



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CENTRO DE POSGRADOS

PROGRAMA DE MAESTRIA EN LABORATORIO CLÍNICO
MENCIÓN MICROBIOLOGÍA COHORTE 2019

PROYECTO DE DESARROLLO

Trabajo de titulación previo a la obtención del grado académico de
Magisteren Laboratorio Clínico Mención Microbiología.

Tema: “Implementación de un sistema de vigilancia de resistencia
antimicrobiana en el Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua”

Autor(a): Lcda. Diana Carolina Vásquez Nuela

Director(a): Bqf. Gabriela Liseth Altamirano Vaca. PHD

Ambato – Ecuador

2022

Anexo 14

APROBACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

A la Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad Ciencias de la Salud. El Tribunal receptor de la Defensa del Trabajo de Titulación presidido por el **Dr. Jesús Onorato Chicaiza Tayupanta Esp.**, e integrado por los señores: **Bqf. Anabell del Rocío Urbina Salazar PHD**, y **Bqf. Ana Gabriela Pacha Jara Mg.**, designados por la Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Trabajo de Titulación con el Tema: **“Implementación de un Sistema de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana”**, elaborado y presentado por la señora: **Lcda. Diana Carolina Vásconez Nuela**, para optar por el Grado Académico de Magister en Laboratorio Clínico, Mención Microbiología Clínica, según Resolución del CES: RPC-S0-32-No.537-2018; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Titulación el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la Universidad Técnica de Ambato.



Firmado electrónicamente por:
JESUS ONORATO
CHICAIZA
TAYUPANTA

Dr. Jesús Onorato Chicaiza Tayupanta Esp.
Presidente y Miembro del Tribunal de Defensa



Firmado electrónicamente por:
ANABELL DEL
ROCIO URBINA
SALAZAR

Bqf. Anabell del Rocío Urbina Salazar PHD
Miembro del Tribunal de Defensa



Firmado electrónicamente por:
ANA
GABRIELA

Bqf. Ana Gabriela Pacha Jara Mg
Miembro del Tribunal de Defensa

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el trabajo de Titulación presentado con el tema: **“Implementación de un Sistema de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana”**, le corresponde exclusivamente a **Lcda. Diana Carolina Vásquez Nuela**, Autor/a bajo la Dirección de la **Bqf. Gabriela Liseth Vaca Altamirano PHD**, directora del Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.



Firmado electrónicamente por:
**DIANA CAROLINA
VASQUEZ NUELA**

Lcda. Diana Carolina Vásquez Nuela
CC: 1804414413
AUTORA



Firmado electrónicamente por:
**GABRIELA LISETH
VACA ALTAMIRANO**

Bqf. Gabriela Liseth Vaca Altamirano PHD
CC: 0603573221
DIRECTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Titulación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad Técnica de Ambato.



Firmado electrónicamente por:
**DIANA CAROLINA
VASCONEZ NUELA**

Lcda. Diana Carolina Vásquez Nuela

CC: 1804414413

AUTORA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CENTRO DE POSGRADOS
PROGRAMA DE MAESTRIA EN LABORATORIO CLINICO MENCION
MICROBIOLOGÍA
INFORMACIÓN GENERAL

TEMA: “Implementación de un sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana”

AUTOR: Diana Carolina Vásconez Nuela

Grado académico: Licenciada en Laboratorio Clínico

Correo electrónico: diana_vazn@hotmail.com

DIRECTOR: Bqf. Gabriela Liseth Altamirano Vaca. PHD

LINEA DE INVESTIGACIÓN:

- Epidemiología y Salud Pública



DEDICATORIA

Dedico este Proyecto de Desarrollo, fruto de todo mi esfuerzo a mi Esposo por su apoyo, paciencia y amor, a mis Padres por confiar en mi capacidad y esmero de estudio, por haber inculcado en mi valores éticos y morales que han fortalecido mi personalidad y carácter. Y sobre todo por ser un ejemplo de trabajo duro y honrado para salir adelante. A mi hermano por su apoyo, compañía y confianza.

Diana



AGRADECIMIENTO

De manera especial quiero agradecer:

A Dios por brindarme sabiduría y fortaleza para tomar decisiones, alcanzar mis objetivos y ayudar al prójimo.

A mi Esposo, a mis Padres y a mi hermano por su amor, por creer en mí y por su apoyo incondicional.

A la Bqf. Gabriela Liseth Altamirano Vaca. PHD por orientarme y fortalecer en mí la investigación científica para culminar este trabajo de desarrollo, pero sobre todo por su paciencia y aprecio.

Al Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de desarrollo, al personal del Servicio de Laboratorio Clínico y sobre todo al Dr. Jorge Murillo, Jefe del Servicio.

A los Docentes de la Universidad Técnica de Ambato que me impartieron sus conocimientos para poder crecer como persona y profesional de la Salud.

A familiares, profesionales y amigos que me brindaron su apoyo desinteresadamente para poder terminar este Proyecto.

Diana

ÍNDICE GENERAL

Contenido

DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ÍNDICE DE GRÁFICOS	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I.....	14
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	14
1.1. Introducción.....	14
1.2. Justificación.....	15
1.3. Objetivos.....	16
1.3.1. Objetivo General.....	16
1.3.2. Objetivos Específicos.....	16
CAPÍTULO II	18
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	18
2.2. MARCO TEÓRICO	22
2.2.1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	23
2.2.2. Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).....	24
2.2.3. Clasificación	24
2.2.4. Tipo de BLEE.....	28
2.2.5. Carbapenemasas.....	30



2.2.6. Control de las enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.	31
2.2.7. Métodos de detección de resistencias bacterianas	32
CAPÍTULO III.....	33
MARCO METODOLÓGICO	33
3.1. Ubicación	33
3.2. Equipos y materiales	33
3.3. Tipo de Investigación.....	34
3.4. Prueba de Hipótesis-Pregunta Científica- idea a defender.....	34
3.5. Población o muestra	35
3.6. Recolección de la Información.....	36
3.7. Procesamiento de la Información y análisis estadístico	37
3.8 Variables respuesta o resultados alcanzados.....	37
CAPÍTULO IV	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. RESULTADOS	40
4.2. DISCUSIÓN.....	46
CAPÍTULO V.....	49
CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	49
5.1 CONCLUSIONES	49
5.2 RECOMENDACIONES	50
5.3 BIBLIOGRAFIA.....	51
5.4. ANEXOS.....	56
Anexo 1. Operacionalización de Variables.....	56
Anexo 2. Consentimiento Informado.....	58
Anexo 3. Formularios.....	64
Anexo 4. Protocolos.....	66



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de nomenclatura de clasificación de BLEE	30
Tabla 2. Sexo de los pacientes participantes en el estudio.	40
Tabla 3. Total de enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas aisladas durante el periodo enero-junio 2022.	41
Tabla 4. Tipo de muestras biológicas con enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.	42
Tabla 5. Servicio en el que se aislaron enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.	44



ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Sexo de los pacientes participantes en el estudio.....	40
Gráfico 2. Total de enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas aisladas durante el periodo enero-junio 2022.	41
Gráfico 3. Tipo de muestras biológicas con enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.....	43
Gráfico 4. Servicio en el que se aislaron enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.....	44



RESUMEN

“Implementación de un sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana”

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que aqueja, a nivel global, a diferentes casas de salud. Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes. El fenómeno es muy preocupante porque las infecciones por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para las casas de salud. El objetivo es implementar un sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana que incluye elaborar y aplicar protocolos de toma de muestras microbiológicas y la detección de las cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas. Para la identificación de las bacterias se utilizará la tinción gram, y el sistema de Identificación BBL Crystal ID. Además, para la identificación de BLEE se utilizará el método de disco difusión combinado de ceftazidima/ceftazidima + ácido clavulánico y cefotaxima/ cefotaxima+ácido claculánico, y para la detección de carbapenemasas se realizará el test de EDTA, ácido borónico, mCIM y eCIM de acuerdo a las guías del CLSI, para generar información sobre los cambios de patrón de resistencia antimicrobiana de los microorganismos sujetos a la misma, con el fin de mejorar el área de microbiología del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua.

Palabras claves: vigilancia, resistencia antimicrobiana, BLEE (Betalactamasas de Espectro Extendido), carbapenemasas, tinción, difusión de discos, antibióticos, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).



ABSTRACT

“Implementation of an antimicrobial resistance surveillance system”

Bacterial resistance is a public health problem that afflicts, at a global level, different health houses. Microorganisms resistant to most antimicrobials are known as ultra-resistant. The phenomenon is very worrying because infections by resistant microorganisms can cause the death of the patient, be transmitted to other people and generate great costs for both patients and health homes. The objective is to implement an antimicrobial resistance surveillance system that includes developing and applying microbiological sampling protocols and the detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemase-producing strains. Gram staining and the BBL Crystal ID identification system will be used for the bacterial identification. In addition, for the identification of ESBL, the combined disk diffusion method of ceftazidime/ceftazidime + clavulanic acid and cefotaxime/cefotaxime+clavulanic acid will be used, and for the carbapenemases detection, the EDTA, boronic acid, mCIM and eCIM tests will be performed, according to the CLSI guidelines, to generate information on the changes in the antimicrobial resistance pattern of the microorganisms subject to it, in order to improve the microbiology area of the SOLCA Núcleo de Tungurahua Hospital.

Keywords: surveillance, antimicrobial resistance, ESBL (Extended Spectrum Beta-lactamases), carbapenemases, staining, disk diffusion, antibiotics, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Introducción

La resistencia antimicrobiana es un proceso que se define como la capacidad de un microorganismo para neutralizar o resistir el efecto del antimicrobiano. Esta resistencia puede ser de 2 tipos. Natural o adquirida (Contreras, 2018) .

Se refiere a resistencia natural cuando todas las cepas bacterianas que corresponden a una misma especie son resistentes a un antibiótico. La resistencia adquirida aparece como consecuencia de mecanismos de defensa que van desarrollando los microorganismos ante la exposición a los antimicrobianos.

La investigación sobre resistencia microbiana a los antibióticos se realiza en redes interdisciplinarias de laboratorios y en asociaciones de investigación nacionales, regionales e internacionales. En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública realiza las confirmaciones mediante biología molecular y lleva los reportes de datos de resistencia a los antimicrobiano.

Existe un considerable número de técnicas que permiten realizar pruebas de detección de resistencias antimicrobianas y llevar a cabo un antibiograma rápido. Entre estas cabe destacar las técnicas moleculares, microarrays, métodos comerciales utilizados en el trabajo de rutina, técnicas inmunocromatográficas, métodos colorimétricos, métodos de imagen, nefelometría, espectrometría de masas MALDI-TOF, citometría de flujo, quimioluminiscencia y bioluminiscencia, microfluidos y métodos de lisis bacteriana (March-Rosselló, 2017).

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas (ONU), la resistencia bacteriana es una de las principales amenazas de salud y su vigilancia permite generar información

sobre los cambios de patrón de resistencia antimicrobiana de los microorganismos sujetos a la misma, para generar estrategias de prevención y control por parte de todos los niveles, y orientar en la toma de decisiones en políticas públicas. Se aplica a todos los hospitales del Sistema Nacional de Salud (SNS) que cuentan con laboratorio de microbiología y que realicen pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

El presente proyecto de desarrollo se ha dividido en 3 fases que corresponden: 1 detección de BLEE y carbapenemasas en enterobacterias, 2 detección de mecanismos de resistencia en bacterias gram positivas-, 3 formar parte de la Red Nacional de Resistencia Antimicrobiana del INSPI (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública)

1.2. Justificación

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que aqueja, a nivel global, a diferentes casas de salud. La adquisición de resistencias por parte de numerosos agentes infecciosos supone una creciente amenaza para la salud pública, que preocupa en todos los países, sobre todo en el sector económico. Resulta alarmante la rápida propagación a nivel mundial de bacterias multirresistentes que son causa de infecciones comunes y resistentes al tratamiento con los fármacos antimicrobianos existentes.

Las bacterias Gram negativas constituyen el principal grupo de bacterias multirresistentes a nivel mundial debido a la propiedad de producir enzimas denominadas Betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas, las que confieren resistencia a un gran número de antibióticos betalactámicos incluido los carbapenémicos. La población oncológica se encuentra vulnerable a las infecciones por Enterobacterias que son positivas para estos mecanismos de resistencia bacteriana.

En el Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua se atienden pacientes con un alto riesgo de infecciones, debido a la inmunosupresión condicionada por la enfermedad que presentan, así como por el tratamiento con quimioterapia en el que desarrollan distintos grados de neutropenia, lo que les vuelve susceptibles a contraer

infecciones. Es frecuente que estos pacientes reciban diferentes esquemas de antibióticos, lo que condiciona presión selectiva bacteriana y favorece el desarrollo de cepas multidrogasresistentes (MDR).

No se dispone actualmente de las pruebas de detección de los mecanismos de resistencia de producción BLEE y Carbapenemasas, por lo que se tiene inconvenientes con el personal médico al momento de recetar el tratamiento. Este estudio busca detectar estos mecanismos de resistencia que son de gran importancia para que los pacientes puedan recibir el tratamiento antibiótico adecuado y oportuno.

Se espera que con la “Implementación de un sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana en el Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua”, se contribuya a la detección de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas en las muestras microbiológicas de las áreas de consulta externa y hospitalización para generar información útil para el médico tratante sobre los perfiles de susceptibilidad de los principales microorganismos que afectan la salud de nuestra población, generando confianza del personal médico para el manejo del tratamiento de las infecciones, beneficiando directamente a los pacientes y por ende a nuestra población.

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Implementar un sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana en el Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Elaborar protocolos de la toma de muestras microbiológicas y de detección de cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas en enterobacterias.

- Aplicar los protocolos elaborados para la detección de las cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas en enterobacterias.
- Determinar la importancia de la detección de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas.

CAPÍTULO II

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

La resistencia a los antimicrobianos (ATM) actualmente es una de las mayores amenazas para la salud pública mundial, si no se toman medidas urgentes se llegará a la denominada “era post antibiótica”, donde ningún ATM tendrá lugar en el tratamiento y las infecciones serán mortales, sumado a esto la facilidad de desplazamiento de las personas, tanto en el ámbito nacional e internacional, agrava el problema debido a la diseminación de gérmenes resistentes (OMS, 2020). Las infecciones por gérmenes resistentes pueden afectar a cualquier persona sin importar edad, religión o región donde se encuentre. A nivel hospitalario las infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS) cada vez se vuelven más difíciles de tratar (Mc Carlie et al., 2020).

