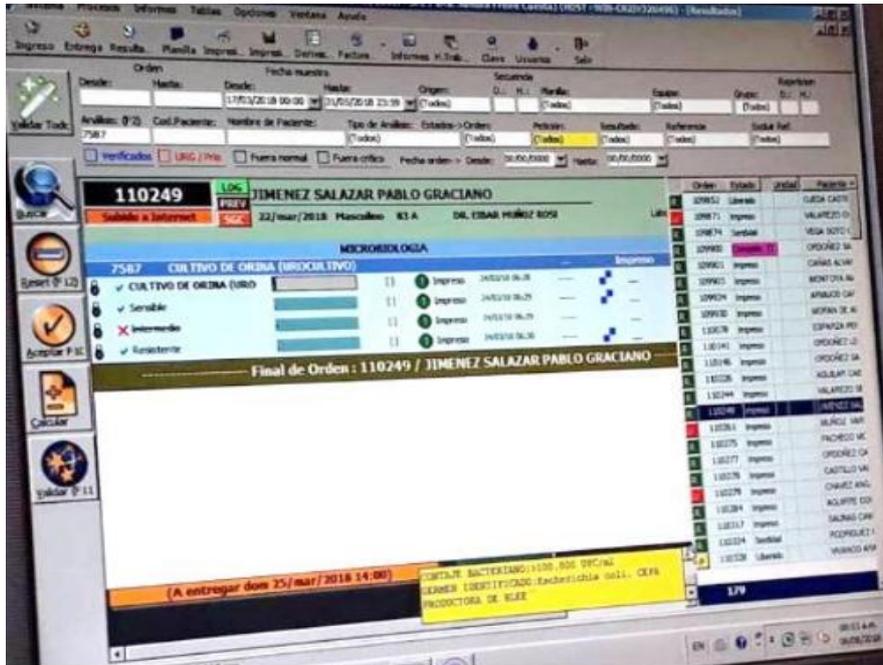
MEDIBAC INC S.A.
 Distribuidor para el Ecuador de
 MICROBIOLOGICS
 Registro Sanitario A° 511-04-13



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 3

Sistema de datos electrónico del laboratorio clínico MEDILAB de Loja





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 4

Formato de registro del laboratorio

| | | |
|--|---|--|
| UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO | FORMATO DE IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA | CÓDIGO: REVISIÓN: 1 EDICIÓN:1 FECHA: 22-03-2018 PÁGINA: 1/1 |
|--|---|--|

| FORMATO DE REGISTRO DE LABORATORIO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--------|---------------------|---------------------|-----------|----------|----|------|---------------------|--------------------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|------|---------------|----|-----|-----|--|
| FECHA DD/MM/AA | CODIGO | PROVENIENCIA | | | SEXO | | EDAD | BACTERIA AISLADA | PERFIL DE SUSEPTIBILIDAD | | | | | | | | | | | | | | OTRO | OBSERVACIONES | | | | |
| | | Consulta externa | Hospitaliza ción | Masculino | Femenino | AN | | | AM | SAM | CF | FEP | CTX | CAZ | CRO | CXM | CIP | ETP | ESB | FOS | GM | MEM | | | FT | NOR | SXT | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

S: Sensible; **R:** resistente; **I:** Susceptibilidad intermedia; **AK:** Amikacina; **SAM:** Ampicilina/Sulbactam; **KZ:** Cefazolina; **FEP:** Cefepime; **CTX:** Cefotaxime; **CAZ:** Ceftazidime; **FOX:** Cefoxitin; **CIP:** Ciprofloxacina; **CN:** Gentamicina; **MEM:** Meropenem; **IMP:** Imipenem **F:** Nitrofurantoina; **SXT:** Trimetropim/ Sulfametoxazol, **ATM:** Aztreonam.

Nota:

- **Presuntivas de expresar BLEE:** Que tengan diámetro de CAZ, < 22mm; CRO < 25 mm y Proteus sp. < 27 mm y ATM < 27 mm.
 - **Presuntivas de expresar AmpC:** Que tengan disminución de sensibilidad o resistencia a cefotaxima y la R a cefoxitina, son resistentes también a los inhibidores de betalactamasas.
 - **Presuntivas de expresar Carbapenemasas:** En el caso de Enterobacterias: MEM e IMP < 22mm Proteae ver ERT < 27mm. Acinetobacter IMP < 21 mm o MER < 18 mm
- En el caso de Pseudomona aeruginosa se usarán puntos de corte de ceftazidime < 22 mm, y MEM < 23 mm. Sospeche de cepas OXA: PTZ < 15 mm o en Proteae < 17 mm.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 5

Protocolo de transporte de muestras al Centro de Diagnóstico Médico de la Universidad Nacional de Loja

1. Introducción

La obtención y el transporte de muestras son etapas fundamentales en el diagnóstico clínico y en la investigación, para mantener la integridad de las muestras se deberá tener en cuenta los procedimientos de obtención, transporte, condiciones de conservación, destino final y bioseguridad. El control de estos proporcionará valor a las muestras asegurando la calidad y estabilidad para obtener resultados confiables y oportunos ya que un manejo incorrecto de sustancias con agentes infecciosos puede ocasionar morbilidad y mortalidad (Rodríguez, 2013).

2. Objetivo

Determinar los pasos y requerimientos necesarios para garantizar el transporte adecuado de las cepas aisladas, dentro de los parámetros requeridos para su análisis posterior.

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

- Cooler hermético
- Medio de transporte Stuart

5. Procedimiento

Una vez analizada la muestra en el laboratorio clínico MEDILAB procedemos a tomar un medio de transporte Stuart

- Se rotula el medio Stuart con el código del paciente, retiramos el hisopo y recolectamos colonias representativas del cultivo.
- Se las guarda en el cooler hermético sin hielo y se las transporta al CDM para su posterior análisis.

6. Observaciones

- Debe ser transportada solo por el personal autorizado, aplicando las normas de bioseguridad.

7. Referencias bibliográficas

Rodriguez, T. (2013). Cursep. Obtenido de

<http://www.higiene.edu.uy/parasito/cursep/Transp.pdf>

| | |
|--|---|
| Elaborado por: María de los Ángeles Ucho Torres. | Revisado y aprobado por: Lic. Iliana Delgado. |
|--|---|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 6

Protocolo de activación y conservación de cepas control (KwikStick)

1. Introducción

Los microorganismos KWIK-STIK™ están previstos para usarse como control y para verificar el desempeño de los ensayos, los reactivos y los medios que se usan en las pruebas microbianas para la detección e identificación de microorganismos aislados cultivados; las preparaciones de microorganismos son rastreables a la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC®) u otra colección auténtica de cultivos de referencia. (Microbiologics, 2017).

2. Objetivo

Establecer el correcto procedimiento para activación y conservación de las cepas control ATCC 700603 Y 25922.

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

4.1 Equipos

- Cabina de seguridad biológica
- Incubadora

4.2 Instrumentos

- Tubos de ensayo
- Viales plásticos
- Gradilla
- Hisopos estériles

4.3 Insumos

- Lápiz graso

4.4 Sustancias y reactivos

- Infusión cerebro corazón
- Glicerina
- Agua destilada

5. Procedimiento

***Escherichia coli* ATCC® 25922**

Características

- Beta-lactamasa negativa.
- Se indica en el CCI de agentes antimicrobianos utilizados en bacterias Gram negativas no fastidiosas.
- En *Acinetobacter spp.* para el control de trimethoprim-sulfametoxazole y tetraciclina.
- Control negativo de test de screening y confirmatorio de BLEE. (Díaz, 2015).

***Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603**

Características

- Productora de beta-lactamasa de espectro extendido tipo SHV-18 (BLEE).

- Control positivo de pruebas screening y confirmatorias de BLEE. (Díaz, 2015).

Procedimiento de activación

1. Abrir el vial por la mitad.
2. Colocar de 0,5 a 1,0 ml de caldo tripticasa de soya preparado en el vial con una pipeta Pasteur y agitar.
3. Llevar el vial a la incubadora y dejar incubar 30 minutos.
4. Luego de la incubación, proceder a sembrar por agotamiento en agar T.B.S y dejar incubar durante 24 horas.
5. A las 24 horas de incubación se procede hacer un pase en agar sangre de cordero y en agar MacConkey Se obtiene cepas aisladas para el control de calidad y se procede a realizar las pruebas piloto.

6. Conservación de las cepas de referencia para el control de calidad interno

1. Se esterilizó todo el material que se va a utilizar: tubos, alícuotas con 500 ul de glicerina, pipeta, hisopos, infusión cerebro corazón.
2. Se coloca en dos tubos estériles una cantidad de 8mL de infusión cerebro corazón para *Klebsiella pneumoniae* 700603 y *Escherichia coli* 25922 respectivamente rotulado.
3. De las cepas crecidas en el Agar Sangre de Cordero y MacConkey se procede a coger colonias y se coloca en los tubos mezclando bien.
4. Se realiza la escala de McFarland dándonos una cantidad de 1 en la escala.
5. Se coloca en las alícuotas con 500 ul de glicerina, 500 ul de la escala de McFarland, se cierran las alícuotas y se procede a rotular cada una de las alícuotas.

6. Llevar las alícuotas en una gradilla para mantenerlas en refrigeración a una temperatura de -80°C para su posterior utilización en el control de calidad de la investigación.

7. Bibliografía

Microbiologics. (2017). Instrucciones de uso KWIK-STIK™. doi: pi.194.span.la rev b.

Díaz, I., & Miranda, S. (2015). Ministerio de salud gobierno de Chile: Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión en disco. Obtenido de: <http://n9.cl/415>

| | |
|--|---|
| Elaborado por: María de los Ángeles Ucho Torres. | Revisado y aprobado por: Lic. Iliana Delgado. |
|--|---|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 7

Preparación de medios de cultivo

1. Agar Macconkey

Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras. (Britanialab, 2011)

Procedimiento

1. Referirse a la etiqueta del envase para las cantidades y volúmenes requeridos.
2. Suspender 49,53 gramos de medio deshidratado en 1000 ml / agua destilada purificada.
Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
3. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Evitar el sobrecalentamiento. Enfriar a 45-50 ° C.

