



Universidad de Panamá
Facultad de Medicina
Escuela de Tecnología Médica



“COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE
Klebsiella pneumoniae PRODUCTORA DE CARBAPENEMASA
(KPC) EN MUESTRAS DE HISOPADOS RECTALES
PROCESADAS EN EL C.H.Dr.A.A.M, AGOSTO A NOVIEMBRE
2013”

Por:

Bravo Ríos, Karina Grissel

Olmos Villegas, Víctor Miguel

INTRODUCCIÓN

- *Klebsiella pneumoniae* bacilo Gram negativo.
- Su importancia se debe a la gran cantidad de factores de virulencia que posee, genes de resistencia que le permiten evadir el mecanismo de acción de los antibióticos.
- Nuestro estudio se llevó a cabo en los meses de agosto a noviembre de 2013 donde evaluamos los hisopados rectales procedentes de pacientes hospitalizados o que ingresaron por el servicio de urgencias al C.H.Dr.A.A.M.

ANTECEDENTES EL PROBLEMA

- *Klebsiella* no es un término nuevo en el campo científico, ya que desde el siglo XIX se habla de ella.



CDC

**CENTERS FOR DISEASE
CONTROL AND PREVENTION**

CDC - CENTRO PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES

- KPC por primera vez fue identificada en los Estados Unidos

1990



- Se logró aislar a la *K. pneumoniae* resistente a carbapenemas en Carolina del Norte

2001



- Primeros brotes en los hospitales de Nueva York.

2004



- Francia

2005



- América del Sur

2006



- Israel se registra un brote

2007



- Puerto Rico

2008



- Brasil

2010





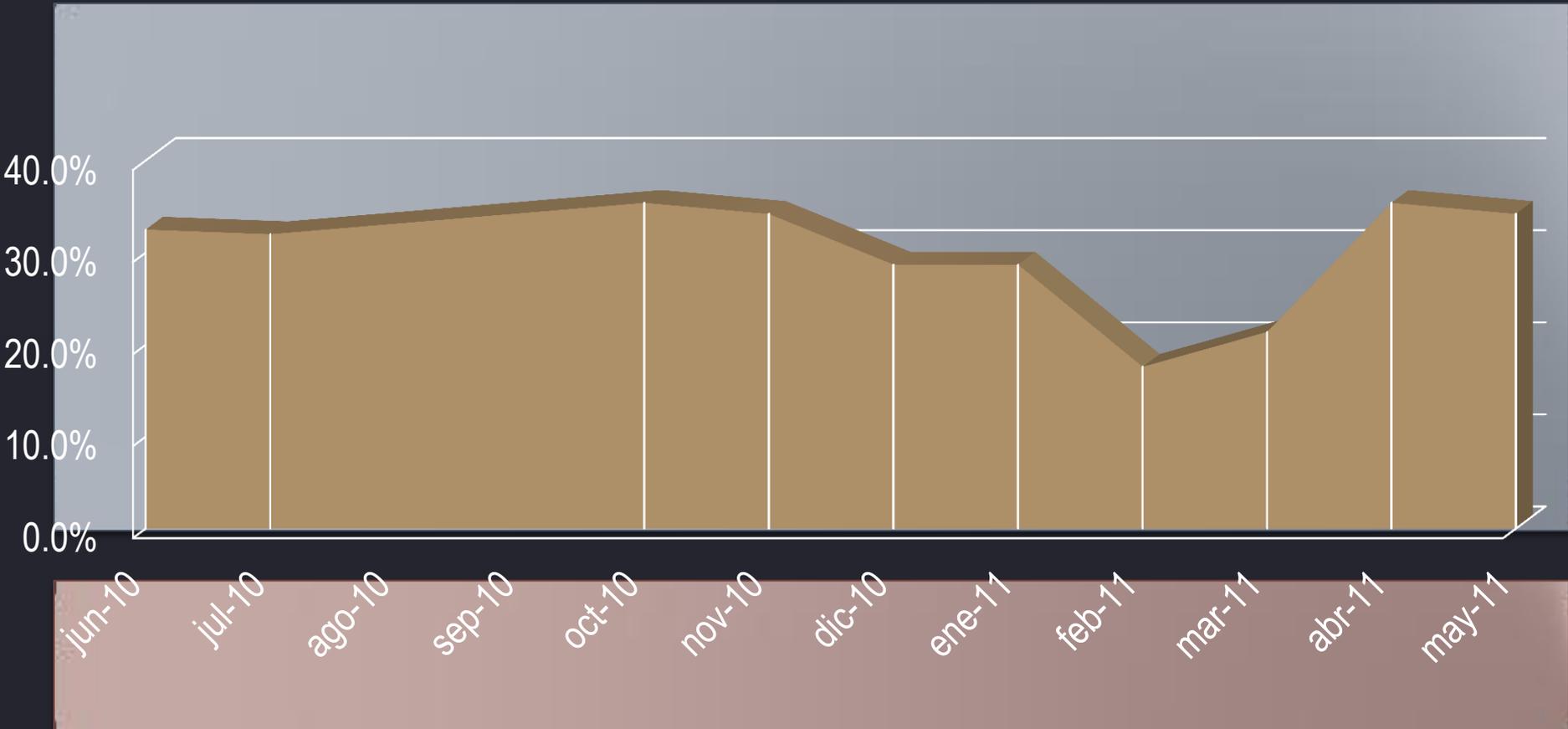
**Instituto Conmemorativo
Gorgas de Estudios de la Salud**

*Líderes de la investigación,
comprometidos con la solución de los problemas de la salud*

2010 - 2011

• PANAMÁ

TASA DE INCIDENCIA DE KPC EN CUIDADOS INTENSIVOS DEL C.H.Dr.A.A.M



KLEBSIELLA PNEUMONIAE

- Inmóviles
- Gram negativas
- Capsuladas
- Fimbrias



Fuente: www.Klebsiella_pneumoniae_mucoide.jpg

PATOGENIA

- Infectan principalmente a inmunocomprometidos y hospitalizados .
- El género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa.