La (Organización Mundial de la Salud, 2017) confirma que la resistencia a los antimicrobianos solo puede detectarse por métodos microbiológicos. Por ello es indispensable tomar muestras de los pacientes para proceder a identificar la especie y analizar su sensibilidad a los antimicrobianos. La capacidad de obtener y transmitir datos de buena calidad y el compromiso de establecer y mantener las labores de vigilancia de forma estable son dos de los criterios más importantes a la hora de seleccionar un punto de vigilancia. Los puntos de vigilancia deben contar con personal responsable y provisto de la formación necesaria para recoger, analizar y transmitir datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio.

De acuerdo con (Mc Carlie et al., 2020) en su investigación “Molecular basis of bacterial disinfectant resistance”: los métodos más frecuentemente utilizados en Microbiología Clínica para la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos se basan en un estudio fenotípico, observando el crecimiento bacteriano de una cepa incubada en presencia del antibiótico a estudiar. Estos métodos requieren normalmente un tiempo de unas 24 h para la obtención de resultados.

(March-Rosselló, 2017) recalca que: “Cuando se realiza el antibiograma es necesaria una disposición estratégica de los monodiscos de antibióticos, de modo tal que se permita la visualización de la presencia de los distintos mecanismos de resistencia. La utilización de multidiscos hace que esto no sea posible y disminuye la probabilidad de comprobar si ese microorganismo presenta portación de BLEE”, relacionándose directamente con el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de (Weinsten, 2022) en cuanto a la aplicación de métodos confirmatorios para la detección de mecanismos de resistencia.

(Espín Custodio et al., 2019) en su investigación: “Hemocultivos en el Servicio de Pediatría del Instituto Oncológico Nacional “Dr. Juan Tanca Marengo”, Solca-Guayaquil, afirma que la creciente resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en cultivos de sangre en pacientes neutropénicos hace necesaria la continua monitorización del antibiograma para vigilar la cambiante susceptibilidad antibiótica. El objetivo de este estudio fue identificar a los microorganismos aislados de hemocultivos y su sensibilidad, en niños con cáncer ingresados en un Instituto Oncológico, concluyendo que la incidencia fue mayor para bacterias Gram negativos. Las bacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC multirresistentes fueron solamente sensibles a tigeciclina y colistin.

(Gragera, 2020) da a conocer que: “En los pacientes que se encuentran en hospitalización o que presentan un cuadro de inmunodepresión, en especial en aquellos que reciben tratamiento antibiótico, presentan una colonización por Enterobacterias. La infección por estas bacterias es frecuente en estos contextos” y que la proporción de aislados resistentes a múltiples antimicrobianos, incluidos aquellos que producen BLEE, ha aumentado de forma ininterrumpida, de modo que casi todos los aislados nosocomiales y muchos de los aislados adquiridos en la comunidad, son ahora resistentes a varias clases importantes de antimicrobianos.

En la investigación realizada por (Rodríguez-Baño et al., 2018) con el tema “Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de betalactamasas, AmpC y carbapenemasas de espectro extendido”, determinan que la terapia de infecciones

invasivas debidas a Enterobacteriaceae multirresistentes (MDR-E) es un desafío, y algunos de los pocos medicamentos activos no están disponibles en muchos países. Para los productores de β -lactamasa de espectro extendido y AmpC, los carbapenémicos son los fármacos de elección, pero se necesitan alternativas porque la tasa de resistencia a los carbapenémicos está aumentando. Los posibles fármacos activos incluyen combinaciones clásicas y nuevas de inhibidores de β -lactámicos- β -lactamasas, cefamicinas, temocilina, aminoglucósidos, tigeciclina, fosfomicina y, en raras ocasiones, fluoroquinolonas o trimetoprim-sulfametoxazol. En cuanto al tratamiento (Wilson & Török, 2018) mencionan que en el caso de enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE), solo algunos medicamentos de "segunda línea", como polimixinas, tigeciclina, aminoglucósidos y fosfomicina, pueden ser activos; los carbapenémicos dobles también se pueden considerar en situaciones específicas. (Corta et al., 2021) en su investigación "Detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in northern Peru" recomiendan la terapia combinada se asocia con mejores resultados para los pacientes de alto riesgo, como aquellos con shock séptico o con neumonía. Ceftazidima-avibactam fue aprobado recientemente y es activo contra los productores de KPC y OXA-48; la experiencia disponible es escasa pero prometedora, aunque el desarrollo de resistencia es motivo de preocupación.

(Chatwin et al., 2021) refieren que los nuevos fármacos activos contra algunos aislamientos de Enterobacterias productoras de Carbapenemasas se encuentran en diferentes etapas de desarrollo, incluidos meropenem-vaborbactam, imipenem-relebactam, plazomicina, cefiderocol, eravaciclina y aztreonam-avibactam. Además, sugieren que la terapia para este tipo de infecciones debe individualizarse de acuerdo con el perfil de susceptibilidad, tipo, gravedad de la infección y las características del paciente.

En países en vías de desarrollo de la región andina, varios estudios muestran que los porcentajes de presencia de bacterias productoras de BLEE puede ser altamente variable en diferentes regiones geográficas. Estas variaciones de presencia de bacterias productoras

de BLEE inclusive pueden ser distintas dentro de un mismo país, así como entre instituciones hospitalarias en una misma localidad (Sanke-Waigana et al., 2021).

En nuestro país varios estudios como el realizado por (Espín Custodio et al., 2019) en la ciudad de Guayaquil (Hospital “Dr. Juan Tanca Marengo”, Solca-Guayaquil.) se determinó una prevalencia de 33.5% para *Escherichia coli* productoras de BLEE en muestras de urocultivos. Así mismo (Pachay, 2015) en otro estudio titulado “Enterobacterias productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) aisladas en el Hospital “Dr. Julio Villacreses Colmont- SOLCA Portoviejo” reporta que la frecuencia de enterobacterias aisladas productoras de BLEE correspondiente al 44,79%, de las cepas aisladas, mientras que en el área con mayor incidencia de enterobacterias productoras de BLEE, fue el área de emergencia con el 47,26% de incidencia, evidenciando un porcentaje alto de enterobacterias productoras de BLEE que podrían ser de origen comunitario, no pudiendo establecerse este origen debido a que el tipo de pacientes que atiende el hospital presentan recurrentes episodios de recaídas que les ocasiona reiterados eventos de hospitalización, por lo que también podrían ser individuos que se colonizaron hospitalariamente y que presentaron un proceso infeccioso posterior. (Jimenez, 2014) concluye “que la prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (*E. coli* y *K. pneumoniae*) es del 3,3%. Es su investigación Vigilancia Microbiológica: Una herramienta para el control de infecciones intrahospitalarias. Área de Cuidados Intensivos (ACI) - Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM)”

En múltiples estudios en hospitales como los de la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana REDNARBEC, el Hospital Carlos Andrade Marín de Quito, la Clínica Alcívar de Guayaquil y SOLCA de Cuenca, sugieren que el sexo femenino es el más frecuente en presentar infecciones con bacterias productoras de BLEE y de Carbapenemasas especialmente *Escherichia coli*. (INSPI, 2019). El microorganismo sujeto a vigilancia de RAM que se ha reportado en mayor porcentaje a partir de los aislados de los servicios hospitalarios registrados por el CRN-RAM - INSPI, es

Escherichia coli con más del 50%, seguido por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. MARCO TEÓRICO

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos. Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad, asimismo causan un mayor costo por mayor estancia hospitalaria y complicaciones (Giono-Cerezo et al., 2020).

Los antibióticos constituyen uno de los pilares de la salud según la Organización Mundial de la Salud (OMS). La resistencia de las bacterias a los antibióticos se ha convertido en un problema muy complejo de múltiples causas que se produce en patógenos tanto a nivel comunitario como hospitalario, esta situación ocurre en todos los países sin discriminación alguna, siendo variable en cada zona geográfica, pero es evidente que los países con mayor consumo sean los que presenten mayores índices de resistencia (IICA & José, 2020).

Las definiciones de resistencia se clasifican según el número y la clase de antibióticos afectados:

- Multirresistencia (MDR): ausencia de sensibilidad a un medicamento en tres o más de las categorías de antibióticos.
- Resistencia extrema (XDR): ausencia de sensibilidad a un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en 2 de ellas o menos.
- Panresistente (PDR): resistente a todas las categorías de antibióticos.



2.2.1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana

El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos.

- Resistencia natural se denomina a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprin sulfametoxazol; bacilos gram negativos aeróbicos a clindamicina.
- Resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, trasposones, integrones) (Alós, 2015).

Las bacterias tienen gran capacidad de adaptación y han logrado desarrollar múltiples mecanismos de resistencia, entre los factores que han producido estos cambios podemos mencionar: el aumento de enfermedades infecciosas crónicas, higiene hospitalaria deficiente, la migración masiva de la población y el uso indiscriminado de los antibióticos en el sector agropecuario (Bender et al., 2018).

La resistencia a los antibióticos betalactámicos se puede atribuir a los diferentes mecanismos como: disminución de la permeabilidad del antibiótico por alteración de porinas que se encuentran en la membrana celular de las bacterias, modificación química del sitio de acción del antibiótico como la alteración de las PBP y el fenómeno de tolerancia. Sin embargo, el mecanismo más frecuente e importante desde el punto de vista terapéutico en Bacilos Gram Negativos, es la resistencia bioquímica debida a la producción de enzimas betalactamasas (Cercenado, 2011) .

La resistencia bacteriana conferida por estas enzimas es facilitada por la transferencia entre especies de material genético a través de la conjugación (apareamiento bacteriano), transformación (incorporación de DNA libre en el entorno) o transducción



(transferencia de material genético entre especies patógenas mediante bacteriófagos)(Mc Carlie et al., 2020).

2.2.2. Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y las monobactamas, pero no las carbapenemes. Se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Castanheira et al., 2021).

El mecanismo más importante de resistencia a los betalactámicos en las enterobacterias es la producción de estas enzimas. Muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* poseen betalactamasas cromosómicas naturales, probablemente derivadas de las propias proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos móviles, y su producción puede ser constitutiva o inducible (García et al., 2010).

Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, algunos microorganismos producen betalactamasas cromosómicas que, en caso de hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico. Entre las enterobacterias que producen estas betalactamasas de forma natural se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri* y distintas especies del género *Kluyvera* (García et al., 2010).

2.2.3. Clasificación

Las Betalactamasas son comúnmente clasificadas en dos esquemas generales:

1. El esquema de clasificación molecular de Ambler

En este esquema se distinguen molecularmente cuatro clases de la A-D acorde a

la similitud proteínica y no a las características fenotípicas, donde A (serinpenicilinas), C (serin-cefalosporinas), y D (serin-oxacilinas) constituyéndose la serina en el componente principal de su sitio activo, y B son metalo-betalactamasas (Curipoma, 2015).

➤ **Enzimas de Clase A**

Gram positivas o Gram negativas, de origen cromosómico o plasmídico son inhibidoras de las cuatro penicilinas de amplio espectro: penicilinas (P); aminopenicilinas AMP y A.ML, ureidopenicilinas PRL.

➤ **Enzimas de Clase B**

Poseen 3 grupos diferentes de metalo-betalactamasas: B1, B2 y B3. Utilizan el ion zinc (Zn) para unir el residuo histidina o cisteína con el grupo carboxilo de la unión amida de la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes. Las enzimas B1 y B3 son de amplio espectro, pero no ataca a monobactámicos, en cambio las enzimas B2 actúan frente a penicilinas y cefalosporinas, estas enzimas se inactivan al incorporar otro átomo de Zn.

➤ **Enzimas de Clase C (AmpC)**

Están presentes en casi todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae con excepción de *Salmonella spp.* y *Klebsiella spp.* Las especies con niveles más altos de producción de AmpC son resistentes a ampicilina y cefalosporinas de primera generación, pero no son inhibidas por ácido clavulánico, característica que les diferencia del resto de BLEE.

➤ **Enzimas de Clase D**

Forman parte las serin-oxacilinasas especialmente activas frente a oxacilina.

2. El esquema de clasificación funcional de Bush, Jacob y Medeiros

Al igual que la clasificación de Ambler consta de cuatro grupos, pero distingue diversos subgrupos detalladamente, basado en las características funcionales, teniendo en cuenta distintos criterios como las propiedades bioquímicas (peso molecular, secuenciación de nucleótidos), las propiedades físicas (punto isoelectrico), el espectro de hidrólisis, el espectro de H₂O.

Esta clasificación es mucho más importante en el diagnóstico microbiológico de laboratorio ya que considera los substratos y los inhibidores de las betalactamasas clínicamente relevantes (Pachay, 2015).

➤ Grupo 1

Tienen relación con la clase molecular C de Ambler, se caracterizan por poseer un punto isoelectrico básico, hidrolizan a la cefaloridina y cefalotina. Estas cefalosporinas no son inhibidas por el ácido clavulánico o sulbactam, pero pueden ser inhibidas por el aztreonam y cloxacilina.

➤ Grupo 2

Incluyen penicilinasas, cefalosporinasas y betalactamasas de amplio espectro que son sensibles a la acción de los inhibidores de betalactamasa y se correlacionan con las clases moleculares A o D de Ambler (Curipoma, 2015). Presenta varios subgrupos que se relaciona con la clase molecular A de Ambler:

- El Subgrupo 2a: penicilinasas que se encuentran fundamentalmente en bacterias Gram positivas.
- El Subgrupo 2b: son de amplio espectro actuando sobre penicilinas y cefalosporinas, se inhiben por el ácido clavulánico, de este subgrupo se deriva 2be que son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos de espectro extendido

pero inhibidas por el ácido clavulánico, mientras que el subgrupo 2br presentan acción limitada contra amino-, carboxy- y ureido-penicilinas.

- El Subgrupo 2c: son sensibles a la acción del ácido clavulánico, estas carbenicilinas presentan mayor acción sobre penicilinas que sobre cefalosporinas.
- El Subgrupo 2e: son cefalosporinas que pueden ser inhibidas por bajas concentraciones de ácido clavulánico esto las diferencian de las betalactamasas del Grupo 1.
- El Subgrupo 2f: son serin-carbapenemasas que pueden ser inhibidas débilmente por el ácido clavulánico, pero no por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Se relaciona con la clase molecular D de Ambler

- El Subgrupo 2d: son oxacilinasas que hidrolizan cloxacilina, pero inhibidas por el ácido clavulánico. El Subgrupo 2de: son oxacilinasas de espectro extendido con inhibición moderada por el ácido clavulánico.