4. Mezclar bien antes de verter en placas de Petri estériles. La superficie del medio debe estar seca cuando se inocula. (Britanialab, 2011)

2. Agar E.M.B

Fundamento

Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; estos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas. El agar es el agente solidificante, muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen un centro oscuro por periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. (Britania, 2011).

Procedimiento

1. Suspender 36g del polvo en 1 litro de agua purificada.
2. Reposar 5 minutos.
3. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta su disolución total.
4. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos.
5. Distribuir en placas de Petri estériles.

Interpretación

Microorganismos fermentadores de lactosa y/o sacarosa: colonias de color negro azulado o amarronado. Pueden tener centro oscuro y brillo metálico.

Microorganismos no fermentadores de lactosa y sacarosa: colonias del color del medio, incoloras. (Britania, 2011).

3. Agar Muller Hinton (OXID CM0337)

Fundamento

El uso principal del Agar Mueller-Hinton es para la Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana (AST). Se ha convertido en el medio estándar para el método Bauer-Kirby, y está especificado por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) y el Comité Europeo de Prueba de susceptibilidad antimicrobiana. (Oxoid Microbiology Products, 2018).

Procedimiento

1. Agregue 38g a 1 litro de agua destilada.
2. Llevar a ebullición para disolver el medio por completo.
3. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

4. Bibliografía

Britanialab. (2011). Agar MacConkey: Laboratorio Britania. Obtenido de: <http://n9.cl/n9k>

Britania. (2011). E.M.B: Britania Lab. Obtenido de: <http://n9.cl/3Ep>

Oxoid Microbiology Products. (2018). Muller Hinton CM0337: Thermo Scientific. Obtenido de: <http://n9.cl/CizV>

| | |
|--|---|
| Elaborado por: María de los Ángeles Ucho Torres. | Revisado y aprobado por: Lic. Iliana Delgado. |
|--|---|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 8

Protocolo de siembra de la muestra y conteo de colonias

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, luego de sembrar se procede a incubar 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. (Lopardo, 2015)

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, se puede distinguir varios aspectos como forma, elevación, borde, tamaño, color. (Lopardo, 2015).

Para el conteo de colonias se usan varios métodos cuantitativos, en este caso utilizaremos el método de asa calibrada, el cual consiste contar el número de colonias desarrolladas después de incubar la siembra a 37 °C durante 24 horas, el resultado se multiplica por 100 ya que el asa de platino contiene 0,01 ml de orina. (Lopardo, 2015).

2. Objetivo

Definir los pasos necesarios que garantice la correcta siembra de la muestra y así poder obtener las colonias aisladas para su posterior análisis.

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

- **Equipos**

Mecheros de bunsen, lámparas de alcohol con alcohol al 70% incubadora.

- **Instrumentos**

Asa de platino calibrada (0.01ml), hisopos estériles, soportes para las asas de platino

- **Insumos**

Lápiz graso, guantes.

- **Sustancias y reactivos**

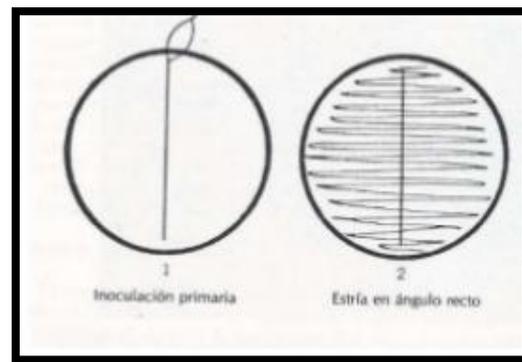
Muestra a estudiar, cajas Petri con medio de cultivo elaborado.

5. Procedimiento

Técnica de dilución con asa calibrada

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. En la orina no centrifugada previamente homogenizada se introduce el asa calibrada de platino de 0.01 ml.
3. Se toma un asada de orina con el asa y se inocula en una caja de agar sangre de cordero, MacConkey, E.M.B y Muller Hinton por estría primaria y secundaria.
4. Se procede a incubar las cajas a 37°C, durante 24 horas a 48 horas
5. Después de la incubación se anotan las características de las colonias.



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.

5. Observaciones

- La siembra debe realizarse de la orina sin centrifugar con un asa calibrada, lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo microbiano.
- Marcar las cajas antes de empezar a trabajar.

- No hablar durante la siembra.
- Flamear el asa antes de realizar la serie de estrías y enfriar en una orilla.
- Las placas no se descartan si no hay crecimiento a las 24 horas, se vuelven a incubar hasta por 72 horas (observando cada 24 horas), si transcurrido el tiempo no hay crecimiento, si se descartan.

6. Bibliografía

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

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

| | |
|--|--|
| Elaborado por: María de los Ángeles Ucho Torres. | Revisado y aprobado por: Dra. Sandra Freire. |
|--|--|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 9

Protocolo de pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana.

1. Introducción

La identificación de una bacteria sospechosa de ser la causa de una infección es uno de los instrumentos principales del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas; para poder ser clínicamente útil, debe ser lo más rápida posible. Una vez aislado el microorganismo de la muestra, se procede a su identificación, es decir, a clasificarlo dentro de un grupo o taxón ya establecido, con el que tenga la mayor semejanza, la complejidad de este proceso depende del nivel de precisión o discriminación que se pretende conseguir. (Hontangas & Castillo, 2016).

2. Objetivo

Definir los pasos necesarios que garantice el procedimiento para identificación por bacteriología convencional en las pruebas de Lisina, Citrato, Urea, Triple azúcar hierro (TSI) y Sulfuro Indol Motilidad (SIM).

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

Equipos

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

Instrumentos

- Puntas de siembra de platino
- Hisopos estériles
- Soportes para las puntas de siembra de platino

Insumos

- Tubos con medio de cultivo elaborado.
- Pruebas bioquímicas para bacteriología convencional: Lisina, Citrato, Urea, TSI, SIM.
- Lápiz graso
- Guantes
- Mascarilla

Sustancias y reactivos

- Reactivo de Kovacs.
- Muestra a estudiar
- Cepas control: *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 700603

5. Procedimiento

5.1 Prueba de citrato

Sirve para determinar la capacidad de la bacteria para obtener energía como única fuente de carbono, el medio incluye citrato de sodio, fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y debe carecer de hidratos de carbono y proteínas. Las bacterias que utilizan el citrato también

pueden extraer nitrógeno de la sal de fosfato produciendo amoníaco lo que alcaliniza el medio.

Preparación del agar Simmons Citrato

1. Suspender 24,28 gramos en 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
3. Mezclar bien y esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos.
4. Distribuir en tubos y dejar enfriar de forma inclinada. (Britania, 2011)

Procedimiento para realizar la prueba de citrato

1. Tomar una colonia aislada de una caja de agar con un asa de punta e inocular en el pico de flauta del agar.
2. Incubar por 24 horas a 35^a C.

Interpretación: La lectura de la prueba incluye un resultado positivo cuando existe un crecimiento bacteriano y cambio de color del medio de verde a azul, o un desarrollo bacteriano visible en la estría sin cambio de color, en este caso se debe dejar 24 horas más para confirmar la positividad con el cambio de color. Y el resultado es negativo cuando no existe crecimiento ni cambio de color.

5.2 Prueba de la descarboxilación lisina

Existen bacterias que tienen la capacidad de descarboxilar la lisina por acción de la enzima lisina descarboxilasa, removiendo una molécula de COOH del aminoácido, también se puede observar la producción de sulfuro de hidrógeno, gracias a la composición del agar.

Preparación del agar lisina hierro

1. Suspender 34,56 gramos en 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
3. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos.
4. Distribuir en tubos de ensayo y enfriar los tubos en posición inclinada para formar tubos inclinados. (Britania, 2011)

Procedimiento para realizar la prueba de la descarboxilación lisina

1. Tomar con un asa de punta una colonia aislada y estriar en la superficie inclinada y picar en la capa profunda sin tocar el fondo del tubo.
2. Se incuba 24 horas a 35°C.

Interpretación: Para leer la prueba se consideran que la prueba es positiva cuando el pico de flauta se mantiene violeta (alcalino) y el fondo violeta.

- El resultado es negativo cuando el pico de flauta es violeta (alcalino) y el fondo amarillo (ácido), es decir se ha fermentado glucosa.
- La producción de sulfuro de hidrógeno se observa con un ennegrecimiento en el fondo del tubo o un precipitado negro.

5.3 Prueba de triple azúcar hierro (TSI)

Se basa en la fermentación de azúcares del medio (lactosa, glucosa y sacarosa), después de 18 – 24 horas de incubación a 35ª C, además se puede observar la producción de gas sulfhídrico y de CO₂ o H₂; determinando la capacidad de las bacterias de utilizar 1, 2 o 3 hidratos de carbono presentes en el medio y la posible producción de gases como producto de la actividad bacteriana.

Preparación del agar triple azúcar hierro (TSI)

1. Suspender 64,32 gramos (el peso equivalente de medios deshidratados por litro) en 1000 ml de agua destilada.
2. Caliente a ebullición hasta disolver el medio completamente.
3. Mezclar bien y esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos.
4. Distribuir en tubos de ensayo y dejar el medio en forma inclinada con la base de aproximadamente 1 pulgada de largo. (Britania, 2011)

Procedimiento para realizar la prueba de triple azúcar hierro

1. El agar debe solidificarse en forma de pico de flauta en un tubo con una profundidad de por lo menos 3 cm y por lo menos 2 cm de pico de agar.
2. Tomar una colonia bien aislada de una caja de agar con un asa de aguja.
3. Inocular en el medio TSI picando en la capa profunda hasta de unos 3-5 mm del fondo del tubo, se retira el asa delicadamente y se estría l superficie inclinada con un movimiento de ida y vuelta.
4. Incubar por 18 – 24 horas a una temperatura de 35 a 37°C.