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos se pueden resumir en cuatro categorías:

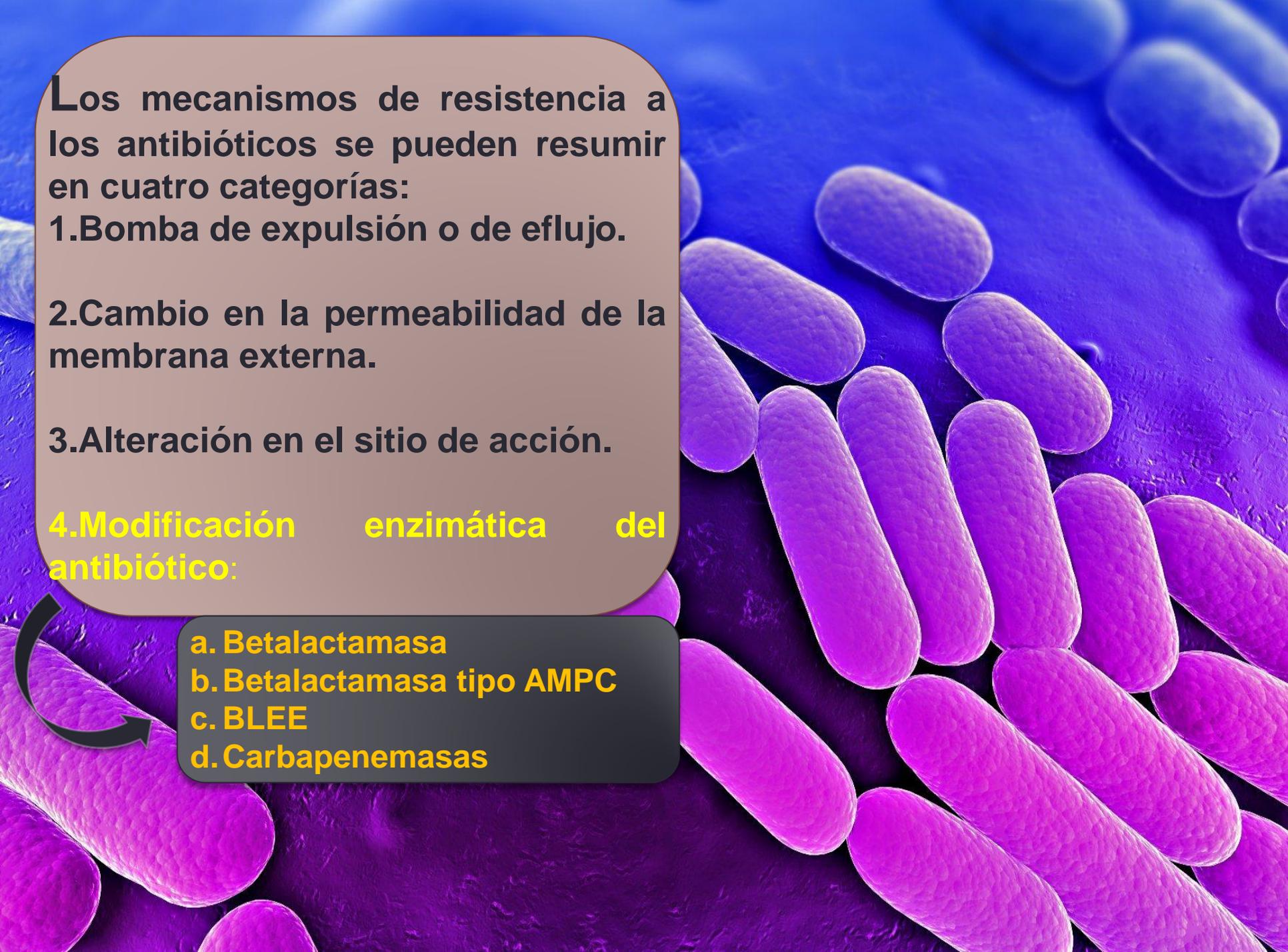
1. Bomba de expulsión o de eflujo.

2. Cambio en la permeabilidad de la membrana externa.

3. Alteración en el sitio de acción.

4. Modificación enzimática del antibiótico:

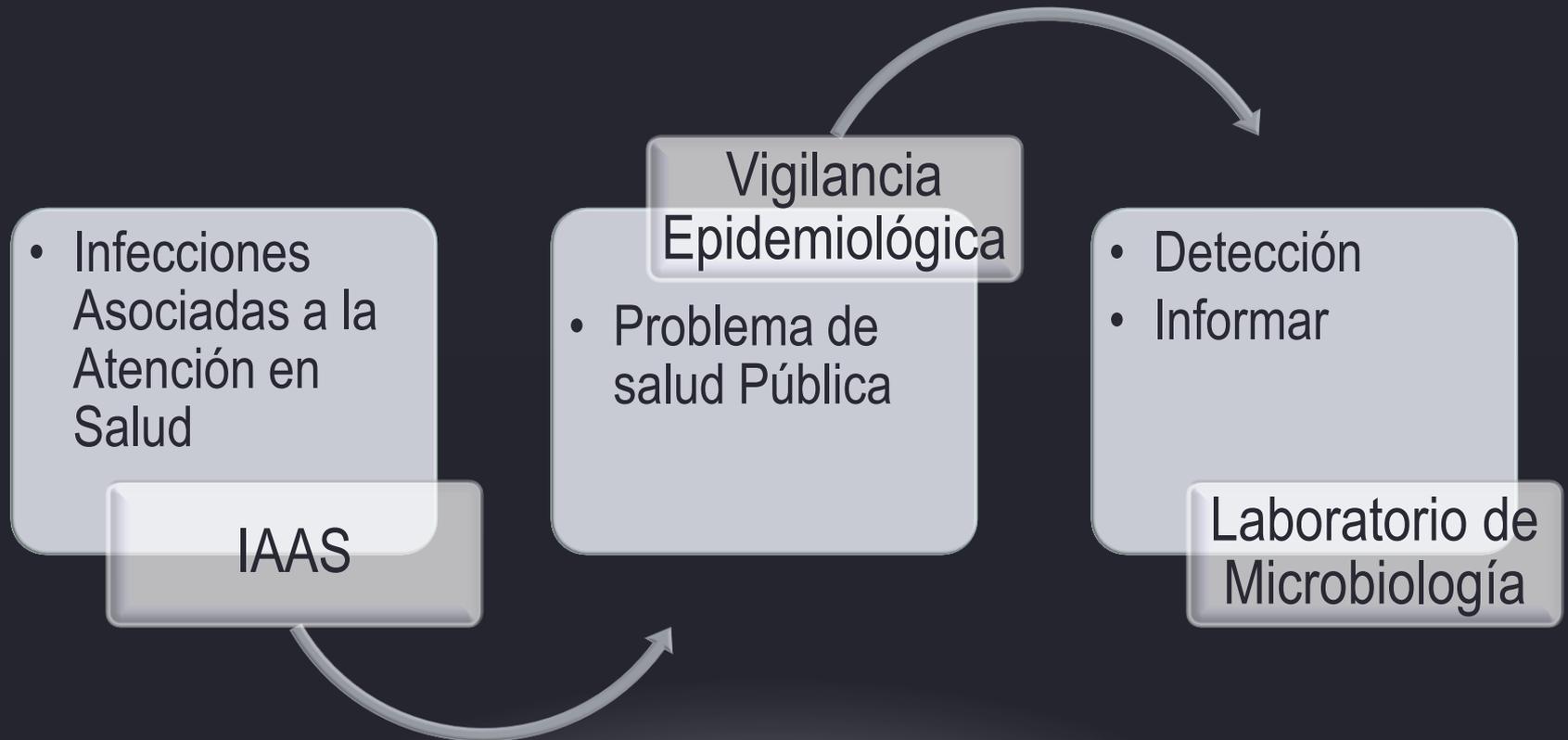
- 
- a. Betalactamasa**
 - b. Betalactamasa tipo AMPC**
 - c. BLEE**
 - d. Carbapenemasas**