➤ Grupo 3

Pertenecen a la clase molecular B de Ambler. Son metalobetalactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenémicos. Estas enzimas pueden ser inhibidas débilmente por inhibidores clásicos excepto por el EDTA y p-cloromercuribenzoato (pCMB).

➤ Grupo 4

No pertenecen a ninguna de las clases moleculares denominadas por Ambler. Son penicilinasas no inhibidas por el ácido clavulánico.

2.2.4. Tipo de BLEE

La mayor parte de las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) forman parte de la clase A. Desde su descripción inicial, se han identificado más de 300 BLEE diferentes, y la mayoría pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M, mientras que los poco frecuentes son PER, GES, VEB, BES, BEL, TLA y SFO. Las BLEE han evolucionado a partir de sustituciones de aminoácidos en las penicilinasas, temoneira (TEM), variable sulfidril (SHV) y oxacilina (OXA) (Acebo, 2014).

Las BLEE de tipo CTX-M se derivan de enzimas cromosómicas de *Kluyvera spp* y su importancia clínica radica por su mayor expansión en los últimos años tanto en el ámbito nosocomial como en la comunidad que emergen primordialmente de mutaciones de genes (Astocondor, 2018).

De entre todas las betalactamasas descritas hasta el momento, caben destacar por su interés e implicaciones clínicas las siguientes:

1. Betalactamasas de espectro extendido (grupos 2be, 2ber y 2de de la clasificación de Bush y Jacoby que se refiere a enzimas tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA).
2. Betalactamasas resistentes a los inhibidores (grupo 2br: enzimas tipo TEM y SHV).
3. Betalactamasas tipo AmpC (grupo 1: enzimas tipo LAT, MIR, CMY y FOX).
4. Carbapenemasas (grupos 2f, 2df y 3: enzimas tipo VIM IMP, IMI, KPC, NDM y OXA (Cercenado, 2011).

En la actualidad se conocen al menos 65 betalactamasas de tipo CTX-M agrupadas en torno a 5 enzimas diferentes según su secuencia de aminoácidos (CTX-M-1, CTX-M2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25).

➤ Tipo AmpC

Las betalactamasas de este tipo son serinbetalactamasas, también se las conoce como cefalosporinas por su espectro de hidrólisis y por su perfil de inhibición. Actualmente pertenecen a la clase C de Amber o al grupo 1 de la clasificación propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros. Se caracterizan por conferir resistencia a una gran variedad de antibióticos betalactámicos como las penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación incluyendo cefamicinas, en menor medida las de tercera generación y no son capaces de conferir resistencia a las cefalosporinas de cuarta generación ni a los carbapenémicos. Las resistencias pueden ampliarse y afectar a las cefalosporinas de cuarta generación (AmpC de espectro extendido). El Aztreonam, la cloxacilina y el ácido borónico tienen la propiedad de inhibir las Betalactamasas tipo AmpC, mientras que no son afectadas por los inhibidores de las Betalactamasas como el clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Las Betalactamasas tipo AmpC pueden ser cromosómicas (cAmpC) o plasmídicas (pAmpC). Las mediadas por cromosomas se han descrito en una gran variedad de la familia Enterobacteriaceae, que las expresan de manera natural como en el caso de *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii.*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Acinobacter baumannii*, *Shigella spp* y organismos no fermentadores como *Pseudomona aeruginosa*. Mientras que las Betalactamasas tipo AmpC mediadas por plásmidos las expresan bacterias como: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella spp*. Estas tienen gran importancia clínica y epidemiológica, debido a que pueden dar lugar a fracasos terapéuticos en el tratamiento con betalactámicos, además pueden transferirse o diseminarse en el ambiente nosocomial como en la comunidad. En el caso de *Escherichia coli* posee tanto plasmídicas como cromosómicas (en este caso cuando posee un alto nivel de producción de estas enzimas).

Tabla 1. Comparación de nomenclatura de clasificación de BLEE

Bush-Jacoby	Ambler	Sustratos	Inhibidos por EDTA	Inhibidos por Ácido Clavulámico o Tazobactam	Tipos de Enzimas Betalactamasa		
1	Clase C	Cefalosporinasas Cefamicinasas	(-)	No	P99 FOX-4		
2	Clase A	Penicilinas	(-)	Si	PC1		
2a				Si	TEM -1, SHV-1		
2b		Si		TEM - 10, SHV-2			
2be		No		TEM - 30			
2br		No		TEM - 50			
2ber		Si		RTG - 4			
2ce		Clase D		Penicilinas	(-)	Variable	OXA - 1
2d	Cefalosporinas		OXA - 11				
2de	Carbapenémicos		OXA -23				
2df							
2e				Si	CepA		
2f		Carbapenémicos		Variable	KPC-2		
3	Clase B	Carbapenémicos	(+)	No			
3a					B1	NDM-1, VIM-2, IMP-1	
3b					B2	CphA	
3a	B3			L1			

2.2.5. Carbapenemasas

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas representan un gran problema por ser uno de los mecanismos enzimáticos que hidroliza a la mayor parte de los antibióticos betalactámicos, entre ellos los carbapenémicos que constituyen la última línea de la familia de los betalactámicos. Los carbapenemes son antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y *Acinetobacter baumannii* (Doi, 2019).

Una de las combinaciones más frecuente en enterobacterias es la de trastornos de permeabilidad más hiperproducción de betalactamasas AmpC o producción de BLEEs.

Las carbapenemasas se clasifican en las clases moleculares A, B y D.

- Las carbapenemasas de la clase A son las de mayor diversidad entre las que tenemos: NMC (not metallo enzyme carbapenemase), IMI (imipenemhydrolyzing B-lactamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), GES (Guiana extended

spectrum), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), descrita con más frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* que presenta actividad hidrolítica sobre todos los B-lactámicos y es inhibida parcialmente por ácido clavulánico, tazobactam y ácido borónico.

- Las carbapenemasas de clase B o metalo-B-lactamasas como IMP (active on imipenem), VIM (Verona integron-encoded metallo-b-lactamase) y NDM (New Delhi metallo-betalactamase) hidrolizan todos los B-lactámicos excepto aztreonam, y son inhibidas por quelantes metálicos como EDTA (ácido etilendiamino-tetra-acético) y ácido dipicolínico.
- En el grupo de B-lactamasas de clase D, la más frecuente en enterobacterias es OXA-48.

(Tamma & Hsu, 2019)

2.2.6. Control de las enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.

Es conveniente considerar los siguientes aspectos para prevenir la colonización o infección por enterobacterias productoras de BLEE:

- Lavado de manos.
- El aislamiento de contacto.
- El uso de instrumental exclusivo.
- La individualización de los pacientes.
- Políticas de reingreso de pacientes (implementación de estudios de vigilancia).
- Desarrollar y controlar el cumplimiento de protocolos de uso de antimicrobianos.
- Control en el uso de antibióticos y especialmente de las cefalosporinas de 3ra generación.

(Organización Mundial de la Salud, 2017a)

2.2.7. Métodos de detección de resistencias bacterianas

Las técnicas rutinarias del antibiograma se basan en un estudio fenotípico en el que se observa el crecimiento microbiano en presencia de diferentes antibióticos. Estas técnicas incluyen la dilución en agar (gold standard del antibiograma), macrodilución y microdilución en caldo, tiras con un gradiente de antibiótico, y requieren de 18 -24 horas para la obtención de resultados. Con el fin de acortar este tiempo, sería deseable disponer de los resultados del antibiograma de una forma rápida y fiable (Hernández-García et al., 2021).

Para evaluar la fiabilidad, de acuerdo con la Food and Drug Administration (FDA), los resultados de un antibiograma rápido se clasifican, con respecto al antibiograma obtenido mediante el gold standard, como agreements (concordancia), minor errors (resultado erróneo de una sensibilidad intermedia), major errors (falsa resistencia) y very major errors (falsa sensibilidad).

Existe un considerable número de técnicas instrumentales que permiten llevar a cabo un antibiograma rápido entre estos el método de disco difusión de acuerdo a los lineamientos del CLSI (Weinsten, 2022). Entre estas cabe destacar las técnicas moleculares, microarrays, métodos comerciales utilizados en el trabajo de rutina, técnicas inmunocromatográficas, métodos colorimétricos, métodos de imagen, nefelometría, espectrometría de masas MALDI-TOF, citometría de flujo, quimioluminiscencia y bioluminiscencia, microfluidos y métodos de lisis bacteriana (March-Rosselló, 2017).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación

El presente proyecto de desarrollo se realizó en el Hospital Oncológico “Dr. Julio Enrique Paredes” SOLCA Núcleo de Tungurahua, ubicado en la ciudad de Ambato, en la parroquia Izamba, sector Yacupamba. Calles Ignacio Vela y Joaquín Vásconez.

Área: Laboratorio Clínico

3.2. Equipos y materiales

Equipos

- Cabina de Bioseguridad
- Estufa
- Autoclave
- Microscopio
- Computador

Materiales

- Agares: Sangre, CLED, MacConkey, Chocolate, Tioglicolato, Mueller Hinton, Caldo Trypticase Soya, Caldo Mueller Hinton ajustado en cationes.
- Tinciones: GRAM
- BBL Crystal ID para la identificación bacteriana
- Asas de Platino
- Mechero de Bunsen
- Frascos de Hemocultivo

- Discos de antibióticos: ceftazidima, ceftazidima + ácido clavulánico, cefotaxima, cefotaxima + ácido clavulánico, ácido borónico, EDTA, imipenem, meropenem y ertapenem.
- Cajas Petri
- Alcohol
- Matraces
- Agua Destilada
- Equipo de Protección Persona (Guantes, gorro, gafas, mandil, mascarilla)

3.3. Tipo de Investigación

- El estudio es aplicativo ya que se plantean protocolos para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y productoras de Carbapenemasas, que fueron aplicados en el análisis de muestras biológicas por lo que el estudio tiene un enfoque mixto, ya que se realizó mediciones de los halos de inhibición de los discos de antibióticos utilizados para la determinación de susceptibilidad, mientras que el enfoque cualitativo se aplicó en la recolección de datos sin medición numérica, como las descripciones y las determinaciones de susceptibilidad (Sensible, intermedio y resistente).

- Este estudio es descriptivo observacional porque se detallaron los datos y características de los métodos de detección de resistencia bacteriana. Presenta un diseño transversal de período seleccionado.

3.4. Prueba de Hipótesis-Pregunta Científica- idea a defender

H₁: La aplicación de los protocolos elaborados para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y productoras de Carbapenemasas podrían mejorar la terapia antibiótica.

H₀: La aplicación de los protocolos elaborados para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y productoras de Carbapenemasas no mejoran la terapia



antibiótica.

3.5. Población o muestra

Población: Muestras biológicas de pacientes atendidos en las áreas de hospitalización y consulta externa del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua que presentan sospecha de infecciones bacterianas.

Muestra: No se calcula muestra porque se incluyeron en el análisis todas las muestras de orina, secreción de herida y hemocultivos de los pacientes atendidos en el período de estudio enero – junio 2022 que presenten cultivos positivos y se analizó de acuerdo a las cepas productoras de BLEE y de Carbapenemasas.

a) Criterios de inclusión

- Pacientes con muestras de secreción de herida, orina y hemocultivo atendidos en hospitalización y consulta externa mayores de edad, cuyos resultados del cultivo y antibiograma fueron positivos con aislamiento correspondiente a enterobacterias que aceptan voluntariamente participar en la investigación mediante la firma del consentimiento informado.
- Antibiogramas con un perfil fenotípico de resistencia o intermedio a 1 o 2 carbapenémicos.
- Antibiogramas con un perfil fenotípico de resistencia o sinergia entre los discos de cefalosporinas de 3ra generación y la amoxicilina + ácido clavulánico.
- Muestras de pacientes con la solicitud de examen que contenga la información completa del paciente.

b) Criterios de exclusión

- Muestras de secreción de herida, orina y hemocultivo mal codificadas o con información incompleta.
- Muestras de cultivos que resultaron con crecimiento bacteriano negativo o contaminadas.

3.6. Recolección de la Información

Fase pre-analítica

- Se tramitó todos los permisos necesarios para el ingreso al Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua y la autorización para acceder a las historias clínicas y a la información pertinente de cada paciente.
- Se realizó los protocolos de toma de muestras y de identificación de resistencias antimicrobianas.
- Se pidió el consentimiento informado.

Fase analítica

- Se prepararon medios de cultivo: agar CLED, MacConkey, Sangre y Mueller Hinton.
- Se seleccionaron las muestras de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión.
- Para la identificación de las bacterias se utilizó la tinción gram y el sistema de Identificación BBL Crystal ID.
- Se realizó el antibiograma por el método de disco difusión Kirby Bauer de acuerdo a las normas de la CLSI.
- Se realizó la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) mediante el método de sinergia con discos de Aztreonam, Ceftazidima, Cefotaxima y Amoxicilina-Acido Clavulánico
- Se realizó la confirmación de BLEE por el método propuesto por la CLSI con discos de Cefotaxima + Acido Clavulánico, Cefotaxima, Ceftazidima + Acido Clavulánico y Ceftazidima.
- Se realizó la detección de Cepas productoras de carbapenemasas mediante los métodos propuestos por el CLSI: Test de Ácido Borónico, Test de ácido



etilendiaminotetraacético (EDTA) y el test de inactivación de meropenem mCIM y eCIM.

- Se realizó pruebas con las cepas ATCC *Escherichia coli* 25922 proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) para garantizar la calidad de los resultados.

Fase post-analítica

- Se estudiaron 72 muestras positivas, es decir con crecimiento bacteriano y varias resistencias fenotípicas para la realización del antibiograma, durante el periodo enero 2022 – junio 2022
- Se registraron todos los datos y resultados de las muestras.

3.7. Procesamiento de la Información y análisis estadístico

El instrumento que se utilizó es una hoja de recolección de datos que se elaboró para registrar la información necesaria como código interno, edad, sexo, tipo de muestra, germen aislado, origen de la muestra, mecanismo de resistencia y la susceptibilidad ante fármacos específicos para desarrollar este proyecto.

Se utilizó el programa estadístico SPSS “Statistical Product and Service Solutions”, que comprende un conjunto de herramientas de tratamiento de datos para el análisis estadístico, para establecer las frecuencias de las muestras, bacterias y resistencias bacterianas encontradas durante el proyecto de desarrollo.

3.8 Variables respuesta o resultados alcanzados.

Se elaboró protocolos para la toma y procesamiento de muestras microbiológicas, que fueron aprobados por el Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua, los mismos que fueron socializados con todo el personal del Laboratorio Clínico del Hospital.