Interpretación: Para leer las reacciones en el tubo se anota primero la del pico de flauta y en segundo lugar del fondo existiendo las siguientes posibilidades.

- A = ácido; K = alcalino.
- A/A= fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa
- A/A (g) = fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa + producción de gas (se observan burbujas o resquebrajamiento del agar)

- A/A, SH₂ = fermentadores de glucosa, lactosa y sacarosa + producción de gas sulfhídrico.
- K/A = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa
- K/A (g) = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa + producción de CO₂ o H₂.
- K/A, SH₂ = fermentadores de glucosa y no de sacarosa ni de lactosa + producción de SH₂.
- K/K = No fermenta ninguna de las azúcares del medio

5.4 Prueba de la ureasa

La úrea es una diamida del ácido carbónico que puede hidrolizarse fácilmente, con liberación de amoníaco y CO₂, así esta prueba se basa en la capacidad que tiene una bacteria de hidrolizar la úrea en los compuestos antes mencionado por actividad o presencia de la enzima ureasa para reaccionar formando carbonato de amonio, alcalinizando el medio.

Preparación del agar Urea (Christensen)

1. Suspender 24g del polvo en 950 ml de agua purificada.
2. Dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución total.
3. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
4. Enfriar a 50°C y agregar 50 ml de una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración o cloroformo.
5. Fraccionar en tubos y dejar solidificar el medio en pico de flauta con fondo profundo.
(Britania, 2011)

Procedimiento para realizar la prueba de la ureasa

1. Se debe solidificar el medio en forma de pico de flauta.
2. Estriar en la superficie inclinada del agar el inóculo bacteriano.
3. Incubar por 18-24 horas de 35 -37°C

Interpretación: Las bacterias que hidrolizan rápidamente la úrea lo pueden hacer dentro de 1 a 2h, las especies menos activas pueden requerir hasta 3 días para hacerlo, es así que para poder decir que hay una reacción positiva se observa un color rojo intenso o fucsia en el pico de flauta y en el fondo o sólo en el pico de flauta y es negativo cuando no hay cambio de color, el medio permanece de color amarillo.

5.5 Prueba del Sulfuro Indol Motilidad (SIM)

Con este medio se puede ver la capacidad de las bacterias para producir sulfuro de hidrógeno, gracias a la liberación de azufre por la acción de la enzima tiosulfato reductasa y la cisteína desulfhidrasa. La presencia de la enzima triptofanasa permite a las bacterias oxidar el triptófano en tres metabolitos el indol, escatol y ácido indolacético y la movilidad de las bacterias inoculadas que poseen flagelos y las que carecen de los mismos.

Preparación de agar motilidad SIM

1. Suspender 30 g del polvo en 1 litro de agua purificada.Reposar 5 minutos.
2. Calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto para disolución total.
3. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Britania, 2011).

Procedimiento para realizar la prueba de prueba del SIM

1. Inocular colonias bacterianas provenientes de un cultivo puro en el agar sulfuro, indol y movilidad en la profundidad del medio, teniendo cuidado de no tocar el fondo del tubo ni mover el asa durante la siembra.
2. Incubar por 18 – 24 horas en atmósfera aerobia en 35 a 37°C.
3. Realizar la interpretación o lectura de la prueba.

Interpretación:

- **Movilidad:** Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra. Resultado negativo: crecimiento solamente en la línea de siembra.
- **Producción de SH₂:** Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio. Resultado negativo: el medio permanece sin cambio de color
- **Prueba del indol:** Agregar al medio de cultivo 3 a 5 gotas del reactivo de Kovac's. Resultado positivo: color rojo. Resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento. (Britania, 2011)

Tabla de interpretación de pruebas bioquímicas de bacterias gram negativas.

| BACTERIA | TSI | GAS | H₂S | Cit* | Urea | Mov** | Indol | Lis*** |
|-------------------------------|------------|------------|-----------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| <i>Escherichia coli</i> | a/a | + | - | - | - | + | + | + |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | a/a | ++ | - | + | - | + | - | + |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | a/a | ++ | - | + | +/- | + | - | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | a/a | ++ | - | + | + | - | - | + |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | a/a | ++ | - | + | + | - | + | + |
| <i>Proteus vulgaris</i> | k/a | +/- | + | -/+ | ++ | + | + | - |
| <i>Proteus mirabilis</i> | k/a | + | + | +/- | ++ | + | - | - |
| <i>Proteus penneri</i> | k/a | +/- | - | +/- | ++ | + | - | - |
| <i>Citrobacter freundii</i> | a/a o k/a | + | + | + | +/- | + | - | - |
| <i>Citrobacter koseri</i> | k/a | + | - | + | +/- | + | + | - |
| <i>Serratia marcescens</i> | k/a | + | - | + | - | + | - | + |
| <i>Morganella morganii</i> | k/a | + | - | - | ++ | + | + | - |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | k/a | -/+ | - | +/- | -/+ | + | -/+ | - |
| <i>Providencia rettgeri</i> | k/a | - | - | + | ++ | + | + | - |
| <i>Edwardsiella tarda</i> | k/a | + | + | - | - | + | + | + |
| <i>Alkalescens dispar</i> | k/a | - | - | - | - | - | + | -/+ |
| <i>Salmonella typhi</i> | k/a | - | + | - | - | + | - | + |
| <i>Salmonella paratyphi A</i> | k/a | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>Salmonella spp</i> | k/a | + | + | + | - | + | - | + |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | k/k | - | - | + | - | + | - | |

*Citrato

**Movilidad

***Lisina

6. Referencia bibliográfica

CLSI, C. a. (2018). Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 28ª ed. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.

Hontangas, L., & Castillo, S. (16 de Mayo de 2016). Tecnicas de Identificacion: MEDIA AXON. Obtenido de MEDIA AXON Web site: <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>

| | |
|--|---|
| Elaborado por: María de los Ángeles Ucho Torres. | Revisado y aprobado por: Lic. Iliana Delgado. |
|--|---|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 10

Protocolo para el antibiograma mediante la técnica de Kirby Bauer

1. Introducción

Este método consiste en depositar en la superficie del medio de cultivo Muller Hinton previamente inoculado con el microorganismo, discos de papel filtro impregnados con antibióticos; el mismo que al ponerse en contacto con la superficie húmeda del agar se difunde. Luego de 18 a 24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona o halo de inhibición. Mediante este procedimiento se determina la sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia de las bacterias recuperadas frente a los antimicrobianos, elegidos.

2. Objetivo

Definir los pasos necesarios que garanticen que el procedimiento para la realización del antibiograma sea efectuado de manera correcta.

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

Equipos

- Cabina de bioseguridad
- Mecheros de bunsen
- Lámparas de alcohol con alcohol al 70%
- Incubadora
- Densitómetro
- Agitador vortex

Insumos

- Cajas Petri con medio de cultivo Muller Hinton
- Lápiz graso
- Guantes
- Mascarilla
- Hisopos estériles

Sustancias y reactivos

- Muestra a estudiar
- Solución salina estéril
- Cepas control: *Escherichia coli* 25922, *Klebsiella pneumoniae* 700603.

5. Procedimiento

Preparación del inoculo por medio de la técnica de suspensión directa de colonias

1. A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas coger varias colonias con un hisopo previamente estéril

2. Con el hisopo mezclar en un tubo con 3 cm de suero fisiológico.
3. Ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland en suero fisiológico.
4. Agitar en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos.

Inoculación en las placas

1. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un hisopo dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.
2. Inocular las placas de Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos

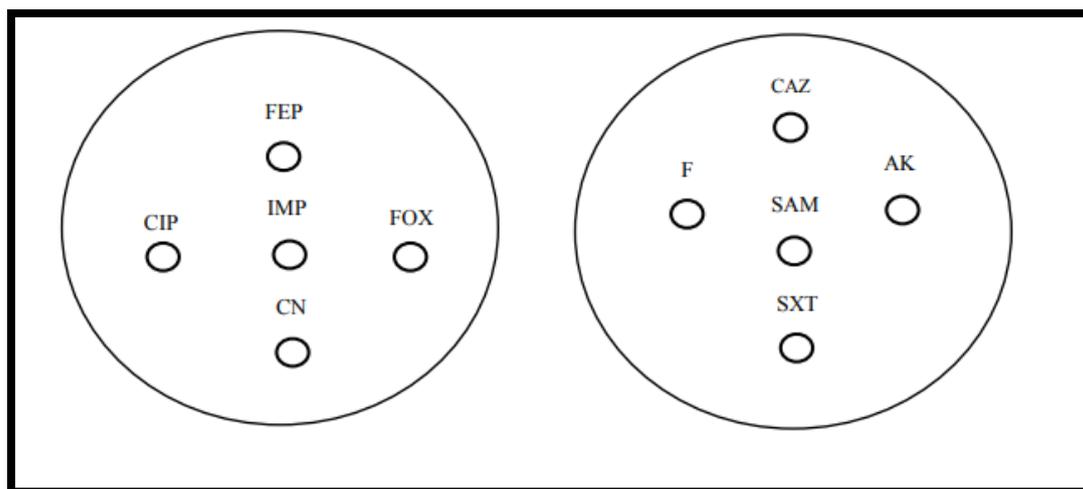
Antibiograma por difusión en disco

1. Colocar los discos presionando ligeramente el agar y flameando la pinza cada vez que coja otro disco.
2. Los discos deben ser distribuidos de forma que los halos de inhibición no se superpongan.
3. Incubar las placas invertidas en incubadora por 18 a 24 horas a 35°C en atmósfera aeróbica para microorganismos no fastidiosos y para bacterias anaerobias facultativas incubar en atmósfera con 5 % de CO₂.
4. Leer el diámetro de inhibición con una regla milimetrada, en medios transparentes se miden por el reverso de la placa y en los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar
5. Comparar las mediciones con las tablas 3A del manual del CLSI M100-S28. Discos para antibiograma en bacterias gramnegativas

