

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA.**

**INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD.**

**“Dr. LUIS FELIPE MONCADA.”**

**UNAN – MANAGUA**



**Trabajo monográfico para optar al Título de:**

Licenciatura en Microbiología

**Tema**

Genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo- $\beta$ -lactamasas, kpc y oxa mediante la técnica de PCR convencional en Enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el periodo Agosto 2015- Octubre 2016.

**Autores**

Lic. Helen María Cerda Aragón

Br. William Yashir Martínez García

Br. Asdrúbal Gerardo Pérez Martínez

**Tutor:**

MsC. Oscar Arbizú Medina.

Lic. BAC, MsC. Microbiología Médica.

**Asesor Metodológico:**

Lic. Benjamín Castillo Gómez.

Lic. Bioanálisis Clínico

## **Agradecimientos**

### **A UNAN-Managua**

Por haber dado su apoyo con los equipos y materiales ya que sin su ayuda no se podría haber realizado este estudio. Este estudio se realizó con fondos para proyectos de investigación (FPI), de la UNAN-Managua, otorgados al autor principal MsC. Oscar Arbizú Medina y ejecutado por la Dirección Vicerectorado de investigación y Postgrado.

### **A Nuestras Familias**

Que pacientemente nos apoyan y nos esperan día a día en nuestros hogares una vez culminada nuestras prácticas diarias en las diferentes instituciones que nos abren sus puertas para que podamos desarrollar los conocimientos adquiridos en esta universidad.

### **A nuestros Docentes:**

Que con amor a su trabajo han podido ser guías y amigos en nuestro camino del saber.

### **Al Hospital Alemán Nicaragüense:**

Por confiar en nosotros como alumnos investigadores y por su colaboración directa con material para la realización de este trabajo.

### **A nuestro tutor**

MsC. Oscar Arbizú Medina por su guía, paciencia y conocimientos brindados al fortalecimiento de nuestra vida profesional.

### **A nuestro Asesor Metodológico:**

Lic. Benjamín Castillo Gómez por su disponibilidad realizando importantes aportes metodológicos a este estudio.

## **Dedicatoria**

A Dios mi fuerza y pilar de todo principio de sabiduría.

A mi familia especialmente a mi madre Martha Rojas Aragón por ser mi mayor ejemplo de vida.

A mis compañeros de trabajo por su apoyo incondicional en estos años de estudio.

A mi compañero de vida Cristhian Artola Arguello por estar conmigo en las mayores dificultades en los periodos más difíciles de la vida.

Al Dr. Carlos Alberto Gutiérrez M. por animarme a no desistir y dar mi primer paso en este crecimiento profesional.

Hellen María Cerda Aragón.

## **Dedicatoria**

A Dios primeramente por darnos la vida y las fuerzas para poder realizar este trabajo.

A mis padres Scarlett Ester Garcia y William Felipe Martínez por darme todo el apoyo que necesité durante toda esta jornada.

También a todos aquellos familiares que de una u otra forma estuvieron brindándome su apoyo para poder superar todos los obstáculos que se presentaron en el camino.

William Yashir Martínez Garcia.

## **Dedicatoria**

A Dios todo poderoso, guía y guardián de mi vida.

A mis padres José Asdrúbal Pérez Martínez y Rosa del Carmen Martínez Díaz por su apoyo incondicional que han tenido a lo largo de los años.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua por ser nuestra alma mater donde hemos crecido y madurado como profesionales.

Al Hospital Alemán Nicaragüense por permitirnos la realización de este trabajo en dicho centro.

A los Docentes de la UNAN Managua que compartieron sus invaluable conocimientos a lo largo de la carrera.

Al profesor Oscar Arbizú nuestro tutor, quien nos guio en la realización de este trabajo monográfico.

Al Licenciado Benjamín Castillo por su importante asesoramiento.

Asdrúbal Gerardo Pérez Martínez.

## RESUMEN

La incidencia de infecciones está en aumento en los ambientes hospitalarios y en la comunidad. El aumento de la resistencia a los antimicrobianos empleados en los tratamientos de estas infecciones requiere la detección de los mecanismos para orientar las estrategias antimicrobianas.

La familia de los carbapenems son a la fecha los  $\beta$ -lactámicos con el espectro de actividad más amplio, por esta razón, estas moléculas son de primera importancia en el tratamiento de infecciones intrahospitalarias principalmente de aquellas causadas por Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

El surgimiento de estas cepas resistentes comprende un gran problema en el sector salud, ya que los pacientes se encuentran expuestos al riesgo de infectarse con estas bacterias resistentes, esto se traduce en mayor costo económico y mayor probabilidad de muerte para los pacientes.

El estudio se realizó en el hospital Alemán Nicaragüense, estudio de tipo prospectivo descriptivo y de corte transversal. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. El universo estuvo comprendido por 249 cepas de Enterobacterias aisladas de muestras de pacientes internados en el hospital Alemán Nicaragüense. La muestra estuvo conformada por 45 cepas de Enterobacterias que fueron capaces de producir enzimas carbapenemasas. En total se muestreo el 18.07% del universo

El tipo de muestreo fue no Probabilístico por conveniencia, utilizando los siguientes criterios de inclusión: que la cepa correspondiera al grupo de las Enterobacterias, que las Cepas fueran provenientes de pacientes hospitalizados en el hospital Alemán Nicaragüense (HAN), que la cepa presentara el fenotipo del mecanismo de resistencia en estudio.

A las 45 cepas en estudio se les realizó la detección de carbapenemasa por método fenotípico de triple disco, 41 presentaron sinergia con EDTA y 4 de estas

no presentaron sinergismo con ninguno de los inhibidores, esto nos indica una prevalencia de 91.11% metalo- $\beta$ -lactamasas y 11.88% de prevalencia para oxacilinasas.

Se utilizó el método la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para conocer los genes de resistencia que poseían las cepas en estudio dando como resultado que en el hospital Alemán Nicaragüense no se encontraron cepas que contengan el gen de tipo KPC, pero si se encontró, la presencia de genes de tipo : IMP con una prevalencia de 18.43%, SPM con 21.06%, VIM con 2.63%, SIM con un 13.15% y genes de tipo Oxacilinasas: OXA 23 con 5.26%, OXA 40 con 21.05%, OXA 51 con 13.16% y OXA 58 con un 5.26% para oxacilinasas.

*Klebsiella pneumoniae* fue la bacteria que obtuvo la mayor frecuencia en nuestra muestra con un total de 29 aislamientos que representaron el 64.47% del total de la muestra. Las salas más afectadas fueron las unidades de cuidados intensivos con un total de aislamientos del 74.02% en especial la unidad de cuidados intensivos de neonatos que obtuvo 51.14% del total de aislamientos

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción .....                               | 1  |
| 2. Antecedentes.....                                | 3  |
| 3. Justificación.....                               | 5  |
| 4. Planteamiento del problema.....                  | 6  |
| 5. Objetivo general: .....                          | 7  |
| 5.1 Objetivos específicos: .....                    | 7  |
| 6. Marco teórico.....                               | 8  |
| 6.1 Enterobacterias.....                            | 8  |
| 6.1.1 Generalidades.....                            | 8  |
| 6.1.2 Taxonomía.....                                | 9  |
| 6.1.3 Diagnóstico de enterobacterias.....           | 9  |
| 6.2 Medios de cultivo.....                          | 10 |
| 6.2.1 Caldo leche Descremada.....                   | 10 |
| 6.2.2 Mueller Hinton.....                           | 10 |
| 6.2.3 McConkey.....                                 | 11 |
| 6.3 Antibiograma.....                               | 11 |
| 6.4 Carbapenémicos.....                             | 11 |
| 6.4.1 Mecanismo de acción.....                      | 12 |
| 6.4.2 Metabolismo y farmacocinética .....           | 12 |
| 6.5 Resistencia bacteriana.....                     | 13 |
| 6.6 Carbapenemasas.....                             | 14 |
| 6.6.1 Clasificación.....                            | 15 |
| 6.7 Mecanismos de resistencia a carbapenémico ..... | 19 |

|   |    |
|---|----|
| Los mecanismos de resistencia mejor estudiados incluyen:.....         | 19 |
| 6.8 Detección de carbapenemasas.....                                  | 20 |
| 6.8.1 Fenotipificación.....   | 20 |
| 6.8.2 Método de detección de genes productores de carbapenemasas..... | 24 |
| 6.8.2.1 Extracción de ácido nucleico.....                             | 24 |
| 6.8.2.2 Cuantificación del ADN.....                                   | 25 |
| 6.7.2.4 Electroforesis.....   | 29 |
| 7. Diseño metodológico.....   | 31 |
| 8 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....                                | 43 |
| 8 Análisis y discusión de Resultados.....                             | 45 |
| 9. CONCLUSIONES.....  | 60 |
| 11. Bibliografía.....   | 63 |
| ANEXOS.....   | 66 |

# 1. Introducción

El surgimiento de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos, es un problema serio de salud pública, que involucra a todos los países alrededor del mundo. A pesar de que la resistencia bacteriana es un fenómeno evolutivo natural, la presión selectiva ejercida por el uso y abuso de antibióticos en los últimos 70 años ha acelerado y sigue aún más su ritmo de lo ocurrido en millones de años anteriores. (Moises, 2012)

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de E.E.U.U, en el 2007 reveló que un 8% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* eran resistentes a carbapenemes, en relación con menos del 1% del año 2000. Desafortunadamente, la prevalencia de Enterobacterias productoras de carbapenemasas ha aumentado durante los últimos 10 años, comprometiendo seriamente las opciones terapéuticas. Las carbapenemasas clase A de *Klebsiella pneumoniae* (KPCs) y las enzimas clase B Metallo- $\beta$ -lactamasas (VIM e IMP) han sido identificadas en todo el mundo, siendo endémicas en algunas regiones. Las de clase D del tipo OXA-48 se identificaron con más frecuencia en la región Mediterránea y Europa. Recientemente, la MBL-1 New Delhi (NDM-1) fue identificada y se ha diseminado en varios países de Latinoamérica. (WHO, 2014)

Hasta 1990 la resistencia de los carbapenémicos por parte de las Enterobacterias era un suceso extraño, la mayor parte de las veces la resistencia a  $\beta$ -lactámicos se producía por la producción de BLEE sumada a la disminución de la permeabilidad bacteriana. La resistencia de *Klebsiella pneumoniae* debido a metalocarbapenemasa fue inicialmente aislada en Asia y más recientemente se han encontrado también en Brasil, así mismo se han reportado brotes de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo serina, y se han expandido hasta abarcar países por toda Latinoamérica.

La organización Mundial de la Salud (OMS) reveló en un informe en el 2014 que el principal causante de infecciones nosocomiales resistentes a carbapenémicos era *Klebsiella pneumoniae*, afectando principalmente las salas de cuidados intensivos y sala de neonatos, estudios que confirman los resultados de esta investigación. Algunos países dentro de la red de la OMS reportaban hasta un 50% de prevalencia de infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos carbapenémicos. En el mismo informe se detalla la situación de Nicaragua revelando que de todos los aislamientos reportados de *Klebsiella pneumoniae* el 9% de estas presentaron resistencia a los carbapenémicos dejando a los pacientes con muy pocas opciones terapéuticas (World Health Organization, 2014).

## 2. Antecedentes

Un estudio realizado en Argentina por Federico Nicola et al, Evaluaron los diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*, concluyendo de los métodos fenotípicos en estudio para la detección de bacterias con carbapenemasas KPC son confiables y fáciles de implementar en los laboratorios de microbiología clínica (Federico G. Nicola, 2012).

En el año 2013 en un estudio descriptivo realizado en la ciudad de Guatemala por Ana M. Chinchilla et al, Identificaron la presencia de carbapenemasas tipo Nueva Delhi Metalo- $\beta$ -lactamasas (NDM-1) y *Klebsiella pneumoniae* con Carbapenemasas (KPC-2), en Enterobacterias con  $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE+), resultando que, de 118 cepas en estudio, con el método genotípico el 19% con gen NDM-1 positivas y 16% KPC 2 positivas. Con el método fenotípico se encontró un 33% MBL (metalo- $\beta$ -lactamasa, posible NDM) positivas y KPC 2.5% positivas (Ana M. Chinchilla et al, 2013).

(Centro Nacional De Referencia de Bacteriología, 2014) El instituto costarricense de Investigación y Enseñanza en nutrición y salud (INCIENSA) realiza su primer aislamiento de Metalo- $\beta$ -lactamasa New Delhi (MBL-NDM), alertando sobre este caso procedente de Nicaragua, confirmando que *E. coli* aislada mostró resistencia no sólo a  $\beta$ -lactámicos, sino también a ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazole y sensibilidad a nitrofurantoina.

Darling Ortiz et al, realizaron un estudio fenotípico en Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan  $\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), identificando a 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y una de *Escherichia coli*, resistente a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, carbapenem, trimetoprim/sulfametoxazol, aminoglucósidos y nitrofurantoina esto debido a que las 13 cepas eran capaces de producir tanto enzimas metalo- $\beta$ -lactamasas como  $\beta$ -lactamasas (Ortiz M. Darling Auxiliadora. Et al 2014).

En un estudio realizado por Julisa Avila se analizó 47 aislamientos y confirmó la presencia del gen blaKPC en 33 cepas, de las cuales 27 que representaron un 82% fueron *Klebsiella pneumoniae*, y 6 cepas representando un 18% fueron *Escherichia coli*, al realizar la búsqueda de la clonalidad, de las 27 cepas de *Klebsiella pneumoniae* se presentaron 13 clones, los cuales fueron 7 clones K, 3 clones B, 4 clones G, en esta se incluyen dos subtipos GI, 3 (I) subgrupo (11), 2 (M), 1 (A,C,D,E,F,H,J y L), en las 6 cepas de *Escherichia coli* se encontraron 4 (A) y 2 clon (B) (Ávila, 2012).

### 3. Justificación

Los carbapenémicos son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de mayor espectro, actividad y resistencia a las  $\beta$ -lactamasas, la presión selectiva provocado por el abuso de antimicrobianos ha generado el surgimiento de bacterias resistentes a medicamentos mediante el desarrollo de mecanismos capaces de inhabilitar el efecto antibiótico. El surgimiento de estas cepas resistentes ha sido uno de los mayores problemas en el sector salud debido a que estas cepas incrementan el estadio del paciente en el hospital, además al estar presente en un ambiente contaminado ellos adquieren el riesgo de infectarse con microorganismos mutantes lo que se traduce en un mayor costo económico y peligro de muerte.

Dada la importancia de los genes codificadores de enzimas carbapenemasas responsables de la alta resistencia a la familia de los carbapenems, quienes representan la última línea de antimicrobianos de amplio espectro ante las Enterobacterias, así como su facilidad de diseminación entre familias de bacterias ha provocado el incremento alarmante en los hospitales. Ante este evento surge la necesidad de nuestro estudio monográfico que trasciende el interés de contribuir con información basada en métodos moleculares en donde se revela la incidencia de estas enzimas como problema trascendental en la salud y así contribuir con datos epidemiológicos de gran relevancia para esta institución de la medicina y diagnóstico clínico en donde los principales beneficiados son los pacientes.

Los datos de este estudio serán un gran aporte científico al comité de Infecciones Intrahospitalaria del Hospital Alemán Nicaragüense y la Universidad Nacional Autónoma de Managua (UNAN), lo que podrá ser utilizados en la implementación de métodos que ayuden a ejecutar técnicas más adecuadas en los protocolos, para hacer frente a las Enterobacterias multirresistentes y el peligro que representan ante los antibióticos carbapenémicos, así como al fortalecimiento de la comunidad científica a nivel docente y comunidad estudiantil.

## **4. Planteamiento del problema**

¿Cuál es la prevalencia de genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo- $\beta$ -lactamasa, Kpc y Oxa en Enterobacterias de pacientes hospitalizados en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el período Agosto 2015- Noviembre 2016?

## **5. Objetivo general:**

Determinar genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo- $\beta$ -lactamasas, Kpc y Oxa mediante la técnica de PCR convencional en Enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas del hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el periodo Agosto 2015- Octubre 2016.