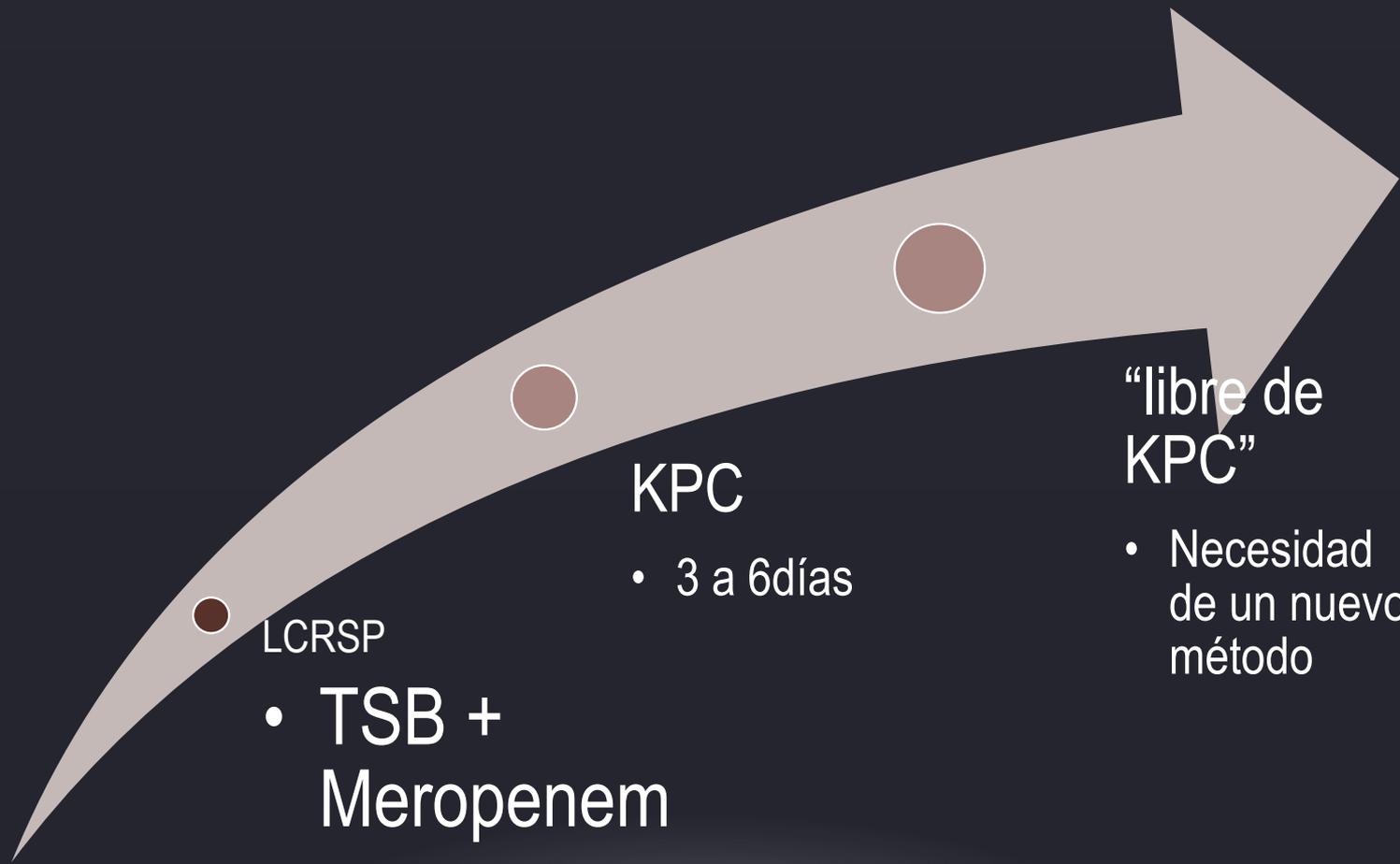


CAUSA DEL PROBLEMA

- La presencia de KPC en Enterobacterias comenzaron a ser exploradas en los últimos años.
- Su presencia en Enterobacterias es un factor independiente de mal pronóstico y que tiene asociada una mayor proporción de fallas terapéuticas e incremento de costos hospitalarios.
- Edwin Klebs planteó en sus estudios que los organismos bacterianos del género "*Klebsiella*" pueden liderar un amplio rango de estados infecciosos como neumonía.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA





OBJETIVOS

- Comparar el método Tripticasa y soya más meropenem con el Método CHROMagar KPC.
- Estimar prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenemasas en áreas críticas.
- Determinar costo-beneficio.
- Calcular sensibilidad y especificidad del método CHROMagar KPC, con muestras de hisopados rectales procesados en el Laboratorio de Microbiología del C.H.Dr.A.A.M de agosto a noviembre 2013.
- Recomendar el método CHROMagar KPC para detectar KPC en muestras de hisopados rectales.