Tabla N 1. Puntos de cohorte de discos antibióticos utilizados para enterobacterias, según el CLSI M100-S28

| ANTIBIOTICO | Medida de halo de inhibición (mm) | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-----|
| | S | I | SDD | R |
| Imipenem | ≥23 | 20-22 | - | ≤19 |
| Cefoxitin (FOX) | ≥18 | 15-17 | - | ≤14 |
| Cefepime (FEP) | ≥25 | - | 19-24 | ≤18 |
| Ciprofloxacina (CIP) | ≥21 | 16-20 | - | ≤15 |
| Cefazolina (KZ) | ≥23 | 20-22 | - | ≤19 |
| Amoxicilina / Sulbactam (SAM) | ≥15 | 12-14 | - | ≤11 |
| Ceftazidime (CAZ) | ≥21 | 18-20 | - | ≤17 |
| Amikacina (AK) | ≥17 | 15-16 | - | ≤14 |
| Gentamicina (CN) | ≥15 | 13-14 | - | ≤12 |
| Trimetropin/Sulfametoxazol (SXT) | ≥16 | 11-15 | - | ≤10 |
| Nitrofurantoína (F) | ≥17 | 15-16 | - | ≤12 |

Distribución de discos de antibióticos:



6. Observaciones

A pesar de que el medio de Agar Muller – Hinton el cual contiene infusión de carne 2; hidrolizado de caseína 17.5; almidón 1.5; agar-agar 13. pH 7.2 -7.3: tiene buena reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad, se debe tener precauciones en el momento de la preparación para poder garantizar que la difusión de los antibióticos y la densidad del inóculo sean estandarizados. Así los parámetros importantes que se deben observar en este medio son: el pH, el grosor del medio, la humedad, el efecto de la timina y timidina y la variación de la composición de los cationes divalentes.

- pH: debe ser de 7,2 o 7,3 a temperatura ambiente. Con pH bajo antibióticos como los aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activas (halos más pequeños y posibles falsas resistencias) y la tetraciclina puede tener mayor actividad (halos grandes = falsas sensibilidades) y de lo contrario con pH alto se espera el efecto opuesto.
- Grosor del medio: el grosor del medio adecuado es de 4 mm, si el medio es muy pequeño la difusión de los antibióticos será mayor y si es muy grueso será menor, por lo que en el primer caso esperamos halos más grandes provocando una lectura de falsas sensibilidades y en el segundo los halos serán menores reportando falsas resistencias.
- Humedad: las placas no deben tener exceso de humedad si esto ocurre se deben colocar en una cabina de flujo laminar por 10 a 30 minutos hasta que no tengan gotas de condensación. Si la superficie de la placa está demasiado húmeda los antibióticos de los discos difundirán en todo el medio y se podrá observar halos inespecíficos y solapados o por el contrario muy pequeños por la acción sinérgica o antagónica de los antibióticos, respectivamente. Efecto de la timina y timidina: los medios con exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos de las sulfonamidas y trimetropina produciendo zonas de inhibición más pequeñas, menos nítidas o sin halo lo que es equiparable a falsas

resistencias. Esto lo garantiza la composición del medio de cultivo de la casa proveedora con la estandarización M6 del agar

- Variación de cationes divalentes: la variación de Ca^{++} y Mg^{++} afectan los resultados de la actividad de los aminoglucósidos y tetraciclina. Un alto contenido de cationes genera reducción de los halos de inhibición y poca cantidad de cationes ocasiona una zona de inhibición falsamente mayor. El efecto está garantizado con el agar M6.

7. Referencias bibliográficas

CLSI, C. a. (2018). Normas de Desempeño para las Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana 28^a ed. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, Complemento CLSI M100. Wayne, PA.

Jawetz, M. (2010). Microbiología médica. En 25^o Edición (págs. 215-219). México, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.

Murray, R. P. (2013). Microbiología Médica. En Sexta Edición (págs. 269-270). Barcelona, España: Elsevier España, S.L.

| | |
|--|---|
| Elaborado por: María de los Ángeles Ucho Torres. | Revisado y aprobado por: Lic. Iliana Delgado. |
|--|---|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 11

Protocolo de tamizaje para búsqueda y confirmación de producción de BLEE

1. Introducción

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

2. Objetivo

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

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

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

Discos para Sinergia de discos

- Cefotaxime
- Ceftazidime
- Cefepime
- Cefoxitin
- Amoxicilina-ácido clavulánico

Discos combinados:

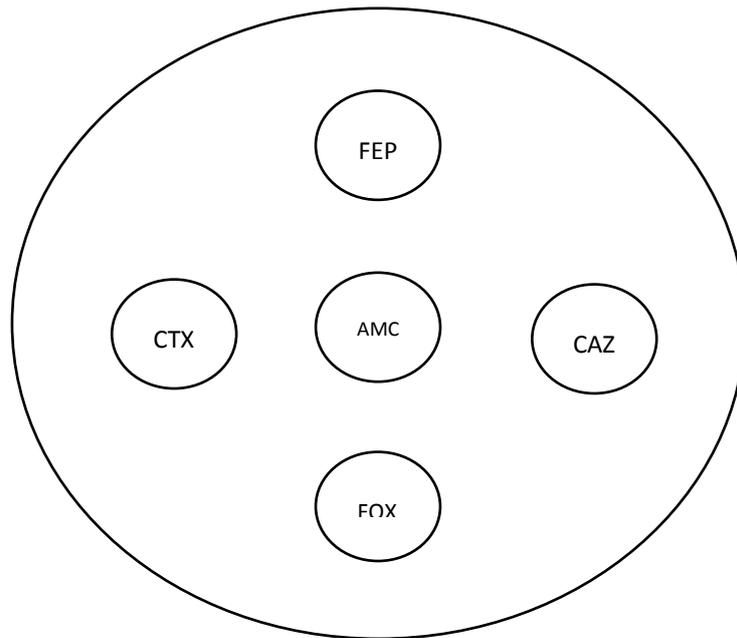
- Ceftazidime 30 ug
- Ceftazidime + Ác. Clavulánico 30/10 ug
- Cefotaxime

- Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug

5. Procedimiento

Sinergia de Discos

1. Rotular los tubos y la caja Petri con Agar Mueller – Hinton a utilizar.
2. Tomar con un hisopo estéril una colonia del cultivo y suspenderla en solución salina.
3. Medir en el densitómetro la turbidez del inóculo, que debe ser equivalente a 0,5 en la escala McFarland, tener precaución de limpiar con gasa estéril el fondo del tubo.
4. En caso de ser menor a 0,5 McFarland se procederá a tomar otra colonia y disolver hasta llegar a la escala indicada. En caso de ser mayor a 0,5 McFarland se procederá a agregar solución salina estéril al inóculo.
5. Impregnar el hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
6. A continuación, se colocan los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría, colocar los discos de cefotaxime, ceftazidime, cefepime y cefoxitin a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina-ácido clavulánico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa. En este sentido, solo para *Proteus mirabilis* se recomienda una distancia de 40-45 mm.
7. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C y se realiza la lectura dentro de las 16-20 horas siguientes.



Interpretación: Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición.

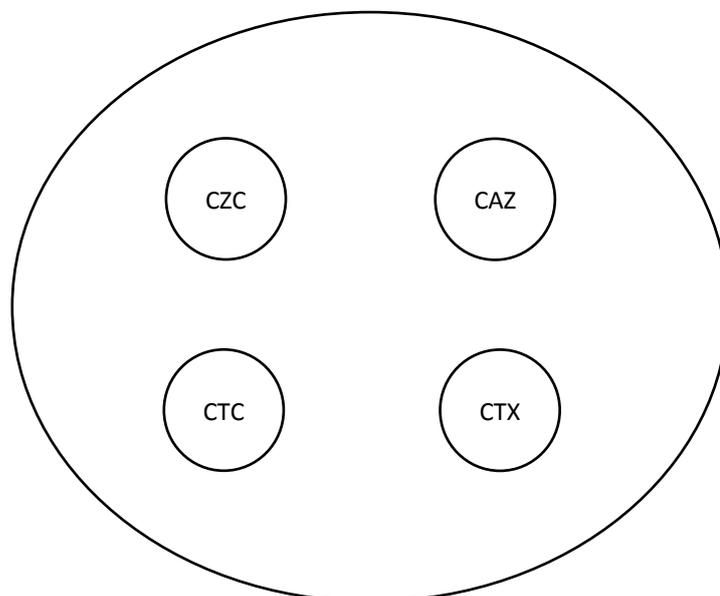
- **Positivo.** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor. Usualmente el halo se deforma adquiriendo formas ovaladas o con cola de pescado.
- **Negativo.** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxime, ceftazidime, cefepime o aztreonam ni presencia de "zona fantasma".

Nota: Si el ceftaxitin no presenta halo de inhibición, lo que quiere decir que es resistente se interpreta como presuntivo de AmpC.

