



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE POSTGRADO, INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGICA

“TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL”
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER EN INVESTIGACIÓN
CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGICA

“CARACTERIZACIÓN POR PCR DE GENES CODIFICANTES DE
CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS. EN EL
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA E INVESTIGACIÓN,
DE GUAYAQUIL, 2014”

AUTOR: Q.F. YOLANDA NARVÁEZ S.M.
TUTORA: DRA. ELIZABETH BENITES E.

GUAYAQUIL – ECUADOR

OCTUBRE-2016



REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS

“CARACTERIZACIÓN POR PCR DE GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS. INSPI, 2016”		
AUTOR/ ES: Q.F. Yolanda Narváez San Martín		REVISORES:
INSTITUCIÓN: Universidad de Guayaquil		FACULTAD: Unidad de Post Grado, Investigación y Desarrollo
CARRERA: Maestría en Investigación Clínica y Epidemiológica		
FECHA DE PUBLICACION:		Nº DE PÁGS:
<p>Resúmen: A fin de identificar Enterobacterias portadoras de genes codificantes de carbapenemasas, durante el año 2014, en el Departamento de Bacteriología, Área Biología Molecular del INSPI de la ciudad de Guayaquil se procesaron diferentes muestras clínicas para la confirmación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de los genes (<i>blaKPC</i>, <i>blaVIM</i>, <i>blaNDM</i>, <i>blaIMP</i> y <i>blaOXA-48</i>) codificantes de carbapenemasas. Se identificaron 156 Enterobacterias a las que realizó la prueba de susceptibilidad por el método de Kirby Bauer, seguida de las Técnica Modificada de Hodge (MHT), Acido Borónico y EDTA descritas para la detección y diferenciación fenotípica de carbapenemasas. La confirmación molecular de los genes <i>bla</i> se realizó por PCR. El mayor número de aislamientos fue para <i>K. pneumoniae</i>, el 57(36,5%) fueron sensibles a carbapenemes; y 42(26,9%) cepas de <i>K. pneumoniae</i> presentaron zonas de inhibición ≤ 22 mm a imipenem, meropenem y ertapenem, de las cuales, el 81% (34) aislamientos eran portadores del gen <i>blaKPC</i> codificante de carbapenemasas y el 19% (8) no evidenciaron el gen. La técnica de PCR mostró superioridad sobre los métodos fenotípicos para la confirmación de genes codificadores de carbapenemasa. Objetivo: Caracterizar por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) genes codificantes de carbapenemasas en Enterobacterias resistentes a carbapenemes. Metodología: El presente trabajo fue un estudio no experimental retrospectivo, observacional, descriptivo de corte transversal y de prevalencia.</p> <p>Palabras Clave: carbapenemasas, genes, PCR, <i>blaKPC</i>.</p>		
Nº DE REGISTRO (en base de datos):		Nº DE CLASIFICACIÓN:
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	SI <input checked="" type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
CONTACTO CON AUTOR/ES: Q.F. Yolanda Narváez San Martín.	Teléfono: 0988481337	E-mail: yolita.narvaez2010@gmail.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Universidad de Guayaquil- Facultad de Ciencias Médicas	
	Teléfono: 0422390311	
	E-mail: http://www.ug.edu.ec	

Quito: Av. Whympner E7-37 y Alpallana, edificio Delfos, teléfonos (593-2) 2505660/1; y en la Av. 9 de octubre 624 y Carrión, edificio Prometeo, teléfonos 2569898/9. Fax: (593 2) 250-9054

CERTIFICADO DE URKUND

The screenshot displays the URKUND web application interface. At the top, the browser address bar shows the URL <https://secure.orkund.com/view/21464>. The page header includes the URKUND logo and the user name Elizabeth María Benites Estupiñán. The main content area is divided into two sections: document details on the left and a list of sources on the right.

Document Details:

- Documento:** [Dra. Yolanda Narváez.docx](#) (D21775525)
- Presentado:** 2016-09-15 10:35 (-05:00)
- Recibido:** elizabeth.benites.ucsg@analysis.orkund.com
- Mensaje:** Dra. Yolanda Narvaez [Mostrar el mensaje completo](#)

A green box indicates that 0% of the document's text is present in the sources.

List of Sources:

Categoría	Enlace/nombre de archivo
	Diseño de Estrategias de Ventas de Uniformes Ejecutivos para la Penetración en el Se...
	1473344008 UTE - FORMATO TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL.docx
	Archivo final M.G..docx
	http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/05/05_9215.pdf
	http://www.monografias.com/trabajos24/profesional-enfermeria/profesional-enfer...

The bottom of the interface features a navigation bar with icons for back, forward, and search, along with a status bar showing 0 warnings and options for 'Reiniciar', 'Exportar', and 'Compartir'.



MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutora de la maestrante Q.F. Yolanda Narvárez San Martín del Programa de Maestría en Investigación Clínica y Epidemiológica, nombrado por el Director General de la Unidad de Postgrado, investigación y desarrollo.

CERTIFICO: que he analizado el proyecto presentado como requisito para obtener el grado académico de Magíster en Investigación Clínica y Epidemiológica, titulado: **“CARACTERIZACIÓN POR PCR DE GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS. EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA E INVESTIGACIÓN, DE GUAYAQUIL, 2014”** el cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que establece el Reglamento aprobado para tal efecto.

Atentamente

Dra. Elizabeth Benites Estupiñan. MSc.

CI: 0904866365

TUTORA

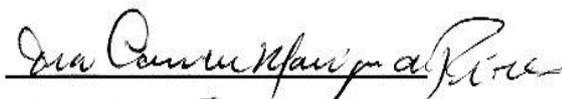
Guayaquil, 15 de Octubre de 2016

CERTIFICADO DEL GRAMÁTICO

Yo, **DRA CARMEN ANGÉLICA MANRIQUE ESCOBAR**, Magíster en Docencia y Gerencia en Educación Superior con el registro del SENESCYT No. 1006-12-744503, por medio de la presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado elaborada por la **Q F YOLANDA DEL ROCÍO NARVÁEZ SAN MARTÍN**, con C.I. 0908632920 previo a la obtención del grado de Magíster en Investigación Clínica y Epidemiológica.

TEMA DE TESIS: **“CARACTERIZACIÓN POR PCR DE GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA E INVESTIGACIÓN, DE GUAYAQUIL, 2014”**

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.



DRA CARMEN MANRIQUE ESCOBAR MSc

C.I. # 0901975326

NÚMERO DE REGISTRO: 1006-12-744503

NÚMERO DE TELÉFONO FIJO Y CELULAR: 2434152-0986027514

DEDICATORIA

A mi Mamá

A mis hermanas, sobrinos

Y a mi Padre Político ausente.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud a:

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) en especial al Departamento de Bacteriología por las facilidades proporcionadas para la ejecución de esta propuesta.

La Universidad de Guayaquil y a mis estimados profesores quienes con sus conocimientos desinteresados contribuyeron a mi formación académica.

La Tutora, Dra. Elizabeth Benites E., por su constante motivación y dedicación fundamentales para la culminación de este trabajo.

AL personal de la Maestría por la asesoría y atención brindada a los maestrantes.

Al grupo de profesionales técnicos del INSPI, que contribuyeron a la realización de este proyecto.

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación especial, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL”

Atentamente

Q.F. Yolanda Narváez San Martín

AUTORA

ABREVIATURAS

AFB	Ácido Fenil Borónico
BLEE	Beta Lactamasa de Espectro Extendido
CDC	Centers for Disease Control
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
CRE	Carbapenemase Resistan Enteroacteriaceae
EDTA	Etilen Diamino Tetra Acético
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae Carbapemasa</i>
MBL	<i>Metalo β-lactamasa</i>
MHT	Test de Hodge Modificado
NDM	<i>New Delhi Metallo-β-lactamase</i>
NMC	<i>Not Metalloenzyme Carbapenemase</i>
PBP	<i>Penicillin Binding Proteins</i> (Proteínas Ligadoras de Penicilina)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
SME	<i>Serratia marcescens enzyme</i>
VIM	<i>Verona Intergon-encoded Metallo-β-lactamase</i>

Tabla de contenido

Resumen	1
Abstract.-	2
Introducción	3
Delimitación del Problema.....	4
Preguntas a investigar:	4
Formulación del problema.....	4
Justificación	4
Objeto de Estudio	5
Campo de acción o de investigación:.....	5
Objetivo General	6
Objetivos Específicos.....	6
La Novedad Científica.....	6
Capítulo I	7
MARCO TEÓRICO	7
Enterobacterias.....	7
Carbapenemasas.....	8
Clasificación Funcional	9
Clasificación Molecular	9
Carbapenemasas Clase A	9
Carbapenemasas Clase B (Metaloenzimas)	10
Carbapenemasas Clase D (Tipo OXA).....	11
Vigilancia	13
Cultivos de Control.....	14
Capítulo II	15
MARCO METODOLÓGICO	15
2.1. Metodología	15

