



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
TECNOLOGÍA MÉDICA
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA**

**“CONCORDANCIA ENTRE LA PRUEBA RÁPIDA Y LA
PRUEBA CONFIRMATORIA DE DISCOS COMBINADOS,
PARA DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO
EXTENDIDO EN HEMOCULTIVOS, EN EL HOSPITAL ALTA
COMPLEJIDAD VIRGEN DE LA PUERTA, AGOSTO –
DICIEMBRE, 2016”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO
TECNÓLOGO MÉDICO EN EL ÁREA DE LABORATORIO
CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

YANG PIERRE WILSON ESPEJO VALDEZ
ASESOR:
Lic. ENMA COTRINA SALCEDO

TRUJILLO- PERÚ

2017

HOJA DE APROBACIÓN

YANG PIERRE WILSON ESPEJO VALDEZ

“CONCORDANCIA ENTRE LA PRUEBA RÁPIDA Y LA PRUEBA CONFIRMATORIA DE DISCOS COMBINADOS, PARA DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN HEMOCULTIVOS, EN EL HOSPITAL ALTA COMPLEJIDAD VIRGEN DE LA PUERTA, AGOSTO – DICIEMBRE, 2016”

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Alas Peruanas.

TRUJILLO – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios, nuestro Señor, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A mis queridos padres: Edita y Joni; por sus consejos, su apoyo incondicional y su paciencia en mi formación personal y profesional.

A mis hermanos: Frank y Yeyson; que más que hermanos, son mis verdaderos amigos.

A mi esposa Sandra; por sus palabras y confianza, por su amor y por brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente.

A mis hijos: Claudia y Rodrigo; por su afecto y su cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo y mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de tesis.

A mi adorado abuelo Santiago Valdez, que siempre me ilumina desde el cielo.

Se Agradece por su contribución para el desarrollo de esta Tesis a:

La Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica y a la plana docente que labora en ella, que con sus enseñanzas y orientaciones hicieron posible mi formación profesional.

Expreso mi sincero agradecimiento a mi asesor, Lic. Tec. Méd. Enma Cotrina, quien con su aporte han hecho posible la realización del presente trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial a todos mis compañeros y amigos con los cuales compartimos gratos momentos de estudio y satisfacciones durante nuestras actividades estudiantiles.

Al personal de Laboratorio del Hospital Alta Complejidad Virgen de la Puerta en especial al Lic. T.M. Ivan Salinas Salcedo, por todos los momentos vividos en la etapa de mi internado, por el aliento que me dieron para poder seguir adelante, y ser como ellos un profesional de éxito.

RESUMEN

Las betalactamasas de espectro extendido son enzimas de configuración plasmídica, producidas por enterobacterias que hidrolizan los antibióticos betalactámicos, incluyendo los que contienen el grupo oximino, como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Los métodos de detección de estas enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) comienzan por una adecuada interpretación de los perfiles de sensibilidad aplicando los criterios habituales de lectura interpretada del antibiograma.

Esta investigación tiene por objetivo determinar si existe concordancia entre la prueba rápida y la prueba confirmatoria de discos combinados y de cuanto sería el porcentaje de dicha concordancia, al margen de los errores que puedan cometer los profesionales de salud para los resultados de dichos exámenes.

El tipo de estudio realizado es descriptivo transversal, las muestras de bacterias fueron tomadas de los pacientes atendidos en el Hospital Alta Complejidad Virgen de la Puerta. La muestra u objeto de estudio fueron 120 frascos de hemocultivos de pacientes hospitalizados.

Los datos fueron procesados a través del programa Excel 2013, previa elaboración de tabla de matriz de datos, así mismo se presentó los resultados en tablas y en gráficos. El análisis de datos se realizó haciendo uso del programa estadístico SPSS versión 23.

Los resultados experimentales muestran que de un total de 120 botellas de hemocultivos, 16 frascos de hemocultivos dieron positivo para betalactamasas de espectro extendido, lo cual al comparar en método rápido para detección de betalactamasas de espectro extendido directo de los frascos de hemocultivos se detectaron de igual manera 16 aislamientos, los mismos que dieron positivo en la prueba confirmatoria, hallando de esta manera una sensibilidad y especificidad del 100%. Según el índice Kappa de Cohen se obtuvo una concordancia perfecta, un grado de concordancia excelente ($K=1.0$) entre ambas pruebas.

Palabras claves: Hemocultivo, gram negativo, gram positivo, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, betalactamasas.

ABSTRACT

Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) are enzymes of plasmidic configuration, produced by enterobacterias that hydrolyze beta-lactam antibiotics, including those that contain oximino group, such as the third and fourth generation cephalosporins. The methods of detention of these enterobacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) beginning by an adequate interpretation of the sensitivity profiles applying the usual criteria in reading interpretation of the antibiogram.

The aim of this investigation is to determinate if there is a concordance between these two methods and how much would be the percentage of this concordance, regardless of the errors that health professionals can make for the results of these exams.

The type of study carried out is cross-sectional descriptive, the bacterial samples were taken from the patients seen in the High Complexity Hospital Virgen de la Puerta. The sample or object of study were 120 bottles of blood cultures of inpatient.

The data were processed through the Excel 2013 program, previous preparation of a data matrix table, that's the same way the results were presented in tables and graphs. The data analysis was carried out using the statistical program SPSS version 23.

The experimental results show that out of a total of 120 bottles of blood cultures, 16 blood culture bottles turned out positive for extended-spectrum beta-lactamases, which when compared in rapid method for detection of direct extended-spectrum beta-lactamases from the blood culture bottles were detected 16 isolates, the same ones that tested positive in the confirmatory test, finding of this way a sensitivity and specificity of 100%. According to Cohen's Kappa index, a perfect concordance was obtained, an excellent degree of concordance ($K = 1.0$) between both tests.