DISEÑO METODOLÓGICO

Área de estudio

Tipo de estudio

Universo
(5333)

Muestra
(186)

Criterios de inclusión

- Hisopados rectales de sujetos de áreas críticas como sala de urgencias, transición, cuidados intensivos y observaciones.

Criterios de exclusión

- Muestras de hisopados rectales que no pertenezcan a las áreas críticas como sala de urgencias, cuidados intensivos, transición y observaciones.

Tipo de muestreo

- No probabilístico.

MATERIALES

➤ **Platos Petri CHROMagar KPC(Biosolutions).**

- Tubos de vidrio con caldo de Trypticase y soja .
- Disco de Meropenem 10ug.
- Platos Petri con agar Mac Conkey.
- Incinerador.
- Hisopo estéril con medio de transporte.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Bolsas plásticas de Bioseguridad.
- Refrigerador 2-6°C.
- Pinzas metálicas.
- Asas metálicas.
- Gradillas.
- Guantes .
- Incubadora 35±2°C.
- Solución Acuosa de NaCl 0.45% a 0.5%, pH 4.5 a 7.0 .
- Densitómetro.

- Micropipetas calibradas.
- Puntillas plásticas desechables.
- Tubos de poliestireno claro de 12x75 mm.
- Tarjetas de identificación, Gram negativas para equipo VITEK 2.
- Tarjetas de sensibilidad, equipo VITEK 2 AST-N058, AST-N249, AST-N174, AST-N250.
- Carruseles VITEK 2.
- Equipo VITEK 2 con Hardware y software incluido.
- Discos de Ácido borónico 10ug.
- Agar Muller Hilton.
- Solicitud de Cultivo.
- Etiquetas con códigos y nombre del paciente.
- Papel toalla.
- Marcador permanente
- Vortex.

PLAN DE PROCESAMIENTO Y RECOLECCIÓN DE DATOS

- A un total de 186 muestras de hisopados rectales provenientes de áreas críticas.
- Se les realizaron las dos técnicas para la detección de KPC en Enterobacterias enfocada a la detección de *K. pneumoniae* (KPC)



CHROMAGAR KPC

(BIOSOLUTIONS, PANAMÁ).



- Se usa para la detección de bacterias Gram negativas, con una susceptibilidad reducida a la mayoría de los agentes de carbapenémicos.

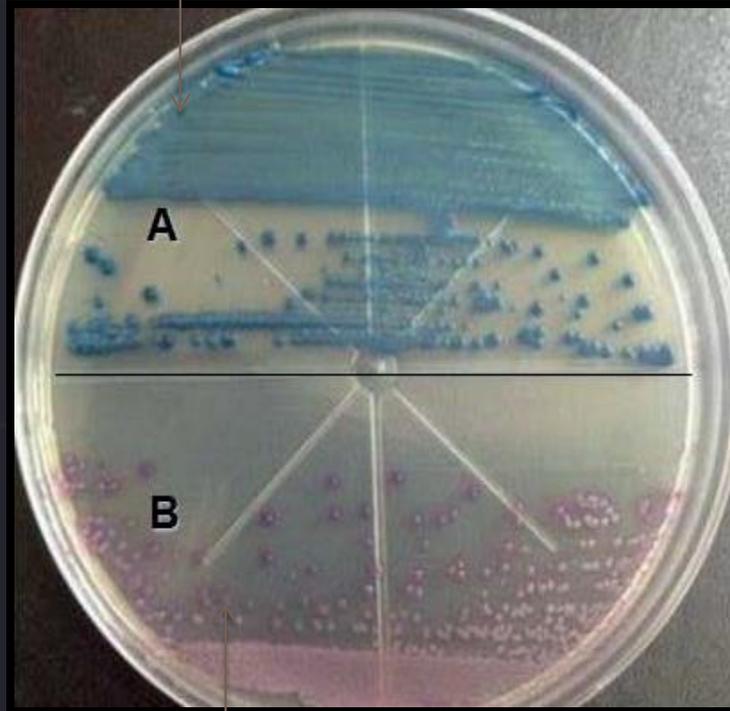
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN CHROMAGAR KPC

	Cepas Carbapenem	Apariencia típica de la colonia
Cepas Carbapenem	<i>Escherichia coli</i>	Rojo oscuro a Rojizo
	<i>Klebsiella spp.</i>	Azul metálico
	<i>Enterobacter spp.</i>	Azul metálico
	<i>Citrobacter spp.</i>	Azul metálico
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Crema o traslúcida
Cepas Carbapenem		Inhibidas
	Cepas Gram positivas	Inhibida
	Levaduras	Inhibidas en su mayoría