2.1.1.- Localización	15
2.1.2.- Período de Investigación.....	15
2.1.3.- Recursos a Emplear.....	15
2.1.3.1.- Recurso Humano	15
2.1.3.2.-Recursos Físicos.....	15
2.1.3.2.1.- Equipos.....	15
Incubadora	15
2.1.3.2.4.-Reactivos	17
Discos de Carbepenemes	17
2.1.3.2.5.- Material de oficina	18
Computadora	18
2.1.3.2.6.- Material a procesar	18
2.2 Métodos	18
2.3 Premisas o Hipótesis	18
2.3.1 Variables	19
2.3.1.1 Variable Dependiente.....	19
2.3.1.2 Variable Independiente	19
2.3.1.3 Variables Intervinientes	19
2.4 Universo y Muestra	19
2.4.1 Criterios de Inclusión.....	19
2.4.2 Criterios de Exclusión.....	19
2.5 CDIU – Operacionalización de las Variables	20
2.6 Gestión de datos	20
2.7 Criterios Éticos de la investigación	20
2.8 Metodología	21
2.8.1 Métodos Fenotípicos	22
2.8.2 Test de Hodge Modificado (MTH).....	22

2.8.3 Prueba de Sinergias.....	23
Capítulo III	25
RESULTADOS.....	25
Capítulo IV	33
DISCUSIÓN	33
Capítulo V	35
PROPUESTA.....	35
Conclusiones y Recomendaciones	36
BIBLIOGRAFÍA	38
Anexos.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Composición de las muestras procesadas	25
Tabla 2.- Frecuencia por edad de los pacientes investigados para la presencia de carbapenemasas.....	26
Tabla 3.-Distribución de los géneros de Enterobacterias aisladas.	27
Tabla 4.-Distribución de la muestra.	28
Tabla 5.-Muestras con Enterobacterias portadoras de carbapenemasas	29
Tabla 6.- Prevalencia de pacientes con resultado positivo de enterobacterias portadoras de genes codificantes de carbapenemasas.....	30
Tabla 7.- Frecuencia por edad de los 34 pacientes investigados con presencia de carbapenemasas.....	30
Tabla 8.- Frecuencia de casos positivos de carbapenemasas por PCR.....	31
Tabla 9.- Frecuencia de género de los casos positivos de K. pneumoniae, carbapenemasa positivo.	31
Tabla 10.- Prueba de contraste de Hipótesis	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.- Composición de las muestras procesadas.....	25
Gráfico 2.- Frecuencia por edad de los pacientes investigados para la presencia de carbapenemasas.....	26
Gráfico 3.- Distribución de los géneros de Enterobacterias aisladas.	27
Gráfico 4.- Distribución de la muestra.	28
Gráfico 5.- Muestras con Enterobacterias portadoras de carbapenemasas	29
Gráfico 6.- Distribución de KPC, según los establecimientos de salud	30
Gráfico 7.- Frecuencia por edad de los 34 pacientes investigados con presencia de carbapenemasas.....	30
Gráfico 8.- Frecuencia de género de los casos positivos de K. pneumoniae, Carbapenemasa positivo.....	31

CARACTERIZACIÓN POR PCR DE GENES CODIFICANTES DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS.

Autora: Q.F. Yolanda Narváez S.M.

Tutora: Dra. Elizabeth Benites E.

Resumen

A fin de identificar Enterobacterias portadoras de genes codificantes de carbapenemasas, durante el año 2014, en el Departamento de Bacteriología, Área Biología Molecular del INSPI de la ciudad de Guayaquil se procesaron diferentes muestras clínicas para la confirmación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de los genes (*blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP* y *blaOXA-48*) codificantes de carbapenemasas. Se identificaron 156 Enterobacterias a las que se les realizó la prueba de susceptibilidad por el método de Kirby Bauer, seguida del test Modificado de Hodge (MHT), la técnica de Ácido Borónico y la prueba de EDTA descritas para la detección y diferenciación fenotípica de carbapenemasas. La confirmación molecular de los genes *bla* se realizó por PCR. El mayor número de aislamientos fue para *K. pneumoniae*, el 57(36.5%) fueron sensibles a carbapenemes; y 42(26.9%) cepas de *K. pneumoniae* presentaron zonas de inhibición menor a 22 mm a imipenem, meropenem y ertapenem. Estos últimos aislamientos, el 81% (34) eran portadores del gen *blaKPC* codificante de carbapenemasas y el 19% (8) no evidenciaron el gen. La técnica de PCR mostró superioridad sobre los métodos fenotípicos para la confirmación de genes codificadores de carbapenemasa. **Palabras Claves:** carbapenemasas, genes, PCR, *blaKPC*

Abstract.-

To identify Enterobacteriaceae that carry carbapenemase encoded genes, during 2014, in the Bacteriology Department, Molecular Biology Area of Public Health National Institute, located in Guayaquil, different clinical samples were processed for PCR (Polymerase Chain Reaction) of genes: *blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP* and *blaOXA-48*. 156 Enterobacteriaceae were identified. Then the susceptibility testing using the Kirby Bauer method was applied. In order to do the detection and phenotypic differentiation, the Modified Hodge Technique (MHT), the boronic acid and EDTA techniques were used. The molecular confirmation of the *bla* genes were performed by PCR.

The largest number of isolates was to *K. pneumoniae*. 57 strains (36,5%) were sensitive to carbapenems; and 42 (26.9%) showed inhibition zones (≤ 22 mm) to imipenem, meropenem and ertapenem. From the last ones, 81% (34) were carriers of the gene *blaKP*, which is encoding to carbapenemases and 19% (8) did not show the gene. The PCR technique showed the superiority over phenotypic methods for confirmation of genes encoding carbapenemase.

Keywords: carbapenemases, genes, PCR, ESBL, AMP-C.

Introducción

Las carbapenemasas son un grupo específico de enzimas, (Bush & Jacoby, 2010) que hidrolizan eficientemente a los carbapenemes (Martínez-Martínez & González-López, 2014), antibióticos β -lactámicos (imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem) considerados los antimicrobianos de primera línea en el tratamiento de infecciones causadas por bacilos gram negativos productores de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) clínicamente significativas a nivel global (Ghafourian, Sadeghifard, Soheili, & Sekawi, 1995).

La producción de carbapenemasas parece ser la causa más común de resistencia a carbapenemes (Papp-Wallace, Endimiani, Taracila, & Bonomo, 2011), planteando un serio problema de salud a nivel mundial en el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacterias* y Bacilos Gram Negativos No Fermentadores. Las Enterobacterias resistentes a carbapenemes (CRE, siglas en inglés) particularmente *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter* spp.; *E coli* y en menor grado otros géneros tienen el potencial para diseminarse ampliamente a través de elementos genéticos móviles.(Bush & Jacoby, 2010) y (Moxon & Paulus, 2016).

En América Latina la diseminación de carbapenemasas, presenta el mismo escenario descrito en otras zonas geográficas. La detección de las primeras carbapenemasas y sus diferentes variedades, Colombia y Argentina reportan los primeros casos, asimismo en el país, se reportó el primer caso de KPC-2.a partir de una secreción purulenta (Iñiguez et al., 2012).

Delimitación del Problema

Caracterización molecular de genes *bla* codificantes de carbapenemasas responsables de resistencia a carbapenemes en cepas de Enterobacterias, aisladas de muestras clínicas, que fueron derivadas de las diferentes unidades de salud y que ingresaron al laboratorio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Guayaquil, para su respectiva confirmación durante el año 2014.

Preguntas a investigar:

¿Cuáles son las Enterobacterias aisladas en este estudio?

¿Cuál es la prevalencia de los genes de carbapenemasa detectados?

¿Cuál es la muestra más frecuente con Enterobacterias, portadoras de carbapenemasas?

¿En qué grupo de edad y género se encuentra Enterobacterias portadoras de carbapenemasas?

Formulación del problema

¿Cuáles son los genes más frecuentes que codifican carbapenemasas, responsables de la resistencia de carbapenemes en Enterobacterias?

Justificación

Las Enterobacterias productoras de carbapenemasas han sido reportadas a nivel mundial como responsables de infecciones nosocomiales asociadas al incremento de la mortalidad, y, a los costos de cuidados en salud. Con esta propuesta se plantea identificar los genes que codifican carbapenemasas con alto potencial de diseminación a varias localizaciones geográficas a través de

elementos genéticos móviles tales como plásmidos transposones que además de transportar genes de resistencia también transportan factores de virulencia desencadenando así severas infecciones.

La detección fenotípica por los métodos convencionales como el Método de Hodge Modificado (MHT), la inhibición con ácido borónico y EDTA son los parámetros más utilizados en los laboratorios, pero que desafortunadamente requieren de varios días para la confirmación de la producción de carbapenemasas, esta realidad retrasa la rápida administración del tratamiento adecuado y la apropiada implementación de medidas efectivas para el control de la infección, necesarias para contener la diseminación de los patógenos portadores de carbapenemasas que amenazan con la vida del paciente.

La identificación de los genes productores de carbapenemasas aportará a las autoridades de salud local y nacional la información apropiada y acertada de la existencia de microorganismos responsables de brotes nosocomiales, uno de los más preocupantes desafíos en salud a nivel mundial.

Objeto de Estudio

La identificación de genes (*blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP* y *blaOXA-48*) codificantes de carbapenemasas responsables de resistencia a carbapenemes

Campo de acción o de investigación:

La identificación de genes (*blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP* y *blaOXA-48*) codificantes de carbapenemasas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas (tracto respiratorio inferior, heridas, úlceras, tejidos, orina, sangre,

secreciones, hisopados rectales y otros) derivadas de la diferentes unidades de salud pública y privadas que ingresaron al laboratorio para la confirmación de resistencia a carbapenemes mediado por carbapenemasas.