Keywords: Blood culture, gram negative, gram positive, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, betalactamases.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Frecuencia de Enterobacterias productoras de betalactamasas de amplio espectro (BLEE).....	30
Figura 2: Determinación de Sensibilidad y Especificidad.....	31

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1: Frecuencia de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> productores de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	30
Tabla N° 2: Determinación de sensibilidad y especificidad de la prueba rápida para detección de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hemocultivo.....	31
Tabla N° 3: Tabla de contingencia para evaluar concordancia entre la prueba rápida para detección de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y la prueba confirmatoria de discos combinados.....	32

ÍNDICE

	Pág.
CARÁTULA	01
HOJA DE APROBACIÓN	02
DEDICATORIA	03
AGRADECIMIENTO	04
RESUMEN	05
ABSTRACT	06
LISTA DE FIGURAS	07
LISTA DE TABLAS	08
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO 1: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	
1.1. Planteamiento del Problema.....	12
1.2. Formulación del Problema.....	14
1.2.1. Problema General.....	14
1.3. Objetivos.....	12
1.3.1. Objetivo General.....	14
1.3.2. Objetivos Específicos.....	14
1.4. Justificación.....	15
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	
2.1. Bases Teóricas.....	16
2.1.1. Bacteriemia.....	16
2.1.2. Bacilo Gram Negativos productores de bacteriemia.....	17
2.1.3. Betalactamasas de espectro extendido	17
2.1.4. Bacterias productoras de BLEE y complicaciones para el paciente.....	19
2.1.5. Concordancia.....	21
2.1.6. Coeficiente de Kappa de Cohen.....	21
2.2. Antecedentes.....	22

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Diseño del Estudio.....	25
3.2. Población.....	25
3.2.1. Criterios de Inclusión.....	25
3.2.2. Criterios de Exclusión.....	25
3.3. Muestra.....	26
3.4. Operacionalización de Variables.....	27
3.5. Procedimientos y Técnicas.....	28
3.6. Plan de Análisis de Datos.....	30

CAPÍTULO 4: RESULTADOS ESTADÍSTICOS

4.1. Resultados.....	31
4.2. Discusiones de resultados.....	34
4.3. Conclusiones.....	36
4.4. Recomendaciones.....	37

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
--	-----------

MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	41
------------------------------------	-----------

INTRODUCCIÓN

Bacteriemia se define como la presencia de bacterias en la sangre que se evidencia por el aislamiento en un hemocultivo, estas son complicaciones graves lo cual es una de las prioridades del laboratorio clínico debido a que está asociada a una elevada mortalidad que oscila entre el 20%-50%.

La producción de betalactamasas es uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana. Las betalactamasas son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos). Las primeras descripciones de estas enzimas se realizaron poco tiempo después de comenzado el uso de las penicilinas. Con el surgimiento y uso repetitivo de nuevos betalactámicos, penicilinas semisintéticas y cefalosporinas fueron apareciendo nuevas variantes de betalactamasas, hasta que en 1983 se describen por primera vez las llamadas betalactamasas de espectro extendido capaces de inactivar las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima) y el aztreonam. Aunque se han descrito con mayor frecuencia en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, las betalactamasas de espectro extendido pueden ser producidas por cualquiera de las enterobacterias, incluso por los bacilos no fermentadores *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Cada metodología utiliza medios de cultivo específicos para evaluar el crecimiento bacteriano. Estos principios sirven particularmente para diferenciar las subpoblaciones de bacterias (*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*); con lo cual llegamos a comparar para poder saber el nivel de concordancia; de cuanto sería y los errores que pueden cometer el profesional de salud para su realización.

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La detección de la bacteriemia es una de las prioridades del laboratorio clínico debido a que está asociada a una elevada mortalidad que oscila entre 20 % - 50%. Bacteriemia se define como la presencia de bacterias en la sangre que se evidencia por el aislamiento en un hemocultivo. ¹

La incidencia de la bacteriemia depende de la población estudiada 5 – 30 casos por 1000 pacientes hospitalizados, independiente de la edad, sobretodo en pacientes graves con enfermedad de base. ¹

La producción betalactamasas de espectro extendido (BLEE) ha emergido como un importante mecanismo de resistencia entre Gram negativos a nivel mundial. La prevalencia entre aislamientos hospitalarios de *Escherichia coli* y *Klebsiella* sp excede el 20%. ²

Bacteriemia asociada con *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE se reportado con mayor tasa de mortalidad comparado con los aislamientos no productores de BLEE. ^{2,3}

Esta elevada mortalidad está asociada con la demora y no apropiado inicio de tratamiento aumentado con la producción de BLEE no detectada. Esta demora ha demostrado estar asociada con incremento en la estadía hospitalaria y aumento de costos. ^{2, 4} En la práctica rutinaria del laboratorio, el lapso entre la indicación del hemocultivo y el reporte de un aislamiento productor de BLEE toma entre 3 a 4 días. ²

Por lo tanto, es importante desarrollar estrategias para facilitar la detección temprana de aislamientos productores de BLEE en hemocultivos para el inicio de una apropiada terapia, buscando reducir el tiempo para la detección de estas. ⁵

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

1.2.1 Problema General:

¿Cuál es el nivel de concordancia entre la prueba rápida y la prueba confirmatoria de discos combinados, para detectar la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hemocultivos, en pacientes del Hospital Alta Complejidad Virgen de la Puerta, Agosto – Diciembre 2016?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General:

OG. Definir el nivel de concordancia que existe entre la prueba rápida con la prueba confirmatoria de discos combinados, para la detección de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hemocultivos, de pacientes del Hospital Alta Complejidad Virgen de la Puerta, Agosto – Diciembre 2016.

1.3.2 Objetivos Específicos:

OE 1. Analizar la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando la prueba rápida en aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, directamente de hemocultivos positivos.

OE 2. Analizar la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando la prueba confirmatoria de discos combinados, en aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, directamente de hemocultivos positivos.