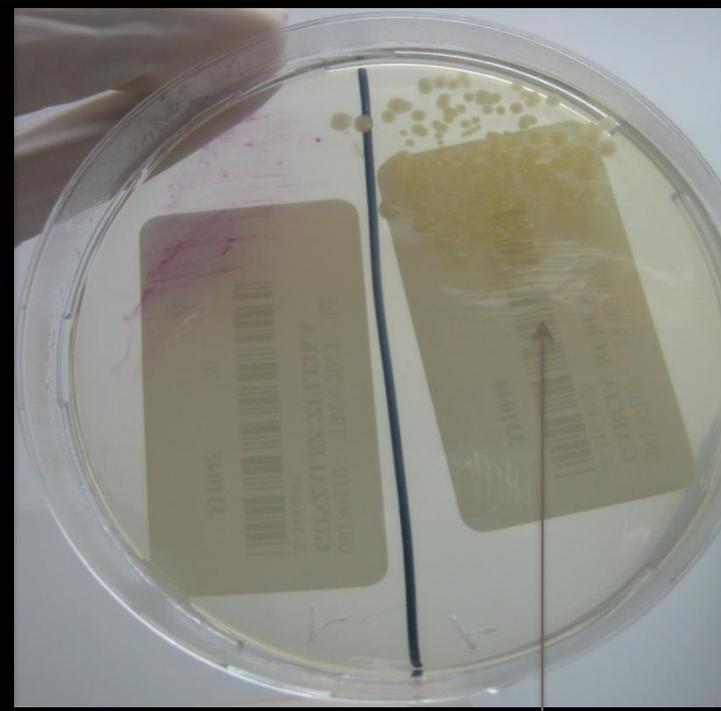


Colonia azul metálico

CRECIMIENTO EN CHROMAGAR



Colonias rojas



Colonias cremas

MÉTODO EN CALDO DE TSB CON MEROPENEM

- Identificar pacientes colonizados con enterobacterias resistentes a agentes carbapenémicos en el tracto intestinal. Los pacientes portadores de estos microorganismos deben ser aislados de contactos para prevenir la transmisión de estas bacterias resistentes.



PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE HISOPADO RECTAL EN TSB CON MEROPENEM

Primer día

- Colocar un disco de meropenem en caldo de tripticasa de soya (TSB). Inocular el hisopo rectal en el caldo de cultivo e Incubar.

Segundo día

- Observar el caldo TSB más Meropenem y evaluar turbidez a las 24 y 48 horas. Pase un agar MacConkey. Incubar

Tercer día

- Examinar el agar MacConkey en búsqueda de colonias fermentadoras de lactosa. Si el cultivo es puro realizar susceptibilidad a carbapenem

Cuarto día

- Lectura / interpretación de la susceptibilidad a los antimicrobianos

PROCESAMIENTO



Verificar datos



Siembra en TSB + Meropenem



Siembra en CHROMagar KPC



Incubación de Trypticase y soja + meropenem y Platos con CHROMagar KPC.