Se aplicó los protocolos de detección de cepas productoras de BLEE y Carbapenemasas que permite generar información sobre los cambios de patrón de resistencia antimicrobiana de los microorganismos sujetos a la misma, para mejorar el área de microbiología del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua y de esta forma se está aportando en la opción terapéutica adecuada para el tratamiento de pacientes con infecciones bacterianas.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto de desarrollo se llevó a cabo en el Hospital Oncológico Dr. Julio Enrique Paredes SOLCA Núcleo de Tungurahua, durante el periodo enero – junio 2022.

Se obtuvieron los siguientes resultados.

Como primer resultado obtenido durante este proyecto es la elaboración y validación de los protocolos que se encuentran en Anexos con sus respectivas firmas de validación. Tras la aprobación de los mismos se presentan los resultados de la aplicación de los protocolos mencionados.

4.1. RESULTADOS

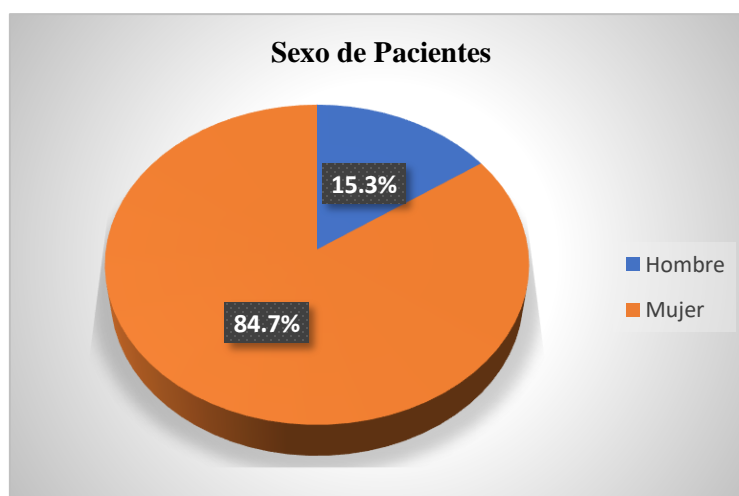
De los 360 cultivos positivos con crecimiento de enterobacterias, en 72 se obtuvo crecimiento de Enterobacterias resistente a varios antibióticos, por lo tanto, se realizó la investigación en las 72 cepas que fueron identificadas en las muestras de pacientes que acudieron al Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua.

Tabla 2. Sexo de los pacientes participantes en el estudio.

<i>n</i> (72)	<i>f</i>	%
Hombre	11	15.3
Mujer	61	84.7

*DS (0.36) M (1.85)

Gráfico 1. Sexo de los pacientes participantes en el estudio



Fuente: Área de microbiología del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua
Elaborado por: Diana Vásquez

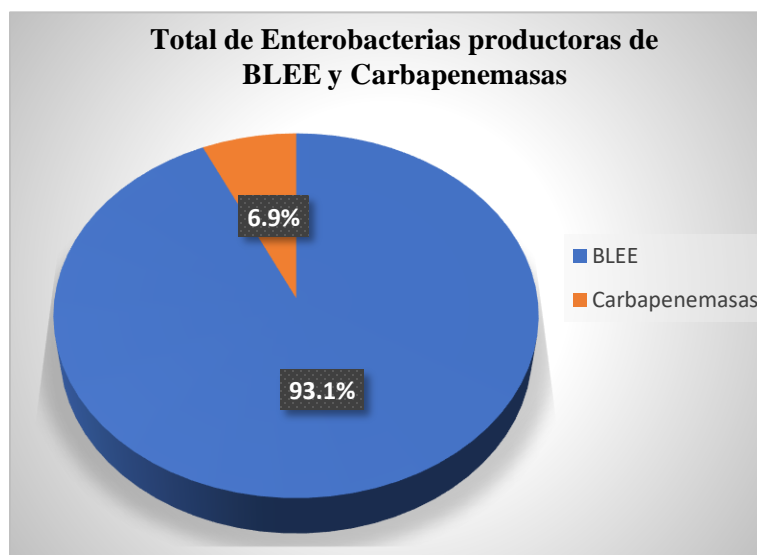
Análisis: La tendencia de la frecuencia para bacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas positivas fue del 84.7% para las mujeres o sexo femenino. Este valor supera al 15,3% de los hombres o sexo masculino.

Tabla 3. Total de enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas aisladas durante el periodo enero-junio 2022.

<i>n</i> (72)	<i>f</i>	%
Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	67	93.1
Carbapenemasas	5	6.9

*DS (0.25) M (1.93)

Gráfico 2. Total de enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas aisladas durante el periodo enero-junio 2022.



Fuente: Área de microbiología del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua
Elaborado por: Diana Vásquez

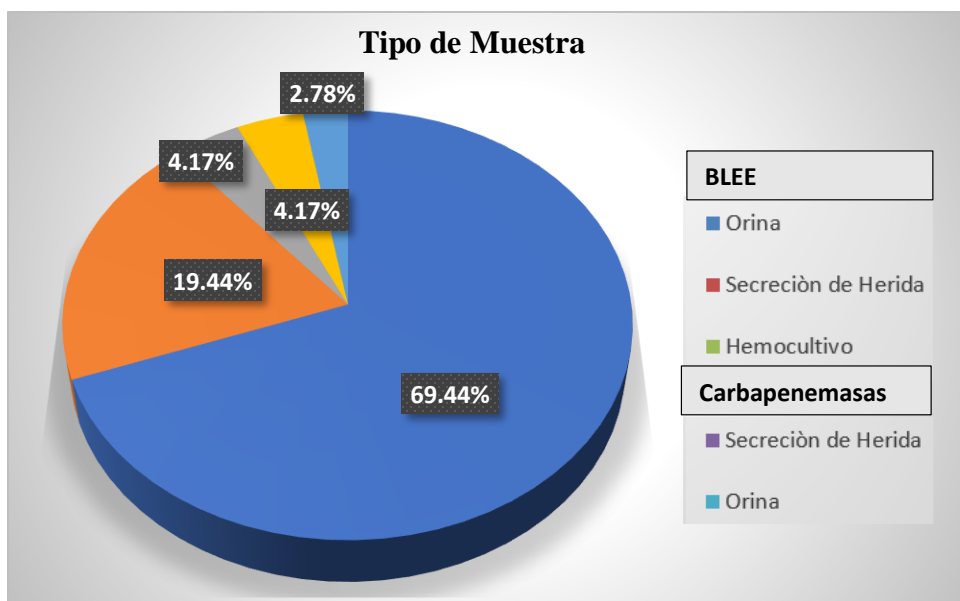
Análisis:

De las 72 muestras positivas analizadas, el 93.1% corresponde a enterobacterias productoras de BLEE y el 6.9% hace referencia a las enterobacterias productoras de Carbapenemasas, siendo las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), la más frecuente.

Tabla 4. Tipo de muestras biológicas con enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.

<i>n</i> (72)	<i>f</i>	%
*BLEE		
Orina	50	69,44
Secreción de Herida	14	19,44
Hemocultivo	3	4,17
*Carbapenemasas		
Orina	2	2,78
Secreción de Herida	3	4,17
*DS (0.55) M (1.32)		

Gráfico 3. Tipo de muestras biológicas con enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.



Fuente: Área de microbiología del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua
Elaborado por: Diana Vásquez

Análisis:

De la información obtenida, el 69.44% corresponde a muestras de orina que se caracterizaron como enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) siendo el mayor porcentaje, seguido por el 19.44% de secreción de herida y el 4.17 de hemocultivos, mientras que mayor porcentaje de cepas productoras de carbapenemasas se ubica en las muestras de secreción de herida con el 4.17% y el 2.78 % en orina.

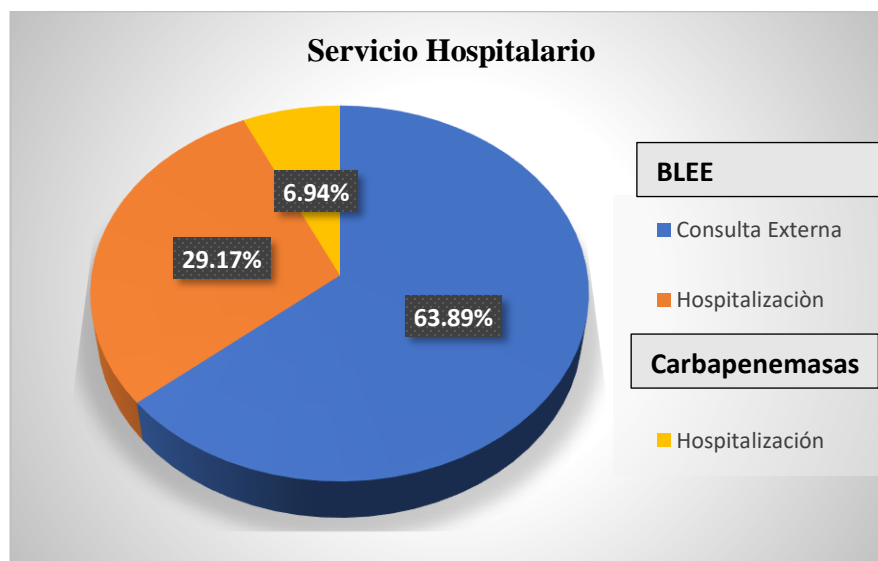


Tabla 5. Servicio en el que se aislaron enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.

<i>n</i> (72)	<i>f</i>	%
*BLEE		
Consulta Externa	46	63,89
Hospitalización	21	29,17
*Carbapenemasas		
Consulta Externa	0	0,0
Hospitalización	5	6,94

***DS (0.48) M (1.64)**

Gráfico 4. Servicio en el que se aislaron enterobacterias productoras de BLEE y Carbapenemasas.



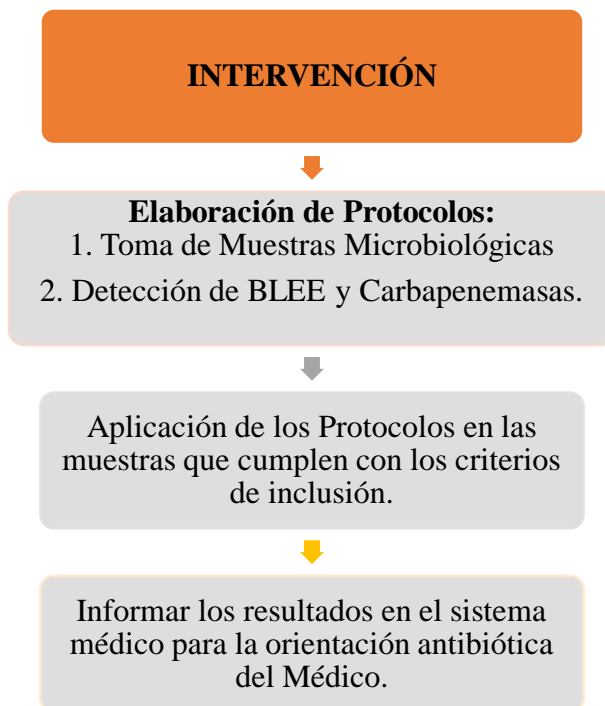
Fuente: Área de microbiología del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua
Elaborado por: Diana Vásquez

Análisis:

Se evidenció en el presente estudio que, de las 72 muestras aisladas, el mayor porcentaje 63.89% corresponde a las enterobacterias productoras de BLEE que procedían de las muestras de pacientes del servicio de consulta externa y el 29.17% del servicio de hospitalización, mientras que las cepas productoras de carbapenemasas procedían únicamente del servicio de hospitalización con un 6.94%.

➤ **Intervención**

El presente proyecto de desarrollo se basó en la intervención técnica microbiológica de la autora en el Laboratorio Clínico del Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua. Como antecedente se tiene resultados de antibiogramas sin la detección de mecanismos de resistencia que ha llevado a grandes fallos terapéuticos, afectando directamente al paciente.



Posterior a la intervención de este proyecto, se realiza la detección de mecanismos de resistencia para enterobacterias en las muestras que ameritan, mecanismos que se reportan en el sistema médico junto con el antibiograma, para orientar al médico que realiza la terapia antibiótica dirigida con el antibiograma respectivo, debido a la complejidad de pacientes que se tratan, ya que por la condición de su enfermedad presentan antecedentes de esquemas de antibióticos recetados.

4.2.DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana es un proceso que se define como la capacidad de una bacteria para neutralizar o resistir al efecto de un antibiótico. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, su incremento constituye un problema de salud pública en todo el mundo, debido a los altos costos que esto genera y la falla del tratamiento de infecciones (OMS, 2020).

Con respecto a los pacientes oncológicos (Curipoma, 2015) en su estudio realizado en SOLCA Guayaquil afirman que son un grupo con un alto riesgo para el desarrollo de resistencia bacteriana, debido a varios factores entre los que se puede mencionar: la utilización repetida de esquemas antibióticos empíricos de amplio espectro, a la exposición repetida de diferentes bacterianos y a su estado de inmunosupresión, por tal motivo en el estudio de (Acebo, 2014) considera que los cultivos son una herramienta de importante valor diagnóstico que permite al médico establecer la presencia de infección, reafirmar el uso de tratamiento empírico o modificar el antibiótico utilizado de acuerdo al resultado del antibiograma respectivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos por medio este estudio realizado en el Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua durante el periodo enero-junio 2022 fue posible determinar que la frecuencia fue del 84.7% para mujeres, este valor supera al 15,3% de los hombres, considerando que la mayor parte corresponde a muestras de orina con un 69.44% para la detección de betalactamasas de espectro extendido y con un 2.78%

para cepas productoras de Carbapenemasas.

En un estudio publicado por (Alvarez, 2017) menciona que las infecciones del tracto urinario son 10 veces más frecuentes en las mujeres que en los hombres, debido a que anatómicamente la uretra en la mujer es mucho más corta y que además se encuentra más cerca del ano lo que aumenta el riesgo de contraer infecciones de bacterias de la flora fecal. La falta de una higiene adecuada, así como la frecuencia en las relaciones y el número de parejas sexuales, constituyen otros factores de riesgo para la mujer.