5.1 Discos combinados

1. Preparar los materiales que se van a utilizar
2. Rotular el tubo de ensayo y la caja Petri con Agar Mueller – Hinton a utilizar

3. Dispensar 3ml de solución salina en un tubo de ensayo
4. Tomar con un hisopo estéril una colonia del cultivo y suspenderla en solución salina.
5. Medir en el densitómetro la turbidez del inóculo, que debe ser equivalente a 0,5 en la escala McFarland, tener precaución de limpiar con gasa estéril el fondo del tubo
6. En caso de ser menor a 0,5 McFarland se procederá a tomar otra colonia y disolver hasta llegar a la escala indicada.
7. En caso de ser mayor a 0,5 McFarland se procederá a agregar solución salina al inóculo.
8. Impregnar el hisopo estéril con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones. Dejar reposar de 3 a 5 minutos.
9. A continuación, se colocan los discos utilizando una pinza previamente flameada y fría y colocar los discos de Ceftazidime 30 ug, Ceftazidime + Ác.Clavulánico 30/10 ug, Cefotaxime, Cefotaxime + Ác. Clavulánico 30/10 ug.
10. Finalmente se coloca en la incubadora con una temperatura de 35°C +/- 2°C y se realiza la lectura dentro de las 10 a 18 horas.
11. Repetir el mismo proceso con la cepa control positivo y negativo.



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

- **Positivo.** Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidime, cefotaxime o cefepime en presencia de ácido clavulánico ≥ 5 mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico.
- **Negativo.** No incremento o diferencia < 5 mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con ácido clavulánico respecto a los de las cefalosporinas correspondientes sin ácido clavulánico. Los resultados positivos se interpretan según la tabla:

Nota: Comparar siempre con el control positivo y negativo

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

6. Control de calidad

El control de calidad se realizará siguiendo las directrices especificadas en los documentos de referencia adoptados por cada centro. Se recomienda realizar un control con cada nuevo lote de reactivos con las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 (control negativo) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (portadora de SHV-18 control positivo). Los resultados esperados del control de calidad se muestran en el manual M100 del CLSI.

7. Bibliografía

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

SEIMC. (2015). Procedimientos en Microbiología Clínica

| | |
|---|--|
| Elaborado por: Edgar Jara, Sthefany Torres, Diana Ramon | Revisado y aprobado por: Lic. Carmen Ullauri |
|---|--|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 12

Tabla 3A Pruebas para betactamasas de espectro extendido en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, del manual CLSI

Table 3A. Tests for Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*

NOTE: Following evaluation of PK-PD properties, limited clinical data, and MIC distributions, revised breakpoints for cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftiozime, ceftioxaone, and aztreonam were published in January 2010 (M100-S20) and are listed in Table 2A. Cefuroxime (parenteral) was also evaluated; however, no change in breakpoints was necessary with the dosage. When using the current breakpoints, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (ie, it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current breakpoints, ESBL testing should be performed as described in this table.

Note that breakpoints for drugs with limited availability in many countries (eg, moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone) were not evaluated. If considering use of these drugs for *E. coli*, *Klebsiella* spp., or *Proteus* spp., ESBL testing should be performed. If isolates test ESBL positive, the results for moxalactam, cefonicid, cefamandole, and cefoperazone should be reported as resistant.

| Test | Criteria for Performance of ESBL Test | | ESBL Test | |
|------------------------------------|---|---|---|--|
| | Disk diffusion | Broth microdilution | Disk diffusion | Broth microdilution |
| Test method | MHA | CAMHB | MHA | CAMHB |
| Medium | MHA | CAMHB | MHA | CAMHB |
| Antimicrobial concentration | For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 10 μ g or Ceftazidime 30 μ g or Aztreonam 30 μ g or Cefotaxime 30 μ g or Ceftriaxone 30 μ g For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 10 μ g or Ceftazidime 30 μ g or Cefotaxime 30 μ g (Using more than one antimicrobial agent improves the sensitivity of ESBL detection.) | For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 4 μ g/mL or Ceftazidime 1 μ g/mL or Aztreonam 1 μ g/mL or Cefotaxime 1 μ g/mL or Ceftriaxone 1 μ g/mL For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 1 μ g/mL or Ceftazidime 1 μ g/mL or Cefotaxime 1 μ g/mL (Using more than one antimicrobial agent improves the sensitivity of ESBL detection.) | Ceftazidime 30 μ g Ceftazidime-clavulanate ^a 30/10 μ g and Cefotaxime 30 μ g Cefotaxime-clavulanate 30/10 μ g (Testing necessitates using both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate.) | Ceftazidime 0.25–128 μ g/mL Ceftazidime-clavulanate 0.25/4–128/4 μ g/mL and Cefotaxime 0.25–64 μ g/mL Cefotaxime-clavulanate 0.25/4–64/4 μ g/mL (Testing necessitates using both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate.) |
| Inoculum | Standard disk diffusion procedure | Standard broth dilution procedure | Standard disk diffusion procedure | Standard broth dilution procedure |
| Incubation conditions | 35°C \pm 2°C; ambient air | 35°C \pm 2°C; ambient air | 35°C \pm 2°C; ambient air | 35°C \pm 2°C; ambient air |
| Incubation length | 16–18 hours | 16–20 hours | 16–18 hours | 16–20 hours |

| Test | Criteria for Performance of ESBL Test | | ESBL Test | |
|--------------------|---|---|--|--|
| | Disk diffusion | Broth microdilution | Disk diffusion | Broth microdilution |
| Test method | Disk diffusion | Broth microdilution | Disk diffusion | Broth microdilution |
| Results | For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime zone \leq 17 mm Ceftazidime zone \leq 22 mm Aztreonam zone \leq 27 mm Cefotaxime zone \leq 27 mm Ceftriaxone zone \leq 25 mm For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime zone \leq 22 mm Ceftazidime zone \leq 22 mm Cefotaxime zone \leq 27 mm Zones above may indicate ESBL production. | Growth at or above the concentrations listed may indicate ESBL production (ie, for <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>K. oxytoca</i> , MIC \geq 8 μ g/mL for cefpodoxime or MIC \geq 2 μ g/mL for ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, or ceftriaxone; and for <i>P. mirabilis</i> , MIC \geq 2 μ g/mL for cefpodoxime, ceftazidime, or cefotaxime). | A \geq 5-mm increase in a zone diameter for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the zone diameter of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime zone = 16; ceftazidime-clavulanate zone = 21). | A \geq 3 twofold concentration decrease in an MIC for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the MIC of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime MIC = 8 μ g/mL; ceftazidime-clavulanate MIC = 1 μ g/mL). |
| Reporting | | | For all confirmed ESBL-producing strains: If laboratories do not use current cephalosporin and aztreonam breakpoints, the test interpretation should be reported as resistant for all penicillins, cephalosporins, and aztreonam. If laboratories use current cephalosporin and aztreonam breakpoints, then test interpretations for these agents do not need to be changed from susceptible to resistant. | |



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 13

Control de calidad de medios de cultivo, de equipos y cepas control

1. Introducción

El control de calidad forma parte una serie de procedimientos que obligan a revisar periódicamente el funcionamiento de los aparatos del laboratorio, así como los medios de cultivo y los reactivos utilizados en el trabajo cotidiano, así como investigar cuidadosamente sus metodologías. Todos los procedimientos deben estar dirigidos a minimizar los errores sistemáticos y aleatorios que deriven del personal, el equipo e instrumentos, los materiales y reactivos, los métodos de muestreo y pruebas analíticas, así como el manejo y reporte de datos.

2. Objetivo

Describir el control de calidad que se realiza en equipos y medios de cultivo durante el proyecto de investigación.

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

- Cinta testigo
- Termómetro

Reactivos y sustancias

- Cepas control *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- Alcohol al 70% Hipoclorito de sodio.

5. Procedimiento

Control de calidad interno

- **De equipos:**
 - Para la estufa de incubación y cámara de bioseguridad al inicio de cada semana de procesamiento de muestras se les realizó limpieza interna y externa con alcohol al 70% y luego con hipoclorito de sodio.
 - En el autoclave se controlara la cantidad de agua para su uso, y se lo utilizo a 121^aC a una presión de una atmosfera.
 - A la estufa de incubación y la refrigeradora se controlara la temperatura con la ayuda de termómetros digitales.
- **De medios de cultivo:** La esterilización se garantizara al utilizar una cinta testigo, y al incubar placas de medios de cultivo y pruebas bioquímicas por 24 horas para así determinar si hubo una posible contaminación de los medios al momento de su preparación, obteniendo resultados favorables.
- Los medios preparados fueron almacenados en refrigeración dentro de fundas plásticas y debidamente rotulados con nombres y fecha de elaboración; de la misma manera las pruebas bioquímicas se colocaron en gradillas y se rotularon con nombres y fecha de elaboración.

- **Cepas control**, *Escherichia coli* ATCC 25922 betalactamasa negativo y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 positivo para SHV-18.
- Utilizar la tabla de referencia 4-A2 del M100 CLSI para método de difusión en disco para las cepas utilizadas.

