
	Cultivos de vigilancia de Enterobacterias productoras de carbapenemasa	
	Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública Ministerio de Salud Pública. URUGUAY	

1. Objetivo

Identificar pacientes colonizados con Enterobacterias productoras de carbapenemasa (EPC) en el tracto gastrointestinal.

2. Introducción

Las EPC usualmente son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos así como a otras clases de agentes antimicrobianos, situación que limita las opciones de tratamiento en pacientes infectados con EPC. En el mundo se han comunicado brotes de EPC en hospitales, siendo los pacientes colonizados la fuente de transmisión principal, hecho que hace fundamental su identificación para la prevención y control de infección.

La resistencia a carbapenemes en Enterobacterias aparece cuando:

- El aislamiento adquiere una enzima carbapenemasa.
- El aislamiento produce otras β -lactamasas (BLEE, AmpC) que al hiper-producirse o combinarse con otros mecanismos, confieren resistencia a los carabapenemes.

El mecanismo de carabapenemasas es el de mayor importancia epidemiológica y clínica por ser fácilmente transmisible, conferir resistencia clínicamente significativa y estar asociado a alta mortalidad. Por lo tanto, su detección en el Laboratorio es fundamental.

3. Procedimiento



3.1 Muestra, transporte y conservación

Hisopado rectal en tubo con medio de transporte (Medio Stuart), que debe ser enviado dentro de las 24 horas posteriores a la toma de muestra. En caso de no disponer de medio de transporte, enviar la muestra **inmediatamente** al laboratorio.

Para realizar el hisopado introducir el hisopo en el recto y rotarlo por unos segundos. Al retirar el hisopo comprobar presencia de tonalidad amarillenta.

3.2 Siembra y seguimiento

Día 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar un disco de meropenem de 10 μg en 5 ml de Caldo Trypticase Soya (TSB) o Caldo Cerebro Corazón (BHI). (*) 2. Inmediatamente introducir el hisopo con la muestra. 3. Incubar de 16 a 24 horas a 35 $^{\circ}$C \pm 2 $^{\circ}$C, en aire ambiente.
Día 2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mezclar y subcultivar 100 μl del caldo incubado en Agar MacConkey, Agar CLED o Medio cromogénico. 2. Estriar aislando a los efectos de obtener colonias aisladas. 3. Incubar de 16 a 24 horas a 35 $^{\circ}$C \pm 2 $^{\circ}$C, en aire ambiente.

	Cultivos de vigilancia de Enterobacterias productoras de carbapenemasa	
	Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública Ministerio de Salud Pública. URUGUAY	

Día 3	1. Examinar las placas en busca de los diferentes tipos de colonias que correspondan a bacilos Gram (-). 2. Aislar cada morfotipo en un medio no selectivo. 3. Si el cultivo se encuentra puro proceder según lo establecido en el día 4.
Día 4	Proceder según esquema.

(*) Miembros de la Tribu Proteae pueden presentar elevados valores de CIMS a imipenem por mecanismos diferentes a la producción de carbapenememasas. Utilizando discos de meropenem se logra una mejor selección de las cepas probablemente productoras de carbapenememasas.

3.3 Control de calidad

La potencia de los discos de carbapenemes utilizados debe ser controlada siguiendo el protocolo establecido por CLSI (documentos M2 y M100).

3.4 Aseguramiento de la calidad

La capacidad de recuperación de EPC debe ser controlada por el siguiente procedimiento:

- Inocular un primer caldo (5 mL de TSB o BHI + un disco de Meropenem 10 µg) con un hisopado rectal de un paciente negativo.
- Inocular un segundo caldo en las mismas condiciones y agregar 0,5 mL de una suspensión 1×10^5 UFC/mL de una cepa control productora de carbapenemasa (por ejemplo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705).
- Aplicar el procedimiento descrito en 3.2.



La cepa control debe ser recuperada del subcultivo del segundo caldo y no del primero.

Preparación de la suspensión 1×10^5 UFC/mL de un aislamiento productor de carbapenemasa:

1. Diluir 0,1 mL de una suspensión 0,5 McFarland del aislamiento productor de carbapenemasa en 9,9 mL de agua destilada estéril o solución salina estéril (Dilución 1:100).
2. Agregar 1,0 mL de la dilución anterior a 9,0 mL de agua destilada estéril o solución salina estéril (Dilución 1:1000).

3.5 Limitaciones del método

- Los pacientes pueden estar colonizados con EPC en concentraciones inferiores al límite de detección de este método (1×10^2 UFC/mL a 1×10^6 UFC/mL). Por lo tanto es posible la no detección de pacientes colonizados.

	Cultivos de vigilancia de Enterobacterias productoras de carbapenemasa	
	Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública Ministerio de Salud Pública. URUGUAY	

- Las Enterobacterias pueden ser resistentes a los carbapenemes por mecanismos diferentes a la producción de carbapenemasa. Este tipo de aislamientos también crecerán en los medios en los cuales se realice el subcultivo del caldo.
- Los bacilos gramnegativos no fermentadores resistentes a carbapenemes, como *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp, también crecerán en el subcultivo del caldo, aunque podrían ser descartados con las pruebas de Gram y oxidasa respectivamente.

4. REFERENCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. and *E.coli* from rectal swabs. http://www.ndhealth.gov/microlab/Uploads/Lab_Protocol_KPC.pdf. Consultado Agosto 2012.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.



Cultivos de vigilancia de Enterobacterias productoras de carbapenemasa

Unidad de Bacteriología.

Departamento de Laboratorios de Salud Pública

Ministerio de Salud Pública. URUGUAY



ANEXO 1. Flujoograma de búsqueda de EPC