(Castanheira et al., 2021) menciona que las Betalactamasas de espectro extendido son enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y los monobactames pero no las carbapenemes. Se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Según los datos de la Organización Panamericana de Salud (OPS) recolectados por la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA), en Latinoamérica, la resistencia a los betalactámicos ha demostrado ser más grave que en otras regiones del mundo. En nuestro país varios estudios como el de (Pachay, 2015) realizado en SOLCA Portoviejo reporta una prevalencia de 44.9% para cepas productoras de BLEE, mientras que en este estudio fue posible determinar que de las 72 enterobacterias aisladas que mostraron resistencia fenotípica a varios antibióticos, el 93.1% correspondían a cepas productoras de BLEE que correspondieron con un 63.89% a muestras procedentes de pacientes de consulta externa y el 29.17% de hospitalización, es importante destacar que las poblaciones muestreadas varían de estudio a estudio.

(León-Luna et al., 2021) menciona en su investigación que el principal problema a nivel mundial es precisamente la diseminación incontrolada de genes que codifican la resistencia a carbapenemes, hasta ahora la última línea en la terapéutica frente a bacilos Gram negativos multirresistentes. (Espín Custodio et al., 2019) en su investigación realizada en SOLCA Guayaquil en muestras de hemocultivos reporta que las cepas productoras de carbapenemasas fueron aisladas en menor frecuencia que las productoras

de betalactamasas de espectro extendido relacionándose con esta investigación donde de las 72 muestras aisladas el 6.94% fueron cepas productoras de carbapenemasas que corresponden a muestras de pacientes del área de hospitalización debido a que en su diagnóstico presentan complicaciones que no pueden ser tratados ambulatoriamente. Además, el tipo de pacientes que atiende el hospital presentan recurrentes episodios de recaídas por la inmunosupresión condicionada por la enfermedad oncológica o por el tratamiento de quimioterapia, lo que les ocasiona reiterados eventos de hospitalización.

Finalmente, el control de infecciones causadas por este tipo de bacterias, deben ser enfatizadas, evitando su diseminación. Por tal motivo (Hernández-García et al., 2021) en su investigación recalca la importancia del lavado de manos, el aislamiento de contacto, la descontaminación habitual del ambiente, el uso de instrumental exclusivo, desarrollar y controlar el cumplimiento de protocolos de uso de antimicrobianos y sobre todo efectuar control en el uso de cefalosporinas de amplio espectro.

Organismos internacionales realizan distintos programas con el propósito de contener y controlar este problema. El sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en el año 2017, determinó que una de las medidas más importantes es conocer la situación que cada región atraviesa con respecto a la resistencia bacteriana, por lo que la detección de los mecanismos de resistencia es indispensable para generar información útil para la vigilancia epidemiológica (Organización Mundial de la Salud, 2017a).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

5.1 CONCLUSIONES

- Se elaboró los protocolos de la toma de muestras microbiológicas de orina, hemocultivo, esputo y secreción de heridas, teniendo en cuenta que esta última es tomada por los médicos residentes de las respectivas áreas. Los protocolos fueron validados por un experto y revisados por el jefe del Laboratorio Clínico (anexo 4), actualmente se encuentran en proceso de autorización por parte del director Médico de la Institución para ser replicados con todo el personal involucrado en el proceso.
- Se inició la implementación un sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana en el Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua con la primera fase de detección de mecanismos de resistencias bacterianas para la familia *Enterobacteriaceae* que constituye el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos de importancia médica y son las bacterias que se recuperan con mayor frecuencia en muestras clínicas humanas.
- Se detectó las cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas en enterobacterias en muestras de pacientes del área de hospitalización y de consulta externa durante el periodo enero-junio 2022. Se utilizó los métodos aprobados por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de difusión de disco, en los que se obtuvo de las 72 muestras analizadas el 93.1% correspondieron a cepas productoras de BLEE (Betalactamasas de Espectro Extendido) y el 6.9% a productoras de Carbapenemasas. Para la confirmación de BLEE se utilizó el método de disco combinado de ceftazidima, ceftazidima + ácido clavulánico, cefotaxima y cefotaxima + ácido clavulánico,

mientras que para para la detección de carbapenemasas de utilizaron los test de ácido borónico, test de EDTA, test de mCIM (Test de inactivación de carbapenémicos para detección de producción de carbapenemasa en enterobacterias) y eCIM (Test de inactivación de carbapenémicos para detección de producción de carbapenemasa en enterobacterias + EDTA).

- Se determinó la importancia de la detección de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas para evitar fracasos terapéuticos y tratar adecuadamente a los pacientes que acuden al Hospital Oncológico SOLCA Núcleo de Tungurahua, que presentan un mayor riesgo de infecciones debido a la inmunosupresión condicionada por la enfermedad que presentan, así como por el tratamiento con quimioterapia en el que desarrollan distintos grados de neutropenia, lo que les vuelve susceptibles a contraer infecciones.

5.2 RECOMENDACIONES

- Una vez autorizados los protocolos, se debe compartir la información que contienen los mismos con todo el personal involucrado del Hospital para mejorar las opciones antibióticas terapéuticas y evitar la propagación de resistencias bacterianas.
- Dado que existen diferentes tipos de mecanismos de resistencia bacteriana, este estudio se debe continuar en esta Institución para implementar completamente el sistema de vigilancia, que se dividió en 3 fases, en los que se deben elaborar los protocolos correspondientes, considerando que la mejor estrategia para evitar la propagación de este problema continúa siendo el uso adecuado de antibióticos.

5.3 BIBLIOGRAFIA

1. Acebo, J. (2014). “*PERFIL DE RESISTENCIA BACTERIANA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL DE SOLCA QUITO.*”
2. Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2014.10.004>
3. Alvarez, D. (2017). *DETERMINACIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO TIPO AMPC EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA*. Universidad Técnica de Ambato.
4. Astocondor, L. (2018). Betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación En Salud*. <http://revistas.unheval.edu.pe/index.php/repis/article/view/224/211>
5. Bender, J. K., Cattoir, V., Hegstad, K., Sadowy, E., Coque, T. M., Westh, H., Hammerum, A. M., Schaffer, K., Burns, K., Murchan, S., Novais, C., Freitas, A. R., Peixe, L., del Grosso, M., Pantosti, A., & Werner, G. (2018). Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates*, 40, 25–39. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2018.10.002>
6. Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/JACAMR/DLAB092>
7. Cercenado, E. (2011). Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *SEIMC*.
8. Chatwin, C. L., Hamrick, J. C., Trout, R. E. L., Myers, C. L., Cusick, S. M., Weiss, W. J., Pulse, M. E., Xerri, L., Burns, C. J., Moeck, G., Daigle, D. M., John, K., Uehara, T., & Pevear, D. C. (2021). Microbiological Characterization of VNRX-5236, a Broad-Spectrum β -Lactamase Inhibitor for Rescue of the Orally Bioavailable Cephalosporin Cefitibuten as a Carbapenem-Sparing Agent against Strains of

- Enterobacteriales Expressing Extended-Spectrum β -Lactamases and Serine Carbapenemases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(8).
<https://doi.org/10.1128/AAC.00552-21>
9. Contreras, B. (2018). *INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS*.
 10. Corta, C., Díaz-Sipi3n Mirko Guerrero-Mendoza, R., Ventura-Flores, R., Ruiz Gallo, P., & Bi3logos Microbi3logos RESUMEN, P. (2021). *Detection of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital in northern Peru*.
<https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2020.133.742>
 11. Curipoma, M. del R. (2015). *ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON INFECCI3N DE VÍAS URINARIAS. SOLCA-GUAYAQUIL* [SOLCA Guayaquil].
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/46335/1/CD-13-CURIPOMA%20HERNANDEZ.pdf>
 12. Doi, Y. (2019). Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(Suppl 7), S565.
<https://doi.org/10.1093/CID/CIZ830>
 13. Dolinsky, A. L. (2017). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *Journal of Services Marketing* (Vol. 8, Issue 3).
 14. Esp3n Custodio, L., Bonilla Nu3ez, A., & Andrade Rada, J. (2019). Hemocultivos en el Servicio de Pediatr3a del Instituto Oncol3gico Nacional “Dr. Juan Tanca Marengo”, Solca-Guayaquil. *Oncolog3a (Ecuador)*, 29(2), 119–126. <https://doi.org/10.33821/87>
 15. Garc3a, C. S., Pardos De La G3ndara, M., Javier, F., & Garc3a, C. (2010). Enfermedades Infecciosas y Microbiolog3a Cl3nica Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than Escherichia coli and Klebsiella. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28, 12–18. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70003-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3)
 16. Generales, C. (n.d.). *Gu3a t3cnica: gu3a de inspecci3n/auditor3a de buenas pr3cticas*

- de laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos.* 1–31.
17. Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., del Rayo Morfín-Otero, M., Torres-López, F. J., María, Y., & Alcántar-Curiel, D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla GACETA MÉDICA DE MÉXICO. *Gac Med Mex*, *156*, 172–180. <https://doi.org/10.24875/GMM.20005624>
 18. Gragera, L. (2020). *Enfermedades infecciosas. Infecciones por enterobacterias.*
 19. Hernández-García, M., Díaz-Agero, C., Pérez-Viso, B., Sánchez, A. M., López-Fresneña, N., Morosini, M. I., Ruiz-Garbajosa, P., & Cantón, R. (2021). Implementation of contact isolation strategy for the containment of extended-spectrum β -lactamase carriers in a University Hospital positively affects the epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacterales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, *39*(9), 429–435. <https://doi.org/10.1016/J.EIMCE.2020.05.020>
 20. IICA, C., & José, E. S. (2020). *Antimicrobial resistance surveillance systems and international trade.*
 21. INSPI. (2019a). *CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS MANUAL DE VIGILANCIA DEL CENTRO DE REFERENCIA NACIONAL DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS (CRN-RAM).*
 22. INSPI. (2019b). *Manual de Vigilancia del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN- RAM).* 1–31.
 23. León-Luna, D., Fajardo-Loyola, A., Yareta-Yareta, J., Burgos-Espejo, A., Peralta-Siesquen, C., Galarza-Pérez, M., & Marcos-Carbajal, P. (2021). Caracterización molecular de enterobacterias multirresistentes en dos departamentos de la selva peruana. *Biomédica*, *41*(Suppl 2), 180. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.5720>
 24. March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *35*(3), 182–188. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2016.12.005>
 25. Mc Carlie, S., Boucher, C. E., & Bragg, R. R. (2020). Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates*, *48*, 100672.

- <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2019.100672>
26. OMS. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
 27. Organización Mundial de la Salud. (2017a). *Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos Manual para la primera fase de implementación*.
 28. Organización Mundial de la Salud. (2017b). Sistema Mundial de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos. In *Organización Mundial de la Salud*.
 29. Pachay, J. (2015). “*ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) AISLADAS EN EL HOSPITAL ‘DR. JULIO VILLACRESES COLMONT’ SOLCA PORTOVIEJO*” [SOLCA PORTOVIEJO]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/46395/1/CD-17-PACHAY%20SOLORZANO.pdf>
 30. Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
 31. Sanke-Waigana, H., Mbecko, J. R., Ngaya, G., Manirakiza, A., & Alain, B. A. (2021). 2003-2019: explosive spread of enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases in Bangui Central African Republic. *The Pan African Medical Journal*, 39. <https://doi.org/10.11604/PAMJ.2021.39.22.28812>
 32. Sive, V. (2016). *Vigilancia SIVE – Hospital Módulo I . Infecciones asociadas a Manual*. 1–61.
 33. Tamma, P. D., & Hsu, A. J. (2019). Defining the Role of Novel β -Lactam Agents That Target Carbapenem-Resistant Gram-Negative Organisms. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 8(3), 251. <https://doi.org/10.1093/JPIDS/PIZ002>
 34. Vigilancia, L. De, Nacional, R., & Referencia, C. De. (2016). *Instructivo Recepción de Cepas Macro-Proceso : Instructivo Recepción de Cepas Macro-Proceso : 2–4*.
 35. Weinsten, M. (2022). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility*

Testing A CLSI supplement for global application. www.clsi.org.

36. Wilson, H., & Török, M. E. (2018). Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics*, 4(7).
<https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000197>



5.4. ANEXOS

Anexo 1. Operacionalización de Variables

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
Identificación Bacteriana	Ejercicio práctico para determinar el tipo de bacteria que ocasiona la infección	Familia y especie bacteriana	BBL Cristal ID.	Cualitativa Nominal Código para la Identificación Bacteriana
Antibiograma	Prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad de una bacteria a un grupo de antibióticos	Sensibilidad de un agente antimicrobiano frente a un antibiótico	Técnica de kirby bauer	Cualitativa Nominal Sensible Intermedio Resistente



Servicio Hospitalario	Área del Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua que brinda al usuario que ingresa a una institución para recibir tratamiento médico	Servicio Hospitalario	Formulario	Cualitativo Nominal Hospitalización Consulta externa
Origen de la Muestra	Precedencia de las muestras o material biológico	Material Biológico	Formulario	Cualitativo Nominal Orina Secreción de Herida Hemocultivo
Resistencia Bacteriana	Es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico.	Carbapenemasas BLEE Betalactamasa de Espectro Extendido	Porcentaje de resistencia	Cualitativo Nominal Carbapenemasas BLEE

Anexo 2. Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA RECOLECCIÓN, USO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS PERSONALES

Título del estudio: “Implementación de un Sistema de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana”

Datos del Investigador Principal: Nombre: Diana Carolina Vásconez Nuela

Dirección: Ambato, Parroquia Izamba, Av. Pedro Vásconez Sevilla

Teléfono: 0983770414

A) Hoja de información:

Le estamos pidiendo que autorice la recolección y uso de datos para la realización del estudio que nos permitirá implementar un sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana.

Su participación es completamente voluntaria; puede no aceptar participar en el estudio principal y sin que ello le provoque inconveniente alguno.

Lea toda la información que se le ofrece en este documento y haga todas las preguntas que necesite al investigador que se lo está explicando, antes de tomar una decisión. También lo alentamos a consultarlo con su familia, amigos y médicos de cabecera.

1) ¿Por qué se realiza este estudio?

Este estudio se realiza para detectar mecanismos de resistencia bacteriana debido a que los pacientes oncológicos dado su enfermedad presentan inmunodepresión, lo que les vuelve susceptibles a contraer infecciones. Es frecuente que estos pacientes reciban diferentes esquemas de antibióticos lo que favorece el desarrollo de cepas multidrogasresistentes (MDR). El objetivo es aportar al médico con información útil para el tratamiento adecuado y oportuno y mejorar la salud del paciente y por ende su calidad de vida.

2) ¿Qué pasará si participo de esta parte del proyecto de desarrollo:

Si participa en el proyecto:

Se realizará el cultivo de la muestra que usted deje en el laboratorio clínico y si amerita se procesará el antibiograma, identificación bacteriana y detección de resistencias bacterianas para el tratamiento oportuno.