### **5.1 Objetivos específicos:**

1. Detectar cepas que presentaron resistencia a los carbapenémicos en la prueba de difusión por disco.
2. Clasificar las carbapenemasas fenotípicamente según los resultados de la prueba de sinergia entre carbapenems, Ácido Fenil Borónico (APB) y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
3. Identificar los genes productores de carbapenemasas tipo Metallo- $\beta$ -lactamasa, serina carbapenemasa tipo Kpc y Oxa mediante la técnica de PCR de los microorganismos en estudio
4. Evaluar el perfil de resistencia de los microorganismos en el estudio.
5. Describir la distribución de Enterobacterias productoras de carbapenemasas estudiadas por salas clínicas.

## **6. Marco teórico.**

### **6.1 Enterobacterias.**

#### **6.1.1 Generalidades.**

Las Enterobacterias son un grupo de familias extenso, cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales, son bacilos Gram-negativos, móviles con flagelos peritricos no móviles; poseen la capacidad de multiplicarse en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros suplementos; pero dan un mejor resultado en agar McConkey, éstas se proliferan en medios aerobios y anaerobios (son anaerobios facultativos); fermentan la glucosa, a menudo producen gas, catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitratos a nitritos.

La familia comprende muchos géneros (*Escherichia, Klebsiella, Shigella, Salmonella, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Hafnia, Yersinia, Proteus, Citrobacter, Morganella, Edwardsiella* y *Providencia*).

Las Enterobacterias presentan numerosos factores de virulencia, la mayoría se adhieren a las superficies mucosas y colonizan mediante de fimbrias, poseen toxinas como la hemolisina que potencia la acción de las fimbrias, presentan una capsula antifagocitaria, tienen la capacidad de secuestrar factores nutricionales como el hierro por la producción de sideroforos; que son compuestos quelantes de hierro extracelulares (enterobactina, aerobactina). Son capaces de variar la fase antigénica; la expresión del antígeno capsular K y del antígeno flagelar H están bajo el control del microorganismo, Estos pueden o no expresarse, siendo una de las características que protege a la bacteria de la acción celular mediada por anticuerpos.

### **6.1.2 Taxonomía.**

La familia Enterobacteriaceae son clasificadas taxonómicamente dentro del filo proteobacteria, de la clase gammaproteobacteria, del orden Enterobacteriales.

Dentro de la esta Familia se reconocen más de 30 géneros diferentes, varios de ellos están siendo sometidos a revisión mediante técnicas de Biología Molecular, estudiando la homología de sus ADN y frecuentemente se crean nuevos géneros con especies de géneros ya existente.

### **6.1.3 Diagnóstico de enterobacterias.**

Para determinar si una bacteria puede ser clasificada dentro del grupo de las enterobacterias primero es necesario cultivarla en un medio de cultivo de preferencia uno selectivo y de esta forma poder trabajar con las bacterias aisladas y determinar a qué familia pertenece.

Para que una bacteria pueda ser incluida dentro de la familia de las enterobacterias debe de cumplir con las siguientes características:

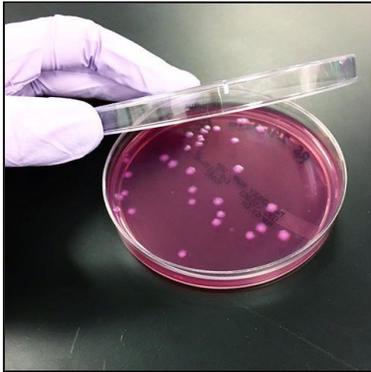
1. Ser gram negativa (coloración roja en la tinción de gram)
2. Dar negativo para la prueba de oxidasa (ausencia de la enzima citocromooxidasa)
3. Fermentar la glucosa
4. Reducir nitratos a nitritos
5. Ser anaerobio facultativos

Una vez que se hayan realizado todas las pruebas y que estas concuerden con las características antes descritas entonces se podrá decir que se está en presencia de una batería perteneciente a la familia de las enterobacterias.

## 6.2 Medios de cultivo.

Un medio de cultivo es una mezcla de nutrientes que, en condiciones físicas adecuadas permite el desarrollo de bacterias, virus, hongos y otros tipos de organismos o microorganismos que se deseen cultivar.

Los medios de cultivo han demostrado ser una herramienta esencial en cualquier laboratorio de microbiología debido a su uso para identificación y recuperación de microorganismos, así como también su almacenamiento y transporte.



### 6.2.1 Caldo leche Descremada.

La leche descremada constituye un buen medio de conservación para muchas bacterias. Es un medio que permite mantener la viabilidad de las bacterias, conservando sus características fisiológicas, morfológicas, tintoriales, etc. Los hay para tiempos cortos y tiempos más prolongados, aunque para mantener y garantizar todas las características bacterianas se deben conservar en este medio congeladas a 20 - 70°C

### 6.2.2 Mueller Hinton.

El medio Mueller Hinton es el medio de cultivo autorizado por el CLSI en el cual se pueden realizar el método de difusión de disco debido a su relativa reproducibilidad, la simplicidad de su fórmula y debido a los extensos estudios realizados por un equipo conformado por Kirby, Bauer y otros investigadores que desean desarrollar una técnica estándar para la realización de los exámenes de sensibilidad de las bacterias.

### **6.2.3 McConkey.**

Es un medio de cultivo diferencial que por la presencia de las sales biliares y el cristal violeta se inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-positivas. Por la presencia de la lactosa, las bacterias capaces de fermentarla acidifican el medio, cambiando el color del rojo neutro y formando colonias rojas o rosadas, pudiendo presentar un halo turbio correspondiente al precipitado biliar. Las bacterias lactosa-negativa dan colonias incoloras

### **6.3 Antibiograma.**

El antibiograma se realiza en el medio de cultivo Mueller-Hilton utilizando la técnica de Kirby-Bauer donde se extiende un inóculo de la bacteria por todo el medio y se colocan discos de papel con una determinada concentración de antibiótico lo que provocara una inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de estos antibióticos. Dependiendo de la extensión de estos halos de inhibición alrededor del disco se podrá determinar si la bacteria de interés es resistente o sensible al fármaco.

### **6.4 Carbapenémicos.**

Los carbapenémicos son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las  $\beta$ -lactamasas. Poseen un amplio espectro de actividad y son altamente potentes contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Estas cualidades hacen que los carbapenémicos sean imprescindibles en el tratamiento empírico donde se sospecha de un patógeno multirresistente, en la monoterapia de numerosas infecciones nosocomiales graves (incluso algunas de origen comunitario) y en la terapia dirigida contra las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistente o productoras de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y espectro extendido. Todos los carbapenémicos disponibles son similares en cuanto a espectro se refiere, aunque con diferencias significativas en

su actividad antimicrobiana que en último término determinan las indicaciones clínicas de cada uno.

#### **6.4.1 Mecanismo de acción.**

Los carbapenémicos al igual que los demás  $\beta$ -lactámicos muestran una elevada afinidad por las diferentes enzimas que participan en el ensamblaje del peptidoglucano, estructura esencial en la pared celular de las bacterias. Estas enzimas se denominan como PBPs (penicillin binding protein, por sus siglas en inglés) y según su función se clasifican en transglicosilasas, transpeptidasas y carboxipeptidasas. Cada antibiótico  $\beta$ -lactámico presenta una afinidad diferente por cada PBP. Se conoce que en bacterias Gram negativas los carbapenémicos muestran una elevada afinidad por PBPs de alto peso molecular y la diferencia de esta afinidad es lo que determina la capacidad antimicrobiana de cada carbapenémico. Para que el carbapenémico pueda ejercer su función debe llegar a su sitio blanco. En el caso de las bacterias Gram positivas las cuales no presentan membrana externa es fácil. Sin embargo, en las bacterias Gram negativas debe primero atravesar la membrana externa a través de porinas inespecíficas. Una vez en el sitio son capaces de inhibir la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, ya que al unirse a residuos de serina que forman parte de las PBPs impiden que la pared bacteriana se ensamble adecuadamente dando como resultado el debilitamiento de ésta y en última instancia la lisis de la célula bacteriana. Su capacidad antimicrobiana depende de la estructura y tiempo de acción de cada carbapenémico. Estas condiciones hacen que su acción ante las diferentes bacterias sea diferente.

#### **6.4.2 Metabolismo y farmacocinética.**

Los carbapenémicos son medicamentos que no se absorben por vía oral, por lo que deben ser administrados parenteralmente. Su unión a proteínas plasmáticas es débil en el caso del Imipenem y Meropenem y fuerte con el Doripenem y

Ertapenem. Tienen buena distribución corporal, sobre todo a nivel del Sistema Nervioso Central, Peritoneo y Riñón. Se excretan principalmente por la orina y poco por la bilis y heces fecales, de ahí su pobre efecto sobre la flora intestinal. Su vida media varía desde una hora para el Imipenem hasta 24 horas para el Ertapenem. Como para el resto de los  $\beta$ -lactámicos, su acción es dependiente del tiempo de permanencia por encima de la concentración mínima inhibitoria, pero a diferencia de otros poseen un efecto post-antibiótico prolongado frente a bacilos gram negativos, lo que determina que el intervalo entre dosis sea de seis a ocho horas, mucho más largo que su vida media. (Monge\*, 2013)

## **6.5 Resistencia bacteriana.**

### 6.4.1 Mecanismos de transmisión de resistencia bacteriana

- a) Resistencia Natural de las Enterobacterias: Las bacterias poseen patrones propios de resistencia a los antimicrobianos, esta depende de funciones o estructuras codificadas generalmente en el cromosoma bacteriano. Se caracteriza por ser inherente a una especie en particular, ya que dichos microorganismos pueden perder los sitios blancos o poseer barreras naturales, evitando que el agente antibacteriano actúe al no poder alcanzar su objetivo. Es una propiedad innata de la bacteria y pueden estar involucrados uno o varios mecanismos de resistencia.
- b) Resistencia Adquirida: Es un verdadero cambio en la composición genética de la bacteria de tal manera que si un antibacteriano alguna vez tuvo actividad sobre ella, al adquirir resistencia éste ya no es más efectivo. Este tipo de resistencia es muy frecuente debido al abuso masivo de los antibióticos. La tolerancia debe ser considerada como un tipo de resistencia adquirida a pesar que el organismo permanece sensible a la droga. Las bacterias pueden adquirir genes de resistencia de un microorganismo vecino, siendo o no este de la misma especie. Dicho intercambio genético puede darse durante tres procesos:

- c) Transformación: El ADN es adquirido directamente a partir de una bacteria que ha liberado su material genético al exterior y es tomado por la bacteria receptora, dentro de ella el ADN podrá mantenerse como tal, cuando se trate de un elemento autónomo, o bien integrarse en el genoma del huésped por recombinación.
- d) Transducción: Un bacteriófago interviene en el proceso, transfiriendo los genes de resistencia entre bacterias compatibles.
- e) Conjugación: Vía principal de diseminación de genes de resistencia, entre las poblaciones bacterianas que consiste en la transferencia de genes entre dos células que están en contacto. (Claudia Mercedes Pérez Rodríguez, 2010)

## 6.6 Carbapenemasas.

Entre las primeras descripciones de carbapenemasas en Enterobacterias fue en España en una Metallo- $\beta$ -lactamasa (MBL) del tipo VIM-1 en 2005 (Jesús Oteo J. O., 2014). En los años posteriores se detectaron casos esporádicos y algún brote aislado de Enterobacterias productoras de MBL, principalmente en gen VIM e IMP. Sin embargo, durante los últimos años la situación ha cambiado drásticamente, con un aumento global de los casos detectados, principalmente en *Klebsiella pneumoniae*, seguida de *Enterobacter* spp, con un incremento del tipo de carbapenemasas y con un número mayor de hospitales afectados por grandes brotes.

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las  $\beta$ -lactamasas. Son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos (Imipemen, Meropenem, Ertapenem) como a otros  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas y/o penicilinas) las cuales se han asociados a elementos genéticos transferibles. Además, presentan la característica de ser resistentes a la acción de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas disponibles. Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles.

### 6.6.1 Clasificación.

Durante los últimos años se ha producido la aparición y dispersión de Enterobacterias productoras de enzimas que confieren resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo los antibióticos carbapenémicos, lo cual limita de manera importante el arsenal terapéutico frente a estas bacterias.

Estas enzimas, denominadas genéricamente carbapenemasas, pertenecen en su mayoría a 3 clases diferentes, según la clasificación molecular de Ambler:

a) Clase A, Serina carbapenemasas, principalmente enzimas del tipo KPC.

b) Clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) dependientes de zinc, principalmente enzimas del tipo: IMP, VIM, SPM, GIM.

c) Clase D o carbapenemasa tipo OXA (principalmente OXA-48). (Jesús Oteo, 2014)

Estos grupos difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores.

a) Serina carbapenemasas

Las serina carbapenemasas clase A hidrolizan penicilinas, cefalosporinas (en menor grado cefalosporinas de tercera y cuarta generación), monobactámicos y carbapenémicos. Su actividad hidrolítica depende del sustrato sobre el que actúan, por ejemplo, SME-3 y KPC-2 hidrolizan mejor el Imipenem que el Doripenem y son levemente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam.

Las carbapenemasas clase A pueden dividirse fenotípicamente en seis diferentes grupos, de los cuales cuatro grupos están formados por miembros de las enzimas SME, IMI/NMC-A, KPC y GES/IBC, que se caracterizan por tener en común tres motivos altamente conservados esenciales para su actividad, mientras que SHV-38 y SFC-1 constituyen cada una un grupo diferente.

Estas enzimas usualmente se encuentran presentes en bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, sin embargo, han sido reportadas en aislamientos de *Pseudomonas pútida*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella spp.*, en casos aislados o causantes de pequeños brotes, procedentes de diferentes partes del mundo. Los genes que codifican por las enzimas SME, IMI, NCM, SHV-8 y SFC- 1 se localizan principalmente en el cromosoma, pero existen reportes de aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* que poseen enzimas SME, IMI y NCM presentes en plásmidos. Los genes bla GES residen en cassettes genéticos principalmente dentro de integrones de clase 1, mientras que los genes blaKPC y blaIMI-2 están flanqueados por transposones ubicados dentro de plásmidos.

b) Metallo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) o carbapenemasas clase B

Este es quizá el grupo más relevante de carbapenemasas debido tanto a su diversificación estructural como a su diseminación prácticamente mundial y en diferentes especies bacterianas. Son enzimas que típicamente hidrolizan todos los  $\beta$ -lactámicos excepto monobactámicos y son inhibidas por quelantes de iones metálicos tales como EDTA, ácido dipicolínico o 1,10- $\sigma$ -phenantrolina, pertenecen al grupo B de Ambler y 3a y 3b en la clasificación de Bush.

Todas las Metallo  $\beta$ -lactamasas (MBLs) comparten las siguientes características funcionales: Potente actividad carbapenemasa, resistencia a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico y sulfonas), y ausencia de actividad contra monobactámicos. Siendo las primeras dos características las que generan mayor preocupación desde el punto de vista clínico.

Los genes MBLs pueden ser transportados en cassettes dentro de integrones, transposones, plásmidos, elementos denominados regiones comunes (CRs) que pueden o no ser transferibles, o estar insertos en el cromosoma, lo que les confiere a especies como *Stenotrophomonas maltophilia* resistencia intrínseca a los carbapenémicos. La adquisición de estos genes potencialmente puede conferir resistencia a un amplio espectro de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y en algunas

ocasiones pueden estar asociados con genes que confieren resistencia a aminoglicósidos, por lo que se pueden identificar bacterias con un fenotipo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y aminoglicósidos. Dentro de las MBLs se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM. Las más importantes incluyen las familias VIM, IMP y SPM-1 las cuales han sido detectadas en cepas de *P. aeruginosa*, miembros de la familia Enterobacteriaceae y *Acinetobacter baumannii*. Es importante recalcar que existen reportes que indican que el Doripenem es estable ante la hidrólisis de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y que es de 5 a 150 veces menos hidrolizado que el Imipenem por las enzimas IMP-1 y VIM-2. En el caso de SPM-1, esta enzima hidroliza el Meropenem y Doripenem cuatro veces más que al Imipenem.