Objetivo General

Caracterizar por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) genes codificantes de carbapenemasas en Enterobacterias resistentes a carbapenemes.

Objetivos Específicos

- Determinar la frecuencia de los genes codificantes de carbapenemasas
- Determinar la frecuencia de Enterobacterias portadoras de carbapenemasas.
- Establecer la frecuencia de *K. pneumoniae* portadora de Carbapenemasa en muestra clínicas.
- Determinar el grupo de edad y género en que se encuentra las carbapenemasas en Enterobacterias.

La Novedad Científica

Las técnicas moleculares para la identificación de genes y confirmación de carbapenemasas son cada vez más usadas. En este caso la PCR convencional es la prueba de referencia con la que se identificaron los genes individuales con un tiempo de consumo de 6 horas para el resultado, a partir del aislado.

Capítulo I

MARCO TEÓRICO

La producción de carbapenemasas es el mecanismo de resistencia más comúnmente encontrado en Enterobacteriaceae, siendo *Klebsiella pneumoniae* la más frecuentemente reportada de aislamientos nosocomiales, seguida por *Escherichia coli*, y menor grado los otros géneros. (Falagas, Lourida, Poulidakos, Rafailidis, & Tansarli, 2014) *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC) son un grupo de emergentes bacilos gramnegativos altamente resistente a los antibióticos. (Arnold et al., 2012).

KPC es sinónimo para *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, término relativamente inadecuado para referirse a todas las enterobacterias debido a que estas enzimas son expresadas por genes, que se transfieren muy fácilmente de una Enterobacteria a otra, cualquiera que sea el género y la especie. (P. Nordmann, 2013).

Enterobacterias

Las Enterobacteriaceae son bacilos gram negativos aerobios facultativos componentes de la flora intestinal de humanos y animales, son organismos poco exigentes, sobreviven en el medio ambiente, contaminan el agua y alimentos, incluye muchos géneros y especies, como *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Citobacter* spp.; *Serratia* spp., etc., son frecuentemente responsables de una gran variedad de infecciones asociadas a la atención en salud (IAS) como: neumonía, cistitis, peritonitis, abscesos abdominales,

sepsis, meningitis, etc., que ponen en riesgo la vida de los pacientes debido a la elevada resistencia a los β -lactámicos incluyendo los carbapenemes quedando sin opciones terapéuticas para tratar las infecciones causadas por los patógenos productores de carbapenemasas, que tienen la habilidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactames y carbapenemes. La resistencia de Enterobacterias a carbapenemes (CRE por sus siglas en inglés) es un desafío para el sistema de salud pública debido al incremento de la prevalencia a nivel mundial. (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011).

La presencia o combinación de otros mecanismos como la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), cefalosporinasas tipo Amp C y la disminución de la permeabilidad de la membrana externa debido a una pérdida o menor expresión de porinas confieren con frecuencia resistencia o susceptibilidad disminuida a carbapenemes (Cao et al., 2000).

Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas que confieren resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo carbapenemes, los antibióticos con el más amplio espectro de actividad antibacteriana. (Rasmussen & Bush, 1997). Las β -lactamasas han sido clasificadas de acuerdo a dos propiedades: funcionales y moleculares, la primera atribuida a las características bioquímicas de la enzima, y la molecular que hace referencia a la homología de secuencia en aminoácidos. (Queenan & Bush, 2007)

Clasificación Funcional

Esta clasificación de β -lactamasas se basa en el análisis bioquímico de la enzima, punto isoelectrico, determinación de hidrólisis del sustrato, perfiles cinéticos e inhibición de la enzima. Esta clasificación funcional de Karen Bush y colaboradores ha sufrido varias revisiones y actualmente las divide en cuatro grupos funcionales. El grupo 2 tiene varios subgrupos que se diferencian de acuerdo al sustrato grupo específico o perfil del inhibidor en 2f, 2d y 3 (Sridhar, 2012).

Clasificación Molecular

Basada en la secuencia de amino-ácidos de Ambler (1980), se conocen cuatro clases de enzimas: A, B, C y D, las cuales se correlacionan con la clasificación funcional; las tres primeras se caracterizan por tener serina en su sitio activo, mientras que la clase molecular B, son metaloenzimas que tienen un sitio activo de zinc. (Queenan & Bush, 2007), este grupo se subdivide en tres subgrupos B1, B2 y B3 basado en la secuencia de alineaciones y análisis estructural. Las enzimas B1 y B3 contienen dos iones de zinc, lo que le confiere un espectro amplio de hidrólisis mientras que B2 tiene únicamente un catión con un espectro de hidrólisis de carbapenemasa (Sridhar, 2012)

Carbapenemasas Clase A

Las carbapenemasas del grupo A está integrado por KPC, SME, IMI, NMC y GES, siendo KPC la carbapenemasa de mayor prevalencia aislada a nivel mundial, se dividen en cinco grupos importantes, algunas son codificadas por cromosomas (IMI, SME, NMC-A) mientras que las carbapenemasas de tipo

KPC, GES son codificadas por plásmidos (De la Lastra, Ulloa, Pinto, Vidal, & Silva, 2010) todas hidrolizan efectivamente una amplia variedad de β -lactámicos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes, inactivan parcialmente el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, lo cual representa una herramienta útil para su detección mediante la sinergia del doble disco con imipenem (Poirel, Pitout, & Nordmann, 2007), las KPC son las enzimas clínicamente más comunes en este grupo que también se han detectado en *Klebsiella oxytoca*, *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas enzimas se han dispersado y reportado en muchos países alrededor del mundo incluyendo Israel, Francia, Brasil Colombia y Argentina.(De la Lastra et al., 2010).

Las carbapenemasas tipo KPC se describieron por primera vez en *K. pneumoniae* (de ahí sus iniciales), es la carbapenemasa clínicamente más relevante la cual se ha vuelto endémica alrededor del mundo.(Paño Pardo, Villar, Ramos Ramos, & Pintado, 2014). La primera *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa codificada por plásmidos denominada como KPC-1 se identificó en Carolina del Norte en 1996 y desde entonces se ha diseminado a través de Estados Unidos (Doi & Paterson, 2015) volviéndose endémica en muchos hospitales de New York y New Jersey. (Bratu et al., 2005).

Carbapenemasas Clase B (Metaloenzimas)

Las metalobetalactamasas (MBL) o de clase B (IMP, VIM, NDM, SPM, GIM y SIM) fueron primeramente detectadas en Bacilos Gram Negativos No Fermentadores (BNF) como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.,

encontrándose también ahora diseminadas en las Enterobacterias (Birgy et al., 2012), hidrolizan todos los antibióticos β -lactámicos, como: penicilinas, cefalosporinas de espectro extendido, carbapenemes, excepto aztreonam. Las MBLs requieren de iones zinc para la actividad enzimática, y se inhiben en presencia de Etilen Diamino Tetra Acético (EDTA) (Queenan & Bush, 2007)

Las metaloenzimas de ciertas especies de bacterias gram positivas y negativas tales como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomna maltophilia*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Aeromonas hydrophyla*, *Legionella gormanni*, *Janthinobacterium lividum* son de origen natural codificadas en cromosomas (P. Nordmann & Poirel, 2002) que hasta la fecha no se han descrito resistencia adquirida.

Carbapenemasas Clase D (Tipo OXA)

También conocidas como β -lactamasas de la clase D que hidrolizan carbapenemes (CHDL), de las 400 enzimas identificadas, solo algunas variantes tienen actividad carbapenemasa (P. Nordmann & Poirel, 2014). Basados en la secuencia de aminoácidos se ha reclasificado en 12 subgrupos: OXA 23, OXA 24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-43, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-299 y OXA-235, que han sido identificados principalmente en *Acinetobacter baumannii*, (Antunes et al., 2014) y con incremento de aislamientos en Enterobacterias, como la OXA-48 (Patel & Bonomo, 2013) en *K. pneumoniae*; que fue descrita por primera vez en Turquía (Laurent, Héritier, Toün, & Nordmann, 2004), alcanzando desde entonces una distribución internacional en Europa, África, Medio Este, etc., (Patel & Bonomo,

2013) como responsable de brotes nosocomiales no solo en *K.pneumoniae* sino también *E. coli*. (Grundmann et al., n.d.). Estados Unidos reporta los primeros casos de *K. pneumoniae* portadora de OXA-48 aislada de pacientes con el antecedente de atención médica en Arabia Saudita e India (Mathers et al., 2013).

Se han identificado más de 10 variantes de OXA-48 (OXA-162; OXA-163; OXA-181; OXA-232; OXA-247; 370; etc.) (Evans & Amyes, 2014). América del Sur no es la excepción, se han reportado, la OXA-163 en *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* en Argentina (Poirel et al., 2011). De los otros grupos de las enzimas OXA; en el año 2004 en Brasil, se realiza el aislamiento de *A. baumannii* portador de la OXA-143 (Higgins et al., 2013); Colombia y Brasil en el 2007, describen *A. baumannii* portadores de OXA-23 y OXA-58 cada uno respectivamente. Argentina detecta en *Acinetobacter baumannii* la OXA-51 (Brown, Young, & Amyes, 2005).