Table 4A-2. Disk Diffusion QC Ranges for Nonfastidious Organisms and β -Lactam Combination Agents*

| Antimicrobial Agent | Disk Content | QC Organisms and Characteristics | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------|---|---|--|---|--|---|--|---|
| | | <i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 25922 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC [®] 27853 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC [®] 25923 | <i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 35218 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC [®] 700603 ^{b,c} | <i>Escherichia coli</i> NCTC 13353 ^{b,c} | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC [®] BAA-1705 TM ^{b,c} | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC [®] BAA-2814 TM |
| | | β -lactamase negative | Inducible AmpC | β -lactamase negative, <i>mecA</i> negative | TEM-1 | SHV-18 OXA-2 Mutations in <i>OmpK35</i> and <i>OmpK37</i> TEM-1 | CTX-M-15 | KPC-2 SHV | KPC-3 SHV-11 TEM-1 |
| MIC QC ranges, mm | | | | | | | | | |
| Amoxicillin-clavulanate (2:1) | 20/10 μ g | 18–24 | – | 28–36 | 17–22 | – | – | – | – |
| Ampicillin | 10 μ g | 15–22 | – | 27–35 | 6 | – | – | – | – |
| Ampicillin-sulbactam (2:1) | 10/10 μ g | 19–24 | – | 29–37 | 13–19 | – | – | – | – |
| Aztreonam | 30 μ g | 28–36 | 23–29 | – | 31–38 | 10–16 | – | – | – |
| Aztreonam-avibactam | 30/20 μ g | 32–38 | 24–30 | – | 31–38 | 26–32* | – | – | – |
| Cefepime | 30 μ g | 31–37 | 25–31 | 23–29 | – | – | – | – | – |
| Cefepime-tazobactam ^d | 30/20 μ g | 32–37 | 27–31 | 24–30 | – | 25–30* | 27–31 | – | – |
| Cefotaxime | 30 μ g | 29–35 | 18–22 | 25–31 | – | 17–25 | – | – | – |
| Cefpodoxime | 10 μ g | 23–28 | – | 19–25 | – | 9–16 | – | – | – |
| Ceftaroline | 30 μ g | 26–34 | – | 28–35 | – | – | – | – | – |
| Ceftaroline-avibactam | 30/15 μ g | 27–34 | 17–26 | 25–34 | 27–35 | 21–27* | – | – | – |
| Ceftazidime | 30 μ g | 25–32 | 22–29 | 16–20 | – | 10–18 | – | – | – |
| Ceftazidime-avibactam | 30/15 μ g | 27–35 | 25–31 | 16–22 | 28–35 | 21–27* | – | – | – |
| Ceftolozane-tazobactam | 30/10 μ g | 24–32 | 25–31 | 10–18 | 25–31 | 17–25 | – | – | – |
| Ceftriaxone | 30 μ g | 29–35 | 17–23 | 22–28 | – | 16–24 | – | – | – |
| Meropenem | 10 μ g | 28–35 | 27–33 | 29–37 | – | – | – | 11–18* | 6* |
| Meropenem-vaborbactam ^d | 20/10 μ g | 31–37 | 29–35 | 32–38 | – | 29–35 | – | 21–27 | 16–20 |
| Piperacillin | 100 μ g | 24–30 | 25–33 | – | 12–18 | – | – | – | – |
| Piperacillin-tazobactam | 100/10 μ g | 24–30 | 25–33 | 27–36 | 24–30 | – | – | – | – |
| Ticarcillin | 75 μ g | 24–30 | 21–27 | – | 6 | – | – | – | – |
| Ticarcillin-clavulanate | 75/10 μ g | 24–30 | 20–28 | 29–37 | 21–25 | – | – | – | – |

* Unsupplemented Mueller-Hinton medium. See Table 4A-1 for QC ranges for combination agents from other drug classes.

Abbreviations: ATCC[®], American Type Culture Collection; MIC, minimal inhibitory concentration; N/A, not applicable; NCTC, National Collection of Type Cultures;

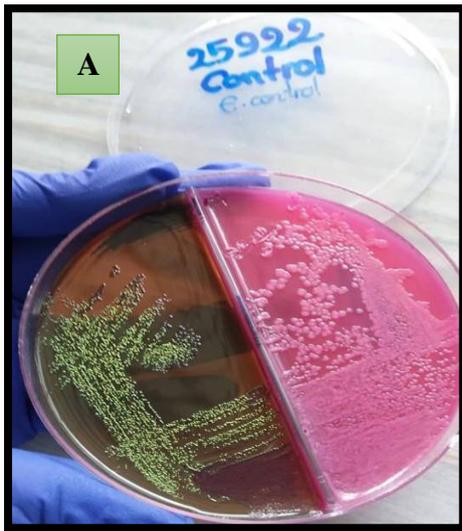
Evidencia del procesamiento de las cepas control: Abril 2018



A. Cepa de control positivo de SHV-18 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

B. Cepa de control de betalactamasa negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

Crecimiento de cepas control en medios de cultivo MacConkey y E.M.B



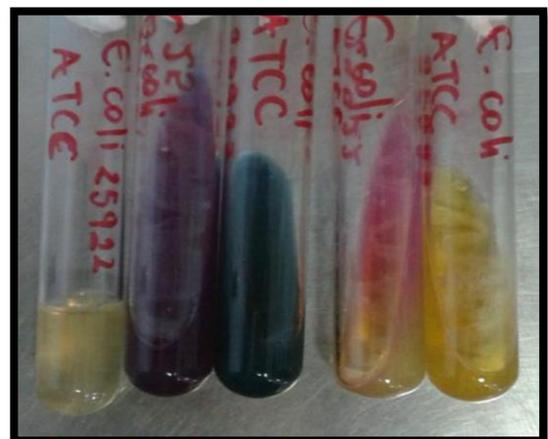
A. *Escherichia coli* ATCC 25922

B. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

Pruebas bioquímicas de cepas control *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (A) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (B).

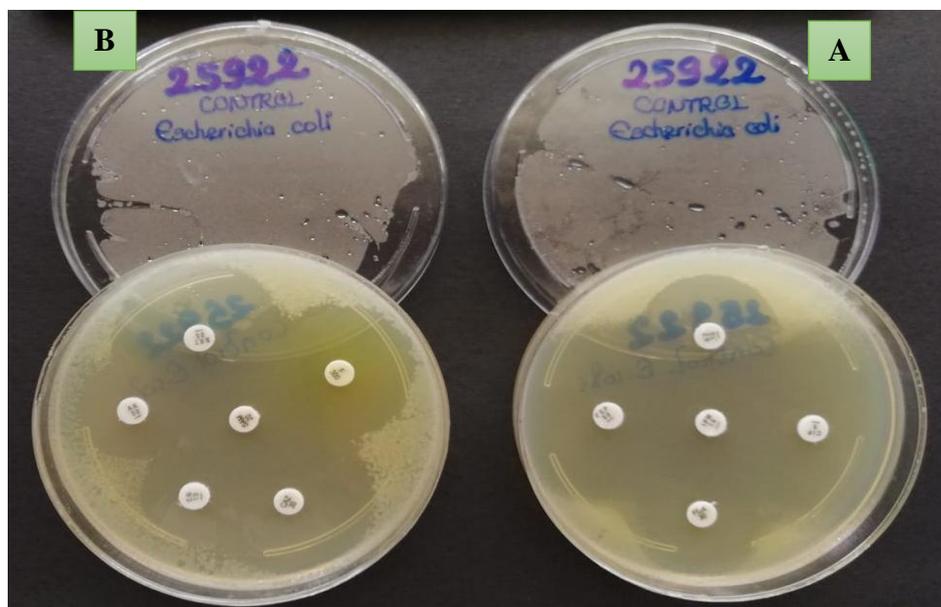


A



B

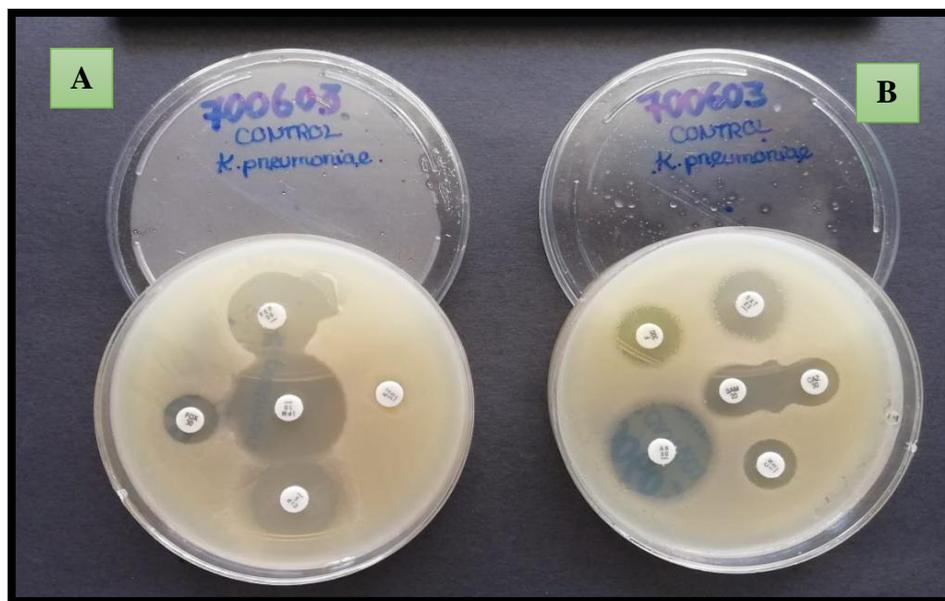
Antibiograma cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922



Registro de resultados de antibiograma de *Escherichia coli* ATCC 25922

| A Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | | B Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | |
|-----------------------------|---|----------|---|---|----------|
| Imipenem | 26mm | Sensible | Amoxicilina / Sulbactam SAM | 30mm | Sensible |
| Cefoxitin (FOX) | 30mm | Sensible | Ceftazidime (CAZ) | 33mm | Sensible |
| Cefepime (FEP) | 39mm | Sensible | Amikacina (AK) | 22mm | Sensible |
| Ciprofloxacina (CIP) | 45mm | Sensible | Gentamicina (CN) | 22mm | Sensible |
| Cefazolina (KZ) | 30mm | Sensible | Trimetropin/Sulfametoxazol (SXT) | 34mm | Sensible |
| | | | Nitrofurantoína(F) | 32mm | Sensible |

Antibiograma cepa control *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



Registro de resultados de antibiograma de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

| A Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | | B Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | |
|---------------------------------|---|------------|---|---|------------|
| Imipenem | 19mm | Resistente | Amoxicilina / Sulbactam SAM | 11mm | Resistente |
| Cefoxitin (FOX) | 11mm | Resistente | Ceftazidime (CAZ) | 12mm | Resistente |
| Cefepime (FEP) | 18mm | Resistente | Amikacina (AK) | 18 mm | Intermedio |
| Ciprofloxacina (CIP) | 15mm | Resistente | Gentamicina (CN) | 11 mm | Resistente |
| Cefazolina (KZ) | 6mm | Resistente | Trimetropin/Sulfametoxazol (SXT) | 15 mm | Intermedio |
| | | | Nitrofurantoína (F) | 12 mm | Resistente |