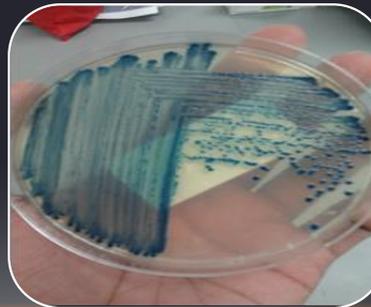
Evaluar la turbidez



VITEK



Crecimiento de colonias mucosa

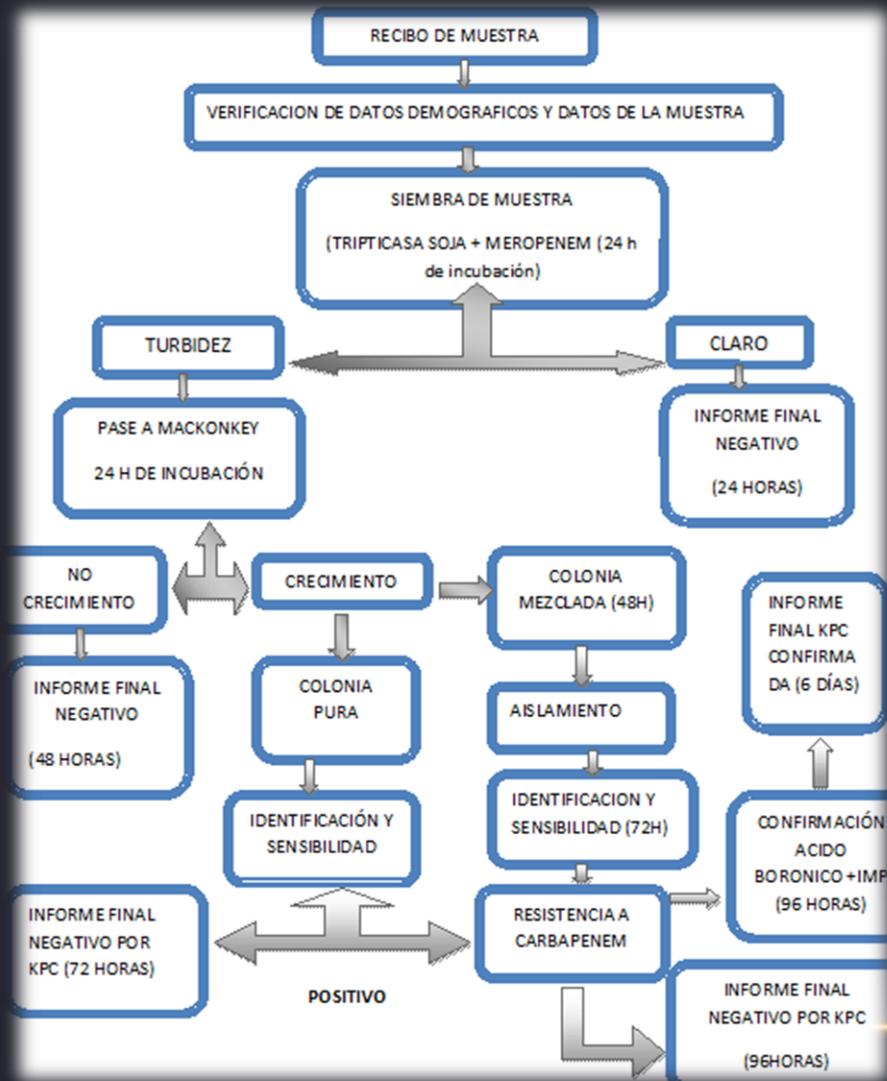


Crecimiento de colonias azul metálico

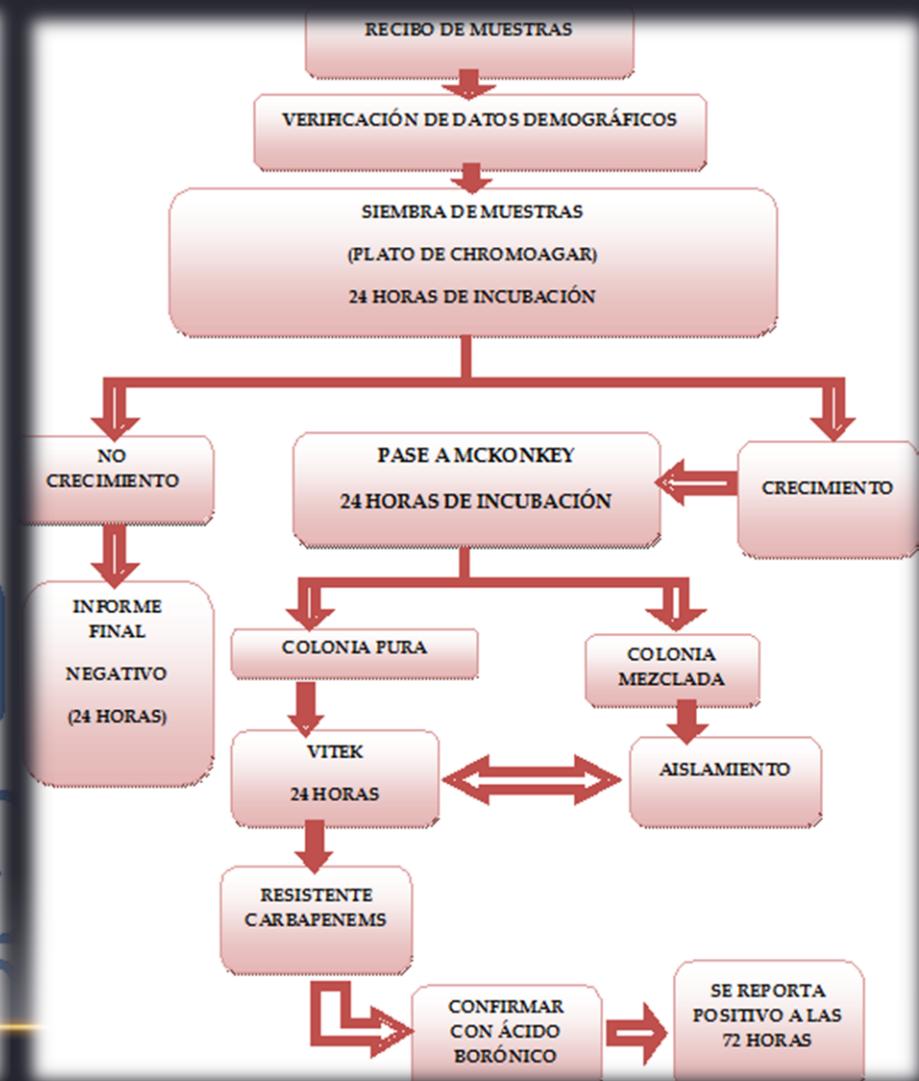


Confirmación con ácido borónico

PROTOCOLO PARA EL PROCESAMIENTO DE HISOPADOS RECTALES EN LA SECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA DEL C.H.Dr.A.A.M.