Todas las CHDL, poseen débil actividad carbapenemas, lo que le confiere bajo nivel de resistencia a carbapenemes en ausencia de la coexistencia de mecanismos de resistencia (P. Nordmann & Poirel, 2014). La mayoría de enzimas tipo OXA no se inhiben por los inhibidores de β -lactamasa disponibles (Patel & Bonomo, 2013), No hay método fenotípico capaz de detectar OXA-48 (Birgy et al., 2012) su bajo nivel de resistencia a carbapenemes, dificulta su detección y los datos reales de prevalencia podrían ser subestimados (Patrice Nordmann et al., 2011).

La diseminación de genes *bla* de carbapenemasas tipo OXA ha sido relacionada con secuencias de inserción (ISAba1, ISAba2, ISAba3 ISAba4 y IS18), las cuales tienen un importante rol en la expresión de los genes de carbapenemasas, en *A.baumannii* multiresistente (Villalón et al., 2013).

Vigilancia

Es importante que las unidades de salud identifiquen los casos de CRE y cuan frecuente son en ese entorno, para de inmediato, implementar las medidas de prevención o de contacto, como las establecidas por el CDC con la finalidad de prevenir la transmisión e interrumpir las vías de transmisión de productores de carbapenemasas. Es importante y necesario la pronta y exacta detección de portadores e infectados en las unidades de salud, debido a que estos pueden actuar como reservorios y contribuir a la diseminación de CRE en el medio ambiente hospitalario (Viau et al., 2015), tanto en la admisión, como en la salida e ingreso a otra unidad específica. (Tzouveleakis, Markogiannakis, Psychogiou, Tassios, & Daikos, 2012).

El cumplimiento de las precauciones de contacto para prevenir la transmisión de organismos multiresistentes pueden ser efectivas sin embargo los pacientes colonizados pueden ser no detectados mediante los cultivos clínicos y por lo tanto pueden no estar sujetos a precauciones de contacto y a la toma del hisopado rectal, convirtiéndolos en un potencial reservorio para la transmisión de organismos multiresistentes (Muñoz-Price et al., 2010).

Cultivos de Control

Una vez que se ha establecido la presencia de CRE en las unidades de salud, es fundamental detener la transmisión, a través de la identificación precisa y oportuna de pacientes colonizados en la etapa inicial de admisión en el hospital, o en una unidad específica de atención (Patrice Nordmann & Poirel, 2013); para el propósito se han diseñado guías y herramientas que hacen referencia a la ejecución de intervenciones específicas para minimizar el riesgo de la transmisión. (Centers for Disease Control and Prevention. CDC, 2015).

El laboratorio debe disponer de metodología de detección confiable, de personal capacitado y de recursos necesarios para realizar el estudio (Tzouvelekis et al., 2012). Los cultivos de vigilancia se han utilizado como parte de una estrategia para interrumpir la transmisión de portadores de carbapenemasas (Gupta, Limbago, Patel, & Kallen, 2011). siendo el mejor sitio anatómico para la toma de muestras de portadores de CRE, el recto. (Wiener-Well et al., 2010) y la región perianal (Buehlmann, Fankhauser, Laffer, Bregenzer, & Widmer, 2010) y (Gupta et al., 2011).

Capítulo II

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Metodología

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, descriptivo de corte transversal de prevalencia.

2.1.1.- Localización

El Proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bacteriología, Área Biología Molecular del INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA “INSPI” de la ciudad de Guayaquil, Provincia de Guayas. Ecuador.

2.1.2.- Período de Investigación

El tiempo de investigación se realizó en el período comprendido del año 2014-2015

2.1.3.- Recursos a Emplear

2.1.3.1.- Recurso Humano

Colaboraron con esta investigación los profesionales técnicos que están relacionados con el procesamiento para la caracterización fenotípica y molecular de carbapenemasas, la autora de esta propuesta y la tutora designada para el propósito.

2.1.3.2.-Recursos Físicos

2.1.3.2.1.- Equipos

Incubadora

Cabina de Bioseguridad

Cabina de Flujo Laminar

Mini centrifuga

Centrífuga refrigerada

Balanza Analítica

Turbidímetro

Hornos

Destilador de Agua

Autoclave

Micronda

Termociclador

Congelador de – 20 °C

Congelador de – 70 °C

Baño de María seco

Vortex

Sistema de Electroforesis

Transiluminador

Sistema de Registro de Imágenes

2.1.3.2.2.- Materiales

Tubos de 75 x 12 mm.

Gradillas

Tubos eppendorf

Asas

Fiola

Probeta

Tubos.

2.1.3.2.3.- Medios

Agar Sangre

Agar Mueller Hinton M6

Agar Soya

2.1.3.2.4.-Reactivos

Discos de Carbapenemes

Discos de Ácido Borónico 300 µg y EDTA

Discos de Meropenem/Cloxacillina

Enzima Taq polimerasa (incluido buffer 10X y Cl₂Mg)

dNTP's (dinucleótidos)

Primers o cebadores

KPC-F AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG

KPC-R AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA

VIM-F AGT GGT GAG TAT CCG ACA G

VIM R ATG AAA GTG CGT GGA GAC

IMP-UF1 GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA

IMP-UR1 GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT

NDM-F AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC

NDM-R GGC GTA GTG CTC AGT GTC

OXA48-F ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG

OXA48-R2 TGAGCACTTCTTTTGTGATG

16S-P AGGAGGTGATCCAACCGCA

16S-M AACTGGAGGAAGGTGGGGAT

Agua estéril, calidad PCR

Agarosa

Marcador de peso molecular

Loading buffer

Tris

EDTA

2.1.3.2.5.- Material de oficina

Computadora

Impresora

Papel

2.1.3.2.6.- Material a procesar

Cepas de Enterobacterias con sensibilidad a Imipenem \leq 22 mm.

Cepas ATCC:

Escherichia coli ATCC 25922

Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 1705 (control MHT positivo)

Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 1706 (control MHT negativo)

Cepas OPS.

2.2 Métodos

Los aislamientos clínicos recolectados para la identificación por PCR los genes (*blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP* y *blaOXA-48*) codificantes de carbapenemasas consistieron en el conjunto de Enterobacterias que presentaron susceptibilidad menor de 22 mm a imipenem, meropenem y ertapenem, los que también se tamizaron por la Técnica Modificada de Hodge (MHT), Acido Borónico y EDTA descritos para la detección y diferenciación fenotípica. La confirmación molecular de los genes se realizó por PCR para la amplificación de los genes codificantes de carbapenemasas.

2.3 Premisas o Hipótesis

La resistencia a carbapenemes en Enterobacterias es causada por los genes *bla* codificantes de carbapenemasas.

2.3.1 Variables

Las variables que se utilizaron en este estudio son:

2.3.1.1 Variable Dependiente

Resistencia de Enterobacterias por carbapenemasas

2.3.1.2 Variable Independiente

Caracterización molecular de genes de carbapenemasa

2.3.1.3 Variables Intervinientes

Edad, sexo, fuente, procedencia

2.4 Universo y Muestra

El universo de estudio de esta investigación correspondió a las diferentes muestras que ingresaron al laboratorio para la caracterización fenotípica y confirmación molecular de genes de resistencia en Enterobacterias, las mismas que fueron derivadas de las diferentes unidades de salud pública y privada. El universo está conformado por 156 muestras correspondientes a las cepas caracterizadas y confirmadas en el laboratorio

2.4.1 Criterios de Inclusión

- Cepas caracterizadas como Enterobacteriaceae
- Cepas de aislamiento único
- Cepas con halos de inhibición de Intermedio o Resistente a carbapenemes (imipenem, meropenem y ertapenem)
- Cepas con registro de datos epidemiológicos completos.

2.4.2 Criterios de Exclusión

- Cepas diferentes de la Familia Enterobacteriaceae
- Cepas aisladas en otro período de estudio

- Cepas con registro de datos epidemiológicos no completos.

2.5 CDIU – Operacionalización de las Variables

VARIABLE	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	MEDICIÓN DE VALORES
No de Enterobacterias aisladas	Cualitativa	Nominal	%
Enterobacterias frecuentes	Cualitativa	Discreta	%
Genes bla	Cualitativa	Discreta	%
No de <i>K. pneumoniae</i> portadora de carbapenemasa	Cualitativa	Discreta	%
Edad	Cuantitativo	Continua	%
Sexo	Cualitativa	Nominal	%
Procedencia	Cuantitativa	Discreta	%

2.6 Gestión de datos

Los datos generados en esta investigación se analizaron con el programa estadístico informático SPSS (Statistical Product and Service Solutions). Se analizaron las variables cualitativas y cuantitativas mediante la frecuencia.

2.7 Criterios Éticos de la investigación

Para el desarrollo de la presente propuesta de investigación se respetaron los principios éticos relacionados con la investigación que involucran seres humanos, enunciados en la Declaración de Helsinki, que proclaman el respeto a las personas; la búsqueda del bien y la justicia. Del mismo modo se aplicaron los principios enunciados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), El

Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, y lo planteado en los objetivos 3 y 11 del “Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017” que promulgan “Mejorar la calidad de vida de la población” y “Asegurar la soberanía y eficiencia de los sectores estratégicos para la transformación industrial y tecnológica” impulsando con ello la investigación científica para el mejoramiento de la atención en salud en el país.

Las muestras de pacientes que ingresaron al Dpto. de Bacteriología para la confirmación y caracterización molecular de genes de carbapenemasa, se procesaron a petición del médico tratante y con el consentimiento voluntario del usuario que reconoce la capacidad técnica y la responsabilidad ética de la institución de aplicar toda clase de precauciones para proteger la confidencialidad de la información que se genera. Además se contó con la aprobación del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Guayaquil y La Líder del Dpto. donde ejecutó la investigación.