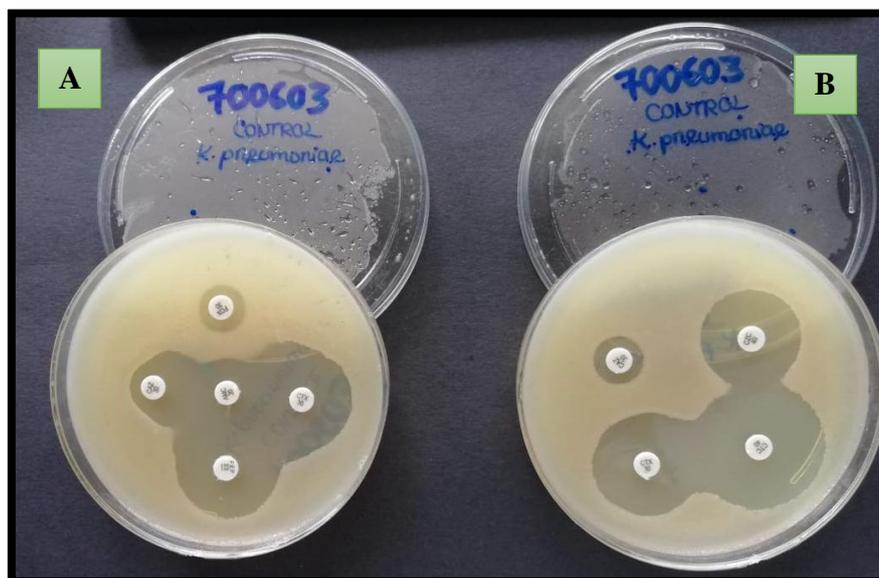
Control de calidad de betalactamasa negativo; cepa *Escherichia coli* ATCC 25922



Registro de resultados de cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922

| Sinergia de Discos | | | Discos combinados | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------|
| A Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | Resultado | B Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | Resultado |
| Cefoxitin (FOX) | 31mm | Negativo | Cefotaxime/ Acido clavulanico (CTC) | 30mm | Negativo |
| Cefepime (FEP) | 44mm | | Cefotaxime (CTX) | 48mm | |
| Ceftazidime (CAZ) | 33mm | | Ceftazidime/ Acido clavulanico (CZC) | 38mm | |
| Amoxicilina/ Acido clavulanico (AMC) | 34mm | | Ceftazidime (CAZ) | 36mm | |
| Cefotaxime (CTX) | 46mm | | | | |

Control de calidad positivo de SHV-18; cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



Registro de resultados de cepa control *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

| Sinergia de Discos | | | Discos combinados | | |
|---|---|-----------|---|---|-----------|
| A Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | Resultado | B Antibióticos | Medida del halo de inhibición (mm) | Resultado |
| Cefoxitin (FOX) | 11mm | Positivo | Cefotaxime/ Acido clavulanico (CTC) | 30mm | Positivo |
| Cefepime (FEP) | 24mm | | Cefotaxime (CTX) | 24mm | |
| Ceftazidime (CAZ) | 12mm | | Ceftazidime/ Acido clavulanico (CZC) | 22mm | |
| Amoxicilina/ Acido clavulanico (AMC) | 16mm | | Ceftazidime (CAZ) | 12mm | |
| Cefotaxime (CTX) | 25mm | | | | |



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 14

Eliminación de residuos en el área de microbiología

1. Introducción

La eliminación de residuos debe ser considerada como una parte muy importante de la seguridad en el área de microbiología. Muchos de los desechos que se generan pueden estar contaminados por microorganismos o contener sustancias químicas tóxicas y peligrosas. En menor medida, el personal del laboratorio puede estar expuesto a los efectos de las radiaciones ionizantes. (Resino, 2011).

La mejor manera de racionalizar los residuos es mediante una gestión integrada cuyos pilares básicos son la minimización, la segregación y la eliminación controlada. El personal del laboratorio debe ser consciente de que la puesta en marcha de normas de buena práctica en la gestión de los residuos repercute poderosamente sobre su salud y la de los que lo rodean, a la vez que contribuye a la reducción de costes. (Resino, 2011).

Un residuo infeccioso es todo aquel material capaz de producir una enfermedad infecciosa. Sin embargo, a diferencia de los residuos químicos y radiactivos, los desechos infecciosos y sus riesgos asociados no pueden ser identificados de una forma objetiva. (Resino, 2011).

2. Objetivos

Establecer la correcta eliminación del material contaminado en el área microbiológica.

3. Alcance

El presente protocolo está al alcance de los estudiantes el cual se cumplirá en el marco del proyecto de investigación para su titulación; el mismo que será de utilidad al investigador y asegurará su correcta realización.

4. Materiales

Equipos

- Autoclave

Instrumentos

- Botella plástica
- Cinta testigo
- Cinta aislante
- Pesa
- Fundas plásticas: rojas, negra
- Contenedores para desechos cortopunzantes, especiales, comunes e infecciosos.

Sustancias y reactivos

- Hipoclorito de sodio al 1 %
- Agua destilada para autoclave

5. Procedimiento

Los residuos biológicos

En esta categoría se incluyen los siguientes residuos de cultivos y muestras almacenadas; estos residuos derivan de la producción de material biológico; placas de cultivo y mecanismos para transferir, inocular o mezclar cultivos; medios de cultivos; muestras almacenadas de agentes infecciosos y productos biológicos asociados

- El lavado y esterilización de material en el caso de tubos de vidrio o material termoresistentes en horno de esterilización o estufa.
- Los residuos corto punzantes contaminados deben eliminarse en contenedores que sean rígidos o semirrígidos y resistentes al corte y la punción con la identificación que debe incluir la fecha.

Cultivos, cepas, productos biológicos

1. Esterilizar en el autoclave a 120 grados centígrados por 60 minutos.
2. Desechar restos en bolsa roja, pesar y rotular.
3. Aplicar las normas de bioseguridad en el uso de guantes y mascarilla.

6. Bibliografía

Resino, S. (2011). *Gestión de los residuos en el laboratorio de microbiología clínica*

Epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Obtenido de:

<https://bit.ly/2Q4SQcB>

| | |
|---|---|
| Elaborado por: María de los Ángeles Ucho Torres | Revisado y aprobado por: Lic. Iliana Delgado. |
|---|---|



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 15 Registro de resultados

| HOJA DE REGISTROS DE LABORATORIO CDM | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--------|------------------|-----------------|-----------|----------|------|--------------------------|--|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|--|
| PROYENIENCIA | | | | SEXO | | | CARACTERISTICAS | | | | | |
| FECHA | CÓDIGO | CONSULTA EXTERNA | HOSPITALIZACION | MASCULINO | FEMENINO | EDAD | BACTERIA AISLADA | MULLER | EMB | McConkey | AGAR SA | |
| 17/03/2018 | 109852 | X | | | X | 73 | KLEBSIELLA OXYTOCA | Colonias planas,blanquesinas,alfa hemolisis | No Reaccion | Fermentadora de lactosa | | |
| 17/03/2018 | 109871 | X | | | X | 21 | | | | | | |
| 17/03/2018 | 109874 | X | | | X | 73 | | | | | | |
| 17/03/2018 | 109900 | X | | | X | 49 | PROTEUS MIRABILIS | Colonias planas, blanquecinas,gamma hemolisis | No Reaccion | no fermentadora de lactosa | | |
| 17/03/2018 | 109901 | X | | | X | 1 | | | | | | |
| 17/03/2018 | 109903 | X | | X | | 3 | | | | | | |
| 17/03/2018 | 109924 | X | | X | | 87 | | | | | | |
| 19/03/2018 | 109930 | X | | | X | 75 | ESCHERICHIA COLI | Colonias planas, redondeadas y grises pequeñas, cremosas | debil Reaccion | Fermentadora de lactosa | | |
| 19/03/2018 | 109980 | | | | | | ESCHERICHIA COLI | Colonias planas, blanquecinas,gamma hemolisis | No Reaccion | Fermentadora de lactosa | | |
| 20/03/2018 | 110078 | X | | | X | 58 | ENTEROBACTER AGGLOMERANS | Colonias planas, blanquecinas,gamma hemolisis | No Reaccion | no fermentadora de lactosa | | |
| 21/03/2018 | 110141 | X | | | X | 29 | | | | | | |
| 21/03/2018 | 110146 | X | | | X | 49 | | | | | | |
| 22/03/2018 | 110226 | X | | | X | 42 | | | | | | |
| 22/03/2018 | 110244 | X | | | X | 81 | | | | | | |
| 22/03/2018 | 110249 | X | | X | | 82 | ESCHERICHIA COLI | Colonias planas, blanquecinas,gamma hemolisis | No Reaccion | Fermentadora de lactosa | | |
| 22/03/2018 | 110261 | X | | X | | 73 | | | | | | |
| 22/03/2018 | 110275 | X | | | X | 62 | ESCHERICHIA COLI | Colonias redondeadas,planas y grises | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 22/03/2018 | 110277 | X | | | X | 34 | | | | | | |
| 22/03/2018 | 110279 | X | | X | | 3 | | | | | | |
| 22/03/2018 | 110284 | X | | | X | 3 | ESCHERICHIA COLI | Colonias redondeadas,blanquecinas,alfahemolisis | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 23/03/2018 | 110317 | X | | | X | 29 | | | | | | |
| 23/03/2018 | 110324 | X | | | X | 92 | | | | | | |
| 23/03/2018 | 110328 | X | | | X | 30 | ESCHERICHIA COLI | Colonias redondas, grises. Pequeñas | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 23/03/2018 | 110341 | X | | | X | 51 | | | | | | |
| 23/03/2018 | 110343 | X | | | X | 44 | | | | | | |
| 23/03/2018 | 110356 | X | | | X | 23 | | | | | | |
| 24/03/2018 | 110393 | X | | X | | 72 | ESCHERICHIA COLI | Colonias redondas, blanquecinas,beta hemolisis | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 25/03/2018 | 110422 | X | | X | | 92 | | | | | | |
| 26/03/2018 | 110482 | X | | X | | 66 | | | | | | |
| 27/03/2018 | 110508 | X | | X | | 58 | ESCHERICHIA COLI | Colonias grises,redondeadas, cremosas | Debil Reaccion | Fermentadora de lactosa | | |
| 27/03/2018 | 110510 | X | | X | | 59 | | | | | | |
| 27/03/2018 | 110538 | X | | | X | 19 | | | | | | |
| 27/03/2018 | 110546 | | X | X | | 87 | | | | | | |
| 27/03/2018 | 110566 | X | | | X | 48 | | | | | | |
| 27/03/2018 | 110578 | X | | | X | 38 | | | | | | |
| 28/03/2018 | 110682 | X | | | X | 85 | ESCHERICHIA COLI | Colonias redondas convexas pequeñas, grises y cremosas | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 28/03/2018 | 110690 | X | | | X | 45 | | | | | | |
| 29/03/2018 | 110709 | X | | | X | 54 | KLEBSIELLA PNEUMONIAE | Colonias mucosas blanquecinas,redondas e irregulares | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 29/03/2018 | 110733 | X | | X | | 3 | | | | | | |
| 29/03/2018 | 110757 | X | | | X | 59 | | | | | | |
| 29/03/2018 | 110768 | X | | | X | 1 | PROTEUS VULGARIS | | | | Colonias Redondeadas, irreg | |
| 29/03/2018 | 110774 | | X | X | | 100 | ESCHERICHIA COLI | Colonias cremosas,grises y redondeadas | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 01/04/2018 | 110821 | X | | | X | 95 | KLEBSIELLA PNEUMONIAE | Colonias redondeadas, irregulares y cremosas, pequeñas | No Reaccion | Fermentadora de lactosa | | |
| 02/04/2018 | 110855 | X | | | X | 22 | | | | | | |
| 02/04/2018 | 110825 | X | | X | | 68 | ESCHERICHIA COLI | Colonias redondeadas, grises, regulares pequeñas | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |
| 03/04/2018 | 110916 | X | | X | | 58 | ESCHERICHIA COLI | | | | Colonias redondeadas, gri | |
| 03/04/2018 | 110926 | X | | | X | 60 | | | | | | |
| 03/04/2018 | 110924 | X | | | X | 22 | ENTEROBACTER AGGLOMERANS | Colonias redondas, grises y beta hemolisis | Reaccion, brillo metalico | Fermentadora de lactosa | | |