#### c) Oxacilinasas

Se ubican dentro del grupo 2df de Bush (clase D de Ambler) descritas en 1980. Se caracterizan por su capacidad de hidrolizar cloxacilina y oxacilina (de ahí su nombre “oxacillinhidrolizing” carbapenémicos, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam (a excepción de OXA 27) y en general son inhibidas por el ácido clavulánico (menos OXA 23 que es resistente). Para el año 2007 se habían identificado más de 100 variantes, de las cuales 9 eran clasificadas como BLEE y 37 como carbapenemasas. Aunque se ha descrito que la hidrólisis a los carbapenémicos es débil, se incrementa si otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo, alteraciones en las porinas o modificaciones en el sitio blanco están presentes. Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA se detectan principalmente en *A. baumannii*, habitualmente dentro de integrones situados en plásmidos o transposones, aunque ciertos casos se han asociado a secuencias de inserción. Sin embargo, también se han hallado más raramente en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y otras especies próximas como *Aeromonas spp.* En el caso de *P. mirabilis* las cepas aisladas en Francia describen la producción de OXA-23 a partir de un gen cromosómico.

OXA tipo carbapenemasas: En su mayoría han sido descritas en *Acinetobacter* spp, este grupo de enzimas a su vez ha sido clasificado en cuatro subgrupos: subgrupo 1 o enzimas tipo OXA-23 (OXA-23, OXA-27, OXA- 49, OXA-73, OXA-102, OXA-103 y OXA-105), subgrupo 2 o enzimas tipo OXA-24 (OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-72), subgrupo 3 o enzimas tipo OXA-51 enzimas de ocurrencia natural en *A. baumannii* (OXA-51, OXA-65, OXA-68, OXA-69 entre otras) este es el subgrupo más grande y se conforma por cerca de 45 variantes las cuales son de tipo cromosomal Sub grupo 4 o enzimas tipo OXA-58 (OXA-58, OXA-96 y OXA-97), las enzimas de los subgrupos 1,2 y 4 han sido asociadas a elementos genéticos móviles como plásmido y secuencias de inserción. Otras OXA tipo carbapenemasas son la enzima OXA-143 reportada recientemente en *A. baumannii* y la OXA-48 reportada en *Klebsiella pneumoniae*.

Las Enterobacterias productoras de estas enzimas se han convertido en un problema clínico y de salud pública emergente, en continua evolución y con una alta velocidad de diseminación intra e interhospitalaria, de difícil control y tratamiento.

Este incremento se debe principalmente a 2 vías de dispersión, en muchas ocasiones coexistentes:

- Adquisición horizontal de genes que codifican las carbapenemasas
- Diseminación clonal de clones productores de estas enzimas especialmente exitosas.

Desde un punto de vista clínico, los principales factores de riesgo para la colonización e infección por estas cepas son:

- Estancia en unidades de cuidados intensivos (UCI)
- Administración de antibioterapia de amplio espectro de forma prolongada,
- Cirugías
- Procedimientos instrumentales invasivos
- Inmunosupresión.

Con frecuencia las cepas productoras de carbapenemasas presentan corresponsibilidades a otras familias de antibióticos no B - lactámicos, por lo que es habitual la existencia de casos de resistencia extensa frente a los cuales no hay una alternativa óptima de tratamiento antibiótico. Muchas de las Enterobacterias productoras de carbapenemasas solo se muestran sensibles in vitro a antibióticos como la colistina, la tigeciclina, la fosfomicina o la amikacina.

## **6.7 Mecanismos de resistencia.**

### **Los mecanismos de resistencia más estudiados incluyen:**

- a. Cambios en proteínas de la membrana externa: los medicamentos se unen a proteínas específicas de la membrana externa de las bacterias, si dichas proteínas cambian resultaría imposible para el antibiótico unirse a su sitio específico (PBP) y por ende no podría llevar a cabo su función.
- b. Bombas de eflujo inespecíficas: Las bombas de e-flujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, tales como metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos. Para su funcionamiento utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato de energía. Su expresión puede ser permanente o inducida. Este mecanismo de resistencia asociado a carbapenémicos se ha descrito en *P. aeruginosa*
- c. Producción de enzimas tipo  $\beta$ -lactamasas: la producción de enzimas tipo  $\beta$ -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia empleado. Estas enzimas periplásmicas hidrolizan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y evitan que la droga se pueda unir a su PBP blanco.
- d. Modificaciones del sitio blanco: Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une. Este mecanismo es principalmente utilizado en bacterias Gram positivas, sin embargo, el número de reportes de Gram negativos resistentes a carbapenémicos mediado por este mecanismo ha ido en aumento.

- e. Alteraciones en la permeabilidad: Las porinas son estructuras proteicas que forman un canal a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Una de sus principales funciones es facilitar el transporte de pequeñas moléculas hidrofílicas tales como mono y disacáridos, nucleósidos y aminoácidos desde el medio externo al espacio periplásmico.

Los carbapenémicos utilizan esta estructura para llegar a su sitio blanco, ante la presión de selección que ejercen, emergen cepas de bacterias mutantes deficientes en porinas, ya sea porque transportan mutaciones que generan porinas alteradas no funcionales o una expresión disminuida de éstas. De esta manera, la cantidad de carbapenémico que llega al espacio periplásmico disminuye considerablemente y por lo tanto se generan cepas con fenotipos de resistencia.

Los tres primeros mecanismos han sido bien descritos en bacterias gram negativas mientras que el último en bacterias gram positivas y casos puntuales en bacterias gram negativas. La adquisición de estos mecanismos origina que la resistencia con frecuencia sea cruzada, pero hay excepciones donde una bacteria puede ser sensible a un carbapenémico y resistente a otro, como ocurre con cepas de *P. aeruginosa* que son sensibles a Imipenem y resistentes a Meropenem y Doripenem, de ello se deriva la necesidad de incluir en el antibiograma a todos los carbapenémicos que se requieran.

## **6.8 Detección de carbapenemasas.**

### **6.8.1 Fenotipificación.**

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, la epidemiología local y la identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas. En este último punto es esencial valorar la posible presencia de otros mecanismos de resistencia que puedan “enmascarar” el fenotipo que confieren las carbapenemasas, entre ellos la alteración de la permeabilidad, la presencia de

bombas de expulsión, afectación de las PBPs o presencia simultánea de otras  $\beta$ -lactamasas.

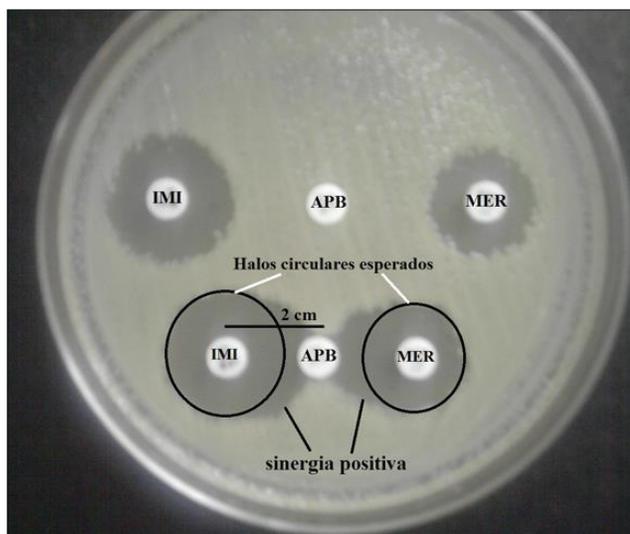
No es igual la expresión de una carbapenemasa en *P. aeruginosa* o en *A. baumannii* que en *E. coli*, *K. pneumoniae* o en una cepa de *E. cloacae*. Cada una de estas especies tiene sus peculiaridades fenotípicas naturales que deben ser contempladas. Así mismo, la expresión de las carbapenemasas no es siempre homogénea y se producen fenómenos de heterorresistencia. Este hecho se ha demostrado claramente con las Enterobacterias y las metalo- $\beta$ -lactamasas que hace que los valores de CMI no sean en ocasiones reproducibles y se sitúen en un amplio rango de concentraciones, incluso por debajo del punto de corte de sensibilidad. (Cantón, 2011)

#### 6.8.1.1 Prueba de sinergia para la identificación fenotípica de carbapenemasas.

Las pruebas de fenotipificación por sinergismo con triple disco en donde se utiliza ácido Fenil Borónico (APB) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Se fundamentan en la potenciación del halo de inhibición, que se genera al rededor del disco del antibiótico, cuando este se enfrenta a un disco cargado con un inhibidor de la acción enzimática. Por tanto, se considera resultado positivo cuando se observa una potenciación del halo de inhibición, generado entre ambos discos

- a) Prueba de Sinergia con Ácido Fenil Borónico (APB) frente a discos de carbapenems.

Los discos de Ácido Fenil Borbónico son utilizados para la detección fenotípica de enzimas AmpC y carbapenemasas de clase A de Ambler, mediante la prueba de sensibilidad a los microbianos, es un inhibidor selectivo de los carbapenemasas de tipo A – serina carbapenemasas (KPC, Sms, NMCA), observándose una sinergia entre el disco de ácido Borónico y el antibiótico carbapenémico.



Las KPC se muestran resistentes al aztreonam y no se inhiben por el EDTA pero sí por el ácido borónico y discretamente por el ácido clavulánico. No se recomienda utilizar ácido clavulánico por su baja sensibilidad. La utilización del Ácido Borónico tiene como inconveniente el ser también un buen inhibidor de AmpC, circunstancia que dificulta la detección de las KPC cuando está presente esta enzima (por ejemplo, en *E. cloacae*). Se ha propuesto utilizar simultáneamente una prueba de discos combinados con cloxacilina para demostrar la presencia de estas  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC

La prueba se realiza con discos con una concentración de 300 ug por disco los que pueden ser comerciales o preparados localmente en el laboratorio (impregnación de discos estériles). (CUADRA, 2014)

b) Prueba de sinergia con EDTA frente a Discos de carbapenems.

Se han diseñado pruebas de aproximación de discos carbapenémicos combinados con EDTA con un carbapenémico para identificar fenotípicamente estas enzimas. En el método de aproximación de discos es importante “acertar” con la distancia entre los discos del carbapenémico y el inhibidor, sobre todo en las cepas con baja expresión de la carbapenemasa en las que los halos de inhibición son amplios.

El disco de EDTA, es empleado en la detección fenotípica de Metallo- $\beta$ -lactamasa (MBLs), por el método de triple disco, el cual consiste en colocar, sobre una placa de agar Mueller-Hinton inoculado con la cepa problema, un disco que contiene un agente quelante (EDTA, SMA, ácido dipicolínico o ácido 2-mercaptopropiónico) rodeado por un disco de imipenem (10 $\mu$ g) y otro de meropenem (10 $\mu$ g). Esta prueba es positiva si se observa un aumento del halo de inhibición o la presencia de una zona de inhibición entre el imipenem y/o el meropenem y el agente quelante.

c) Detección de  $\beta$ -lactamasas tipo Oxacilinas Clase D (grupo 2d)

Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA son enzimas dependientes de serina, este es un grupo de enzimas con gran diversidad, en el encontramos  $\beta$ -lactamasas con espectro de hidrólisis amplio las cuales son resistentes a penicilinas y cefalosporinas o  $\beta$ -lactamasas con espectro de hidrólisis expandido, las cuales pueden hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y carbapenemes. Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA no son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam ni sulbactam, sin embargo, su actividad puede ser inhibida in vitro por el cloruro de sodio (NaCl). La mayoría de los genes de la  $\beta$ -lactamasa Clase D, han sido identificados en Enterobacteriaceae y *P. aeruginosa* en plásmidos transferibles. Algunos genes encontrados en *P. aeruginosa* han sido localizados de forma cromosómica como son los que codifican para OXA-13 y OXA-17, OXA-18 y OXA-20 (21). La gran mayoría de carbapenemasas tipo OXA han sido detectadas en *Acinetobacter spp* en especial en *A. baumannii* y solo unos pocos aislamientos de *P. aeruginosa* y *Proteus spp*, la primera carbapenemasa tipo OXA detectada fue OXA-23 o ARI-1, descrita en 1993 en una cepa de *A. baumannii* aislada en 1985. Las enzimas tipo OXA, están formadas por variantes, hasta el momento han sido descritas cerca de 31 variantes, las cuales se han clasificado de acuerdo a su secuencia de aminoácidos en 4 subgrupos (subgrupo 1 o tipo OXA-23, subgrupo 2 o tipo OXA-24, subgrupo 3 o tipo OXA-51 y subgrupo 4 o tipo OXA-58), el más grande es el subgrupo 3, el cual es intrínseco en *A. baumannii*, mientras que los subgrupos restantes son adquiridos. (DC, 2010)

## **6.8.2 Método de detección de genes productores de carbapenemasas.**

### **6.8.2.1 Extracción de ácido nucleico.**

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula.

La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR.

De los tres pasos críticos que componen el análisis de patógenos por PCR, la extracción de ADN es quizás el más desconocido y sobre el que más control podemos ejercer.

Etapas en la extracción de ADN

Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación del ADN mediante un procedimiento químico son:

- 1) Lisis de las células o virus. Las sales caotrópicas ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos consiguiendo su desnaturalización. La adición de un detergente como el SDS es necesaria a menudo para eliminar las membranas.
- 2) Degradación de la fracción proteica asociada al ADN. Se consigue mediante la adición de una proteasa. La fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico.
- 3) Purificación. Consta de 3 fases:

- Precipitación del ADN. El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar etanol frío o isopropanol y recuperar mediante una centrifugación. El alcohol del sobrenadante se llevará las sales añadidas previamente.
- Lavado del pellet. Se realiza con alcohol frío volviendo a centrifugarse
- Recuperación. El sedimento se puede resuspender en agua o tampón Tris tras ser secado completamente.

De todas las muestras biológicas que podemos someter a un proceso de extracción de ADN, las suspensiones bacterianas, son quizás las que ofrecen menos problemas por la homogeneidad y riqueza del material. En particular, las suspensiones densas de bacterias gramnegativas pueden liberar cantidad suficiente de ADN en condiciones bastante suaves como pueden ser una simple ebullición, congelación o una combinación de ambas.

#### **6.8.2.2 Cuantificación del ADN.**

Es importante determinar el rendimiento de la extracción del ADN, mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica. En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 µg/ml.

Se debe considerar el factor de dilución para la obtención de la concentración en nanogramos/microlitro (ng/µl). En el caso de algunos equipos como el espectrofotómetro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra y el equipo proporciona directamente la concentración en ng/µl, se considera que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng de ADN en cada muestra.

Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol. (Laura P.Alejos Velasquez).

### **6.8.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de "polymerase chain reaction" es un método de amplificación in vitro de segmentos de ADN que fue ideado por Kary Mullis a mediados de la década de los 80. Desde entonces el análisis de la base molecular de la variación biológica a nivel del material genético se ha facilitado enormemente, pues sin necesidad de pasos previos de clonación, se pueden obtener cantidades de ADN de una región específica del genoma a partir de una disolución compleja de ADN para su posterior caracterización por diversos métodos.

El PCR es un método libre de células, rápido y sensible de clonación de fragmentos de ADN. El PCR estándar es un procedimiento in vitro para la amplificación de una secuencia específica de ADN, desde cantidades muy pequeñas de material genético o de origen antiguo. La amplificación específica requiere alguna información primordial sobre las secuencias del ADN objetivo.

El principio fundamental del PCR se basa en la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante la multiplicación exponencial de ciclos sucesivos hasta obtener suficiente producto para ser visualizado. De esta manera, una molécula simple de ADN puede ser amplificada más de 1000 millones de veces, en 30 ciclos de reacción

La PCR se basa en ciertas características de la duplicación in vivo del ADN; la primera es que la síntesis de nuevas cadenas de ADN es un proceso catalizado

enzimáticamente por el ADN polimerasa y la segunda es la necesidad de la ADN polimerasa de iniciadores (primers) para que se pueda ligar a la hebra de ADN que le servirá de base o molde para sintetizar la nueva hebra. Este requerimiento es el que se explota para lograr la síntesis específica de un segmento determinado del genoma a partir de una disolución de ADN extraído directamente de las células.

Si se conoce la secuencia de la región de interés, se pueden sintetizar estos iniciadores y luego en repetidos ciclos de amplificación, aumentar exponencialmente el número de copias de la región, pues cada copia recién sintetizada, sirve de molde para la síntesis de otra en el ciclo siguiente.

El PCR es una reacción en cadena porque las nuevas bandas de ADN actúan como plantillas para futura síntesis de ADN que son alrededor de 25-35 ciclos subsecuentes, teóricamente cada ciclo duplica la cantidad de ADN amplificado. Al final, al menos están presentes 105 copias del objetivo específico a secuenciar. El producto amplificado puede ser visualizado como una banda de tamaño específico después de la electroforesis en gel.