2.8 Metodología

Se procesaron un total de 112 muestras derivadas de las diferentes unidades de salud, pública y privadas que ingresaron al laboratorio para la identificación de Enterobacterias, y, las respectivas pruebas, fenotípica y molecular de confirmación de genes codificantes de carbapenemasas, responsables de la resistencia a carbapenemes. Del total de cepas caracterizadas, solo 42 identificadas como *K. pneumoniae* presentaron una zona de inhibiciones ≤ 22 mm de diámetro para imipenem, meropenem y ertapenem sugestivas de ser productoras de carbapenemasas, las mismas que se confirmaron con el Test

Modificado de Hodge (MHT). Las técnicas de ácido borónico y EDTA en discos fueron utilizados para diferenciar serino carbapenemasas de metaloenzimas. Los aislamientos con las características de carbapenemasas se confirmaron mediante PCR, para la confirmación del gen codificante de la enzima.

2.8.1 Métodos Fenotípicos

Para la identificación de los géneros bacterianos se ejecutaron los procedimientos del laboratorio utilizados para la caracterización fenotípica bacteriana. Las pruebas de susceptibilidad y el test de Hodge modificado se realizaron según el procedimiento descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI 2010, siglas en inglés). Las pruebas de susceptibilidad se ensayaron los antibióticos establecidos como:

cefalosporinas, monobactames, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y carbapenemes mediante el método de difusión: técnica de Kirby Bauer, que utiliza, una suspensión bacteriana con una turbidez de 0.5 Mc. Farland, inoculada en agar Mueller Hinton pH 7.3, e incubada a 35 °C durante 16-18 horas.

2.8.2 Test de Hodge Modificado (MTH)

El test de Hodge modificado se realizó, inoculando sobre agar Mueller Hinton, una dilución 1:10 de una suspensión Mac Farland 0.5 de *E. coli* ATCC 25922, dejar secar por 3 minutos, seguido colocar un disco de ertapenem (10 µg/ml) y meropenem (10 µg/ml), a continuación trazar desde el borde del disco hacia la periferia, una estría en línea recta de las cepas control positivo y negativo para carbapenemasas (*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 y *K. pneumoniae* ATCC

BAA-1706 respectivamente) y, por último la cepa, posible portadora del gen codificante de carbapenemasa, dejar incubando en aerobiosis a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 16-24 horas. La presencia de crecimiento de la cepa hacia el disco de carbapenem provocado por la hidrólisis del antibiótico, distorsionando el halo, se interpretó como Test Modificado de Hodge positivo.

2.8.3 Prueba de Sinergias

Para la prueba de sinergia con ácido borónico, se inoculó en una placa de Mueller Hinton una suspensión bacteriana, con turbidez Mc. Farland 0.5, a continuación se colocaron los discos de: ertapenem (10 μg), Acido Fenil Borónico de 300 μg y meropenem (10 μg) entre centro y centro de cada disco, se mantuvo una distancia, calculada en base a los diámetros de inhibición obtenidos en las pruebas de susceptibilidad iniciales, se incubaron las cajas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 16-24 horas. La observación de sinergia entre el ácido borónico y los carbapenemes se consideró positivo para carbapenemasas de clase A, más la zona de inhibición $\geq 5\text{ mm}$, entre el disco de meropenem (10 μg) y el disco de meropenem suplementado con 10 μl de cloxacilina (750 $\mu\text{g}/\text{dl}$) optimizó el resultado.

Para la detección de carbapenemasas de la clase molecular B o metaloenzimas, se realizó la prueba de sinergia con EDTA/SMA, para el propósito se inoculó en una placa de Mueller Hinton, una suspensión bacteriana, con turbidez Mc. Farland 0.5, a continuación, a una distancia ajustada en base a las zonas de inhibición primarias, se colocan los discos de: imipenem (10 μg), el disco del inhibidor EDTA/SMA (750 μg de EDTA + 2 mg de SMA) y meropenem (10 μg),

se incubaron las cajas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 16-24 horas para su revisión. La prueba de sinergia con Ácido Borónico y cloxacilina, se realizó con el objetivo de diferenciar carbapenemasas de la clase A, de potenciales productores de AMP-C. No existen pruebas fenotípicas disponibles con inhibidores específicos para la detección de carbapenemasas de la clase D.

La detección molecular de genes codificantes de carbapenemasas (KPC, IMP, VIM, NDM y OXA-48) se ejecutó aplicando los procedimientos establecidos en los protocolos del Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos Malbran”. Centro Regional de Referencia para el Control de Calidad de la Resistencia Bacteriana en América Latina.

La caracterización molecular de los genes *blaKPC*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, y la extracción del ADN (Ácido Desoxirribonucleico) se hizo mediante el método de ebullición. Anexo1.

Capítulo III

RESULTADOS

3.1 Antecedentes de la unidad de análisis o población

Universo: 156 muestras que fueron procesadas para investigar los genes codificantes de carbapenemasas (*blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaIMP* y *blaOXA-48*)

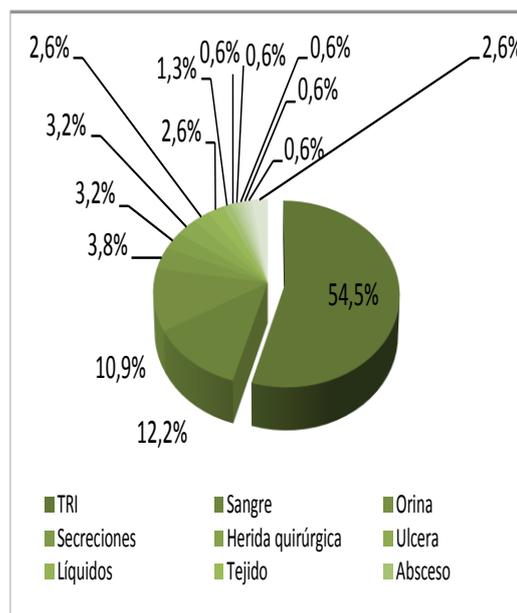
Tamaño de la Muestra: **42(26.9%) *K. pneumoniae* presentaron sensibilidad disminuida a imipenem.**

Muestras positivas.- 34

Tabla 1 y Gráfico 1.- Composición de las muestras procesadas

MUESTRAS	Nº	%
TRACTO RESPIRATORIO INFEROR	85	54,5
Sangre	19	12,2
Orina	17	10,9
Secreciones	6	3,8
Herida quirúrgica	5	3,2
Ulcera	5	3,2
Líquidos	4	2,6
Tejido	4	2,6
Absceso	2	1,3
Biopsia	1	0,6
Fístula	1	0,6
Lesión	1	0,6
Punta de catéter	1	0,6
Muestra Ambiental	1	0,6
Hisopado rectal	4	2,6
TOTAL	156	100

Fuente: Registros del Laboratorio
Elaborado por Q. F. Yolanda Narváez S.M.



Fuente: Registros del Laboratorio
Elaborado por Q. F. Yolanda Narváez S.M.

Análisis.- Con el objetivo de identificar por PCR, genes *bla* codificantes de carbapenemasas, en cepas con sensibilidad disminuida a carbapenemes, se procesaron 156 cepas de Enterobacterias, aisladas de diferentes muestras que ingresaron al laboratorio para la confirmación fenotípica y molecular. Las cepas

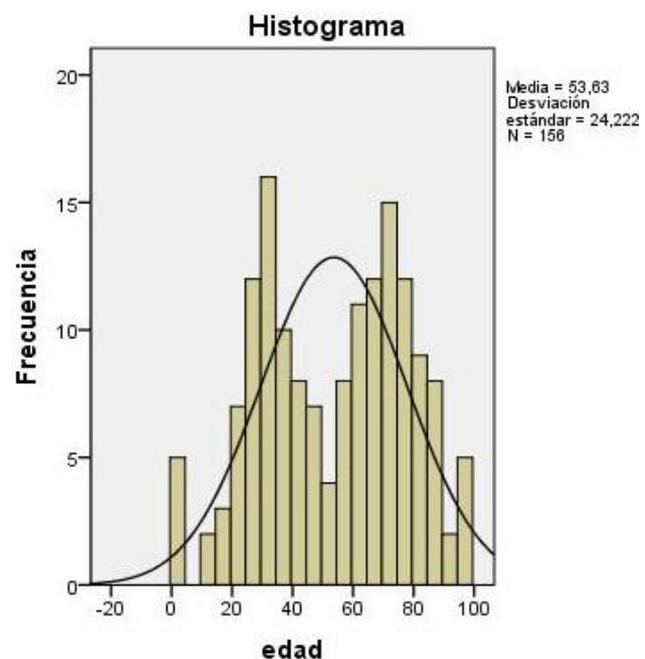
analizadas se obtuvieron de las siguientes fuentes: Secreciones del Tracto Respiratorio inferior el 54.5%, sangre 12.2%, orina 10.9%, secreciones de otro sitio anatómico 3.8%; 3.2% para herida quirúrgica y ulcera cada una; tejidos y líquidos con 2.6%; absceso 1.3%; hisopado rectal 2.6%, y finalmente 0.6% para cada una de las muestras de lesión, biopsia, fístula, punta de catéter y muestras ambientales.