PROCEDIMIENTO

3) ¿Qué estudios harán con mis datos/muestras?

Los estudios que se harán con su muestra es una tinción gram, un cultivo y si es necesario un antibiograma, identificación bacteriana y pruebas de resistencias bacterianas. Con los datos obtenidos se realizará un análisis con el fin de disminuir y controlar las resistencias antimicrobianas.

4) ¿Qué riesgos podría tener si participo?

Los riesgos que podría tener son muy bajos, sin embargo, cualquier incomodidad que presente puede notificarlo al investigador.

5) ¿Qué se sabe de este tipo de estudios?

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que aqueja, a nivel global, a diferentes casas de salud. La adquisición de resistencias por parte de numerosos agentes infecciosos supone una creciente amenaza para la salud pública, que preocupa en todos los países y en muchos sectores económicos.

6) ¿Cuánto tiempo me tomará participar en esta parte del estudio?

El tiempo requerido para la recepción de la muestra, procesamiento y emisión de resultados es de aproximadamente 3 días.

7) ¿Tendré beneficios por participar?

Los beneficios que tiene por participar en el estudio es la detección de resistencias bacterianas para mejorar sus opciones terapéuticas y evitar la aparición de nuevas resistencias.

8) ¿Me darán información sobre los resultados del estudio, luego de su finalización?

Los resultados del estudio de su muestra serán confirmados en su historia clínica para que su médico tratante lo pueda observar y lo interprete de manera adecuada para su posterior tratamiento.

9) ¿Qué gastos tendré si participo del estudio?

Su participación en el estudio no tiene costo, es decir no pagará nada, simplemente debe cumplir con las recomendaciones dadas.

10) ¿Qué pasará si sufro algún evento adverso mientras participo en el estudio?

El riesgo que se produzca eventos adversos es muy bajo, la investigadora está pendiente y cualquier evento adverso debe ser notificado.

11) ¿Puedo dejar de participar en cualquier momento, aún luego de haber aceptado?

SI puede dejar de participar en el estudio después de haber aceptado, sin embargo, no se le realizarían las pruebas que son necesarias para evaluar su estado de salud.

12) ¿Puedo retirar mi consentimiento para la utilización de muestras biológicas, aún luego de haber aceptado?

Si puede retirar su consentimiento para la utilización de muestras biológicas, pero con anticipación debido a que las muestras se procesan inmediatamente.

13) ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos/muestras?

Se garantiza la confidencialidad de sus datos mediante la asignación de un código, lo que hace que usted permanezca anónimo. Este código es dado por el Laboratorio Clínico.

14) ¿Cómo se almacenarán mis datos/ muestras?

Los datos se almacenarán de acuerdo a la codificación que se le ha otorgado como respaldo tanto para usted como paciente como la investigadora.

15) ¿Dónde y cuánto tiempo se almacenarán mis datos/muestras? ¿Cómo las destruirán luego de su utilización?

Los datos se almacenarán en el Laboratorio Clínico y será de uso exclusivo del Hospital y se mantendrá 5 años guardados en el archivo pasivo que se maneja como se realiza con todos los datos de resultados de los pacientes que acuden al hospital.

16) ¿Puedo ser retirado del estudio aún si yo no quisiera?

Puede decidir retirarse si consideran que es lo mejor para usted. También pueden decidir retirarse por las siguientes causas:

- Muestra inadecuada
- Muestra contaminada

17) ¿Me pagarán por participar?

No se le pagará por su participación en este estudio, el beneficio se basa en realizar la detección de resistencias bacterianas, si lo requiere.

18) ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos personales? ¿Cómo harán para que mi identidad no sea conocida?

Los datos que lo identifiquen serán tratados en forma confidencial como lo exige la Ley, usted no podrá ser identificado y para ello se le asignará un código compuesto. En caso de que los resultados de este estudio sean publicados en revistas médicas o presentados en congresos médicos, su identidad no será revelada.

19) ¿Los resultados genéticos que obtengan de mis muestras biológicas, pueden ser usados con un fin distinto al que aquí se explica?

No aplica este punto en el Proyecto de Desarrollo, que se está ejecutando.



20) ¿Quiénes tendrán acceso a mis datos personales?

El Investigador principal, directora y el médico responsable de su atención en su hospital del Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua tendrán acceso a los resultados de sus estudios, como las pruebas de laboratorio.

21) ¿A quiénes puedo contactar si tengo dudas sobre el estudio y mis derechos como participante en un estudio de investigación?

a) Sobre el estudio: contactar al Investigador Principal: Diana Carolina Vásquez Nuela

Teléfono: 0983770414/032451048

b) Sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación:

Si Usted tiene alguna pregunta relacionada con sus derechos como participante en la investigación puede contactarse con el Comité de Bioética CBISH de la Facultad de Ciencia de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato.



Título del estudio: “Implementación de un Sistema de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana”

Autor del proyecto: Diana Carolina Vásquez Nuela
C.C. 1804414413

B) Consentimiento Informado (Hoja de firmas):

He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.

He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión a la Licenciada responsable del estudio.

Firma, nombre completo, número de cédula del paciente y fecha

Firma, nombre completo, número de cédula de la investigadora y fecha

Anexo 3. Formularios

I. LISTA DE VERIFICACIÓN

(Generales, n.d.)

(Sive, 2016)

(Dolinsky, 2017)

Aspectos a Verificar		Logrado	No Logrado	Observaciones
1	Autorización del Hospital	✓		
	Elaboración de Protocolos	✓		
2	Revisión por un experto, jefe del laboratorio y autorización del director médico.	✓		
3	Aplicar los protocolos	✓		
4	Socializar Resultados	✓		

II. FORMULARIO DEL INVESTIGADOR

(INSPI, 2019b)

(Vigilancia et al., 2016)


(Organización Mundial de la Salud, 2017b)



Código de la Muestra:		
Servicio:		
Procedencia de la Muestra:		
Edad		
Diagnóstico Patológico		
Germen Aislado		
Antibiograma		
Sensible	Intermedio	Resistente
Pruebas de Resistencia		
BLEE	Carbapenemasas	
Observaciones		

Anexo 4. Protocolos

- Protocolo de Toma de Muestras Microbiológicas
- Protocolo de Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y cepas productoras de Carbapenemasas.



	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	


HOSPITAL ONCOLÓGICO "DR. JULIO E. PAREDES C."

SOLCA NÚCLEO DE TUNGURAHUA




PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Realizado por: Lcda. Diana Vásconez	Validado por: Dra.Mónica Moreno	Revisado por: Dr. Jorge Murillo	Autorizado por: Dr. Yamandú Jiménez
 Firmado electrónicamente por: DIANA CAROLINA VASCONEZ NUELA	 Firmado electrónicamente por: MONICA SUSANA MORENO AVILES		
Licenciada de Laboratorio Clínico	Magíster en Microbiología Clínica	Jefe de Laboratorio Clínico	Director Médico

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 2 de 12

Contenido

1.	Autores o responsables de elaboración del protocolo	3
2.	Revisores del protocolo	3
3.	Declaración de conflictos de intereses de los (las) autores(as) y de los las) revisores(as).....	3
4.	Justificación	3
5.	Objetivos.....	4
5.1.	Objetivo General	4
5.2.	Objetivos específicos.....	4
6.	Profesionales a quien está dirigido	4
7.	Población Diana	4
8.	Responsables	4
8.1.	Ejecución	4
8.2.	Control.....	5
9.	Definiciones	5
9.1	Tipos de muestra.....	6
9.2	Manejo de las muestras	6
9.3	Toma de Muestra	7
10.	Bibliografía	10

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 4 de 12

referentes a la recogida, transporte y procesamiento de las muestras que son relevantes para que la actividad del laboratorio de microbiología se desarrolle de manera eficaz y eficiente.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Definir los procedimientos de toma de muestras microbiológicas en el área de laboratorio clínico del Hospital Dr. Julio Enrique Paredes, para el adecuado procesamiento analítico.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Detallar los procedimientos de la toma de muestras microbiológicas.

5.2.2. Reconocer las interferencias que ocasionan una muestra inadecuada.

6. Profesionales a quien está dirigido

✓ Tecnólogos médicos (Laboratorio Clínico)


7. Población Diana

Pacientes que requieren realizarse exámenes de cultivo y antibiograma en el área de Microbiología del Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua.

8. Responsables

8.1. Ejecución

La aplicación de su cumplimiento de las autoridades del hospital, así como el personal de Laboratorio Clínico.

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 5 de 12

8.2. Control


Es responsabilidad del jefe de laboratorio clínico la vigilancia y control de la ejecución del protocolo.

9. Definiciones

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se basa en el estudio de los síntomas y signos clínicos, así como en la demostración de la presencia de su agente etiológico. Toda la información diagnóstica que el laboratorio de microbiología puede proporcionar, depende de la calidad de la muestra recibida. Por ello, una toma mal realizada, pobremente recogida o mal transportada determinará un posible fallo en la recuperación de los agentes patógenos o de microbiota normal, que puede inducir a errores diagnósticos, e incluso a un tratamiento inadecuado del enfermo (1).

A la hora de obtener muestras para microbiología hay que tener en cuenta una serie de aspectos fundamentales:

- La muestra debe ser representativa del proceso que se va a estudiar, es decir la cantidad recogida debe ser suficiente para asegurar un examen completo y adecuado.
- Si es posible, debe obtenerse la muestra antes de iniciar el tratamiento. Si esto no fuera posible debe informarse al laboratorio sobre los antibióticos que está recibiendo el paciente.
- La muestra debe ser tomada del lugar en el que sea más probable hallar los microorganismos sospechosos.
- Asegurar la mínima contaminación externa.
- Recoger la muestra en el estadio de la enfermedad más adecuado.
- Emplear recipientes estériles.

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 6 de 12

9.1 Tipos de muestra

Las muestras utilizadas en el análisis microbiológico se pueden clasificar en tres tipos:

- **Muestras de zonas que albergan flora normal:** Piel, boca, tracto respiratorio, genitales externos, exudados vaginales, uretrales etc. Una muestra de estas zonas tendrá flora normal, lo que debe tenerse presente al valorar los resultados de los exámenes microbiológicos.
- **Muestras de zonas normalmente estériles:** pero cuya secreción o exudación implica el paso a través de una segunda zona que contiene flora normal. A este grupo pertenece la orina, secreciones de vías respiratorias inferiores, etc. Se realiza una toma de muestra lo más aséptica posible que minimice la contaminación por la flora normal.
- **Muestras de zonas normalmente estériles que no son secreciones o exudados:** Sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), etc.

La toma de muestra se realiza por métodos cruentos asépticos y deben tomarse todas las precauciones necesarias para evitar contaminaciones (2).

9.2 Manejo de las muestras

- **Conservación**

Las muestras se deben ser transportadas inmediatamente al laboratorio e inoculadas en el medio de cultivo adecuado, caso contrario deben ser conservadas. Como norma general, las muestras deben ser refrigeradas a 4-6 °C. El período de refrigeración varía con el tipo de muestra. Con la refrigeración se pretende evitar un crecimiento excesivo de flora acompañante y mantener viables los posibles patógenos(3).


	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	

Tabla 1. Conservación de algunos tipos de muestra en microbiología

Nevera (4 °C)	Estufa (37 °C)
Hongos	LCR
Parásitos	Hemocultivo
Micobacterias	
Urocultivo	
Exudados vaginal y uretral	
Exudado de heridas	
Exudados faríngeos y nasales	
Espujo	
Coprocultivo	


Un medio de transporte habitual es el conocido como medio de Stuart: agar semisólido amortiguado que contiene tioglicolato de sodio como agente reductor, mantiene un pH favorable e impide tanto la deshidratación de las secreciones durante su transporte como al oxidación o autodestrucción enzimática de los patógenos presentes y se utiliza para el transporte de exudados faríngeos, conjuntivales, nasales y heridas. Para el transporte de muestras fecales se utilizan el medio de Cary-Blair (2).

Las muestras normalmente asépticas, como la sangre o LCR, deben ser mantenidas en estufa, no refrigeradas. Dado que en estas localizaciones no existe flora normal, se presume que los posibles microorganismos que puedan contener serán agentes patógenos, así que lo que se intenta es favorecer su crecimiento (3).

9.3 Toma de Muestra

1. Orina

- Recoger en un recipiente estéril, tras lavado de genitales externos con abundante agua y sin secar.
- Debe recogerse la orina de primera hora de la mañana despreciando el primer chorro y tomando la orina de la porción media de la micción.
- Indicar en el formato de remisión de muestra si el paciente está sondado.
- Conservar la muestra refrigerada y remitir lo antes posible al laboratorio.

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 8 de 12


En pacientes que se encuentren con sonda vesical, deberá seguirse el siguiente procedimiento:

- Pinzar la sonda por al menos una hora.
- Luego dejar fluir la orina por la sonda desconectada hacia un frasco estéril. En caso exista un dispositivo para uso de jeringuilla este deberá ser empleado para extraer la orina, a través del dispositivo de goma para punción de la sonda.
- Nunca debe obtenerse muestra de la bolsa colectora; tampoco, se debe desconectar la sonda de la bolsa para la recogida de la muestra, ya que la apertura del sistema aumenta el riesgo de infección.
- Si la sonda ha permanecido puesta más de 2 semanas debe cambiarse y se debe obtener para cultivo la primera orina que fluye a través de la nueva sonda. Las muestras obtenidas a través de sondas puestas por un periodo prolongado de tiempo (≥ 2 semanas) están contaminadas con bacterias de la biopelícula por lo que en la orina se encuentran un mayor número de bacterias y en mayores recuentos comparado con la orina obtenida a través de la nueva sonda (4).

2. Esputo

Para disminuir la contaminación superficial de la muestra con la microbiota que coloniza el tracto respiratorio superior y la cavidad oral, se han recomendado algunas medidas a tomar, como la extracción de la dentadura postiza, si se utiliza, y el enjuague de la boca con agua o solución salina estéril, antes de la recogida de la muestra.

- El esputo obtenido por expectoración espontánea debe ser el resultado de un golpe de tos profunda y contener secreciones purulentas representativas del tracto respiratorio inferior.
- Desechar los esputos compuestos por saliva o secreciones postnasales (moco).
- El esputo inducido, obtenido por la inhalación de NaCl al 3% mediante un nebulizador ultrasónico, tiene su principal indicación para la detección de

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	

Pneumocystis jiroveci y *Mycobacterium tuberculosis*. Para el resto de los microorganismos su utilidad es dudosa (5)


3. Exudado Faringo-Amigdalal

- Bajo visión directa, con la ayuda de un depresor lingual, se tocará con un hisopo en todas las partes con exudado, membranas o inflamación. Se deben frotar las criptas tonsilares y la faringe posterior.
- No tocar nunca la mucosa oral, lengua o úvula.
- No realizar la toma si la epiglotis esta inflamada (5).