OE 3. Comparar la prueba rápida y la prueba confirmatoria de discos combinados de hemocultivos positivos en pacientes hospitalizados, con la finalidad de desarrollar estrategias para facilitar la detección temprana de aislamientos productores de BLEE en hemocultivos.

1.4 JUSTIFICACIÓN

La bacteriemia por Gram negativos es de importancia clínica por la severa respuesta inflamatoria y aumento de mortalidad. Dado que las características clínicas pueden no ser suficientes para determinar el pronóstico de la bacteriemia, el tiempo para positividad es crucial, debido a que un resultado positivo de un hemocultivo ayuda a elegir la terapia adecuada. ^{2,6}

Existen medios automatizados como MALDITOF MS que han reducido dramáticamente los resultados en los hemocultivos, identificando especies en menos de dos horas, especialmente en enterobacterias, aun así, el reconocimiento temprano de mecanismos de resistencia como betalactamasas directamente de hemocultivos aún es un reto importante para la elección de la terapia antimicrobiana, adicionando el aumento de costos para el uso de esta tecnología. ⁷

Existe un aumento significativo en la mortalidad de los pacientes con bacteriemia por cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en comparación con los pacientes con bacteriemia por las mismas cepas sin capacidad de producir BLEE, esto fue confirmado por un meta análisis donde se evidenció que la mortalidad cruda fue del 50,9% en los pacientes que presentaron bacteriemia por cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)⁸.

Es por esto que este estudio busca proponer una alternativa para acortar el tiempo en la confirmación de producción de BLEE en aislamientos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, directamente del frasco de hemocultivo positivo, dando un aporte al clínico para elegir una estrategia antimicrobiana adecuada para el tratamiento de la bacteriemia.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 BASES TEÓRICAS:

2.1.1 Bacteriemia

Bacteriemia se define como la presencia de bacterias en la sangre que se evidencia por el aislamiento en un hemocultivo. Estas son complicaciones graves, debido a que los microorganismos invaden el torrente sanguíneo y se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos. La incidencia de la bacteriemia depende de la población estudiada 5 – 30 casos por 1000 pacientes hospitalizados, independiente de la edad, sobretodo en pacientes graves con enfermedad de base. La detección de la bacteriemia es una de las prioridades del laboratorio clínico debido a que está asociada a una elevada mortalidad que oscila entre 20 % - 50%.¹

Los sitios de entrada más comunes para la bacteriemia son tracto genitourinario (25%), tracto respiratorio (20%) y abscesos (10%), mientras que en un 35% de los casos no se conoce con exactitud la fuente de la bacteriemia. Los bacilos Gram-negativos, en particular los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* y *Serratia sp*) y *Pseudomonas aeruginosa* están presentes en más del 50% de las bacteriemias. Estos microorganismos son capaces de colonizar rápida y eficazmente la piel y tracto gastrointestinal de pacientes hospitalizados, lo cual, sumado a su resistencia relativamente alta a los antimicrobianos, se convierten en un factor de riesgo importante.^{9,10}

El choque es la complicación más grave de la septicemia por presencia de productos bacterianos y los componentes defensivos del sistema inmune actúan en conjunto para provocar graves alteraciones en los principales sistemas fisiológicos del hospedero.¹¹

2.1.2 Bacterias Gram Negativas productoras de bacteriemia

Las bacterias Gram-negativas poseen en su pared celular el lipopolisacárido, o endotoxina, el cual ejerce un efecto potente sobre varias funciones fisiológicas. El lipopolisacárido puede ser liberado durante el ciclo normal de crecimiento bacteriano o después de la destrucción de las bacterias por las defensas del hospedero.¹¹

El agente infeccioso más frecuente es *Escherichia coli* la cual es la primera causa de bacteriemia adquirida en la comunidad y la tercera más común en bacteriemia nosocomial.^{12, 13} Aunque se ha visto un incremento de las bacteriemias por otras Enterobacteriaceae, como *Klebsiella sp.*^{13, 14} El tratamiento primordial para ambos tipos de bacteriemias esta principalmente constituido por oximinocefalosporinas.^{13, 15}

2.1.3 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que confieren resistencia frente a todos los antibióticos betalactámicos excepto cefamicinas y carbapenemicos.^{13, 15, 16, 17}

Los elevados niveles de resistencia a los antimicrobianos han incrementado los problemas relacionados con las enfermedades infecciosas, haciéndose cada vez más necesarios el uso de nuevos antimicrobianos, costosos y tóxicos para el paciente.^{17,}

Siendo las BLEE las de mayor trascendencia clínica, codificadas por plásmidos, transposones e integrones. Por lo general, se presenta en bacilos gram negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter sp*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*.¹⁷

La capacidad hidrolítica de la enzima BLEE son las oximino-cefalosporinas como Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima y el Aztreonam, siendo sensibles a las cefamicinas (Cefoxitin, Cefotetan) y carbapenemicos (Imipenem, Meropenem, Ertapenem)^{17, 19} En general las bacterias productoras de BLEE constituyen un problema terapéutico y epidemiológico de gran magnitud.¹⁷

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda como pruebas de tamizaje buscar la disminución de la inhibición en Aztreonam, Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona que permitan sospechar la presencia de BLEE en *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* y como método confirmatorio se emplea Cefotaxima, Ceftazidima con y sin Ácido Clavulánico, siendo esto el método de referencia para la detección fenotípica de BLEE.¹⁷ (Ver imagen 1 en anexos)

2.1.4 Bacterias productoras de BLEE y complicaciones para el paciente

La *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son las productoras de BLEE más comunes a nivel mundial.^{13,14} En estudios no han encontrado diferencias en las tasas de mortalidad comparadas en pacientes con bacteriemias por cepas productoras y no productoras de BLEE.¹³

En tanto otros, han encontrado que los pacientes con bacteriemias por *Escherichia coli* y *Klebsiella sp*, productoras de BLEE presentan una mayor tasa estancia y gasto hospitalario, ^{13, 20} mayor fracaso terapéutico con tratamientos empíricos ¹³ y un mayor requerimiento de UCI ^{13, 21}