Cada ciclo, involucra 3 tiempos estrictamente controlados y reacciones a temperaturas controladas en termociclador automatizados, toma alrededor de 1-5 minutos.

Los 3 pasos en cada ciclo son:

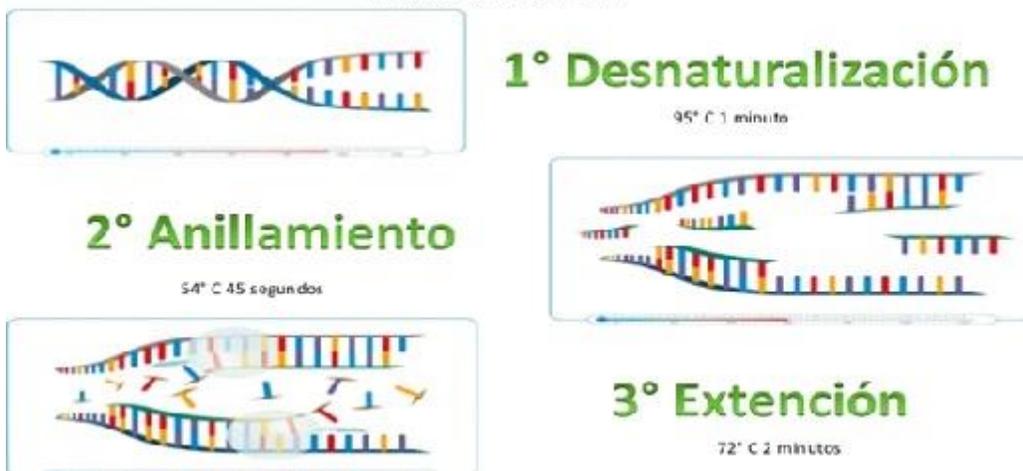
**Desnaturalización 90-95°C:** La doble hebra de ADN templado o molde se abre por efecto del calor, esto sucede porque la energía térmica rompe los puentes de hidrógeno que mantienen las dos hebras de ADN juntas a temperaturas más bajas. Se prefiere la desnaturalización térmica de ADN a la desnaturalización química porque es fácilmente reversible por enfriamiento.

**Hibridización: Annealing** o apareamiento de los cebadores o “primers” a las regiones flanqueantes de la secuencia de ADN a amplificar, en el rango de 55-65°C (Estrada, 2013). La hibridación del cebador, inicia cuando la mezcla de

reacción se enfría y los cebadores oligonucleótidos que se encuentran a los lados de la zona por amplificar, se hibridan con las hebras simples de la molécula de ADN molde.

**Extensión:** Durante esta etapa el ADN polimerasa termoresistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de Identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de Carbapenemasa y genes que portan  $\beta$ -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE). 24 72°C ya que es la temperatura a la que la "Taq polimerasa" alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica y después de 20 ciclos ya tenemos aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas molde iniciales ADN En cada ciclo posterior el ADN sintetizado sirve como plantilla para otra ronda de síntesis. El primer ciclo da como resultado ADN sintetizado de longitudes variables que terminan en 3' porque la síntesis continúa más allá del sitio de secuencia. Lo mismo pasa durante los ciclos subsecuentes, pero las cadenas variables son rápidamente superadas por ADN nuevo con longitudes corregidas a ambos extremos porque las síntesis no pueden continuar pasado el termino de los primers en la plantilla opuesta (Ortiz M. Darling Auxiliadora, 2014).

### Pasos de la PCR



#### 6 .7.2.4 Electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ion, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética. (Instituto de Biotecnología, 2006).

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta

forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones. La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética.

### **Inhibidores de la PCR**

Se trata de sustancias que interfieren con los ADN polimerasas termoestables ya sea mediante el bloqueo directo total o parcial de su actividad catalítica o mediante la unión directa al ADN de doble cadena. Por ejemplo, algunas sustancias interaccionan con los iones  $Mg^{2+}$ .

Otra importante fuente de inhibición son los propios reactivos que se usan en el proceso de extracción de ADN, como por ejemplo, el exceso de KCl, NaCl y otras sales, detergentes iónicos, etanol e isopropanol, fenol y otros. Los inhibidores pueden eliminarse mediante purificación química del extracto o física mediante columnas de sílica.

## **7. Diseño metodológico.**

### **1. Área de Estudio**

El estudio se realizó en el hospital Alemán Nicaragüense, hospital de atención general y con especialidades en unidades de Cuidados Intensivos de Adultos y Neonatos, Medicina Interna, Cirugía General y Ortopedia, Pediatría y neonatología y ginecología.

### **2. Tipo de Estudio**

Se realizó un estudio de tipo prospectivo descriptivo y de corte transversal en el cual se determinaron genes productores de enzimas carbapenemasa de tipo: Metalo- $\beta$ -lactamasa, KPC y Oxacilinasas en cepas provenientes de pacientes hospitalizados.

### **3. Universo**

El universo estuvo comprendido por 249 cepas de Enterobacterias captadas en el periodo del estudio y que eran procedentes de los pacientes ingresados en el Hospital Alemán Nicaragüense.

### **4. Muestra.**

La muestra estuvo comprendida por 45 cepas fenotípicamente resistente a carbapenémicos.

### **5. Tipo de Muestreo.**

Se realizó un muestreo no Probabilístico por conveniencia, utilizando los siguientes criterios de inclusión:

- Que la cepa correspondiera al grupo de las Enterobacterias.
- Que las Cepas fueran provenientes de pacientes hospitalizados en el hospital Alemán Nicaragüense (HAN).
- Que la cepa presentara fenotipo del mecanismo de resistencia en estudio.

Criterios de Exclusión:

- Cepas no correspondieran al grupo de las Enterobacterias.
- Cepas de Enterobacterias con resistencia a carbapenémicos y que sean aisladas en pacientes provenientes de otras unidades de salud.
- Cepas de Enterobacterias que no presenten el perfil de resistencia a Carbapenemes.

## **6. Procesamiento y Análisis de las Muestras.**

Una vez identificado el genotipo de las cepas se colocaron en caldo leche y se congelaron a -20 °C.

Fenotipificación en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense

- Se realizó una suspensión al 0.5 % en la escala de Macfarland con la cepa en estudio.
- Se realizó un inóculo de la suspensión en agar Mueller Hinton distribuyendo en todo el plato uniformemente.
- Se colocaron discos impregnados con EDTA y APB (10 ug) en medio de discos de Imipenem y Meropenem a una distancia de 10 mm entre el centro de cada disco.
- Se incubó las placas invertidas a temperaturas de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 18 -24 horas.
- Se revisaron las placas en busca de sinergia entre los inhibidores y el carbapenémico.
- Fueron positivas para MBL aquellas que presentaron sinergia entre el carbapenémico y EDTA.
- Fueron positivas para serina carbapenemasa aquellas que presentaron sinergia entre el carbapenémico y APB.
- Los inóculos en cuyos crecimientos no se observó sinergia fueron clasificados como posibles productores de enzimas carbapenemasas de tipo Oxacilinasas y fueron confirmadas por métodos moleculares.

### **Recuperación de las cepas en estudio a partir de Caldo leche.**

Identificadas y llenadas las fichas de recolección de datos, las cepas se inocularon en Agar MaConkey para su recuperación y activación a partir de caldo leche en el cual fueron conservadas a una temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$ , se incubaron por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , esta recuperación de colonias se realizó en el laboratorio de bacteriología del hospital Alemán Nicaragüense, se trasladaron las cepas en placas selladas y rotuladas hasta los laboratorios de Biología molecular para la realización de la extracción del ADN y posterior realización de la PCR convencional.

### **Inoculación en Agar MaConkey**

Se Seleccionó la cepa según los criterios mencionados y se llevaron de temperaturas de congelación a temperatura ambiente.

Se ambientaron placas de agar MaConkey y rotular respectivamente:

1. Con un hisopo estéril se tomó una muestra de la cepa en caldo leche y se inoculó en la placa de agar MaConkey, se dejó que el inóculo fuera absorbido por el agar.
2. Se realizó la siembra haciendo rayado por agotamiento para obtener colonias características y bien aisladas.
3. Se llevaron las placas y colocaron en posición invertida en ambiente de incubación con temperaturas de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.
4. Luego del periodo de incubación se observaron colonias características y crecimientos sin contaminaciones por otros microorganismos, se sellaron las placas con papel parafilm, después se colocaron en bolsas de seguridad y se guardaron en termos para su transporte hacia el laboratorio de biología molecular.
5. Si se observaban crecimientos con colonias atípicas o características de contaminación se realizaba un segundo aislamiento a partir de colonias de interés.

### **Extracción por calor del ADN de las cepas en estudio.**

Fue de gran importancia que las muestras a las que se les realizó la extracción correspondieran a crecimientos no mayor de 24 horas de incubación de lo contrario se corría el riesgo de contaminación de la placa o bien pérdida ADN de interés.

Para la obtención del ADN fue necesario realizar la técnica de extracción por calor el cual se realizó en el cuarto negro del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Politécnico de la Salud POLISALy de la siguiente manera:

1. En tubo eppendorf se midieron 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.



2. De un cultivo fresco (24 horas) se realizó un pool de célula/ufc (4 – 5 colonias) y se inoculó en el tubo eppendorf con agua libre de nucleasas.
3. Se dió vortex para mezclar bien.
4. Se colocó el tubo en baño maría en ebullición por 10 minutos.
5. Se retiró la muestra y se enfrió en hielo por 5 minutos.
6. Luego se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos.



7. Se extrajo 80ul del sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf asegurando la tapa y rotulándose según el código de la cepa extraída. (Sambrook, 2001, 3ra Edición) (Europ).



Una vez extraídos los ADN se procedió a guardar las extracciones en refrigeración (-70 °C).

En el cuarto blanco se realizó la reconstitución de los primers a utilizar en la técnica de la PCR convencional, los cuales fueron diluidos a diferentes volúmenes según la prescripción del fabricante y a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , a partir de estos se realizaron concentraciones a 10  $\mu\text{M}$  (micro molar) el cual constituyó la solución de trabajo de cada primer.

Una vez listos los reactivos de trabajo y las extracciones de ADN de cada cepa, se realizaron la master mix para los diferentes protocolos de trabajo y de acuerdo al volumen de muestra a correr en la PCR:

**Protocolo de trabajo para mezcla de corrida de Metallo-β-lactamasa:**

| <b>Reactivo/producto</b>       | <b>Volumen reactivo/producto</b> | <b>Total p&lt; de la mezcla en base a 10 muestras</b> |
|--------------------------------|----------------------------------|---|
| <b>Reaction Buffer 10x</b>     | 5 µl                             | 50 µl   |
| <b>Enhancer solution P. 5x</b> | 10 µl                            | 100 µl  |
| <b>dNTP-Mix (10 mM)</b>        | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>IMPF (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>IMPR (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>VIMP (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>VIMR (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>GIMF (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>GIMR (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>SIMF (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>SIMR (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>SMPF (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>SMPR (10 uM)</b>            | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>ADN molde</b>               | 2 µl                             | 2 µl  |
| <b>Agua libre de nucleasas</b> | 21 µl                            | 210 µl  |
| <b>Taq – Polimerasa</b>        | 1 µl                             | 10 µl   |

La amplificación del producto para Metallo-β-lactamasa se realizó en un tiempo de 30 minutos a 94°C para la desnaturalización, 40 minutos a 52 °C para la hibridación y 50 minutos a 72 °C para la extensión por ciclo.

**Protocolo de trabajo para mezcla de corrida de serina carbapenemasa tipo KPC:**

| <b>Reactivo/producto</b>       | <b>Volumen reactivo/producto</b> | <b>Total de la mezcla en base a 10 muestras</b> |
|--------------------------------|----------------------------------|---|
| <b>Reaction Buffer(10x)</b>    | 5 µl                             | 50 µl   |
| <b>Enhancer solution P. 5x</b> | 10 µl                            | 100 µl  |
| <b>DNTPs</b>                   | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>Bla-KPC Forward</b>         | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>Bla-KPC Reverse</b>         | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>Taq-polimerasa</b>          | 1 µl                             | 10 µl   |
| <b>ADN (producto)</b>          | 2 µl                             | µl  |
| <b>Agua (Sigma)</b>            | 23.5 µl                          | 145 µl  |

La amplificación del producto para KPC se realizó en un tiempo de 1 hora a 95°C para la desnaturalización, 30 minutos a 58 °C para la hibridación y 1 hora y 30 minutos a 72 °C para la extensión en cada ciclo.

**Protocolo de trabajo para mezcla de corrida de Oxacilinasas:**

| <b>Reactivo/producto</b> | <b>Volumen reactivo/producto</b> | <b>Total de la mezcla en base a 10 muestras</b> |
|--------------------------|----------------------------------|---|
| Reaction Buffer(10x)     | 5 µl                             | 50 µl   |
| Enhancer solution P. 5x  | 10 µl                            | 100 µl  |
| DNTPs                    | 1 µl                             | 10 µl   |
| Oxa – 23 Forward         | 1 µl                             | 10 µl   |
| Oxa – 23 Reverse         | 1 µl                             | 10 µl   |
| Oxa- 40- Forward         | 1µl                              | 10 µl   |
| Oxa – 40 Reverse         | 1 µl                             | 10 µl   |
| Oxa – 51 Forward         | 1 µl                             | 10 µl   |
| Oxa – 51 Reverse         | 1 µl                             | 10 µl   |
| Oxa – 58 Forward         | 1 µl                             | 10 µl   |
| Oxa – 58 Reverse         | 1 µl                             | 10 µl   |
| Tap polimerasa           | 0.5 µl                           | 5 µl  |
| ADN (producto)           | 2 µl                             | µl  |
| Agua (sigma)             | 23.5 µl                          | 145 µl  |

La amplificación del producto para Oxacilinasas se realizó en un tiempo de 25 minutos a 94 °C para la desnaturalización, 40 minutos a 55 °C para la hibridación y 50 minutos a 72 °C para la extensión de cada ciclo.

Realizada la master mix se tomó una cantidad de 48 µl y se colocaron en tubos eppendorf previamente rotulados con el código de cada cepa en estudio, se le agregó el ADN ya extraído (2 µl) y se colocaron en el termociclador para su amplificación.

En el tiempo de amplificación se preparó el gel de agarosa de la siguiente manera:

### **Preparación del Gel Agarosa para la corrida (1.5 %)**

Se pesaron, en balanza analítica 2.55 gr de agarosa liofilizada se colocó en un beaker y se diluyó en 170 ml de TBE con concentración de 1X se colocó en el calentador hasta que se disolvió completamente presentando aspecto transparente, se le colocaron 3 µl de Bromuro de etidio y se mezcló luego se vertió el gel en la cámara con peine para su gelificación. Una vez gelificado se retiró el peine y se le colocó TBE 1X en los lados de la cámara.

### **Electroforesis en Gel de Agarosa**

Cuando concluyeron los ciclos de amplificación, se tomó el producto amplificado más buffer de carga (Loading), se procedió a mezclar bien sobre papel parafilm y se colocaron cada muestra en su posición en el gel de agarosa según el protocolo de corrida incluyendo el marcador molecular y los controles positivos que correspondían a cepas certificadas proporcionadas por el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), cepas internas que funcionaron como controles internos y controles negativos para el cual se utilizó agua libre de ADNsa que validaron cada corrida:

| <b>Tipo de peine</b>     | <b>Voltaje (V)</b> | <b>Tiempo</b> | <b>Buffer de carga Loading</b> | <b>Producto</b> |
|--------------------------|--------------------|---------------|--------------------------------|-----------------|
| <b>Peine de 5 pozos</b>  | 120 v              | 45 minutos    | 2 µl                           | 8 – 10 µl       |
| <b>Peine de 8 pozos</b>  | 120 v              | 45 min        | 2 µl                           | 6 µl            |
| <b>Peine de 12 pozos</b> | 120 v              | 1 hora        | 2 µl                           | 8 µl            |
| <b>Peine de 20 pozos</b> | 120 v              | 1 hora        | 2 µl                           | 6 µl            |

Colocada las mezclas se cerró la cámara y se procedió a conectar a una fuente de poder primero con un tiempo y potencia de acuerdo al número de muestras en proceso.

Corridas las muestras se colocó el gel de agarosa sobre la cámara de fluorescencia y se analizaron los pesos moleculares obtenidos, se tomaron fotos de los productos amplificados para su debido registro.