Tabla 2 y Gráfico 2.- Frecuencia por edad de los pacientes investigados para la presencia de carbapenemasas.

Estadísticos		
edad		
N	Válido	156
	Perdidos	0
Media		53,63
Mediana		59,00
Moda		32
Desviación estándar		24,222
Varianza		586,700
Rango		96
Percentiles	20	30,00
	25	32,00
	40	44,00
	50	59,00
	60	65,20
	75	73,75
	80	77,00

Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.



Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.

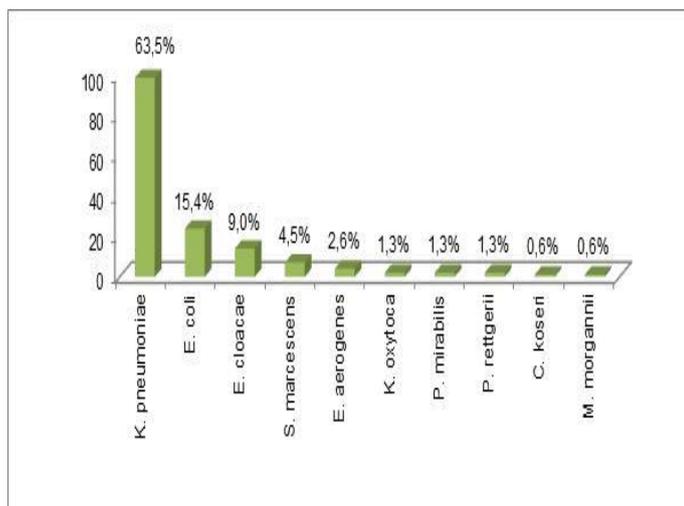
Análisis.- De las 156 muestras para investigar por PCR la presencia del gen portador Carbapenemasa, derivan de personas cuya mediana de edad es 59 años, correspondientes al 50 percentil.

Tabla 3 y Gráfico 3.- Distribución de los géneros de Enterobacterias aisladas.

ENTEROBACTERIAS	Nº	%
<i>K. pneumoniae</i>	99	63,5
<i>E. coli</i>	24	15,4
<i>E. cloacae</i>	14	9,0
<i>S. marcescens</i>	7	4,5
<i>E. aerogenes</i>	4	2,6
<i>K. oxytoca</i>	2	1,3
<i>P. mirabilis</i>	2	1,3
<i>P. rettgerii</i>	2	1,3
<i>C. koseri</i>	1	0,6
<i>M. morgannii</i>	1	0,6
TOTAL	156	100

Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.



Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.

Análisis.- Las 156 Enterobacterias aisladas, estaban integradas por 99 (63.5%) cepas de *K. pneumoniae*; 24 (15.4%) *E. coli*; 14 (9%) *E. cloacae*; 7 (4.5%) *Serratia marcescens*; 4 (2.6%) *E. aerógenes*; *K. Oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *P rettgerii* (1.3%) cada uno; *C. Koseri*, y *M. morganii* (0.6%) respectivamente.

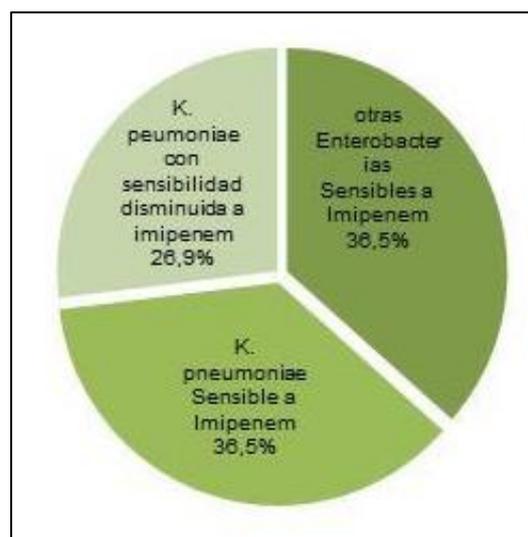
Tabla 4 y Gráfico 4.- Distribución de la Muestra.

De la muestra poblacional de 156 datos; 57(36.5%), corresponden a los géneros de Enterobacterias recuperados en menor frecuencia; 57(36.5%) *K. pneumoniae*; ambos grupos mostraron zonas de inhibición a imipenem, mayor a 22 mm., y 42(26.9%) fueron *K. pneumoniae* que presentaron sensibilidad disminuida a imipenem.

Enterobacterias	Nº	%
otras Enterobacterias Sensibles a Imipenem	57	36,5
<i>K. pneumoniae</i> Sensible a Imipenem	57	36,5
<i>K. pneumoniae</i> con sensibilidad disminuida a imipenem	42	26,9
TOTAL	156	100

Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.



Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.

Análisis.- Las 42 cepas con sensibilidad disminuida por imipenem se ensayaron para la técnica modificada de Hodge (MHT); de las cuales 33 (78,57%), cepas fueron positivas mientras que el 21,43% no mostraron la deformación característica. Así mismo la técnica de sinergia con APB y cloxacilina presentaron el 85,71%(36) y 4,76% (2) de rendimiento respectivamente.

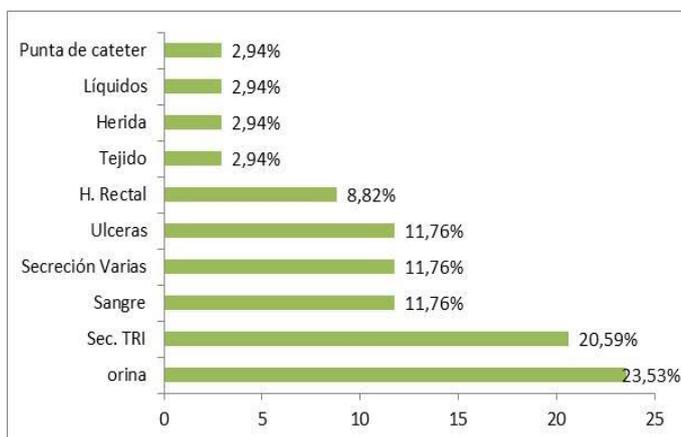
Tabla 5 y Gráfico 5.- Muestras con Enterobacterias portadoras de carbapenemasas

De las 42 cepas analizadas mediante PCR, el 81% (34) de cepas de *K. pneumoniae* presentaron el gen *bla* KPC, y en el 19% de los casos no se detectó la presencia del gen, ni los otros genes ensayados: *bla*VIM, *bla*NDM, *bla*IMP y *bla*OXA-48.

MUESTRA	Nº	%
orina	8	23,53
Sec. TRI	7	20,59
Sangre	4	11,76
Secreción Varias	4	11,76
Ulceras	4	11,76
H. Rectal	3	8,82
Tejido	1	2,94
Herida	1	2,94
Líquidos	1	2,94
Punta de cateter	1	2,94
TOTAL	34	100

Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.



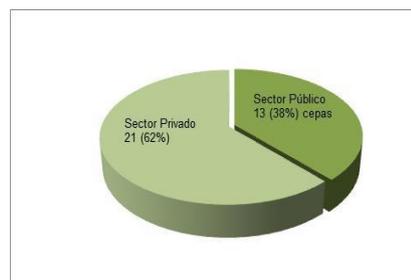
Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.

Las muestras con mayor presencia de carbapenemasas fueron a partir de: orina 23.53%(8); secreciones del tracto respiratorio 20.59%(7); sangre, secreciones, ulceras con el 11.76%(4) cada una respectivamente, 8.82% (3) para hisopado rectal, seguidas de tejidos, heridas, líquidos y punta de catéter con el 2.94% (1) de los casos.

Gráfico 6.- Distribución de KPC, según los establecimientos de salud

Las muestras procesadas para la detección del gen KPC, fueron derivadas en mayor porcentaje de las unidades de salud privadas.



Fuente: Registros del Laboratorio

Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.

Cálculo de la Prevalencia.

Tabla 6.- Prevalencia de pacientes con resultado positivo de Enterobacterias portadoras de genes codificantes de Carbapenemasas.

34 muestras con Enterobacterias portadoras del Gen *bla* KPC

Prevalencia: _____ : $0,809 \times 100$: **80,9%**

42 muestras procedas para identificar genes *bla*

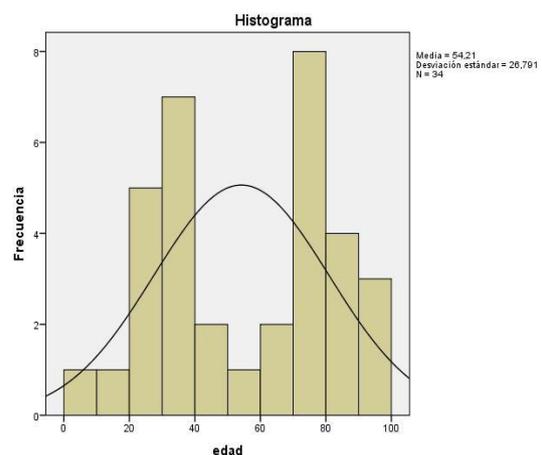
Análisis.- De las 42 muestras que se procesaron para identificar el gen *bla*, en el 80,9% de cepas se identificó el gen *bla* KPC, codificante de carbapenemasa.

Tabla 7 y Gráfico 7.- Frecuencia por edad de los 34 pacientes investigados con presencia de carbapenemasas.