En relación a la mortalidad por bacteriemia por cepas productoras de BLEE, los factores de que han mostrado asociación incluyen; retraso de antibioticoterapia apropiada, el tratamiento empírico inadecuado; la edad, el uso de oximinocefalosporinas como tratamiento definitivo, las comorbilidades, el mayor tiempo hospitalario, la neutropenia, el foco no identificado, el shock séptico y la admisión a UCI. ¹³

La producción de BLEE es un factor de riesgo independiente para la mortalidad por bacteriemia, por lo tanto su presencia debe evaluarse tempranamente tras la sospecha diagnóstica y la elaboración de la terapéutica inicial, lo que podría disminuir la mortalidad por esta causa. ¹³

2.1.5. Concordancia

Si dos o más instancias del fenómeno bajo investigación tienen solo una circunstancia en común, la circunstancia en la que concuerdan todas las instancias, es la causa (o el efecto) del fenómeno considerado.

El método de concordancias constituye un razonamiento o inferencia por concordancia se basa en la comparación de las condiciones que han acompañado varias veces la aparición de un fenómeno, es decir las causas que lo provocan. Al referirse al Método de Concordancia, se establece que si A va seguida de a, entonces presumiblemente A es la causa de a.

La palabra presumiblemente se utiliza a propósito, pues es obvio que A no es necesariamente la causa de a aunque siempre la haya precedido. ²¹

2.1.6. Coeficiente de Kappa de Cohen:

El índice kappa relaciona el acuerdo que exhiben los observadores, más allá del debido al azar, con el acuerdo potencial también más allá del azar. El proceso de elaboración del índice es el siguiente: se calcula la diferencia entre la proporción de acuerdo observado y la proporción de acuerdo esperado por azar; si ésta es igual a cero, entonces el grado de acuerdo que se ha observado puede atribuirse enteramente al azar; si la diferencia es positiva, ello indica que el grado de acuerdo es mayor que el que cabría esperar si solo estuviera operando el azar y viceversa: en el caso (ciertamente improbable) en que la diferencia fuera negativa entonces los datos estarían exhibiendo menos acuerdo que el que se espera solo por concepto de azar. Kappa es el cociente entre esa cantidad y el acuerdo máximo que se puede esperar sin intervención del azar. Este índice cumple las características que debe tener una medida de concordancia.

Primero, cuando los observadores son independientes, toma el valor 0; en segundo lugar, alcanza el valor máximo de 1 sólo si hay acuerdo perfecto entre los observadores y, por último, nunca es menor que -1 . ²²

Una escala de interpretación del valor de kappa que considera como aceptable un valor mayor o igual a 0,40 y excelentes los valores superiores a 0,75. ²³

2.2 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.2.1 Antecedentes Internacionales

Un estudio realizado por S. Navon Venezia et al., inocularon botellas de hemocultivos con cepas productoras y no productoras de BLEE logrando identificar, mediante el método confirmatorio de discos combinados, las cepas productoras de BLEE directamente del frasco de hemocultivo, alcanzado una sensibilidad de 95% y una especificidad de 100%, estudio aplicado en Israel – Febrero 2004.²

Un estudio basado en técnicas de biología molecular como el sistema Verigene con la tecnología de microrrayas, se analizó que puede detectar producción de BLEE en enterobacterias con una sensibilidad de 84%, mostrando una reducción del tiempo entre 4 – 9 horas menos en la metodología convencional, estudio realizado por Siu GK et al. en la región de Hong Kong, Octubre 2015.⁹

Una prueba fenotípica comercial rápida para detectar betalactamasas, usando una cefalosporina cromogénica, llamado β LACTA; ha sido evaluada mostrando una sensibilidad de 75% y especificidad de 100%, estudio realizado por Prod'hom G et al., Junio, 2015. Así como otros estudios realizados por Renvoise A et al., 2013 y Morosini M et al., 2014 que reportan una sensibilidad entre 97.5% - 100% para esta metodología, estudios aplicados en la región de Lausanne – Suiza, 2015.⁷

Otro estudio realizado por Doret et al., 2015 usando metodología de MALDI-TOF, espectrofotometría de masas, ha mostrado ser de ayuda para detección bacteriana y en conjunto con la detección rápida y directa de producción de BLEE a través de la hidrólisis del anillo betalactámico de la Cefotaxima, logrando ambas una identificación en 30 minutos,¹⁰ aplicado en Lausanne – Suiza, Marzo 2015.

2.2.2 Antecedentes Nacionales

En el Perú, no hay estudios que han evaluado sobre este tema. Solo hay estudios de frecuencia de BLEE, uno realizado en niños de comunidades rurales de la selva peruana que no se exponen a antimicrobianos, se determinó que las *E. coli* comensales en heces presentaban una tasa de resistencia a ceftriaxona de 0.1% 2002 y de 1,7 % 2005. ¹¹

En una publicación, se ha mostrado que la producción de BLEE en *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* aisladas de hemocultivos de nueve hospitales de Lima durante el 2008-2009 fue de 75,1% y 76,8 %, respectivamente. Además, se demostró que las enterobacterias productoras de BLEE tenían niveles de resistencia mayores a los otros grupos de antimicrobianos, hallazgo que se ha visto en casi todos los otros estudios mencionados. Ninguna cepa fue resistente a carbapenemes. ¹¹

3. METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es de tipo descriptivo transversal.

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño de investigación es no experimental de corte transversal.

3.3. POBLACIÓN

La población está constituida por todos los aislamientos en hemocultivos finitos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, en el laboratorio de microbiología del Hospital de Alta Complejidad Virgen de la Puerta, durante Agosto y Diciembre 2016.

3.3.1. Criterios de Inclusión:

- Hemocultivos que evidencien crecimiento bacteriano sospechoso a bacterias gram negativas.
- Se incluyó un solo aislamiento bacteriano de hemocultivo por paciente.