### Tipos de primers empleados para el estudio

Protocolo para los genes Metalo- $\beta$ -lactamasa (Gonzales Escalante E, 2013)

| Primers     | Secuencia                   | Tamaño del producto amplificado (pb) |
|-------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| <b>IMPF</b> | 5`GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC 3` | 188 pb                               |
| <b>IMPR</b> | 5`CCAAACYACTASGTTATCT 3`    |                                      |
| <b>VIMF</b> | 5`GATGGTGTTTGGTCGCATA 3`    | 390 pb                               |
| <b>VIMR</b> | 5`CGAATGCGCAGCACCCAG 3`     |                                      |
| <b>GIMF</b> | 5`TCGACACACCTTGGTCTGAA 3`   | 477 pb                               |
| <b>GIMR</b> | 5`AACTTCCAACCTTGCCATGC 3`   |                                      |
| <b>SIMF</b> | 5`TACAAGGGATTTCGGCATCG 3`   | 570 pb                               |
| <b>SIMR</b> | 5`TAATGGCCTGTTCCCATGTG 3`   |                                      |
| <b>SPMF</b> | 5`AAAATCTGGGTACGCAAACG 3`   | 271 pb                               |
| <b>SPMR</b> | 5`ACATTATCCGCTGAAACAGG 3`   |                                      |

Secuencias de los iniciadores para la detección de genes tipo Oxacilinas utilizados para la detección de carbapenemasas en la prueba de PCR

convencional y el tamaño del producto de amplificación (Elena Fernández Colón, 2009).

| <b>Iniciador</b> | <b>Secuencia</b>                    | <b>Tamaño de producto de amplificación.</b> |
|------------------|-------------------------------------|---|
| <b>OXA-23 F</b>  | 5´ - GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3´  | 501 bp                                      |
| <b>OXA-23 R</b>  | 5´ - ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3´  |   |
| <b>OXA-40 F</b>  | 5´ - GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3´  | 246bp                                       |
| <b>OXA-40 R</b>  | 5´ - AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3´  |   |
| <b>OXA-51 F</b>  | 5´ - TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3´  | 353bp                                       |
| <b>OXA-51 R</b>  | 5´ - TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3´  |   |
| <b>OXA-58 F</b>  | 5´ - AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3   | 599 bp                                      |
| <b>OXA-58 R</b>  | 5´ - CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC- 3´ |   |

Protocolo de amplificación del gen bla-KPC, Primers utilizados se muestran en esta tabla (ZULIA, 2013).

| Primers           | Secuencia                         | Tamaño del producto amplificado |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| <b>blaKPC - F</b> | 5'-TGT CAC TGT ATC GCC GTC-3'     | 900 bp                          |
| <b>blaKPC - R</b> | 5'-CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC-3' |                                 |

La información obtenida de los registros del laboratorio, así como los de los análisis serán procesados en los programas de informática Word, Excel Y Power Point 2010.

## 8 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

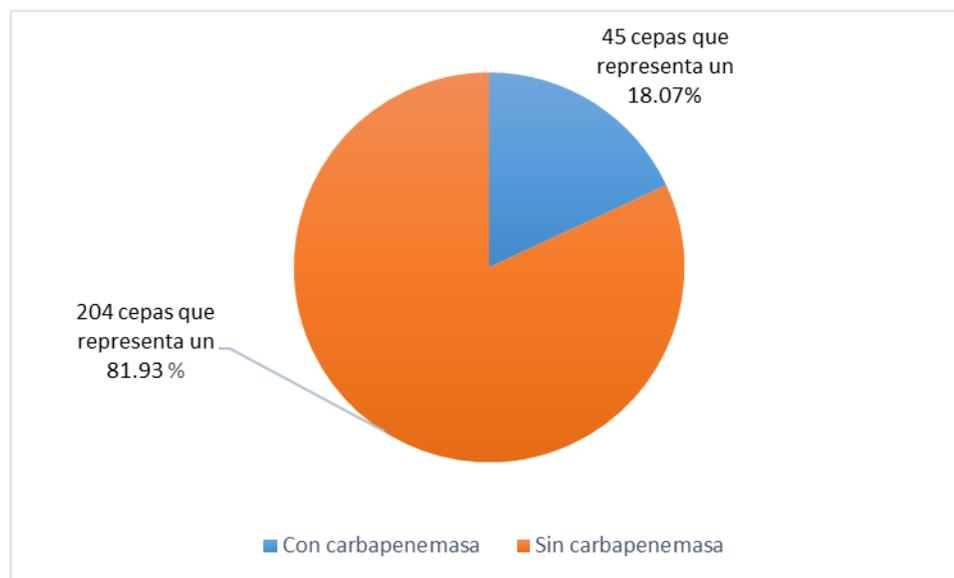
| VARIABLE                     | SUB-VARIABLE         | INDICADOR   | VALOR                | Criterio                         |
|------------------------------|----------------------|---|----------------------|----------------------------------|
| <b>Carbapenemasa</b>         |                      | Imipenem  | Halo >22<br>Halo <21 | Carbapenemasa                    |
| <b>Fenotipo</b>              | KPC                  | Sinergia con APB  |                      | Positivo                         |
|                              | Metalo-carbapenemasa | Sinergia con EDTA   |                      | Negativo<br>Positivo<br>Negativo |
|                              | Oxacilinasas         | Sin sinergia  |                      | Positivo<br>Negativo             |
| <b>Genotipo</b>              | KPC                  | Bla kPC 900 pb  |                      | Positivo<br>Negativo             |
|                              | MBL                  | IMP 188 pb<br>VIM 390 pb<br>GIM 477 pb<br>SIM 570 pb<br>SPM 271 pb      |                      |                                  |
|                              | OXA                  | Oxa – 23 501 pb<br>Oxa- 40 246 pb<br>Oxa – 51 353 pb<br>Oxa – 58 599 pb |                      |                                  |
| <b>Ambiente hospitalario</b> | UCI                  |   | 8                    | Carbapenemasa positivos          |
|                              | Medicinas            |   | 5                    |                                  |
|                              | Ginecología          |   | 1                    | Carbapenemasa                    |
|                              | Cirugía              |   | 3                    |                                  |

|                                     |                       |          |  |                              |
|-------------------------------------|-----------------------|----------|--|------------------------------|
|                                     | Pediatría<br>Neonatos |          | 5<br>23  | negativos                    |
| <b>Resistencia<br/>antibiótica.</b> | Halo                  | Medición | AMP < 13 mm<br>PIP < 17 mm<br>AMC < 13 mm<br>TZP < 17 mm<br>CEP < 14 mm<br>FEP < 18 mm<br>CEC < 14 mm<br>CTX < 22 mm<br>CXM < 14 mm<br>CRO < 19 mm<br>CAZ < 17 mm<br>FOX < 14 mm<br>ERT < 18 mm<br>IMP < 19 mm<br>MEM < 19 mm<br>COL < 10 mm<br>GEN < 12 mm<br>AMK < 14 mm<br>CIP < 15 mm<br>LVX < 13 mm<br>NAL < 13 mm<br>SXT < 10 mm<br>CHL < 12 mm<br>NIT < 14 mm | Resistentes<br><br>Sensibles |

## 8 Análisis y discusión de Resultados.

### Gráfico No 1

**Aislamientos de Enterobacterias con resistencia a carbapenémicos en muestras de pacientes internos del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo agosto 2015 a octubre 2016.**



Fuente: Libros de registro de laboratorio HAN.

El universo estuvo constituido por 249 cepas de enterobacterias las cuales cumplieron con los criterios de inclusión, de estas 45 muestras que correspondían el 18.07 % presentaron resistencia a los antibióticos carbapenémicos Imipenem y Meropenem en la prueba de difusión por disco, lo que fue representativo para conformar la muestra del estudio.

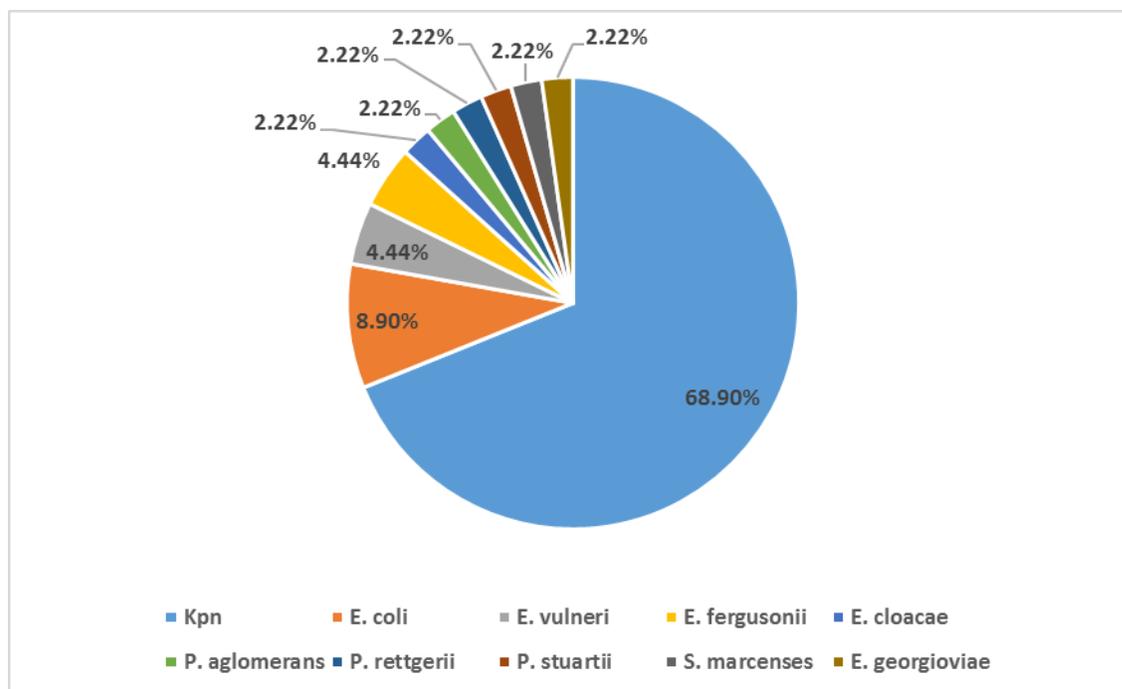
En un estudio realizado por Ortiz Machado, Darling y colaboradores durante el año 2014 en el hospital Antonio Lenin Fonseca reflejaron que de las 730 muestras que conformaban su universo, 13 de estas muestras equivalentes al 1.8% fueron positivos para carbapenemasa, mientras que en nuestro estudio las muestras con carbapenemasa tuvieron una prevalencia del 18.07%, esto nos indica que

actualmente la incidencia de bacterias resistentes a carbapenémicos está en aumento debido a la presencia de genes codificadores capaces de transmitirse fácilmente entre las mismas bacterias y que las bacterias se están adaptando para sobrevivir a los antibióticos considerados como última línea de acción.

M. Echeverri-Toro, V. Rueda, y colaboradores durante el 2012 en un hospital universitario de Colombia revelaron que de 243 aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* 4 aislamientos que representaron un 5% fueron resistentes a carbapenémicos, lo que nos indica que la resistencia no es un fenómeno aislado sino que es un fenómeno que es frecuente en otros países, donde Nicaragua según los estudios está presentando un comportamiento similar.

## Gráfico No 2

Total de bacterias aisladas en pacientes internados en el Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo agosto 2015 a octubre 2016.



Fuente: Libros de registro de Laboratorio HAN.

De las 45 cepas aisladas que presentaron resistencia a los carbapenémicos Imipenem y meropenem según los lineamientos del CLSI 2016, *Klebsiella pneumoniae* se presentó con mayor prevalencia, con un total de 31 aislamientos (68.90%) y el segundo microorganismo es *E. coli* con un total de 4 aislamientos (8.90%), luego se presenta *E. vulneri* y *E. fergusonii* con 2 aislamientos cada uno (4.44% respectivamente), y *E. cloacae*, *E. georgioviae*, *P. agglomerans*, *P. rettgerii*, *P. stuartii* y *S. marcenses* con solo un aislamiento cada uno (2.22% respectivamente).

*Klebsiella pneumoniae* es una de las mayores causantes de infecciones intrahospitalarias debido a su alta adaptabilidad a ambientes hospitalarios y el poder sobrevivir en equipos hospitalarios, manos y prendas del personal de salud. Esto ha contribuido en su diseminación a todos los niveles del hospital

representando un riesgo para pacientes que estén susceptibles a infecciones bacterianas.

*Klebsiella pneumoniae* también es la mayor causante de infecciones resistentes a carbapenémicos debido a la facilidad que tiene esta de compartir genes de resistencia a otras Enterobacterias lo que la convierten en una preocupación por su facilidad de diseminación y transporte de genes que confieren resistencia a los carbapenémicos.

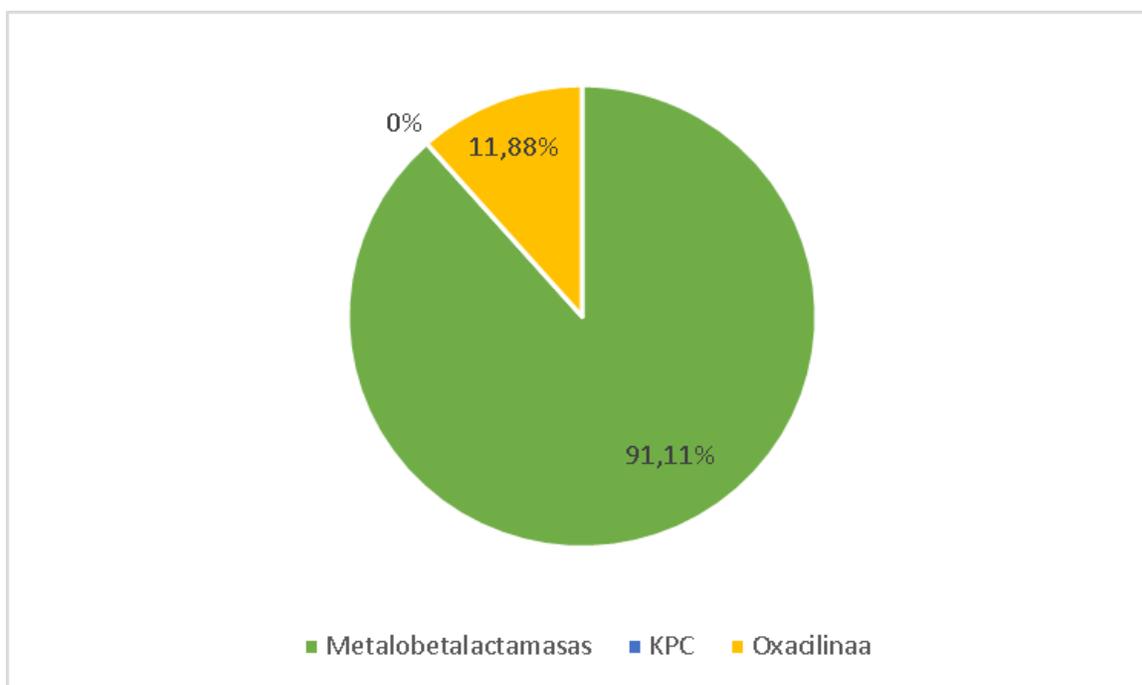
Esto concuerda con los datos a nivel mundial donde *Klebsiella pneumoniae* es la mayor causante de infecciones resistentes a carbapenemasas con una prevalencia del 70% seguida por *E. coli* con un 20% (World Health Organization, 2014).

El gráfico nos revela también que en nuestro estudio no solo están presentes *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* sino también otras Enterobacterias que representan el 22.2% del total de los aislamientos lo que es un dato alarmante ya que significa que *Klebsiella pneumoniae* comparte sus genes de resistencia con otras Enterobacterias por medio de plásmidos, lo que puede provocar que en cualquier momento puede surgir un brote de distintas bacterias capaces de compartir genes de resistencia entre sí, incluso las cepas bacterias capaces de resistir la acción de colistín, lo que descartaría todas las opciones terapéuticas a los pacientes como sucedió en los que presentaron microorganismos resistentes a carbapenémicos y que eran naturalmente resistente al colistín como lo fueron *Serratia* y *Proteus*, las cuales causaron el fallecimiento de los pacientes de quienes se aislaron dichas cepas.