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

Anexo N° 17

Evidencia fotográfica del trabajo de campo

1. Preparación del material de trabajo

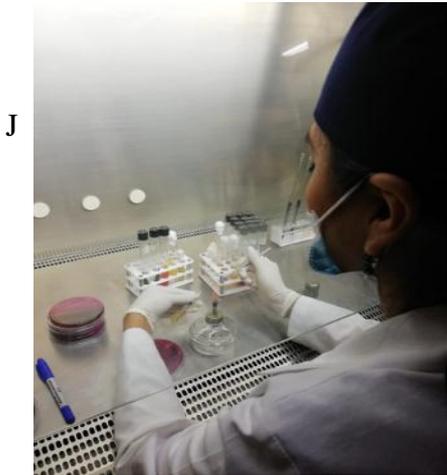


2. Conservación y almacenamiento del material de trabajo

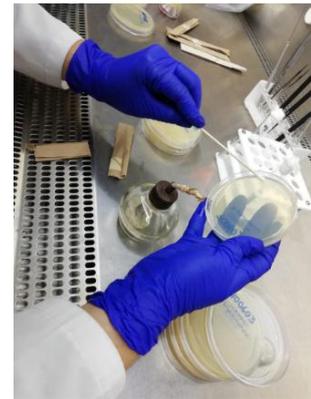


3. Procesamiento de muestras

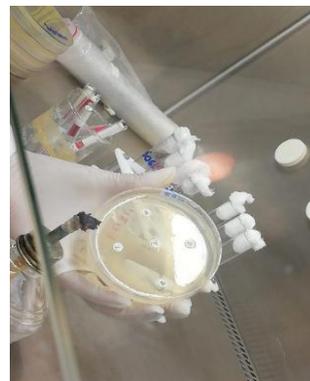
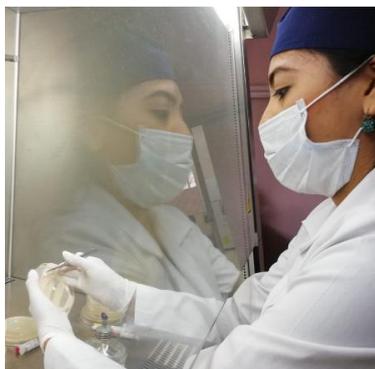
Siembra de cepas

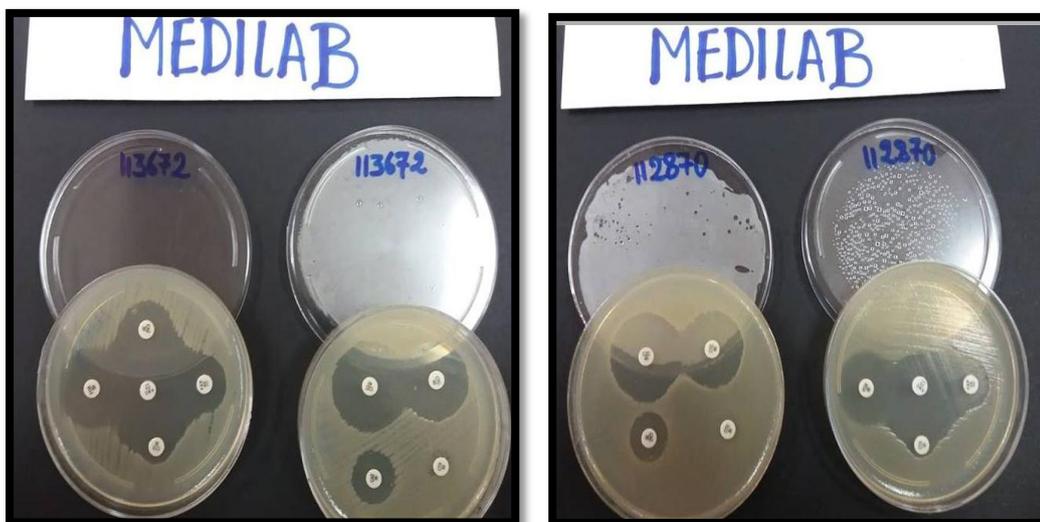


Preparación del inculo



Realización del antibiograma, colocando los discos de sensibilidad en Agar Muller Hinton



Muestras productoras de betalactamasas tipo BLEE Cod. 113672 y 112870



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 18

Certificación de haber realizado el procesamiento en el CDM

Loja, 09 de Julio del 2018

Ing. María Jiménez
Responsable del Centro de Diagnóstico Médico de la UNL.

A petición verbal del interesado, CERTIFICO:

Que la Srta. María de los Ángeles Ucho Torres, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, realizó la parte práctica del procesamiento de muestras de Urocultivos realizado en el horario de 15:00 a 19:00 de Lunes a Viernes, los meses de Marzo, Abril y Mayo del presente año, en el Centro de Diagnóstico Médico para la realización del proyecto titulado "ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS CAUSANTES DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO MEDILAB DE LOJA". Previo a la obtención del título de licenciado en Laboratorio Clínico.

Es cuanto puedo informar en honor a la estricta verdad y faculto al interesado de hacer uso legal que creyera conveniente de la presente certificación. Atentamente.

Atentamente.

Ing. María Jiménez
Responsable del Centro de Diagnóstico Médico de la UNL.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Anexo N° 19

Certificación de haber cumplido con la práctica del presente trabajo de investigación

Loja, 09 de Julio del 2018

Dra. Sandra Freire

Docente de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

A petición verbal del interesado, CERTIFICO:

Que la Srta. María de los Ángeles Ucho Torres, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, realizó la parte práctica del trabajo investigativo durante los meses de Marzo, Abril, y Mayo del presente año, el cual incluyó la recolección de datos y muestras con solicitud de urocultivos de usuarios que acuden al Laboratorio Clínico MEDILAB, además del procesamiento de muestras de urocultivos positivos en el Centro de Diagnóstico Médico del Área de la Salud Humana de la UNL; con el objetivo de obtener información correspondiente para que sea utilizada en el proyecto de investigación titulado: "ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS CAUSANTES DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN USUARIOS DEL LABORATORIO CLÍNICO MEDILAB DE LOJA", previo a la obtención del título de licenciado en Laboratorio Clínico.

Es cuanto puedo informar en honor a la estricta verdad y faculto al interesado de hacer uso legal que creyera conveniente de la presente certificación.

Atentamente.

Dra. Sandra Freire

Docente de la carrera de Laboratorio Clínico



Certificado de traducción del ingles

Loja, 28 de octubre del 2018

Certifico:

Yo, Lizbeth Catherine Criollo Medina con CI 1103990733 Licenciada en la titulación de Ingles de la Universidad Técnica Particular de Loja, certifico que el resumen de tesis titulada **“Enterobacterias productoras de betalactamasas causantes de infecciones de vías urinarias en usuarios del laboratorio clínico MEDILAB de Loja”**, realizada por la Srta. **María de los Ángeles Ucho Torres**, con el número de cedula 0750338956, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, ha sido debidamente traducido bajo mi responsabilidad.

Es cuanto puedo informar en honor a la verdad y faculto al interesado de hacer uso legal que creyera conveniente de la presente certificación.

Atentamente.



Lic. Lizbeth Catherine Criollo Medina

CI: 1103990733