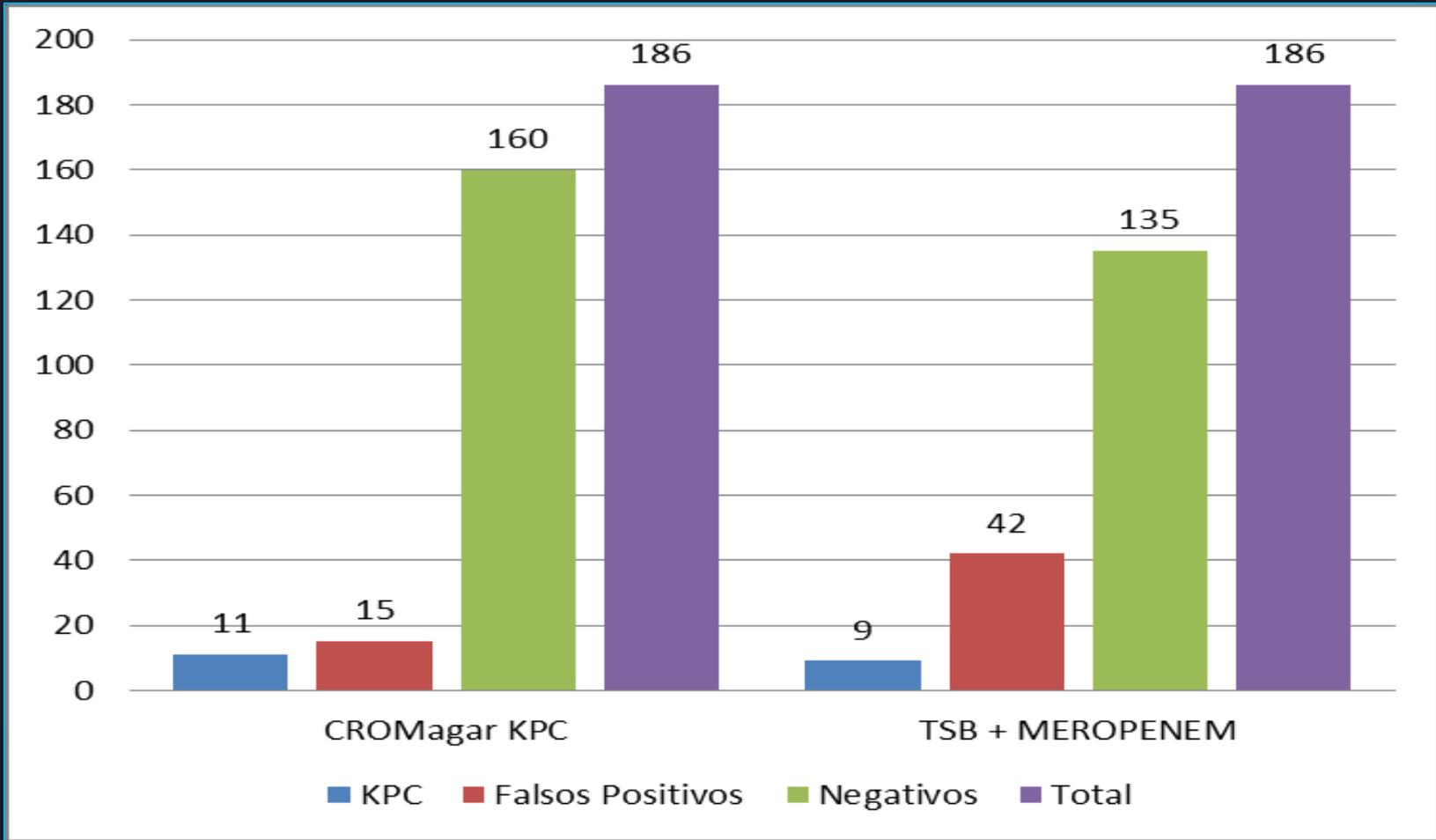


TRIPTICASA SOJA + MEROPENEM



MÉTODO CHROMagar KPC

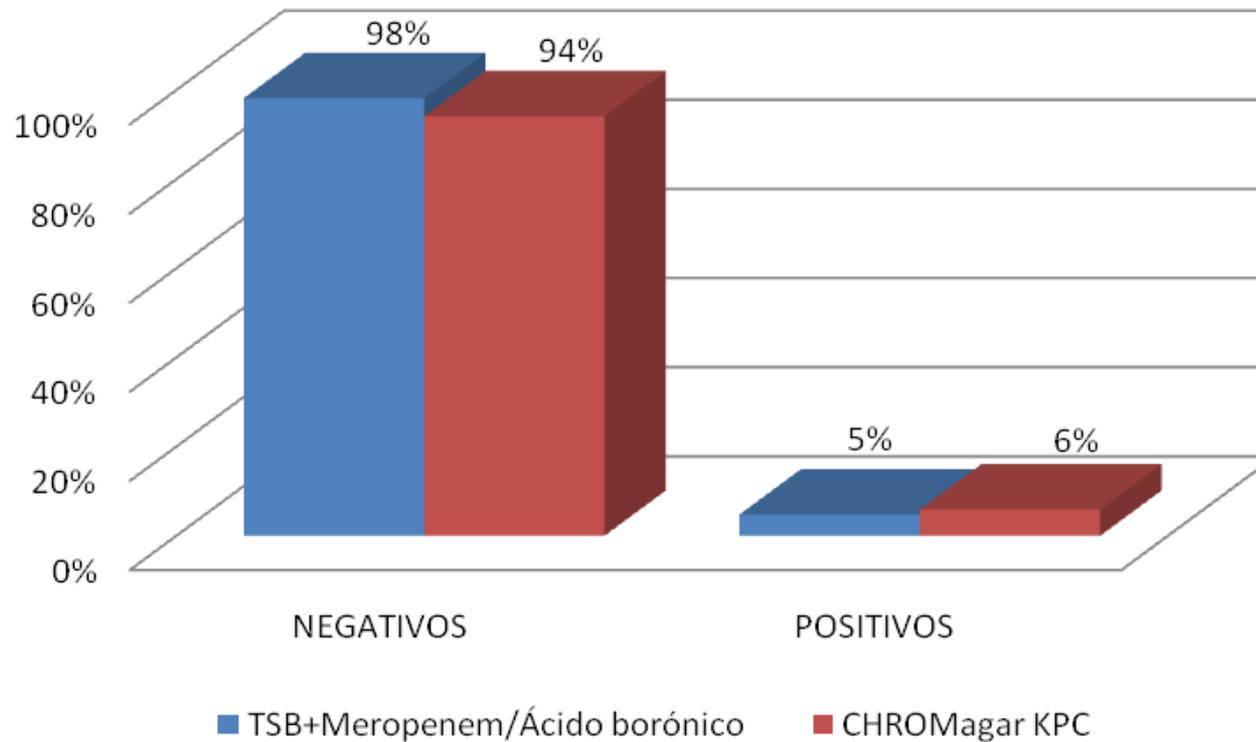
COMPARACIÓN DEL AISLAMIENTO DE COLONIAS KPC EN METODO CHROMAGAR KPC Y TSB CON MEROPENEM