4. Sangre

La toma de muestras para hemocultivo, deberá realizarse en condiciones extremas de asepsia, para luego ser trasvasada a los frascos específicos de hemocultivo.

- Se obtiene la muestra, previo a la administración del tratamiento y durante los periodos (picos) febriles.
- En general se extrae 1 set de hemocultivos (1 frasco para aerobios y 1 para anaerobios) mínimo.
- Debe utilizarse una vena distinta para cada extracción.
- Se debe utilizar material estéril: guantes y gasas.
- La piel del sitio elegido para la punción debe ser desinfectada adecuadamente con clorhexidina, gasas estériles y alcohol al 70%.
- Extraer la muestra de sangre sin tocar en ningún momento el campo desinfectado. Si fuera necesario palpar nuevamente la vena se utilizarán guantes de goma estériles o se desinfectarán los dedos de la misma manera que la piel del paciente.
- Introducir la sangre en cada frasco (1 aerobio y 1 anaerobio), previamente se debe desinfectar el tapón de goma de los frascos con alcohol al 70%, e inyectar

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 10 de 12

la sangre en cada frasco. Esto cuando se emplee jeringuilla. Caso contrario se tomará la muestra directamente en los frascos de hemocultivo al vacío.


- En caso de sospecha de endocarditis en pacientes febriles, se recomienda realizar de 6 a 9 sets de hemocultivos en los intervalos de 30 a 60 minutos de lugares diferentes de venopunción.
- Para los casos de fiebre de origen a determinar, deben realizarse repeticiones diarias de muestra durante tres días.
- Mezclar suavemente por inversión el contenido de los frascos.
- Mover los frascos para que la sangre y el medio de cultivo se mezclen. Introducir los frascos a 37°C (6).

5. Secreción de Heridas


- El área de lesión debe limpiarse con alcohol al 70%, empleando gasa (no debe usarse algodón).
- Dejar que se seque.
- Tomar la muestra del área purulenta abarcando la mayor parte de material posible para procesar con un hisopo estéril (7).

10. Bibliografía

1. Cercenado E, Cantón R, Sánchez C, Autores C, Guerrero C, Carlos G, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2015;
2. Picazo Coordinador JJ, Piédrola De Angulo G, Elías J, Sánchez G, Luisa M, Centelles GL, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2018;

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 11 de 12

3. Lopez R. Manejo y transporte de muestras en microbiología [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 27]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13018375>
4. Sáenz K. MANUAL DE SERVICIOS-SYNLAB. 2019;
5. Sáinz De Baranda C, Joaquín C, Álvarez B, Blas J, Rafael S, González C, et al. MANUAL DE RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS. 2020;
6. Lopez A. MANUAL DE TOMA DE MUESTRAS DE MICROBIOLOGÍA [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 30]. Available from: https://sectorzaragozados.salud.aragon.es/uploads/documentos/documentos_Manual_Toma_de_Muestras_2017_6208e76d.pdf
7. Benadof DD, Hospital M, del Río R. TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS. 2019;

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS	Página 12 de 12

Anexo 1. Instructivos de Toma de muestras para pacientes.

Recolección de Muestra de Orina

- Recoger en un recipiente estéril de boca ancha.
- Lavar los genitales con abundante agua.
- Recolectar la orina de primera hora de la mañana despreciando el primer chorro y tomando la orina de la porción media de la micción, es decir se debe terminar de orinar en el baño.
- Conservar la muestra en un ambiente fresco y remitir lo antes posible al laboratorio

Es Importante....

- No recolectar la muestra de orina si esta menstruando (Mujeres) y comunicar en el laboratorio




Recolección de Muestra de Espujo

Para disminuir la contaminación superficial de la muestra con microbiota que coloniza el tracto respiratorio superior y la cavidad oral, se han recomendado algunas medidas a tomar:

- Retirar de la dentadura postiza, si se utiliza y lavar de la boca con agua o solución salina estéril, antes de recoger la muestra.
- Recoger la muestra de espujo: escupir en un frasco estéril.
- El espujo obtenido por expectoración espontánea debe ser el resultado de un golpe de tos profunda y contener secreciones purulentas representativas del tracto respiratorio inferior.
- Desechar los espucos compuestos por saliva o secreciones postnasales (moco).






	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 1 de 18


HOSPITAL ONCOLÓGICO "DR. JULIO E. PAREDES C."

SOLCA NÚCLEO DE TUNGURAHUA




PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) Y CEPAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS

Realizado por: Lcda. Diana Vásconez	Validado por: Dra. Mónica Moreno	Revisado por: Dr. Jorge Murillo	Autorizado por: Dr. Yamandú Jiménez
 Firmado electrónicamente por: DIANA CAROLINA VASCONEZ NUELA	 Firmado electrónicamente por: MONICA SUSANA MORENO AVILES		
Licenciada de Laboratorio Clínico	Magíster en Microbiología Clínica	Jefe de Laboratorio Clínico	Director Médico

	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 2 de 18

Contenido

1.	Autores o responsables de elaboración del protocolo	3
2.	Revisores del protocolo	3
3.	Declaración de conflictos de intereses de los (las) autores(as) y de los (las) revisores(as)	3
4.	Justificación	3
5.	Objetivos.....	4
5.1.	Objetivo General	4
5.2.	Objetivos específicos.....	4
6.	Profesionales a quien está dirigido	5
7.	Población Diana	5
8.	Responsables	5
8.1.	Ejecución	5
8.2.	Control.....	5
9.	Definiciones	5
9.1.	Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	6
9.1.1.	Procedimiento de Detección de BLEE	7
9.2.	Producción de Carbapenemasas	8
9.2.1.	Procedimiento de Detección de Cepas productoras de Carbapenemasas.....	9
➤	Test de Hodge modificado (MHT):	9
➤	Test de Ácido Borónico	11
➤	Test ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	13
➤	Prueba de inactivación al Carbapenémico (mCIM).....	15
➤	Prueba de inactivación al Carbapenémico con EDTA (eCIM).....	16
10.	Bibliografía	17

	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 3 de 18

1. Autores o responsables de elaboración del protocolo

- Lic. Diana Vásconez Licenciada de Laboratorio Clínico

2. Revisores del protocolo

- Dra. Mónica Moreno Magister en Microbiología Clínica
Hospital IESS Riobamba
- Dr. Jorge Murillo Jefe Laboratorio Clínico
SOLCA Núcleo de Tungurahua


3. Declaración de conflictos de intereses de los (las) autores(as) y de los (las) revisores(as)

No se declaran conflictos de interés entre la autora y los revisores

4. Justificación

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que aqueja, a nivel global, a diferentes casas de salud. La adquisición de resistencias por parte de numerosos agentes infecciosos supone una creciente amenaza para la salud pública, que preocupa en todos los países, sobre todo en el sector económico. Resulta alarmante la rápida propagación a nivel mundial de bacterias multirresistentes que son causa de infecciones comunes y resistentes al tratamiento con los fármacos antimicrobianos existentes.

Las bacterias Gram negativas constituyen el principal grupo de bacterias multirresistentes a nivel mundial debido a la propiedad de producir enzimas denominadas Betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas, las que confieren resistencia a un gran número de antibióticos betalactámicos incluido los carbapenémicos. La población oncológica se

	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 4 de 18

encuentra vulnerable a las infecciones por Enterobacterias que son positivas para estos mecanismos de resistencia bacteriana.

En el área de oncología del Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua, se encuentran pacientes con mayor riesgo de infecciones debido a la inmunosupresión condicionada por la enfermedad que presentan, así como por el tratamiento con quimioterapia en el que desarrollan distintos grados de neutropenia, lo que les vuelve susceptibles a contraer infecciones. Es frecuente que estos pacientes reciban diferentes esquemas de antibióticos, lo que condiciona presión selectiva bacteriana y favorece el desarrollo de cepas multidrogorresistentes (MDR).

La implementación de este método de resistencia en el área de microbiología en el Hospital SOLCA Núcleo de Tungurahua brindará información oportuna al médico tratante sobre el estado de salud de los pacientes y además proporcionar información que refleje la situación actual del Hospital en perfiles de susceptibilidad de los principales microorganismos que afectan la salud de nuestra población.


5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Detectar las cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Definir los métodos de detección de BLEE y carbapenemasas.

	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 5 de 18

5.2.2. Fundamentar la aplicación de programas de prevención y control de resistencias antimicrobianas.

6. Profesionales a quien está dirigido

- ✓ Tecnólogos médicos (Laboratorio Clínico)

7. Población Diana

Pacientes que acuden al área de Laboratorio Clínico para realizarse exámenes de cultivo y antibiograma y que presentan algún mecanismo de resistencia.

8. Responsables

8.1. Ejecución


Es responsabilidad del personal del Laboratorio Clínico la realización de las pruebas de detección de BLEE y carbapenemasas.

8.2. Control

Es responsabilidad del jefe de laboratorio clínico la vigilancia y control de la ejecución del protocolo.

9. Definiciones

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos. Las infecciones causadas por bacterias

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 6 de 18

multirresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad, asimismo causan un mayor costo por mayor estancia hospitalaria y complicaciones (1).


Los antibióticos constituyen uno de los pilares de la salud según la Organización Mundial de la Salud (OMS). La resistencia de las bacterias a los antibióticos se ha convertido en un problema muy complejo de múltiples causas que se produce en patógenos tanto a nivel comunitario como hospitalario, esta situación ocurre en todos los países sin discriminación alguna, siendo variable en cada zona geográfica, pero es evidente que los países con mayor consumo sean los que presenten mayores índices de resistencia (2).

Las definiciones de resistencia se clasifican según el número y la clase de antibióticos afectados:

- Multirresistencia (MDR): ausencia de sensibilidad a un medicamento en tres o más de las categorías de antibióticos.
- Resistencia extrema (XDR): ausencia de sensibilidad a un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en 2 de ellas o menos.
- Panresistente (PDR): resistente a todas las categorías de antibióticos.

9.1. Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y las monobactamas, pero no las carbapenemes. Se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam(3).

	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 7 de 18


El mecanismo más importante de resistencia a los betalactámicos en las enterobacterias es la producción de estas enzimas. Muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* poseen betalactamasas cromosómicas naturales, probablemente derivadas de las propias proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos móviles, y su producción puede ser constitutiva o inducible (3).

Cuando se realiza el antibiograma es necesaria una disposición estratégica de los monodiscos de antibióticos, de modo tal que se permita la visualización de la presencia de los distintos mecanismos de resistencia. La utilización de multidiscos hace que esto no sea posible y disminuye la probabilidad de comprobar si ese microorganismo presenta portación de BLEE”(4).

9.1.1. Procedimiento de Detección de BLEE

El CLSI ha recomendado el método del doble disco, como técnica estandarizada y confirmatoria (5). Se realiza como el método convencional de difusión en agar, en placas de agar Mueller-Hinton, con un inóculo Mac Farland 0,5 y ensayando 4 discos:

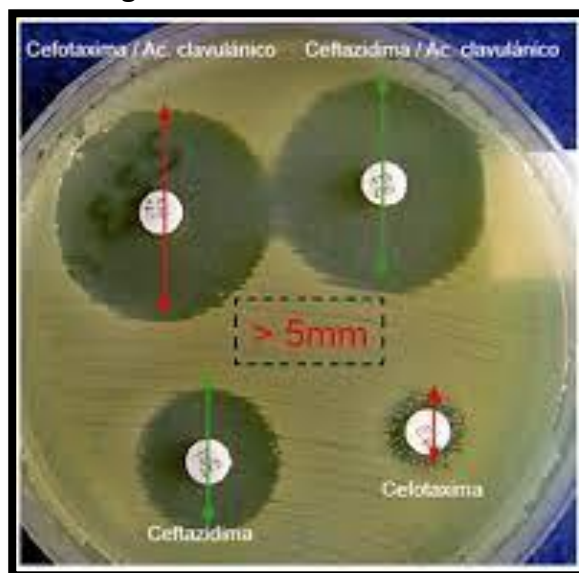
1. Se coloca el disco de ceftazidima (CAZ) y ceftazidima más ácido clavulánico (CAZ + AC) a una distancia mínima de 2.5 mm.
2. Se coloca el disco de cefotaxima (CFTX) y cefotaxima más ácido clavulánico (CAZ + AC) a una distancia mínima de 2.5 mm.
3. Se incuba normalmente en atmósfera normal durante 18 a 24 horas a 37°C.
4. Se miden los halos de inhibición en forma convencional.

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 8 de 18

Interpretación:


La confirmación de la producción o no de BLEE se realiza midiendo el diámetro de inhibición producido por el microorganismo, el cual debería ser mayor o igual a 5 mm. del halo con los discos que contienen la mezcla de cefalosporina y ácido clavulánico en relación al disco de cefalosporina sola.

Imagen 1. Confirmación de BLEE



9.2. Producción de Carbapenemasas

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas (KPC) representan un gran problema por ser uno de los mecanismos enzimáticos que hidroliza a la mayor parte de los antibióticos betalactámicos, entre ellos los carbapenémicos que constituyen la última línea de la familia de los betalactámicos. Los carbapenemes son antibióticos de elección para el tratamiento

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 9 de 18

de infecciones causadas por Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y *Acinetobacter baumannii* (6).


El criterio de sospecha en el antibiograma de la cepa productora de carbapenemasa en enterobacterias mediante método de difusión es el resultado de imipenem y/o meropenem intermedios o resistentes. La resistencia a ertapenem es menos específica para detección de carbapenemasas, puede ser debido en gran medida a otros mecanismos, como impermeabilidad o por hiperproducción de BLEE (7,8).

9.2.1. Procedimiento de Detección de Cepas productoras de Carbapenemasas

Test fenotípicos para confirmación de carbapenemasas en Enterobacterias de acuerdo al CLSI vigente

➤ Test de Hodge modificado (MHT):

1. Estandarizar 0,5 MF cepa E. coli ATCC® 25922. Esta cepa es utilizada como siembra base de la placa por su característica de ser sensible a los carbapenémicos.
2. Diluir 1/10 en suero fisiológico.
3. Sembrar 2 placas agar Mueller Hinton con la cepa E. coli ATCC® 25922 diluida 1/10.
4. Dejar secar entre 3 -10 minutos.
5. Colocar en una placa al centro el disco de meropenem 10µg y en la otra placa el disco de ertapenem 10 µg. No es recomendado el uso de discos de imipenem para esta prueba (CLSI).
6. Con asa 10 µL sembrar en línea hacia el antimicrobiano las cepas en estudio y las cepas controles.
7. Incubar 35 +- 2°C por 16-20 horas.