Un estudio realizado en Paraguay (2014) se detectaron 76 cepas productoras de carbapenemasa tipo KPC, de las cuales el 87% de los aislamientos fue encontrada *Klebsiella pneumoniae*, el 11% fueron provocadas por *E. cloacae* y 1% tanto para *S. marcescens* y *K. oxytoca*, dicho estudio concuerda con el nuestro ya que en ambos la bacteria aislada con mayor frecuencia fue *Klebsiella pneumoniae*.

### Grafico No 3

Fenotipos encontrados según la prueba de sinergia entre carbapenémicos con APB y EDTA.



Fuente: Libros de registro de laboratorio HAN.

Se realizó la detección fenotípica de carbapenemasa por medio del test de sinergismo de triple disco con ácido Fenil Borónico (APB) y Acido Etilendiaminotetraacético (EDTA) y carbapenémicos. De las 45 cepas en estudio, 41 presentaron sinergia con EDTA clasificándose en el grupo metalo- $\beta$ -lactamasas, las cuales correspondían al 91.11% de la muestra. Ninguna de las muestras presentó sinergismo con ácido Fenil Borónico por lo que no se detectó carbapenemasas serino tipo kpc, aquellas cepas que no revelaron sinergismo con los inhibidores se tomaron como cepas con genes tipo OXA siendo estas un total de 4 muestras que representaban 11.88% del estudio.

Las pruebas de fenotipificación por sinergismo con triple disco utiliza ácido Fenil Borónico (APB) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y un carbapenemico,

este método se fundamenta en la potenciación del halo de inhibición, que se genera al rededor del disco del antibiótico, cuando este se enfrenta a un disco cargado con un inhibidor de la acción enzimática. Por tanto, se considera resultado positivo cuando se observa sinergia entre ambos discos

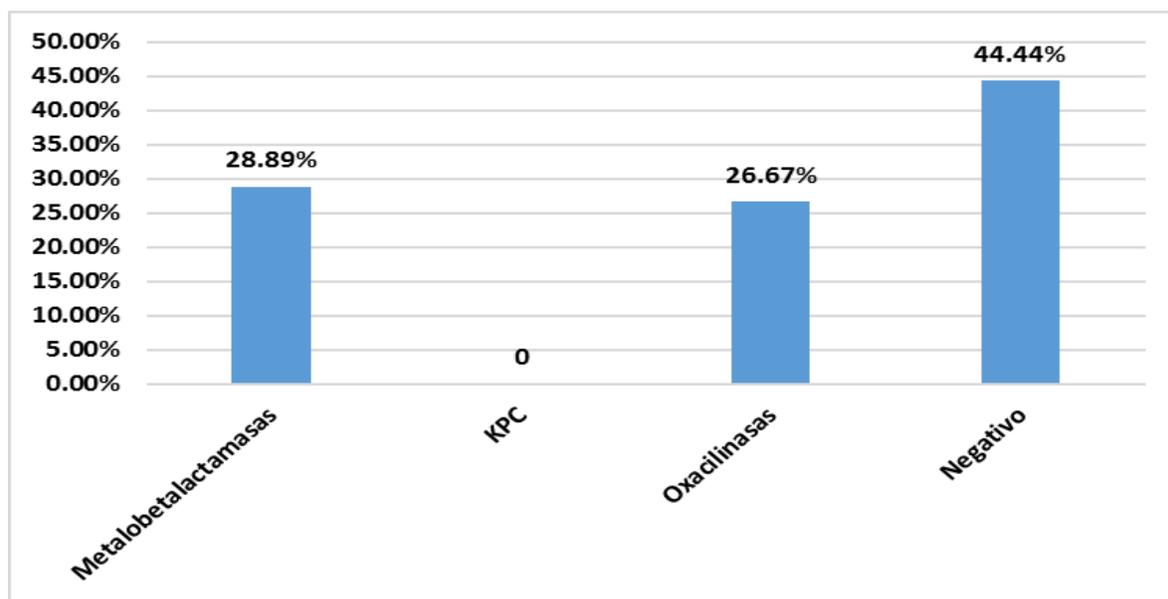
En un estudio (Darling Ortiz Machado, et al. 2014) realizado en Managua, en el Hospital Antonio Lenin Fonseca, se aislaron 13 cepas resistentes a carbapenems, y se les realizó la prueba de sinergismo con EDTA y APB, dando como resultado una sinergia negativa para APB y una sinergia positiva con EDTA del 100% de sus muestras.

El estudio realizado en el Laboratorio de Bacteriología, Micología y Parasitología del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas en Buenos Aires, Argentina, en su estudio de Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias concluyó que los métodos fenotípicos para la detección de bacterias con carbapenemasas KPC son confiables y fáciles de implementar en los laboratorios de microbiología clínica (Federico G. Nicola\*, 2012). Esto resulta de enorme importancia desde el punto de vista terapéutico, epidemiológico y de control de infecciones.

Pillai y colaboradores en su estudio realizado en el 2013 en la India comprobaron por métodos genotípicos la efectividad del método de sinergia con discos de EDTA Imipenem y Meropenem, concluye que el método de triple disco es confiable para la detección de enzimas de carbapenemasas de tipo Metallo  $\beta$ -lactamasa (Pillai, y otros, 2013).

#### Grafico No 4

#### Identificación genotípica a través de la prueba de PCR convencional para mecanismos de resistencia de tipo carbapenemasa



Fuente: Datos de laboratorio Biología Molecular POLISAL

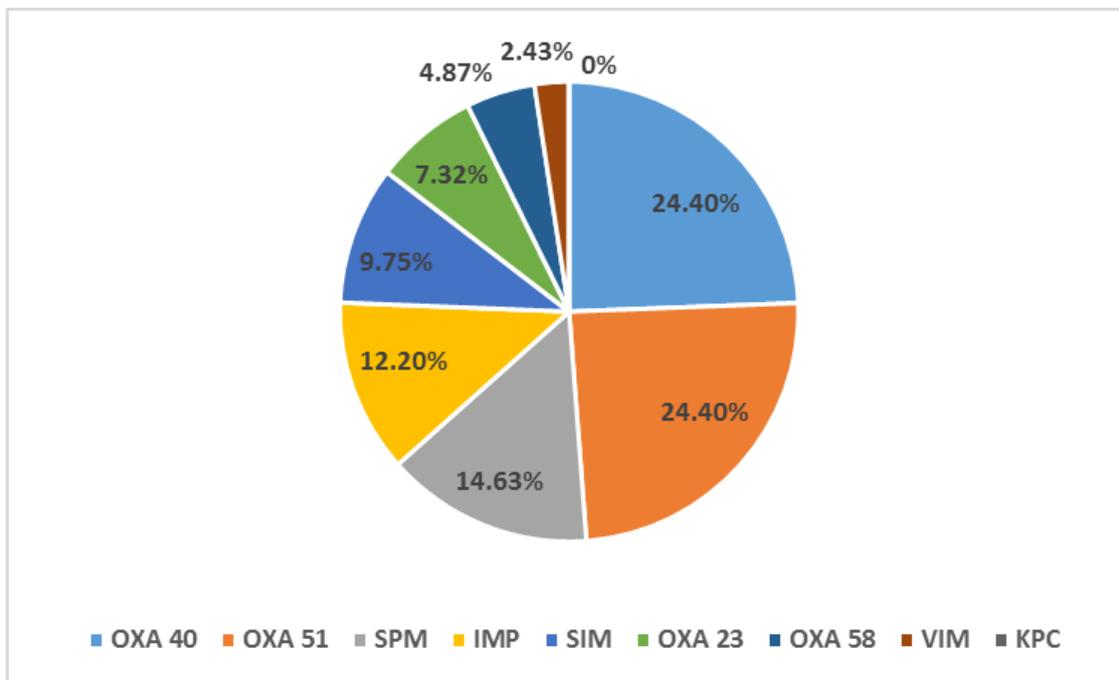
De las 45 muestras analizadas con la técnica del PCR convencional, 13 muestras correspondiente al 28.89% presentaron genes codificadores de carbapenemasas de tipo metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), 12 muestras correspondientes al 26.67% presentaron genes codificadores de carbapenemasas del tipo OXA, se mostró una incidencia del 0% en genes del tipo serina, 20 de las muestras las cuales representan un 44.44% se presentaron negativas a todos los genes buscados en el estudio.

Los análisis genotípicos demuestran que los genes codificadores de carbapenemasas más abundantes fueron los de tipo metalo- $\beta$ -lactamasas, resultado que concuerda con la investigación realizada por (Ana Chinchilla, 2013) en la ciudad de Guatemala en el cual reflejó que las MBL presentó la mayor prevalencia con un 39 %.

Cabe mencionar que todas las muestras con resultado negativo por el método del PCR fueron positivas por el método de triple disco sugerentes de la presencia de genes codificadores de enzimas productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas, esto nos hace sospechar de genes de los cuales no disponíamos de primers para realizar su identificación como es el caso del gen New Dheli, o de algunos genes con mutaciones en las regiones específicas, en algunas de las electroforesis realizadas para la detección de genes de tipo metalo- $\beta$ -lactamasas se encontraron genes con un peso de 900 pares de bases lo cual podría deberse a diversos motivos dentro de los cuales están un mutación en la región amplificada y un gen tipo metalo- $\beta$ -lactamasa que no corresponda a los buscados en el estudio.

### Gráfico No 5

Genes codificadores de carbapenemasas encontradas en cepas aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense por la técnica de PCR convencional en el periodo agosto 2015 a octubre 2016.



Fuente: Datos de laboratorio Biología Molecular POLISAL

El estudio revela que los genes con mayor frecuencia fueron el gen OXA 40 y el gen OXA 51 encontrado en 10 cepas cada uno lo que representó un 24.4% respectivamente, seguidos de SPM encontrado en 6 cepas correspondiente a un 14.63%, luego tenemos IMP donde se encontró en 5 cepas lo que significa un 12.2%, el gen SIM fué encontrado en 4 cepas lo que representa un 9.75 %, OXA 23 estaba presente en 3 cepas lo que representa un 7.32 %, seguido de tenemos OXA 58 presente en 2 cepas lo cual representa un 4.87% y para finalizar tenemos el gen VIM presente en una única cepa lo cual corresponde a un 2.43 %.

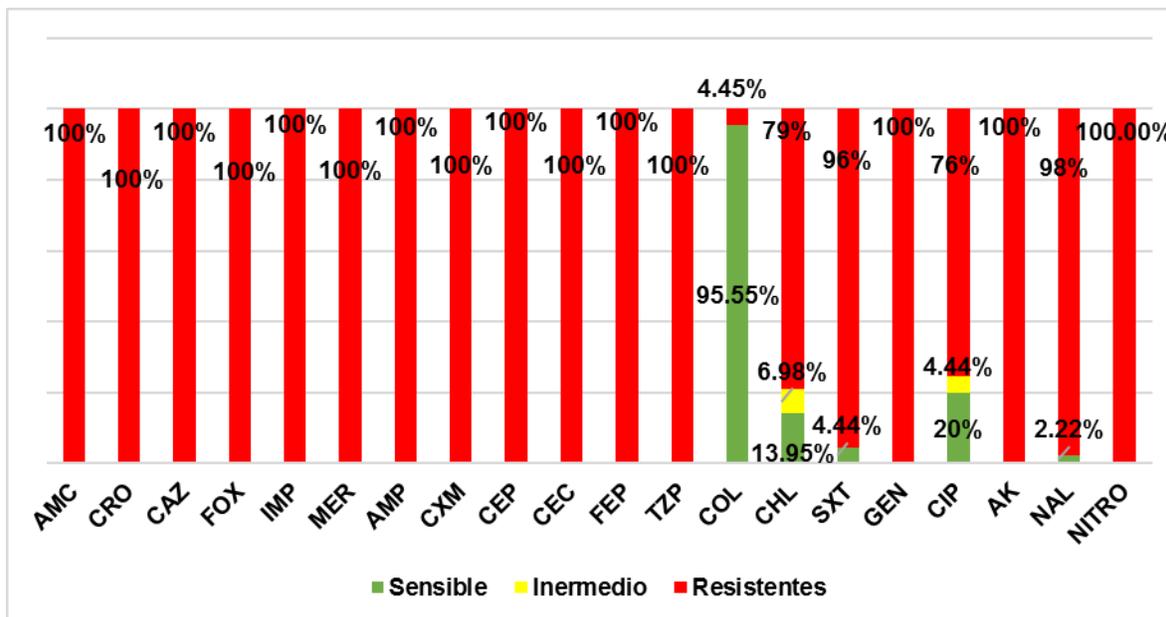
El estudio nos demuestra la presencia de todos los genes en estudio a excepción de genes Serina KPC lo que nos indica que no hay presencia de dicho gen en el

Hospital Alemán Nicaragüense. Los genes fueron encontrados en cepas aisladas de distintas salas del Hospital Alemán Nicaragüense.

Nuestro estudio difiere de los datos a nivel mundial debido a que no se detectó genes productores de carbapenemasas tipo Serina KPC, ya según los datos del CDC y de la OMS, los genes Serina KPC son los genes más asociados a resistencia de carbapenemicos teniendo una prevalencia del 50% en cepas de Klebsiellas pneumonias productoras de carbapenemasas (Word Health Organizacion, 2014).

## Gráfico No 6

Perfil de resistencia encontrada en cepas productoras de carbapenemasas aisladas en pacientes internados en el Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo agosto 2015 a octubre 2016.



Fuente: Libros de registro de laboratorio HAN

Mediante la técnica de difusión por disco se determinó la sensibilidad antimicrobiana, donde se encontró que la mayoría de las cepas tienen resistencia a gran parte de los antibióticos, siendo los únicos antibióticos donde se presentaron sensibilidad Trimetropinsulfa metoxasol SXT, Cloranfenicol CHL, Ciprofloxacina CIP, Acido Nalidixico NAL Y Colistín COL, este último se presentó eficaz contra 42 de las cepas (95.55%), las únicas en ser resistentes a este antibiótico fueron cepas de tipo *Serratia* y de tipo *Providencia* las cuales poseen resistencia de forma natural al Colistina.

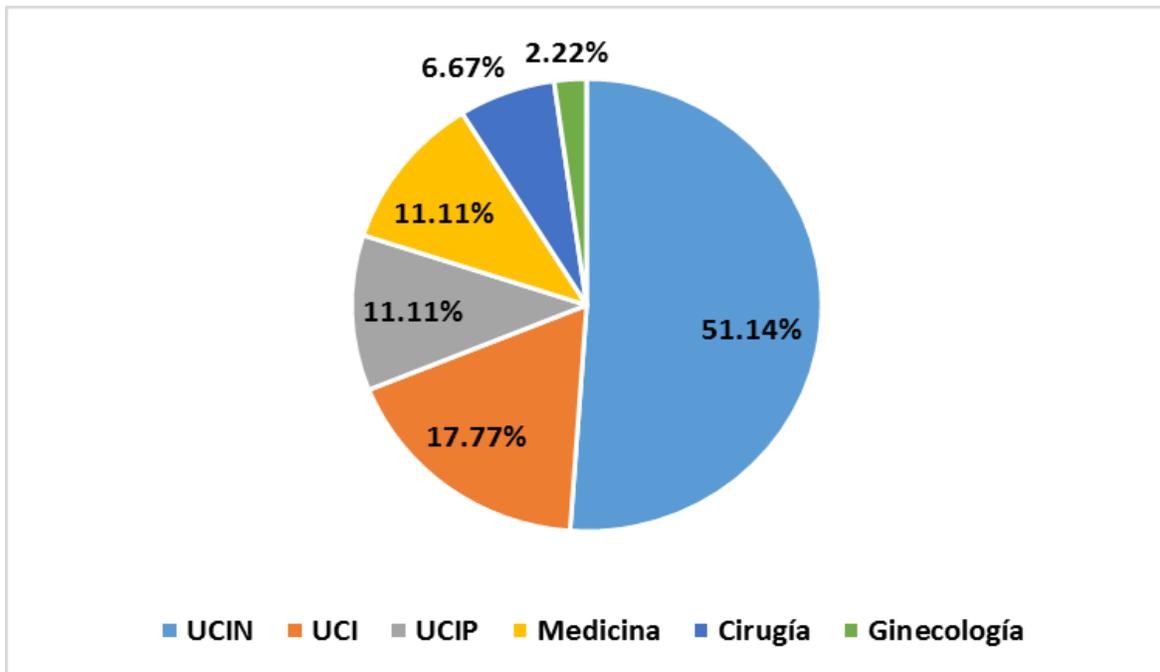
Nuestro estudio concuerda con el estudio de (Darling Ortiz Machado, 2014) en el hospital Antonio Lenin Fonseca en el año 2014 donde las cepas de dicha investigación también presentaron resistencia a la mayoría de los antibióticos evaluados. Sin embargo, es importante señalar que a diferencia del estudio

realizado por (Darling Ortiz Machado, 2014), donde no se presentó ninguna resistencia a Colistín en nuestro estudio se vio reflejado por el aislamiento de una cepa correspondiente al género *Serratia spp* que presenta una resistencia natural a colistina.