Estadísticos

edad		
N	Válido	34
	Perdidos	0
Media		54,21
Mediana		56,00
Moda		72
Desviación estándar		26,791
Varianza		717,744
Rango		96
Percentiles	25	30,75
	50	56,00
	75	77,00

Fuente: Registros del Laboratorio
Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváz S.M.



Fuente: Registros del Laboratorio
Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváz S.M.

Análisis.- De las 34 muestras con presencia del gen portador Carbapenemasa por PCR, derivan de personas cuya mediana de edad es 56 años, correspondiente al 50 percentil.

Tabla 8.- Frecuencia de casos positivos de carbapenemasas por PCR.

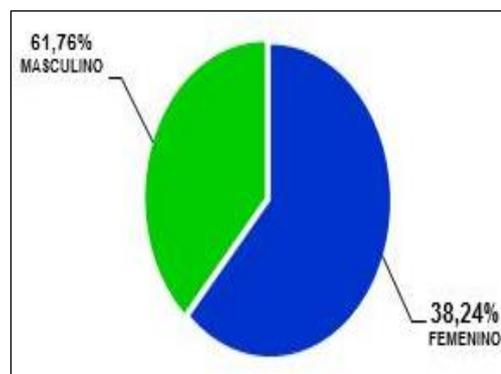
Klebsiella pneumoniae portadora del gen bla KPC					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	NEG	8	19,0	19,0	19,0
	POS	34	81,0	81,0	100,0
	Total	42	100,0	100,0	

Análisis.- De los 42 aislamientos de *K. pneumoniae*, el 81% resultaron positivos por PCR para el gen portador de Carbapenemasa, y el 19% resultaron negativas, la mayoría fueron muestras de orina.

Tabla 9 y Gráfico 8.- Frecuencia de género de los casos positivos de *K.pneumoniae*, carbapenemasa positivo.

SEXO	Nº	%
Masculino	21	61,76
Femenino	13	38,24
TOTAL	34	100

Fuente: Registros del Laboratorio
Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.



Fuente: Registros del Laboratorio
Elaborado por: Q. F. Yolanda Narváez S.M.

Análisis.- De los 34 pacientes positivos con *K. pneumoniae* portadores del gen de Carbapenemasa el 61,76% eran de sexo masculino y 38,23% de sexo femenino.

Tabla 10.- Prueba de contraste de Hipótesis

El gen de Carbapenemasa está en relación con la edad de los pacientes?

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de edad es la misma entre las categorías de kpc.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,803 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Análisis.- De los 34 pacientes positivos con *K pneumoniae*. Se observó que la edad no está relacionada con la aparición del gen de Carbapenemas. A pesar de que las betalactamasas de tipo KPC se encuentran principalmente en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, cada vez son detectadas en otros tipos de bacterias gram negativas. Desde la aparición de las enzimas KPC, el número de carbapenemasas plasmídicas se ha proliferado y se han difundido rápidamente hasta convertirse en un problema global, dispersándose por todo el mundo y siendo responsables de numerosos brotes nosocomiales. Currie, B. 2012. Muchos autores manifiestan que no hay relación con la edad o el tipo de raza y su aparición lo identifican con personas vulnerables, es decir el estado crítico en que se encuentran este tipo de pacientes y su manejo hospitalario.

Capítulo IV

DISCUSIÓN

4.1 Contrastación empírica:

Las carbapenemasas son un grupo de β -lactamasas clínicamente importante que ha emergido y diseminado entre las Enterobacterias; desde el primer aislamiento en *Klebsiella pneumoniae* en Estados Unidos se ha extendido exitosamente alrededor del mundo. En esta propuesta se encontró que el 81% de los aislados eran portadores de genes codificantes de carbapenemasa, *bla* KPC, lo que evidencia que las carbapenemasas están circulando en las unidades de donde se derivaron las muestras para su detección y confirmación.

4.2 Limitaciones:

La disponibilidad de documentación bibliográfica, y el acceso a herramientas informáticas hace que aplazara la ejecución de la propuesta.

4.3 Líneas de investigación

El presente estudio se fundamentó en la identificación por PCR de genes codificantes de carbapenemasas, el que debe ser complementado con otras técnicas moleculares de tipaje como la técnica de campo pulsado (PFGE) de referencia para la tipificación de especies bacterianas, que identifique al mismo tiempo la relación clonal y las diferencias filogenéticas entre cepas, parámetro de utilidad en la vigilancia molecular de especies causante de brotes en las unidades de salud; o la técnica molecular de secuenciación, que identifica el serotipo y la relación genética no solo con los países de la región sino del continente y del mundo.

4.4 Aspectos relevantes

Para nuestro conocimiento, esta propuesta de investigación fue la primera en documentar los genes codificantes de KPC en Enterobacterias aisladas en diferentes muestras clínicas.

Capítulo V

PROPUESTA

La detección de genes de carbapenemasas por PCR debido a su alta sensibilidad y especificidad, y a la obtención de resultados en corto tiempo, es la técnica estándar para la identificación de genes codificantes de carbapenemasas, en comparación con los métodos fenotípicos que presentan gran variabilidad y requieren de varios días para el resultado.

La utilización de PCR en la vigilancia de organismos productores de carbapenemasa se debe desarrollar no solo en caso de brotes sino de manera continua y con el propósito de comparar la diversidad genética, ejecutar la técnica de electroforesis en campo pulsado y la secuenciación multilocus o MLST que identifican clones y complejos clonales altamente epidémicos dispersos y reportados en áreas geográficas diferente, lo que evidencia la transferencia intercontinental de especies

Se ha descrito que el serotipo clonal de *K. pneumoniae* ST258 ha sido identificado como productor de carbapenemasa mediado por plásmidos lo que ha facilitado su diseminación a nivel mundial.

Conclusiones y Recomendaciones

Del conjunto de cepas procesadas, el único género de Enterobacterias que presentó sensibilidad disminuida a carbapenemes fue *K. pneumoniae* en un total de 42 cepas. Los métodos microbiológicos o fenotípicos; MHT (Técnica Modificada de Hodge) y Ácido Borónico, exhibieron el 78,57% y el 85,71% de cepas positivas en cada uno de los métodos ensayados, lo que predice la presencia de carbapenemasas; y la ausencia de sinergia frente al disco combinado de meropenem/cloxacilina, con un rendimiento del 4.76% confirma carbapenemasa de la Clase A, pero debido a que presentan gran variabilidad, es recomendable asociar estos resultados con métodos moleculares como PCR para la confirmación e identificación final de tipo de carbapenemasas.

El 34 (81%) cepas procesadas por PCR presentaron el gen *bla* que codifica para carbapenemasas de la clase A tipo KPC evidenciado la presencia de la enzima en la unidades de salud derivantes de las muestras. El 19% (8) cepas no evidenciaron la presencia del gen *bla* KPC, ni los otros genes ensayados, propuestos en esta investigación, indicando que estos aislados transportan otro mecanismo de resistencia que no involucra carbapenemasas.

Las cepas de *K. pneumoniae* portadoras de carbapenemasa, según el sitio de aislamiento, fueron orina con 8(23,53%) casos, seguida de 7(20,59%) muestras del tracto respiratorio inferior; más sangre, secreciones y úlceras con el 11,76% (4) de los casos cada una, correspondiéndole a tejido, herida, líquidos y punta de catéter el 2,94% a cada una e hisopado rectal en el 8.82%.

Los diferentes tipos de muestras procesadas demuestran la presencia de carbapenemasa en diferentes escenarios recomendados para la vigilancia activa de CRE, que promueve la evaluación de colonizantes (hisopado rectal) e infectados (muestras clínicas) para la temprana identificación de un brote e implementar las precauciones necesarias para el cuidado de los pacientes con Enterobacterias portadoras de Carbapenemasas y prevenir su diseminación dentro de la unidad.

Estos tipos de muestras se asocian a pacientes con infecciones previas, con presión selectiva de antibiótico originado por tratamiento prolongado de los mismos que influencia la colonización de estos organismos. Así mismo los dispositivos de larga permanencia como catéteres que contribuyen a la adquisición de carbapenemasas.

La edad promedio de los pacientes con cepas portadoras de KPC fue de 54, y su presencia no está asociada a la edad, sino a factores de riesgo que pueden ser independientes como la permanencia prolongada en las unidades de cuidado intensivo, el estado funcional del paciente y la terapia previa de antibióticos. Otros factores de riesgo que se han asociado con carbapenemasas son los trasplantes de órganos y de células.

BIBLIOGRAFÍA

- Antunes, N. T., Lamoureaux, T. L., Toth, M., Stewart, N. K., Frase, H., & Vakulenko, S. B. (2014). Class D β -Lactamases: Are They All Carbapenemases? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2119–2125. <http://doi.org/10.1128/AAC.02522-13>.
- Arnold, R. S., Thom, K. a, Sharma, S., Phillips, M., Johnson, J. K., & Morgan, D. J. (2012). Emergence of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC)- Producing Bacteria. *South Med J*, 104(1), 40–45. <http://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181fd7d5a>.Emergence.
- Birgy, A., Bidet, P., Genel, N., Doit, C., Decré, D., Arlet, G., & Bingen, E. (2012). Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1295–1302. <http://doi.org/10.1128/JCM.06131-11>.
- Bratu, S., Landman, D., Haag, R., Recco, R., Eramo, A., Maqsood, A., & Quale, J. (2005). Rapid Spread of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae in New York City. *ARCH INTERN MED*, 165, 1430–1435. Retrieved from www.archinternmed.com.
- Brown, S., Young, H. K., & Amyes, S. G. B. (2005). Characterization of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of Acinetobacter baumannii from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 15–23. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1943.tb08237.x>.
- Buehlmann, M., Fankhauser, H., Laffer, R., Bregenzer, T., & Widmer, A. F. (2010). The Inguinal Skin: An Important Site of Colonization with Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Enterobacteriaceae. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(4), 425-427427–428. <http://doi.org/10.1086/651302>.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of ??-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <http://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- Cao, V. T., Arlet, G., Ericsson, B. M., Tammelin, a, Courvalin, P., & Lambert, T. (2000). Emergence of imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(6), 895–900. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102406>.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC. (2015). Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases*, (November), 24. Retrieved from https://www.osha.gov/SLTC/ebola/control_prevention.html.
- De la Lastra, V., Ulloa, M. T., Pinto, M. E., Vidal, M., & Silva, F. (2010). Serinocarapenemasas de clase A en enterobacterias. *Rev Hosp Clín Univ Chile*, 21(1), 232–7.