3.3.2. Criterios de Exclusión:

- Se excluyó los hemocultivos con evidencia de crecimiento bacteriano sospechoso a cocos gram positivos.
- Frascos de hemocultivos con más de 24 horas de evidencia de crecimiento. Incubación prolongada.

3.4. MUESTRA

La muestra está formada por toda la población, por ser una población finita. Los hemocultivos que cumplieron los criterios de inclusión en el tiempo de ejecución participaron en el estudio.

3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable Independiente					
Producción confirmatoria BLEE	Detección de producción de enzimas que hidrolizan los agentes antimicrobianos Betalactámicos. Como resultado la célula es resistente a la acción de los medicamentos Betalactámicos. ²⁵	Un incremento ≥ 5 mm en el diámetro del halo para Cefotaxima o Ceftazidima cuando se prueban en combinación con ácido clavulánico, comparándolo con el diámetro del halo cuando se prueba sin ácido clavulánico, confirma la producción de BLEE. ²⁶	Productor de BLEE No Productor de BLEE	Aislamiento resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas (más no las cefamicinas) y Aztreonam. Aislamiento posiblemente sensible a las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas.	Nominal
Variables Dependientes					
Producción de BLEE por prueba rápida.	Detección de producción de enzimas que hidrolizan los agentes antimicrobianos Betalactámicos, directamente del frasco de hemocultivo, como resultado la célula es resistente a la acción de los medicamentos Betalactámicos. ²	Un incremento ≥ 5 mm en el diámetro del halo para Cefotaxima o Ceftazidima cuando se prueban en combinación con ácido clavulánico, comparado con el diámetro del halo cuando se prueba sin ácido clavulánico.	Probable productor de BLEE Probable No productor de BLEE	Probable aislamiento resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas (más no las cefamicinas). Probable aislamiento sensible a las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y Aztreonam.	Nominal

3.6 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

Se mencionó las dos técnicas a correlacionar: La detección producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) directamente del hemocultivo y la técnica de confirmación para la producción de BLEE de discos combinados.

3.6.1 Detección de producción de BLEE directamente de frasco de hemocultivo:

- Se seleccionó un frasco de hemocultivo positivo (con evidencia de crecimiento bacteriano).
- Después de homogenizar el frasco se procedió a separar una alícuota obtenida por aspiración con jeringa. De esta alícuota se realizó una coloración Gram para determinar si se trataba de un aislamiento de Gram negativo, de ser así se procedió con el siguiente paso.
- Posteriormente con una pipeta automática se inoculó 200uL de la alícuota en una placa de agar Müeller Hinton y se procedió a estriar en forma de tapete.
- Dejamos secar el sembrado por 5 a 10 minutos, para posteriormente colocar los discos de Ceftazidima 30ug, Cefotaxima 30ug, Ceftazidima + Ácido clavulánico 30/10 ug y Cefotaxima + Ácido clavulánico 30/10.
- Incubamos a 35°C a medio ambiente por 16 a 18 horas.

3.6.2 Prueba Confirmatoria Producción BLEE:

- Del cultivo en agar Sangre realizado del frasco de hemocultivo positivo, se procedió a la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.
- Colocamos un disco con Ceftazidima, Ceftazidima - ácido clavulánico, Cefotaxima, Cefotaxima - ácido clavulánico.
- Incubamos a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16 - 20 horas.

3.7 PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

Los datos fueron procesados a través del programa Microsoft Excel 2013, previa elaboración de tabla de matriz de datos, así mismo se presentó los resultados en tablas y en gráficos de barras que ayudan a entender mejor los resultados obtenidos. El análisis de datos se realizó haciendo uso del programa estadístico SPSS de IBM versión 23, a través del análisis estadístico descriptivo.

4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

4.1 RESULTADOS

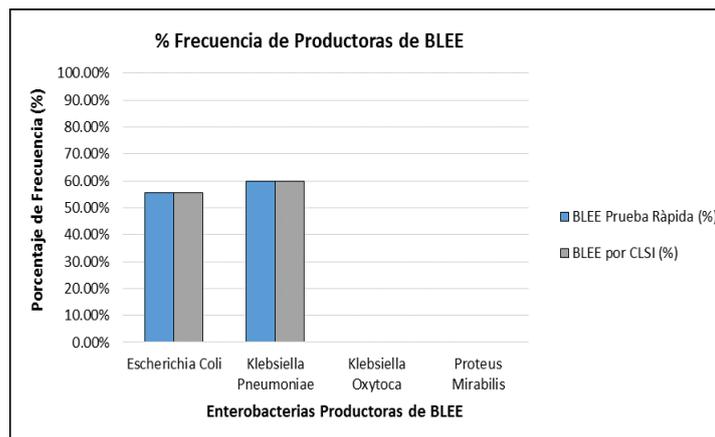
Frecuencia de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* productores de BLEE.

Tabla Nº 1: Frecuencia de Enterobacterias productoras de BLEE

	Total	BLEE por CLSI (%)	BLEE prueba rápida (%)
<i>Escherichia coli</i>	18	10 (55.5%)	10 (55.5%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	6 (60%)	6 (60%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0

Se analizaron 120 botellas de hemocultivos de las cuales se tomó una muestra de 28 botellas que dieron positivo, de bacilos gram negativos (BGN), de las cuales se aplicó la prueba rápida y el método confirmatorio CLSI (gold estándar).

De 28 botellas con bacilos gram negativos, 18 fueron *E. coli* y 10 fueron *K. pneumoniae*. Ahora de estas 18 *E. coli*, solo 10 producían BLEE y 8 no producían BLEE. Mientras *K. pneumoniae* de las 10 que habían, 6 producían BLEE y 4 no producían BLEE. Las demás bacterias no se aislaron durante el periodo del estudio.



La Figura Nº 1: Muestra la frecuencia de Enterobacterias productoras de betalactamasas de amplio espectro (BLEE).

Determinación de sensibilidad y especificidad de la prueba rápida para detección de betalactamasas de amplio espectro (BLEE) en hemocultivos.