La mejor opción terapéutica es Colistín ya que presentó la mejor eficacia contra las cepas debido a que la mayoría se presentó sensible a este antibiótico, es importante señalar que a pesar de la efectividad de este fármaco se debe tener especial atención en las dosis usadas ya que es posible un alto riesgo de agravamiento dada la nefrotoxicidad de la misma, podría producir una complicación de la condición patológica del paciente. Por ello, se recomienda un riguroso control clínico del paciente.

### Gráfico No 7

Distribución de cepas productoras de enzimas carbapenemasas aisladas en pacientes internos del Hospital Alemán Nicaragüense por salas en el periodo agosto 2015 a octubre del 2016.



Fuente: Datos de Laboratorio Biología Molecular POLISAL

De las 45 cepas del estudio 23 fueron aisladas del área UCIN lo que representó un 51.14%, seguido por 8 cepas de la sala de UCI representando un 17.77%, luego tenemos las salas de UCIP y Medicina con 5 cepas aisladas en cada lo que representa un 11.11%, después tenemos el área de Cirugía con 3 aislamientos representando un 6.67% y finalizando con el área de Ginecología con un aislamiento el cual representó un 2.22%.

Las salas de unidades de cuidados intensivos son áreas con factores predisponentes a la adquisición de microorganismos portadores de genes de resistencia a carbapenémicos y en donde se encuentran pacientes en estado muy crítico, inmunosuprimidos y con larga. Un estudio de 21 aislamientos de *Klebsiella spp* realizado por Marqués Herrera Kelly y colaboradores en el año 2015 en un

Hospital pediátrico de tercer nivel de Bogotá Colombia refleja un 43% correspondiente a 9 casos aislados en UCI pediátrica, 29 % correspondiente a 6 casos aislados en otras salas y 9.5% correspondiente a 2 casos para las salas de Oncología, UCIN y Urgencias, podemos observar que estos porcentajes se encuentran muy relacionado a nuestro estudio en cuantos a casos de aislamientos en salas de UCI pediátrica y de Neonatos, en estos encontramos factores importantes para la puertas de entradas a microorganismos multirresistente y causantes de sepsis graves y que conllevan a la gravedad de pacientes con edades en donde su sistema inmunológico es aun inmaduro adicionándole los procesos traumáticos a los que son sometidos como lo son la intubación para la respiración mecánica, uso de catéteres y flebotomías a repetición que en sus casos son procedimientos estrictos a los que se deben de someterse para la administración de fármacos intravenosos y monitorización de los mismos.

Los genes codificadores de carbapenemasas se pueden diseminar por varias vías entre ellas, la dispersión entre áreas específicas, como sucede en el paso de pacientes que cursaron con un estado de sepsis grave en UCI y que luego de terminar tratamientos en esta área retornan a su sala de origen como Medicina, Ginecología y Cirugía general llevando consigo bacterias productores clones codificadores de enzimas carbapenemasas y principalmente contituyendo transmisión cruzada interhospitalaria, tampoco podemos obviar uno de los puntos de mayor importancia como lo es el traslado de estas cepas resistentes entre salas a través de objetos de uso personal contaminado por manos indebidamente lavadas y en contactos con estetoscopios, celulares, y gabachas .

También nuestro estudio lo podemos asociar un estudio realizado en la ciudad de Guatemala en el 2014 por Garrido Ortega, Mayra, química bióloga quien determinó carbapenemasas en *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* Aisladas en el Hospital General san Juan de Dios, en donde se encontró un 15 % de prevalencia de carbapenemasas en salas de Cuidados Intensivo y Medicina respectivamente.

En relación con nuestro estudio podemos observar un porcentaje similar entre las salas de medicina que corresponden a un porcentaje menor en cuanto a las UCI.

Las salas de Cirugía con un 6.67% y Ginecología con un 2.22 % fueron las salas menos afectadas en cuanto a las salas abordadas en todo el estudio ya que en ellas podemos contemplar casos menos graves de bacteriemias, el poco uso de procedimientos invasivos así como las características de ser áreas abiertas en donde la proliferación es menor al estar en contacto con factores del ambiente natural, podemos enmarcar que en estas salas el uso de antibióticos carbapenémicos es más restringido lo que es un punto muy a favor de evitar la resistencia a los mismos debido a presión selectiva.

## 9. CONCLUSIONES.

En total se aislaron 249 Enterobacterias que fueron las que cumplieron con todos los requisitos para entrar al estudio y que constituyeron nuestro universo. De estas 249 Enterobacterias se aislaron 45 cepas que presentaban resistencia a los carbapenémicos Imipenem y Meropenem, estas fueron las que constituyeron la muestra del estudio.

El fenotipo se demostró a través del test de sinergismo entre Imipenem, meropenem e inhibidores (Ácido Fenil Borónico y EDTA) se clasificó cada tipo de carbapenemasa obteniendo un total de 41 cepas con sinergismo con EDTA clasificándose como tipo metalo- $\beta$ -lactamasas y 4 que fueron negativas con ambos inhibidores clasificadas como tipo Oxacilinasas y no se obtuvieron muestras positivas con Ácido Fenil Borónico por lo que no se lograron aislar carbapenemasas de tipo serina.

Los genes con mayor frecuencia encontrado a través de la técnica del PCR convencional fueron el OXA 40 y OXA 51, seguido por el gen SPM, el cuarto gen más encontrado fue IMP, cabe destacar que el gen KPC no se encontró en ninguna cepa en estudio.

Todas las cepas aisladas en el estudio presentaron resistencia a todos los antibióticos de tipo penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactamicos, evaluados, el caso de colistina se presentaron tres cepas resistentes debido a que pertenecían a los generos Proteus y Serratia las cuales presentan resistencia natural a colistín, Algunas de las 45 cepas del estudio demostraron sensibilidad ante otros antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacina y trimetripim sulfametoxasol.

Las Enterobacterias resistentes a carbapenémicos se encuentran distribuidos por todas las salas de internados del hospital, pero su prevalencia es mayor en salas

de cuidados intensivos donde hay pacientes con factores de riesgo que los predisponen a infectarse más fácilmente y en especial la sala de UCIN donde se encontraron la mayor cantidad de aislamientos.

## **10. RECOMENDACIONES.**

1. Invitamos a los estudiantes de microbiología a realizar estudios sobre resistencia a Carbapenemasas presentes en los hospitales del país.
2. Instamos al POLISAL a que promueva estudios de Genotipificación para conocer mayormente la resistencia a carbapenémicos que enfrenta nuestro país.
3. Al personal de salud para que sé que forme conciencia acerca de la problemática que conlleva el abuso de los antibióticos.
4. A los hospitales para que realicen estudios epidemiológicos en las distintas salas de hospitalizados y estar al tanto de la situación en que estos se encuentran y conocer los datos de las bacterias presentes en estas salas.

## 11. Bibliografía.

- , U. N.-F. (s.f.). FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE. *Microbiología e Inmunología*, 1.
- , U. N.-F. (s.f.). FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE. En L. S. Luis A. Merino, *Microbiología e Inmunología* (pág. 1).
- Ávila, J. (2012). *Caracteización genotípica y fenotípica de Enterobacterias productoras de Carbapenemasas tipo KPC*. Managua.
- Cantón, E. C. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gram negativos. En *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pág. 54). España.
- Claudia Mercedes Pérez Rodríguez, J. R. (2010). Frecuencia de genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas aisladas de urocultivos provenientes de pacientes ambulatorios de los municipios de León y Juigalpa. . LEON.
- CUADRA, Q. E. (2014 de Enero de 2014). recomendacion para la inclusion de pruebas de screnning para carbapenemasas en Klepsiella spp. Chile.
- DC, A. M. (2010). *MANUAL DE ACTUALIZACION EN RESISTENCIA BACTERIANA Y NORMA CLSI M100*. BOGOTA .
- Echerverri-Toro, L., Rueda, Z., Maya, W., Agudelo, Y., & Ospina, S. (2012). Klebsiella pneumoniae multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista chilena de infectología*.
- Elena Fernández Colón, Z. B. (2009). Determinación de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínicos de Acinetobacter baumannii de hospitales de la ciudad de Cochabamba. *BIOFARBO*, 9.
- Europ, W. H. (s.f.). Extraccion y purificacion de ADN.

- Federico G. Nicola\*, J. N. (2012). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección. *Revista Argentina de Microbiología* .
- Gonzales Escalante E, V. T. (2013). METALO- $\beta$ -LACTAMASES IN CLINICAL ISOLATES OF *Pseudomonas aeruginosa* IN LIMA, PERU. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*.
- Instituto de Biotecnología, U. N. (30 de ayo de 2006). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos.
- Jesús Oteo, E. c. (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España. *ELSEVIER DOYMA*, 667 - 669.
- Jesús Oteo, J. O. (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: Documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *ELSEVIER DOYMA*, 667 - 670.
- Laura P. Alejos Velasquez, M. A. (s.f.). Extracción y Purificación de ADN.
- M. Echeverri-Toro, L., V. Rueda, Z., Maya, W., Agudelo, Y., & Ospina, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista chilena de infectología*.
- Mateos-Rodríguez, A. P.-G. (2010). Enterobacterias. *Medicine*.
- MD, M. J. (2014). Infecciones por *Klebsiella Pneumoniae* y su perfil de resistencia en egresados del Hospital. *TESIS MONOGRAFICA*. Managua.
- Moises, D. G. (2012). Carbapenemasas, una amenaza actual. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*.
- Monge\*, K. M. (2013). CARBAPENÉMICOS: TIPOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANOS. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXX (608) 599 - 605, 2013, 7*.

Ortiz M. Darling Auxiliadora, R. O. (Abril - Julio de 2014). Identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan B-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas aisladas de procesos infecciosos en los pacientes internados en el hospital Antonio Lenin Fonseca. Managua.

Oxoid. (2006). *The oxoid manual 9th edition*. Inglaterra: Oxoid limited.

Panreac. (s.f.). *Manual básico de microbiología Cultimed*.

Pillai, P., Vadwai, V., Deshpande, P., Panchal, M., Shetty, A., Soman, R., & Rodrigues, C. (2013). Triple-disk assay for phenotypic detection of predominant Carbapenemases. *The Indian Journal of Medical Research*.

Sambrook, J. a. (2001, 3ra Edición). *Molecular Cloning " A laboratory Manual"*. Cold Spring Harbor, NY.

Scielo, R. (2008). Modelos de estudios en investigación aplicada: conceptos y criterios para el diseño. *Scielo*.

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*.

ZULIA, U. D. (2013). DETECCIÓN DE CEPAS DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASA KPC EN PERSONAL DE SALUD. *SERBILUZ*, 47.

# ANEXOS

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA UNAN MANAGUA**

**UNAN-MANAGUA.**



**Instituto Politécnico de la Salud**

**“Dr. Luis Felipe Moncada”**

**POLISAL**

**Instrumento de recolección de la información**

Esta ficha de trabajo tiene como propósito la recopilación de datos concernientes a las muestras del estudio Determinación de genes productores de enzimas carbapenemasas mediante la técnica de PCR convencional en Enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas del hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el periodo Agosto 2015-Octubre 2016.

## 1. Datos de muestra:

- a. Código de muestra:
- b. Fecha de recolección de la muestra:
- c. Sala:
- d. No. Expediente:
- e. Procedencia de muestra (Tipo)
  - Secreción:
  - Líquido:
  - Sangre:
  - Orina.

## 2. Microorganismo aislado:

- a. Género:
- b. Especie:

## 3. Mecanismo de Resistencia:

### Carbapenemasas tipo:

- a. Metallo- $\beta$ -lactamasa: sinergia con EDTA\_\_\_\_\_
- b. KPC: sinergia con Ácido Fenil Borónico (APB)\_\_\_\_\_
- c. Oxacilinasas: sin efecto de sinergia \_\_\_\_\_

#### 4. Sensibilidad Método Kirby Bauer.

| Fármaco | S | R | Fármaco | S | R | Fármaco | S | R |
|---------|---|---|---------|---|---|---------|---|---|
| CXM     |   |   | IMP     |   |   | COL     |   |   |
| CF      |   |   | MEN     |   |   | CIP     |   |   |
| CEC     |   |   | AMP     |   |   | AMK     |   |   |
| CAZ     |   |   | FEP     |   |   | SXT     |   |   |
| AMC     |   |   | TZP     |   |   | CHL     |   |   |
| FOX     |   |   | GEN     |   |   | ----    |   |   |
| CRO     |   |   | NAL     |   |   | ----    |   |   |

## **5. Resultado de la PCR.**

Positivo:

Negativo:

Gen Amplificado:

# Carbapenemasas adquiridas

↑↑ Pseudomonas  
↓ Enterics (↑ Grecia)  
↓ Acinetobacter (↑ L.O.)

**MBL**  
**METALOS**  
*VIM, IMP, SPM, GIM, SIM, AIM, NDM, KHM, LIM, DIM*  
  
R a C3G y C4G  
S a AZT  
  
Inh. per EDTA

**Grupo 3**

↑↑ Enterics  
↓ BGNNF (↑ Colombia, Puerto Rico & Argentina)

**SERINO**  
**Enzimas**  
  
KPC y GES:  
R a C3G, C4G y ATZ  
  
Smo, IMI/NMC, BIC-1:  
S a C3G, C4G y AZT  
  
Inh. per CLAV +/-  
Inh. per APB

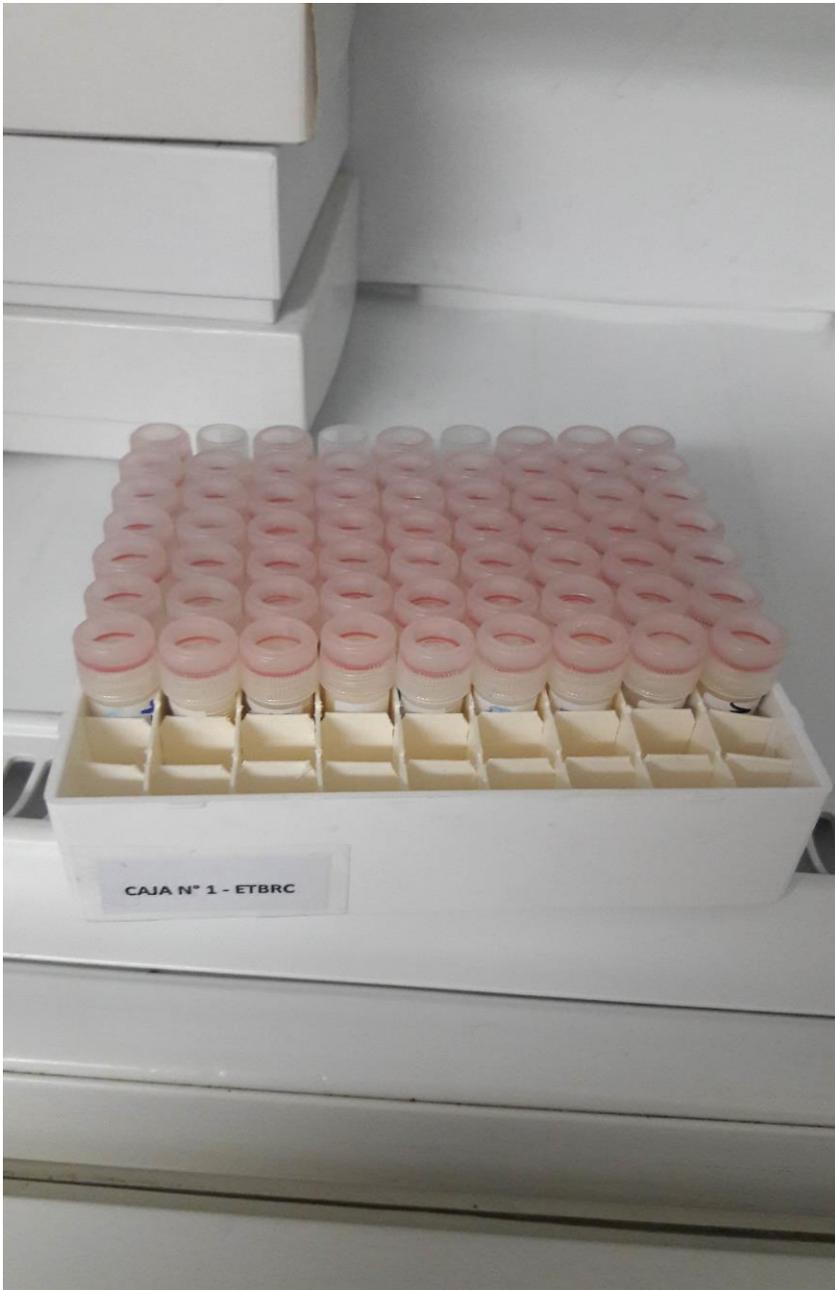
**Grupo 2f**

↑↑ Acinetobacter  
↓ Pseudo  
↓ Enterics (↑ UK, India, Turkia)