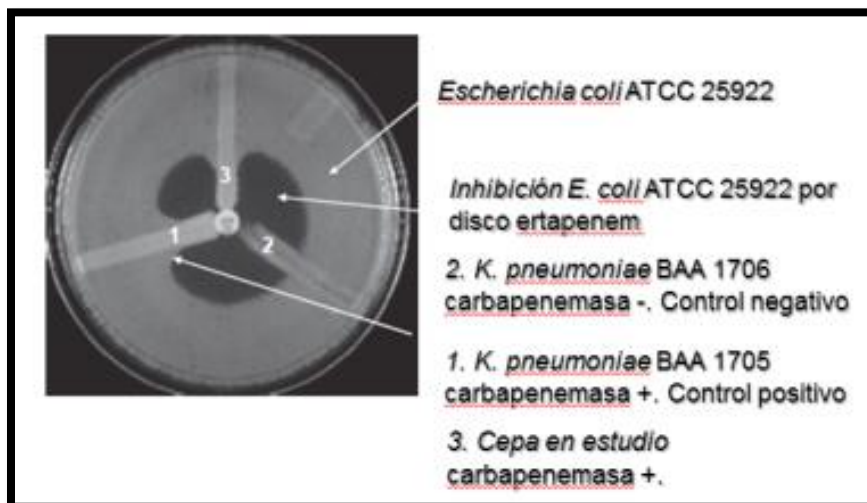
	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 10 de 18


- Control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1705, la cual constituye una cepa productora de carbapenemasas tipo KPC.
- Control negativo *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1706 que corresponde a una cepa resistente a carbapenémicos por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.

Interpretación de los resultados:

Resultado positivo: se observa una formación de punta de flecha por el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC® 25922 en la intersección entre el halo de inhibición (generado por la difusión del antibiótico) y la estría de la cepa productora de carbapenemasa. La carbapenemasa es liberada al medio, permitiendo el desarrollo de la *E. coli*, observándose una hendidura en la parte proximal al disco de meropenem y/o ertapenem

Imagen 2. Test de Hodge



	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 11 de 18

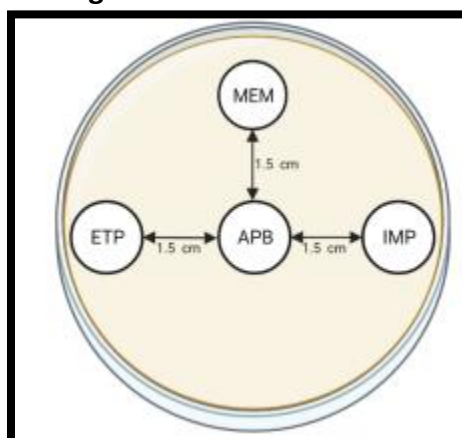
➤ Test de Ácido Borónico


El ácido borónico es un inhibidor selectivo de las carbapenemasas tipo A – serin carbapenemasas (KPC, Sme, Nmc), IMI y GES observándose una sinergia entre el disco de ácido borónico y el antibiótico carbapenémico. Se utiliza discos impregnados con una concentración de 300 µg de ácido borónico. Estos discos pueden ser comerciales o preparados localmente en el laboratorio (impregnación de discos estériles).

El ácido borónico tiene baja especificidad para detectar la presencia de carbapenemasas en cepas que presenten altos niveles de AmpC, como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y en *P. aeruginosa*. El procedimiento de colocación de los discos ácido borónico, se realiza de la siguiente manera:

1. Estandarizar la cepa en estudio a 0,5 Mac Farland.
2. Sembrar placa de agar Mueller Hinton.
3. Colocar los discos de imipenem 10µg, de meropenem 10 µg, ertapenem 10 ug y ácido borónico de acuerdo a esquema.
4. Depositar cuidadosamente a una distancia de 1.5 cm. cada uno.

Imagen 3. Test de Ácido Borónico



	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 12 de 18

5. Incubar a 37°C por 24 horas

Interpretación de los resultados:


El test es positivo cuando se observa sinergia o ensanchamiento del halo de inhibición entre los discos de los carbapenémicos y el disco de ácido borónico, debe haber sinergia como se observa en las imágenes.

Imagen 4. Test de Ácido Borónico



Interpretación de resultados
Carbapenémicos = Resistentes
Sinergia APB-Carbapenémico = Serincarbapenemasa
Sinergia EDTA-Carbapenémico = Negativo

Es muy importante la distancia a la que deben quedar los discos para que sea posible observar el efecto de sinergia. Cuando hay una distancia entre discos, mayor a lo recomendado, no es posible observar el efecto.

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 13 de 18

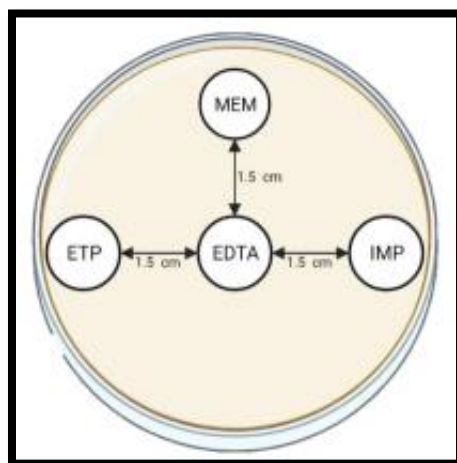
➤ Test ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Es una sustancia utilizada como agente quelante, debido a que tiene la capacidad de combinarse con iones metálicos para formar complejos cíclicos no iónicos, solubles en agua y no disociables.


Los discos impregnados con este compuesto permiten la detección de carbapenemasas del tipo Meta Betalactamasa (MBL), solamente las carbapenemasas de este grupo son inhibidas por esta molécula. La prueba de detección de MBL puede ser usada en Enterobacterias como en *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Estandarizar la cepa en estudio a 0,5 Mac Farland
2. Sembrar placa de agar Mueller Hinton.
3. Colocar el disco de EDTA entre los discos de imipenem, meropenem y ertapenem a una distancia de 1.5 cm.

Imagen 5. Test de EDTA



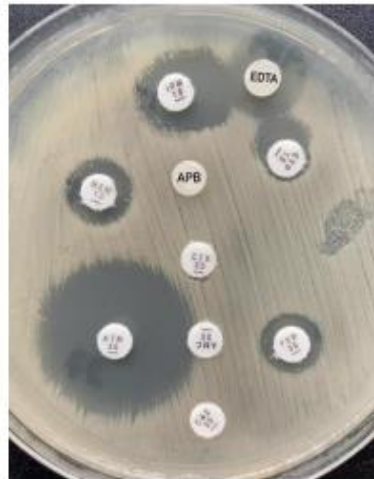
4. Incubar a 37°C por 24 horas.

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 14 de 18

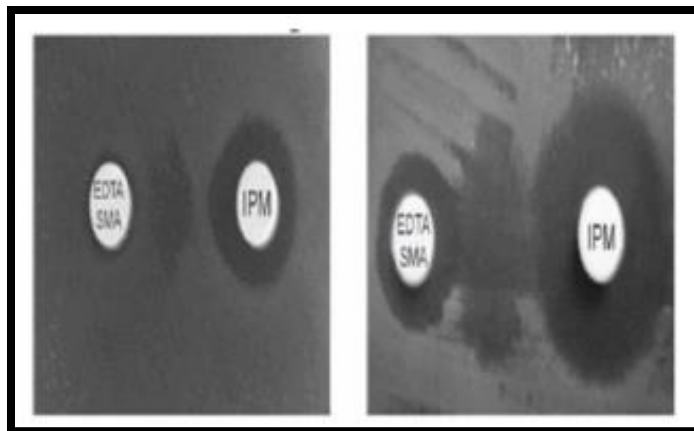
Interpretación de los Resultados:


Resultado positivo cuando se observa una sinergia entre los discos de carbapenémicos y el disco de EDTA, lo que es interpretado como probable presencia de carbapenemasa tipo MBL.

Imagen 6. Test ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)



Interpretación de resultados
Sinergia EDTA-Carbapenémico = Metalobetalactamasa
Aztreonam: Susceptible
Sinergia APB-Carbapenémico = Negativo



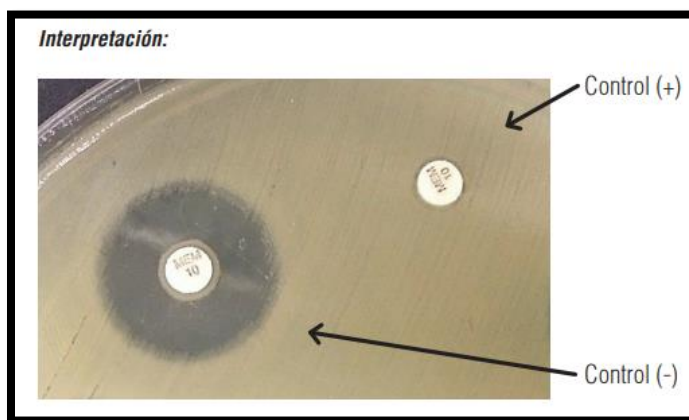
	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 15 de 18


➤ Prueba de inactivación al Carbapenémico (mCIM)

Método para la detección de carbapenemasas que se basa en la inactivación de meropenem, lo que le diferencia de la mayor parte de métodos que utilizan imipenem. Esto puede ser importante en la detección de carbapenemasas en algunas Enterobacterias como *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Moraxella spp.* y *Morganella spp.*, especies que pueden presentar un elevado CIM a imipenem por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas, pudiendo dar resultados falsos positivos o indeterminados con los otros test. Este método está definido para ser utilizado en Enterobacterias.

1. Colocar un disco de 10 ug de meropenem en 2 ml de caldo TSB.
2. Colocar de 2 a 3 colonias de la cepa pura a estudio de 24 horas.
3. Incubar a 37°C por 2 horas.
4. Preparar la cepa E.coli ATCC® 25922 a 0,5 MF e inocular una placa MHA.
5. Dejar secar.
6. Una vez que se cumpla las 2 horas (punto3), retirar con un asa el disco de meropenem del caldo TSB eliminando el exceso del caldo en las paredes del tubo.
7. Colocar el disco en la placa ya seca, de agar Mueller Hinton sembrada.
8. Incubar a 35°C toda la noche

Imagen 7. Prueba de inactivación al Carbapenémico (mCIM)



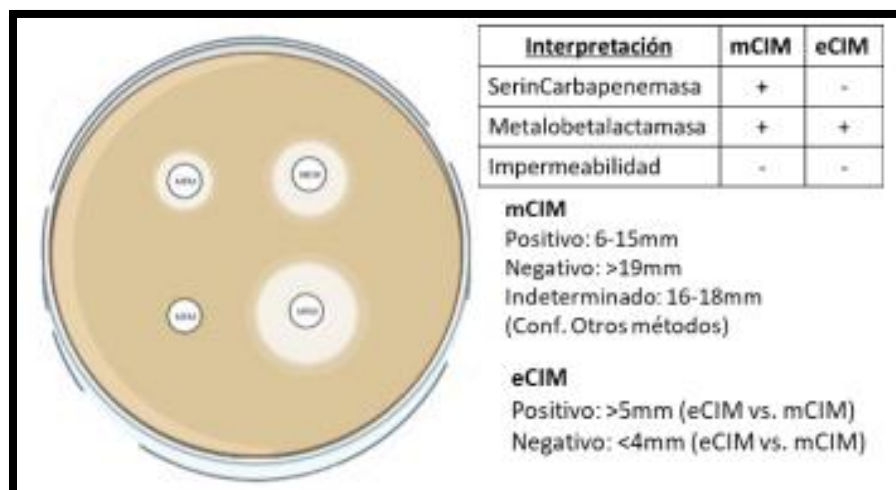
	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 16 de 18


Este método posee una sensibilidad y especificidad superior al 99% para detección de carbapenemasas como: KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM, y OXA. Estudios realizados en OXA-232 en *K. pneumoniae* fueron negativos.

➤ Prueba de inactivación al Carbapenémico con EDTA (eCIM)

1. Colocar un disco de 10 ug de meropenem en 2 ml de caldo TSB.
2. Añadir un disco de 20 ug de EDTA en los 2 mL de caldo TBS + meropenem
3. Colocar de 2 a 3 colonias de la cepa pura a estudio de 24 horas.
4. Incubar a 37°C por 2 horas.
5. Preparar la cepa *E.coli* ATCC® 25922 a 0,5 MF e inocular una placa MHA.
6. Dejar secar.
7. Una vez que se cumpla las 2 horas (punto3), retirar con un asa el disco de meropenem del caldo TSB eliminando el exceso del caldo en las paredes del tubo.
8. Colocar el disco en la placa ya seca, de agar Mueller Hinton sembrada.
9. Incubar a 35°C toda la noche


Imagen 8. Prueba de inactivación al Carbapenémico con EDTA (eCIM)



	Hospital Oncológico “Dr. Julio E. Paredes C”	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 17 de 18

10. Bibliografía

1. Cercenado E. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC.
2. Astocondor L. Betalactamasas: la evolución del problema. Revista Peruana de Investigación en Salud [Internet]. 2018 [cited 2022 Apr 9]; Available from: <http://revistas.unheval.edu.pe/index.php/repis/article/view/224/211>
3. García CS, Pardos De La Gándara M, Javier F, García C. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2010 [cited 2022 Apr 9]. Available from: <http://www.elsevier.es/24/03/2010.Copiaparausopersonal,seprohíbelatransmisióndeestedocumentoporqualquiermediooformato>.
4. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2015 Dec 1;33(10):692–9.
5. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. [cited 2022 Jul 14]; Available from: www.clsi.org.
6. Doi Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America [Internet]. 2019 Dec 12 [cited 2022 Jul 9];69(Suppl 7):S565. Available from: [/pmc/articles/PMC6853760/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31811111/)
7. Organización Mundial de la Salud. Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos Manual para la primera fase de implementación. 2017;

	Hospital Oncológico "Dr. Julio E. Paredes C"	Versión 1.0
	Protocolo de Detección de BLEE y Carbapenemasas	Página 18 de 18

8. INSPI. Centro de Referencia Nacional de Resistencia a Los Antimicrobianos Manual de Vigilancia del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM). 2019;