TABLA Nº 2: Determinación de sensibilidad y especificidad

PRUEBA CONFIRMATORIA PARA BLEE (CLSI)			
PRUEBA RÁPIDA PARA DETECCIÓN DE BLEE EN HEMOCULTIVOS	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	16	0	16
NEGATIVO	0	12	12
TOTAL	16	12	28

En esta tabla hacemos la distribución de los resultados obtenidos con la prueba rápida en botellas de hemocultivo y la prueba de discos combinados (CLSI) para la búsqueda de betalactamasas de amplio espectro (BLEE). Como podemos ver los resultados 16 son las coincidencias de betalactamasas de amplio espectro (BLEE) positivo tanto por la prueba rápida y la prueba confirmatoria de CLSI, mientras 12 son los resultados que ambos dan negativo. Por lo tanto, si hacemos los cálculos para hallar la sensibilidad según la fórmula sería: $16/16$ por 100 que es igual a 100%.

Si calculamos la especificidad según la fórmula sería: 12/12 por 100 que es igual 100%.

Sensibilidad (S): La sensibilidad se obtuvo de la siguiente ecuación.

$$S = \frac{16}{16} \times 100 = 100\%$$

Especificidad (E): La especificidad se obtuvo de la siguiente ecuación.

$$E = \frac{12}{12} \times 100 = 100\%$$

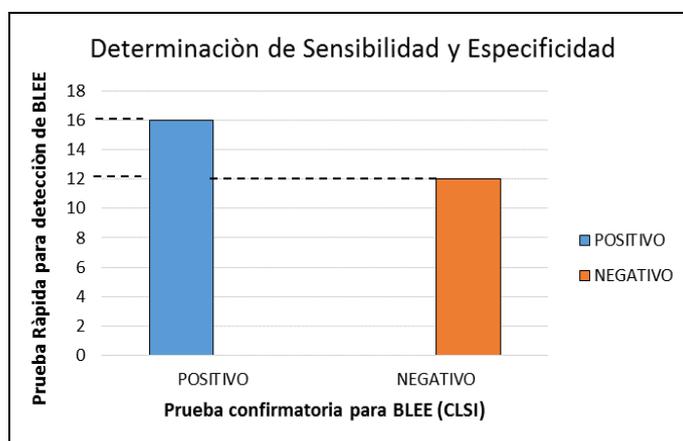


Figura Nº 2: Determinación de Sensibilidad y Especificidad.

La Figura Nº 2: Muestra la determinación de Sensibilidad y Especificidad.

Al obtener el índice Kappa de Cohen se obtuvo una concordancia perfecta, un grado de concordancia excelente ($k=1.0$) entre la prueba rápida para detección de Betalactamasas de Amplio Espectro (BLEE) en botellas de hemocultivo y la prueba confirmatoria del CLSI.

Concordancia entre la prueba rápida para detección de BLEE y la prueba confirmatoria para BLEE por CLSI

TABLA Nº 3: Determinación de sensibilidad y especificidad

PRUEBA RÁPIDA PARA DETECCIÓN DE BLEE EN HEMOCULTIVOS	PRUEBA CONFIRMATORIA PARA BLEE (CLSI)	
	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO	16	0
NEGATIVO	0	12

El Índice kappa de Cohen es una medida de la concordancia entre los dos evaluadores, y se mide como la razón entre las concordancias observadas y esperables al azar, y la máxima concordancia posible (100%) y la esperada al azar, es decir:

$$\kappa = \frac{p_i - p_e}{1 - p_e} = \frac{1.000 - 0.510}{1 - 0.510} = 1.000$$

El grado de acuerdo es excelente.

4.2 DISCUSIONES DE RESULTADOS

Este estudio es el primer realizado en nuestra región por consecuencia la mayor aproximación es la realizada por Navon Venezia et al., quienes reportaron una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98%, coincidiendo con nuestros resultados de manera contundente, la especificidad mayor alcanzada en este estudio es debido a que solo se incluyó en el presente trabajo solamente especies de *E. coli* y *K. pneumoniae sub pneumoniae* los cuales presentan estandarizados sus procesos para detectar BLEE por metodología CLSI, mientras en el trabajo de Navon Venezia incluyó otros bacilos gram negativos entre ellos *Acinetobacter sp* y *Enterobacter sp*.

En comparación con la prueba rápida basada en microarrays, Sistema Verigene desarrollada por Siu GK et al., en la región de Hong Kong, donde hallaron una sensibilidad de 84% entre 4 a 9 horas, esta prueba rápida presentada en este estudio se obtuvo una sensibilidad de 100% aunque se tuvo que incubar 18 horas es un método rápido y barato pues se usan los mismos discos para la confirmación de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Si comparamos con la metodología β LACTA; que se ha reportado una sensibilidad de 75% y especificidad de 100%, sin embargo se necesitan comprar insumos que aumentarían los costos del laboratorio clínico, aun así presentarían problemas de sensibilidad, por lo que para la realidad de nuestro medio, realizar la pesquisa de BLEE mediante la prueba rápida sigue otorgando una mejor sensibilidad y especificidad.

Usando la metodología MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight), espectrofotometría de masas, la cual permite obtener resultados en 2 horas a partir de una colonia bacteriana. Obteniendo una sensibilidad de 99% datos que equiparan al hallado en este trabajo. Sin embargo, al igual que las otras metodologías mencionadas, se necesita adquirir un equipo solo para este propósito, de alto costo, el cual no está al alcance de cualquier laboratorio, manteniendo a la prueba rápida como alternativa para obtener un resultado oportuno de producción BLEE.

Como se mencionó al inicio de este apartado, no hay estudios en nuestro país sobre esta metodología rápida. Los datos descriptivos sobre la elevada frecuencia de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* en nueve hospitales de Lima durante 2008 – 2009, que fueron de 75.1% y 76.8% respectivamente propone esta prueba rápida de fácil aplicación, su gran utilidad en la práctica clínica en la labor diaria del laboratorio de microbiología.