**OXAS**  
*Gr. OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-92, OXA-143*  
  
S a C3G, C4G y AZT  
  
Sin inhibidores

**Grupo 2df**

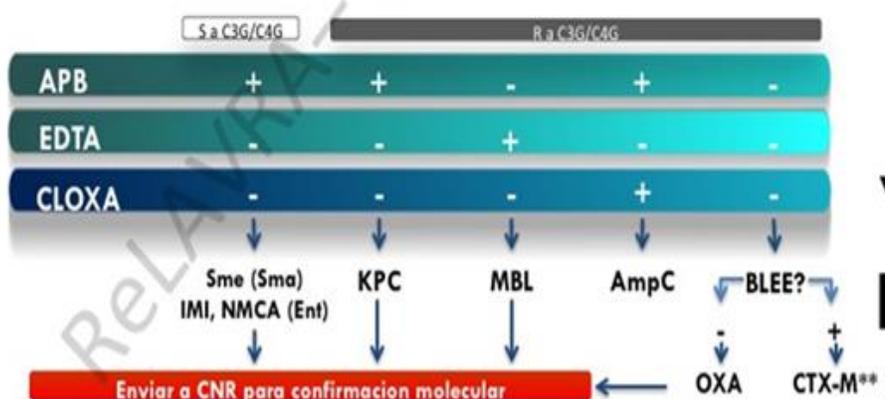
Busk K, AAC 54:969; 2010



Cepario de Enterobacterias del Laboratorio de Bacteriología HAN.

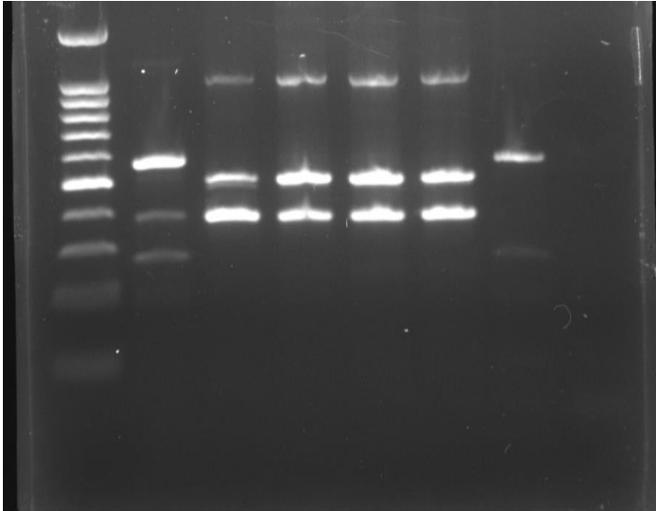


Cepas sospechosas de producir carbapenemasa. Confirmar con:



# Enterobacterias carbapenemasas

\* Para Salmonella utilizar IMP <=24 mm y para la tribu Proteae utilizar IMP <=22 + MERO <=27 mm. \*\* Deberá presentar perfil de BLEE compatible con cefotaximas



Electroforesis, primera línea marcador molecular, segunda línea control positivo para IMP (188pb), SPM (270 pb) GIM (477 pb), los pacientes 1, 2, 3, 4 dieron positivos para el gen SPM y VIM, y el paciente 5 se encontró positivo para el gen GIM.



Electroforesis para gen Bla-KPC donde se demuestra marcador de peso molecular seguido de control positivo y paciente negativos.

### Tabla No 1

Asilamiento de Enterobacterias con resistencia a carbapenémicos en muestras de Pacientes internos del HOSPITAL ALEMAN NICARAGUENSE en el periodo agosto 2015 – octubre 2016.

|                          | Frecuencia | Porcentaje % |
|--------------------------|------------|--------------|
| <b>Con carbapenemasa</b> | 45         | 18,07        |
| <b>Sin carbapenemasa</b> | 204        | 81,93        |
| <b>Total</b>             | 249        | 100          |

### Tabla No 2

Tipos de carbapenemasa encontradas por fenotipo según el resultado de la prueba de sinergia en las muestras de pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo agosto 2015 – octubre 2016.

| Resistencias                                 | Frecuencia | Porcentaje % |
|--|------------|--------------|
| <b>Metallo-<math>\beta</math>-lactamasas</b> | 41         | 91,11        |
| <b>KPC</b>                                   | 0          | 0            |
| <b>Oxacilinasas</b>                          | 4          | 11,88        |
| <b>Total</b>                                 | 45         | 100          |

### Tabla No 3

Tipos de carbapenemasas encontrados genotípicamente según el resultado según la prueba de PCR convencional en muestras de las muestras de pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo agosto 2015 – octubre 2016.

| Genes  | Frecuencia | Porcentaje % |
|--|------------|--------------|
| <b>Metallo-<math>\beta</math>-lactamasas</b> | 13         | 28,89%       |
| <b>KPC</b>                                   | 0          | 0            |
| <b>Oxacilinasas</b>                          | 12         | 26,67%       |
| <b>Negativo</b>                              | 17         | 37,77%       |
| <b>Pendiente</b>                             | 3          | 6,67%        |
| <b>Total</b>                                 | 45         | 100%         |

**Tabla No 4**

Perfil de resistencia encontrado en cepas productoras de enzimas carbapenemasas aislados de muestras de pacientes internos del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo agosto 2015- octubre 2016.

| Antibióticos | Sensible   |            | Intermedios |            | Resistentes |            | TOTAL |
|--------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------|
|              | Frecuencia | Porcentaje | Frecuencia  | Porcentaje | Frecuencia  | Porcentaje |       |
| AMC          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| CRO          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| CAZ          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| FOX          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| IMP          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| MER          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| AMP          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| CXM          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| CEP          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| CEC          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| FEP          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| TZP          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| COL          | 43         | 95.55%     | 0           | 0          | 2           | 4.45%      | 45    |
| CHL          | 6          | 13.95%     | 3           | 6.98%      | 34          | 79%        | 43    |
| SXT          | 2          | 4.44%      | 0           | 0          | 43          | 96%        | 45    |
| GEN          | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| CIP          | 9          | 0%         | 2           | 4.44%      | 34          | 76%        | 45    |
| AK           | 0          | 0          | 0           | 0          | 45          | 100%       | 45    |
| NAL          | 1          | 2.22%      | 0           | 0          | 44          | 98%        | 45    |
| NITRO        | 0          | 0          | 0           | 0          | 2           | 100.00%    | 2     |

**Tabla No 5**

Distribución de enzimas carbapenemasas por áreas clínicas encontradas en las muestras de pacientes internos del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo agosto 2015 – octubre 2016.

| <b>Sala</b>        | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje</b> |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| <b>UCI</b>         | 8                 | 17,77             |
| <b>UCIN</b>        | 23                | 51,14             |
| <b>UCIP</b>        | 5                 | 11,11             |
| <b>Medicina</b>    | 5                 | 11,11             |
| <b>Cirugía</b>     | 3                 | 6,67              |
| <b>Ginecología</b> | 1                 | 2,22              |
| <b>Total</b>       | 45                | 100               |

**Tabla 6**

Distribución de microorganismos encontrados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo agosto 2015 – octubre 2016.

| <b>Especies</b>              | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje</b> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| <b><i>Kpn</i></b>            | 31                | 68.90%            |
| <b><i>E. coli</i></b>        | 4                 | 8.90%             |
| <b><i>E. cloacae</i></b>     | 1                 | 2.22%             |
| <b><i>E. fergusonii</i></b>  | 2                 | 4.44%             |
| <b><i>E. vulneri</i></b>     | 2                 | 4.44%             |
| <b><i>P. aglomerans</i></b>  | 1                 | 2.22%             |
| <b><i>P. rettgerii</i></b>   | 1                 | 2.22%             |
| <b><i>P. stuartii</i></b>    | 1                 | 2.22%             |
| <b><i>S. marcenses</i></b>   | 1                 | 2.22%             |
| <b><i>E. georgioviae</i></b> | 1                 | 2.22%             |
| <b>Total</b>                 | 45                | 100%              |

**Tabla No 7**

Variabilidad genética encontrada por el método de PCR convencional en cepas productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo agosto 2015 – octubre 2016

| <b>GEN</b>    | <b>Frecuencia</b> | <b>Porcentaje</b> |
|---------------|-------------------|-------------------|
| <b>IMP</b>    | 7                 | 17.50%            |
| <b>SPM</b>    | 8                 | 20%               |
| <b>VIM</b>    | 1                 | 2.50%             |
| <b>SIM</b>    | 5                 | 12.50%            |
| <b>OXA 23</b> | 2                 | 5%                |
| <b>OXA 40</b> | 10                | 25%               |
| <b>OXA 51</b> | 5                 | 12.50%            |
| <b>OXA 58</b> | 2                 | 5%                |
| <b>KPN</b>    | 0                 | 0%                |
| <b>Total</b>  | 40                | 100%              |

**Tabla No 8**

Variabilidad genética encontrada por el método de PCR convencional de cepas aisladas en pacientes internados en el Hospital Alemán Nicaragüense según salas en el periodo agosto 2015 – octubre 2016.

| <b>Salas</b>       | <b>IMP</b> | <b>SPM</b> | <b>VIM</b> | <b>SIM</b> | <b>OXA 23</b> | <b>OXA 40</b> | <b>OXA 51</b> | <b>OXA 58</b> | <b>KPN</b> |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| <b>UCI</b>         | 4          | 3          | 0          | 0          | 0             | 1             | 0             | 1             | 0          |
| <b>UCIN</b>        | 3          | 4          | 1          | 3          | 2             | 5             | 5             | 0             | 0          |
| <b>UCIP</b>        | 0          | 0          | 0          | 0          | 0             | 2             | 0             | 1             | 0          |
| <b>Medicina</b>    | 0          | 1          | 0          | 1          | 0             | 2             | 0             | 0             | 0          |
| <b>Ginecología</b> | 0          | 0          | 0          | 0          | 0             | 0             | 0             | 0             | 0          |
| <b>Cirugía</b>     | 0          | 0          | 0          | 1          | 0             | 0             | 0             | 0             | 0          |
| <b>Total</b>       | 7          | 8          | 1          | 5          | 2             | 8             | 5             | 2             | 0          |

**Tabla No 9**

Resultados de la técnica del PCR convencional en las 45 cepas seleccionadas como muestras en el estudio.

| <b>Código de la muestra</b> | <b>Microorganismo</b> | <b>Resultado</b>         | <b>Sala</b> |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------|
| 1-1-1                       | <i>E. coli</i>        | Negativo                 | Medicina    |
| 1-1-2                       | <i>K. pneumoniae</i>  | IMP, SPM                 | UCI         |
| 1-1-3                       | <i>K. pneumoniae</i>  | IMP                      | UCI         |
| 1-1-4                       | <i>K. pneumoniae</i>  | IMP, SPM                 | UCI         |
| 1-1-5                       | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-6                       | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-7                       | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 40                   | UCIP        |
| 1-1-8                       | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-9                       | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 51                   | UCIN        |
| 1-1-10                      | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-11                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 51                   | UCIN        |
| 1-1-12                      | <i>E. coli</i>        | OXA 23 , OXA 40          | UCIN        |
| 1-1-13                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 40                   | UCIN        |
| 1-1-14                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 51                   | UCIN        |
| 1-1-15                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 51                   | Medicina    |
| 1-1-16                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 51                   | UCIN        |
| 1-1-17                      | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | Ginecología |
| 1-1-18                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 51                   | Medicina    |
| 1-1-19                      | <i>E. giorgiobiae</i> | OXA 40                   | UCIP        |
| 1-1-20                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 40 , OXA 51          | UCIP        |
| 1-1-21                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 40 , OXA 51          | UCI         |
| 1-1-22                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 40 , OXA 51          | Cirugía     |
| 1-1-24                      | <i>K. pneumoniae</i>  | IMP , SPM                | UCIN        |
| 1-1-26                      | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | Cirugía     |
| 1-1-27                      | <i>P. agglomerans</i> | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-28                      | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-29                      | <i>E. vulneri</i>     | SIM , SPM                | UCIN        |
| 1-1-34                      | <i>E. coli</i>        | OXA 40 , OXA 51          | UCIN        |
| 1-1-41                      | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-42                      | <i>K. pneumoniae</i>  | SPM                      | UCIN        |
| 1-1-43                      | <i>K. pneumoniae</i>  | Negativo                 | UCIN        |
| 1-1-44                      | <i>P. Stuartii</i>    | OXA 23 , OXA 40 , OXA 58 | UCI         |
| 1-1-45                      | <i>K. pneumoniae</i>  | OXA 23 , OXA 40          | UCIN        |

|               |                        |               |          |
|---------------|------------------------|---------------|----------|
|               |                        | , OXA 58      |          |
| <b>1-1-46</b> | <i>K. pneumoniae</i>   | Negativo      | UCIP     |
| <b>1-1-47</b> | <i>E. vulneris</i>     | Negativo      | UCIP     |
| <b>1-1-48</b> | <i>K. pneumoniae</i>   | Negativo      | Medicina |
| <b>1-1-49</b> | <i>K. pneumoniae</i>   | SIM, SPM      | Medicina |
| <b>1-1-50</b> | <i>E. cloacae</i>      | IMP, VIM, SIM | Neonato  |
| <b>1-1-51</b> | <i>S. marcescens</i>   | Negativo      | Neonato  |
| <b>1-1-52</b> | <i>K. pneumoniae</i>   | Negativo      | UCI      |
| <b>1-1-53</b> | <i>E. coli</i>         | SIM           | Cirugía  |
| <b>1-1-54</b> | <i>P. rettgeri</i>     | Negativo      | UCI      |
| <b>1-1-55</b> | <i>E. vulneris</i>     | Negativo      | UCI      |
| <b>1-1-56</b> | <i>E. vulneris</i>     | Negativo      | UCIN     |
| <b>1-1-57</b> | <i>K. cryocrescens</i> | Negativo      | UCI      |

## **Glosario**

A:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AK: Amikacina.

AMC: Amoxicilina más ácido clavilánico

AMP: Ampicilina

APB: Acido fenil borónico

ARN: Ácido ribonucleico

B:

BLEE: B-lactamasa de espectro extendido

C:

CAZ: Ceftazidima

CDC: Centro de control de enfermedades

CEC: Cefaclor

CEP: Cefalotina

CHL: Cloranfenicol

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: Instituto de estandarización clínica y laboratorios

CNDR: Centro nacional de diagnóstico y referencia

COL: Colistín

CRO: Ceftriaxona

CXM: Cefuroxima

E:

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

F:

FEP: Cefepime

FOX: Cefoxitín

H:

HAN: Hospital Alemán Nicaragüense

I:

IMP: Imipenem

K:

KPC: Serino Carbapenemasa

Kpn: Klebsiella pneumoniae

M:

MBL: metalo  $\beta$ -lactamasa

MER: Meropenem

N:

NAL: Ácido nalidixico

NDM: NEW Dehli Carbapenemasa

NITRO: Nitrofurantoina

O:

OMS: organización mundial de la salud

OXA: Oxacilinas

P:

PBP: Proteína fijadoras de penicilinas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

S:

SXT: Trimetropín sulfametoxazol

T:

TBE: Disolución tampón Tris Borato y EDTA

TZP: Piperacilina Tazobactan

U:

UCI: unidad de cuidados intensivos

UCIP: unidad de cuidados intensivos pediátrica

UCIN: unidad de cuidados intensivos de neonatos