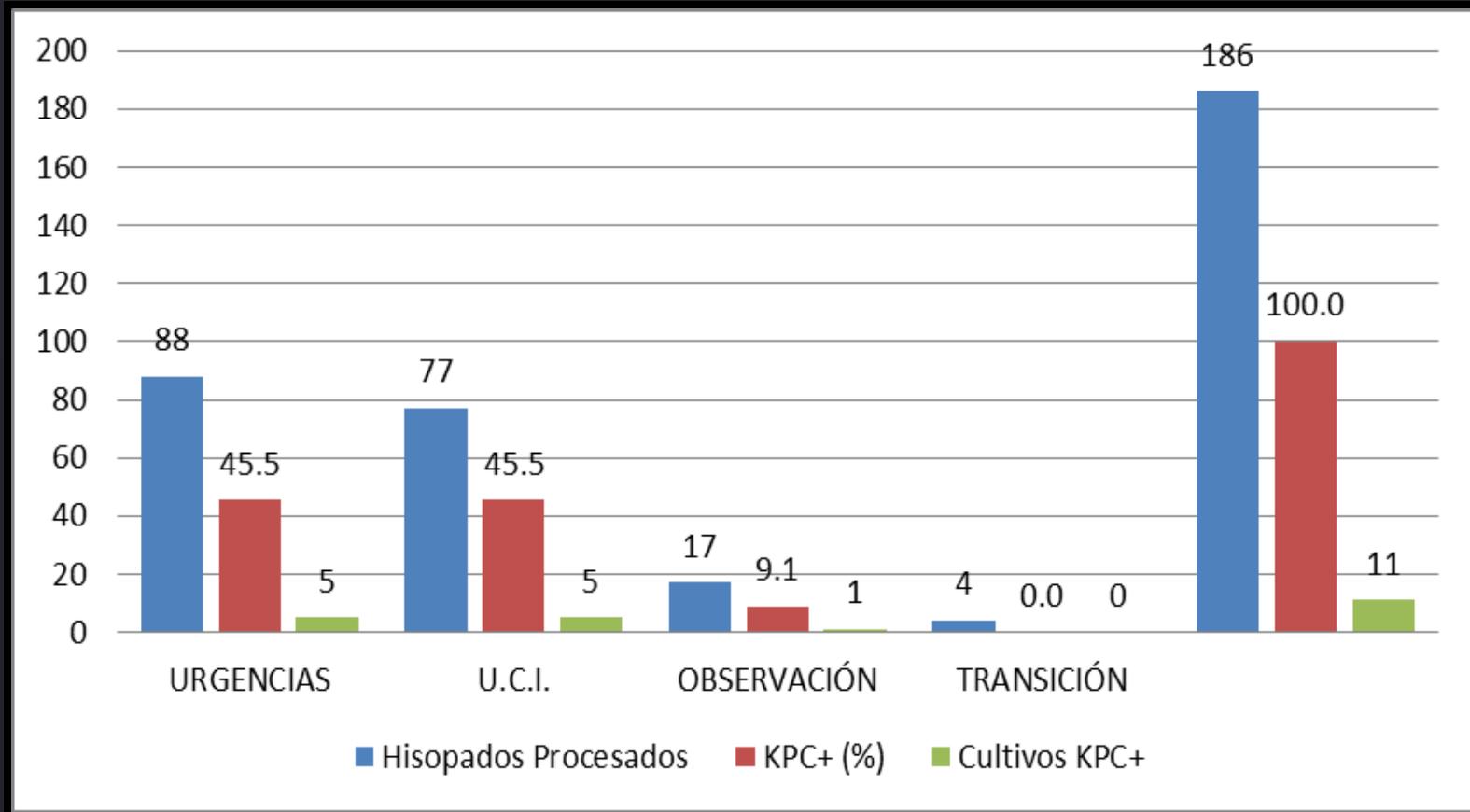
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE KPC

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
TSB + Meropenem /Ác. Borónico	82%	76%
CHROMagar KPC	100%	91%

COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS ESTUDIADAS



ÁREAS HOSPITALARIAS DE ALTO RIESGO PARA LA DISEMINACIÓN DE KPC, DONDE FUERON OBTENIDAS LAS MUESTRAS PROCESADAS DE AGOSTO – NOVIEMBRE 2013.



ANALISIS COSTO - BENEFICIO

	TSB + Meropenem	CHROMagar
Mano de obra (846.00 mensual)	0.96 ¢/min	0.74¢/min
Insumo para la toma de la muestra	0.35¢	0.35 ¢
Plato petri	0.18 ¢	0.18 ¢
Reactivos		
TSA	0.68 ¢	-----
Discos	1.50 \$	1.00 \$
MacConkey	0.68 ¢	0.68 ¢
Muller Hilton	0.68 ¢	0.68 ¢
CHROMagar	-----	2.96
Total	5.03\$	6.59\$

DISCUSIÓN



Ventajas en la detección de bacterias productoras de carbapenemasas, entre ellas podemos mencionar: una mayor recuperación de aislamientos de KPC, en menos tiempo y la menor cantidad de falsos positivos.

El método CHROMagar KPC posee propiedades inhibitorias y selectivas, lo cual garantiza la selección de las cepas de interés clínico. Con este método podemos evaluar distintas especies de bacterias productoras de carbapenemasas lo cual enriquece nuestro sistema de vigilancia, ya que no solamente la *K. pneumoniae* posee estas enzimas.

Referente al método TSB con meropenem, es importante mencionar que la forma de interpretación a través de la turbidez del caldo puede resultar subjetiva y de este modo se escapan algunas bacterias resistentes y de lento crecimiento.

En ambos métodos es necesario realizar pruebas confirmatorias antes de hacer el reporte final. Para ellos se utiliza el VITEK 2 y el método de referencia de Ácido Borónico que es el método recomendado por la OPS.

El método CHROMagar KPC mostró mayor sensibilidad y especificidad que el método de referencia, y con estos resultados podemos afirmar que el método permite mayor recuperación de Enterobacterias productoras de carbapenemasas y que puede ser utilizado para vigilancia epidemiológica.

Un aspecto importante al momento de introducir una metodología nueva es el factor costo beneficio. Para evaluar este factor se consideraron aspectos necesarios para la realización de ambas pruebas.

CONCLUSIONES

Demostramos el método CHROMagar KPC con el método TSB más meropenem, el primero demostró ser más rápido, sencillo, eficiente y eficaz en la detección de *KPC*.

La prevalencia de *KPC* en las áreas hospitalarias de alto riesgo fue estimada, siendo Urgencia y Cuidados Intensivos las más probables para la diseminación de *KPC*.

Estimamos el costo – beneficio siendo el método por TSB más meropenem más económico, en cuanto al método CHROMagar *KPC* que resultó ser más costoso, pero a largo plazo involucra una disminución de la estadía de los pacientes en el hospital.

RECOMENDACIONES

En la detección de KPC el tiempo cobra un factor importante en la toma de decisiones y en la prevención de la diseminación de cepas resistentes.

Al implementar el CHROMagar KPC se deberían utilizar diversos métodos para el control de calidad, utilizando cepas de referencia para controlar la efectividad del medio.

La búsqueda rigurosa de bacterias multiresistentes requiere de técnicas reproducibles, por tal razón es de gran importancia establecer estándares de calidad.

Promovemos la utilización del método de CHROMagar KPC en las instalaciones de salud, tomando en cuenta las necesidades y los requerimientos del laboratorio y del centro de salud u hospital

Siendo estas la capacidad de inhibir bacterias de la flora normal; estandarizando el tiempo de lectura para así poder recuperar bacterias de lento crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina
Universidad de Panamá.
 - Laboratorio de Microbiología, C.H.Dr.A.A.M
 - Biosolutions, Panamá

Muchas
Gracias!