4.3 CONCLUSIONES

1. Luego de haber realizado la presente investigación, concluyo que si existe concordancia entre la prueba rápida para detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y la prueba confirmatoria de discos combinados de las muestras obtenidas de hemocultivos positivos en pacientes hospitalizados; ya que el valor del coeficiente de kappa de Cohen es de 1.000, con grado de acuerdo excelente, siendo un buen método alternativo para la pesquisa, por su alto grado de concordancia y por acortar el tiempo para su detección; por lo tanto, podemos afirmar que la concordancia entre ambos métodos es Considerable.

4.4 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios donde incluyan mayor cantidad de hemocultivos para lograr incluir mayor diversidad de bacilos Gram negativos como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, etc.
- Realizar estudios evaluando otras metodologías automatizadas para hemocultivos diferente a BactAlert (Biomeriux), así como también evaluar la metodología manual de esta manera generalizar el empleo de esta metodología para acortar la búsqueda de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hemocultivos.
- Capacitar a los profesionales de Tecnología Médica que trabajan en los Hospitales de zonas rurales a evaluar esta metodología manual, ya que es un buen método alternativo para la pesquisa, por su alto grado de concordancia y por acortar el tiempo para su detección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández E, Planes A, Rodríguez M. Procedimientos en Microbiología Clínica, Hemocultivos. 2003. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.
2. Navon Venezia S, Ben Ami R, Schwaber M. Protocol for the Accelerated Detection of Extended-Spectrum β Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains From Blood Culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 200 – 202.
3. Kim YK, Lee H, Park SE, Choi EH, Kim J, Kim JH, Kim EC. Bloodstream infections by extended – spectrum β Lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1481-1491.
4. Ibrahim EH, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. Influence of inadequate antimicrobial treatment of blood stream infections on patient outcomes in the UCI setting. *Chest* 2000; 118:146 -155.
5. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended spectrum β Lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1162 – 1171.
6. Kang CI, Song JH, Chung DR, Peck KR, Ko KS et al. Risk factors and pathogenic significance of severe sepsis and septic shock in 2286 patients with gram-negative bacteremia 2011. *J infect* 62 (1): 26 – 33.

7. Prod'hom G, Durussel C, Blanc D, Croxatto A, Greub G. Early detection of extended-spectrum β lactamase from blood culture positive for an Enterobacteriaceae using β LACTA test. 2015. *New Micro and New Infect*; 8:1 - 3.
8. Ferrández O, Grau S, Saballs P, Luque R, Terradas, Salas E. Factores de riesgo de mortalidad en pacientes con bacteriemia por cepas productoras de betactamasas de espectro extendido. 2011. *Rev Clin Esp*; 211(3): 119 – 126.
9. Siu GK, Chen JH, Ng TK, Lee RA, Fung KS, To SW, Wong BK, Cheung S, Wong IW, Tam MM, Lee SS, Yam WC. Performance Evaluation of the Verigene Gram-Positive and Gram-Negative Blood Culture Test for Direct Identification of Bacteria and Their Resistance Determinants from Positive Blood Cultures in Hong Kong. *PLoS One*. 2015 Oct 2; 10.
10. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. *Emerg Infect Dis*. 2015 Mar; 21(3):504-7.
11. García C, Astocondor L, Banda C. Enterobacterias productoras de beta - lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta méd. Peruana*. 2012;29(3).
12. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, Muñoz A et al. Analysis of 4758 Escherichia coli bacteraemia episodes: predictive factor for isolation of an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. 2009. *J Antimicrob Chemother*; 63(3):568 – 74.
13. Adrianzén D, Arbizu A, Ortiz J, Samalvides F. Mortalidad por bacteriemia causada por Escherichia coli y Klebsiella spp. Productoras de beta lactamasas de espectro extendido: Cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú. 2013. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*; 30(1):18- 25.

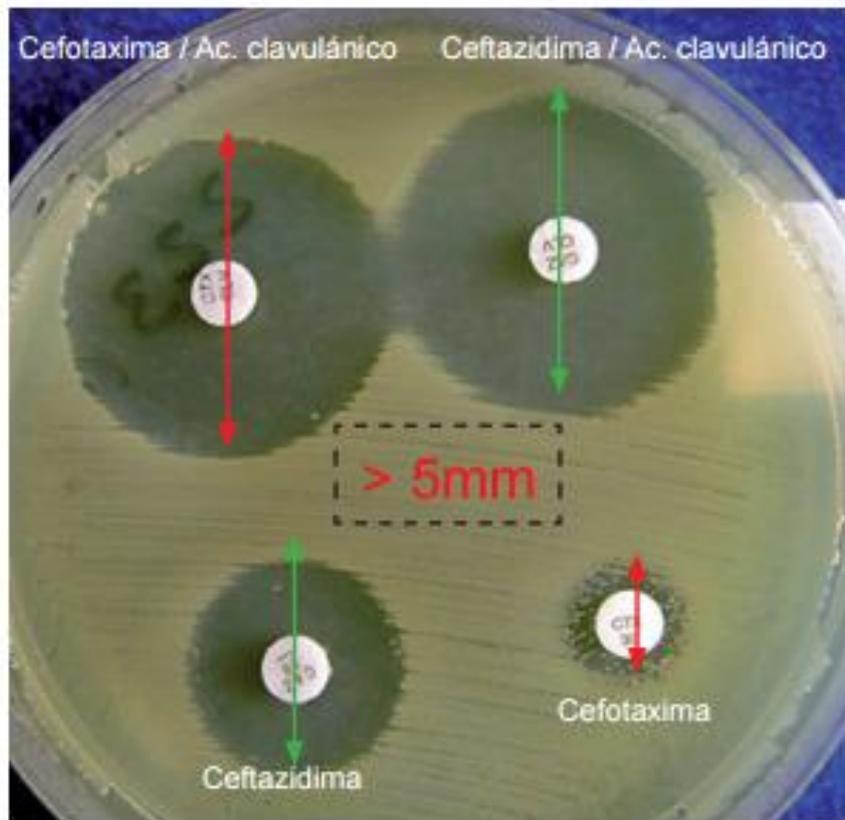
14. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC et al. Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12):4574- 81.
15. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R, Montuori E, Leone F et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob Agent Chemother.* 2006; 50(2):498 – 504.
16. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infec Dis.* 2013; 32 (8): 1162 – 71.
17. Lezameta L, Gonzales E, Tamariz J. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2010. 27(3):345 - 51.
18. Labarca L, Araos R. Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. *Rev Chil Infect.* 2009; 26(1):8 – 9.
19. Paterson DL, Bonono RA. Extended-spectrum beta lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18 (4) 657- 86.
20. Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *L Infect.* 2007; 55(3):254 – 9.
21. Mill. *Methods of Induction: Decision Rules for Casual Inference.* BAAM Science Lessons.