Doi, Y., & Paterson, D. (2015). Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36(1), 074–084. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1544208>.

Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–263. <http://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>.

Falagas, M. E., Lourida, P., Poulidakos, P., Rafailidis, P. I., & Tansarli, G. S. (2014). Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 654–663. <http://doi.org/10.1128/AAC.01222-13>.

Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (1995). Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 17, 11–22.

Grundmann, H., Livermore, D. M., Giske, C. G., Canton, R., Rossolini, G. M., Campos, J., & Vatopoulos, A. (n.d.). Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Group*, 1–13. <http://doi.org/19711> [pii].

Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., & Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 53(1), 60–67. <http://doi.org/10.1093/cid/cir202>.

Higgins, P. G., Pérez-Llarena, F. J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G., & Seifert, H. (2013). OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2121–2126. <http://doi.org/10.1128/AAC.02413-12>.

Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A., & Maldonado, L. (2012). *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2: primer reporte en el Ecuador. *Rev Fac Cien Med*, 37(September 2016), 39–41.

Laurent, P., Héritier, C., Toün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 15–22. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15>.

Martínez-Martínez, L., & González-López, J. (2014). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 32(Supl 4), 4–9. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70128-9](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70128-9).

Mathers, A. J., Hazen, K. C., Carroll, J., Yeh, A. J., Cox, H. L., Bonomo, R. A., & Sifri, C. D. (2013). First Clinical Cases of OXA-48-Producing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the “Menace” Arrives in the New World. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 680–683. <http://doi.org/10.1128/JCM.02580-12>.

Moxon, C. A., & Paulus, S. (2016). Beta-lactamases in Enterobacteriaceae infections

in children. *Journal of Infection*, (May). <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.021>.

Muñoz-Price, L. S., Hayden, M. K., Lolans, K., Won, S., Calvert, K., Lin, M., ... Weinstein, R. a. (2010). Successful Control of an Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *K. pneumoniae* at a Long-Term Acute Care Hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 31(4), 341–7. <http://doi.org/10.1086/651097>.

Nordmann, P. (2013). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44(2), 51–56. <http://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>.

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–1798. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3201/eid1710.110655>.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(6), 321–331. <http://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x>.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 487–489. <http://doi.org/10.1093/jac/dks426>.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 821–830. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>.

Paño Pardo, J. R., Villar, S. S., Ramos Ramos, J. C., & Pintado, V. (2014). Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 32(S4), 41–48. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70173-9](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70173-9).

Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <http://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>.

Patel, G., & Bonomo, R. A. (2013). “Stormy waters ahead”: Global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAR), 1–17. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00048>.

Poirel, L., Castanheira, M., Carrër, A., Rodriguez, C. P., Jones, R. N., Smayevsky, J., & Nordmann, P. (2011). OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), 2546–2551. <http://doi.org/10.1128/AAC.00022-11>.

Poirel, L., Pitout, J. D., & Nordmann, P. (2007). Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiology*, 2(5), 501–512. <http://doi.org/10.2217/17460913.2.5.501>.

Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–458. <http://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.

Rasmussen, B. A., & Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(2), 223–232.

Sridhar, R. P. N. (2012). Carbapenemases. [Www.Microrao.Com](http://www.Microrao.Com), 1–12.

Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682–707. <http://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>.

Viau, R., Frank, K. M., Jacobs, M. R., Wilson, B., Kaye, K., Donskey, C. J., ... A., B. R. (2015). Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods, 29(1), 1–27. <http://doi.org/10.1128/CMR.00108-14>.Address.

Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Vindel, A., & Saez-Nieto, J. A. (2013). Epidemiology of the acinetobacter-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of acinetobacter baumannii from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 550–553. <http://doi.org/10.1093/jac/dks448>.

Wiener-Well, Y., Rudensky, B., Yinnon, A. M., Kopuit, P., Schlesinger, Y., Broide, E., ... Raveh, D. (2010). Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *Journal of Hospital Infection*, 74(4), 344–349. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.07.022>.

Anexos

Anexo 1.- Caracterización Molecular de Genes de Carbapenemasas

Extracción de ADN a partir de cepa, mediante el Método de Boiling

Muestra: Cepas de Enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenemes.

Extracción

Colocar 100 µl de agua destilada calidad PCR en un tubo eppendorf de 1,7 ml

Colocar 4-5 colonias de un cultivo fresco de *Enterobacteriaceae* de 18-24 h, sembrado en agar soya, disolver totalmente la cepa que no queden grumos

Colocar los tubos en el Thermomixer calentado a 100 °C

Calentar por 10 min con agitación constante.

Centrifugar a 12000 rpm por 10 min.

Separar el sobrenadante y conservarlo a - 20 °C hasta su uso

Preparación de los Reactivos

Agua destilada calidad PR

Buffer 10 X (Invitrogen)

Cl₂Mg 50mM (Invitrogen)

dNTP's 100 mM

Taq- Polimerasa 5 U/ µl

Primers o cebadores

KPC-F AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG

KPC-R AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA

VIM-F AGT GGT GAG TAT CCG ACA G

VIM R ATG AAA GTG CGT GGA GAC

IMP-U F1 GGY GTT TWT GTT CAT ACW TCK TTY GA

IMP-U R1 GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT

NDM-F AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC

NDM-R GGC GTA GTG CTC AGT GTC

OXA48-F ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG

OXA48-R2 TGAGCACTTCTTTTGTGATG

16S-P AGGAGGTGATCCAACCGCA

16S-M AACTGGAGGAAGGTGGGGAT

Materiales

Pipetas automáticas de 0,5- 10 µl; 20-50 µl; 200-1000 µl

Puntas con filtro para cada pipeta

Gradillas para tubos eppendorf

Tubos eppendorf de 1,7 ml, 100 µl.

Cálculo del volumen y concentraciones de los reactivos para la amplificación de los genes a caracterizar.

REACTIVOS	VOLUMEN (µl)
Agua	17,6
Buffer 10 X	2,5
Cl ₂ Mg (50 mM)	0,75
dNTP's (10 mM)	0,5
Taq (5U/µl)	0,15
Primer Forward (10 µl)	0,5
Primer Reverse (10 µl)	0,5
ADN	2,5
Vol. Final	25

Colocar en los tubos agua destilada grado PCR, luego agregar la cantidad necesaria de cada reactivo en el orden de: buffer, seguido del Cl₂Mg, dntp's, primer F y primer R. y por último la Taq

Distribuir volúmenes de 22,5 µl de la mix en los tubos codificados (100 µl)

Secuencia de los iniciadores y condiciones de amplificación

PRIMERS	SECUENCIA DE LOS CEBADORES 5'--3'	GEN	AMPLICON	Desnaturalización inicial	Ciclado	Extensión Final
KPC-F	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG	KPC	916 pb	94 °C por 5 min	30-35 ciclos de: 94 °C 30 seg--50 °C 30 seg-- 72 °C 60 seg.	72 °C por 10 min
KPC-R	AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA					
VIM-F	AgT ggT gAg TAT CCg ACA g	vim	310 pb	94 °C por 5 min	30-35 ciclos de: 94 °C 30 seg--57 °C 30 seg-- 72 °C 30 seg.	72 °C por 5 min
VIM-R	ATg AAA gTg CgT ggA gAC					
IMP-UF1	GGY GTT TWT GTT CAT ACWTCK TTY GA	IMP	404 pb	94 °C por 5 min	30-35 ciclos de: 94 °C 30 seg--50 °C 30 seg-- 72 °C 30 seg.	72 °C por 5 min
IMP-UR1	GGY ARC CAA ACC ACT ASG TTA TCT					
NDM-F	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC	NDM	512 pb	94 °C por 5 min	30-35 ciclos de: 94 °C 30 seg--50 °C 30 seg-- 72 °C 60 seg.	72 °C por 10 min
NDM-R	GGC GTA GTG CTC AGT GTC					
OXA48-F	ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG	OXA-48	775 pb	94 °C por 5 min	30-35 ciclos de: 94 °C 30 seg--50 °C 30 seg-- 72 °C 60 seg.	72 °C por 10 min
OXA48-R	TGAGCACTTCTTTTGATG					

Evaluación e Interpretación de los Resultados

Control Negativo: Ausencia de amplificación con el control negativo

Control Positivo: Presencia de bandas nítidas, y con el peso molecular esperado del gen esperado

Control con 16S: Presencia de bandas, indicativo que hay amplificación.