- 22.** Shoukri MM. Measurement of agreement. Armitage P, Colton T, editors. Encyclopedia of Biostatistics Vol. 1. Chichester: John Wiley & Sons; 1998. pp. 103-17.
- 23.** Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33:159-74.

ANEXOS

IMAGEN 1.

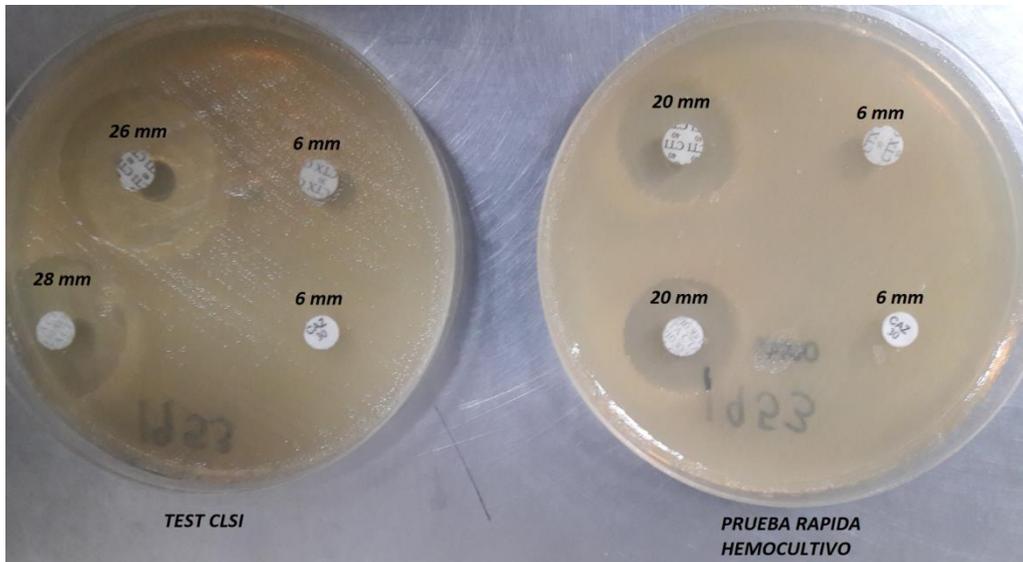
PRUEBA DISCO COMBINADO PARA DETECCIÓN DE BLEE – CONFIRMATORIO



Se observa la diferencia de halo de inhibición entre el disco de Ceftazidima (19mm) y el Ceftazidima/Ácido Clavulánico (30mm). La diferencia entre los discos de Cefotaxima (8mm) y el de Cefotaxima/Ácido Clavulánico (29mm). Una diferencia mayor de 5mm nos confirma la presencia de BLEE.

IMAGEN 2.

RESULTADOS OBTENIDOS ENTRE PRUEBA RAPIDA Y LA PRUEBA DISCO COMBINADO PARA DETECCION DE BLEE (CLSI)



Aislamiento de *Escherichia coli* productora de BLEE, placa a la izquierda fue realizada por la metodología del CLSI prueba confirmatoria, a la derecha tenemos la prueba rápida. Ambos dan un mismo resultado (una diferencia mayor de 5 mm entre el disco solo con su respectivo disco combinado con Ác clavulánico. CAZ: Ceftazidima, CTA: Ceftazidima + Ac. Clavulánico, CTX: Cefotaxima, CTT: Cefotaxima + Ac. Clavulánico.

MATRIZ DE CONSISTENCIA:

PROBLEMA	OBJETIVOS	VARIABLES	DIMENSIONES
<p>GENERAL</p> <p>¿Cuál es el nivel de concordancia entre la prueba rápida y la prueba confirmatoria de discos combinados, para detectar la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hemocultivos, en pacientes del Hospital Alta Complejidad Virgen de la Puerta, Agosto – Diciembre 2016?</p>	<p>GENERAL</p> <p>Definir el nivel de concordancia que existe entre la prueba rápida con la prueba confirmatoria de discos combinados, para la detección de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en hemocultivos, de pacientes del Hospital Alta Complejidad Virgen de la Puerta, Agosto – Diciembre 2016.</p> <p>ESPECÍFICOS</p> <p>O1 Analizar la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando la prueba rápida en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>, directamente de hemocultivos positivos.</p> <p>O2 Analizar la detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando la prueba confirmatoria de discos combinados, en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>, directamente de hemocultivos positivos.</p> <p>O3 Comparar la prueba rápida y la prueba confirmatoria de discos combinados de hemocultivos positivos en pacientes hospitalizados, con la finalidad de desarrollar estrategias para facilitar la detección temprana de aislamientos productores de BLEE en hemocultivos.</p>	<p>Producción confirmatoria de BLEE.</p> <p>Concordancia.</p>	<p>Prueba rápida.</p> <p>Prueba confirmatoria de discos combinados.</p> <p>Nivel de la concordancia obtenida entre ambos métodos.</p>