



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Caracterización molecular de la resistencia a carbapenems de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* aisladas del Hospital Maria Auxiliadora – San Juan de Miraflores**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

### **AUTOR**

Fernando Enrique GUIBERT CHIPOCO

### **ASESORES**

Maria Elena SALAZAR SALVATIERRA

Maria Jesús PONS CASELLAS (coasesora)

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Guibert F. Caracterización molecular de la resistencia a carbapenems de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* aisladas del Hospital Maria Auxiliadora-San Juan de Miraflores [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2022.

---

## Metadatos complementarios

| <b>Datos de autor</b>            |   |
|----------------------------------|---|
| Nombres y apellidos              | Fernando Enrique Guibert Chipoco  |
| Tipo de documento de identidad   | DNI   |
| Número de documento de identidad | 72005884  |
| URL de ORCID                     | <a href="https://orcid.org/0000-0001-5282-0148">https://orcid.org/0000-0001-5282-0148</a> |
| <b>Datos de asesor</b>           |   |
| Nombres y apellidos              | Maria Elena Salazar Salvatierra   |
| Tipo de documento de identidad   | DNI   |
| Número de documento de identidad | 08675623  |
| URL de ORCID                     | <a href="https://orcid.org/0000-0002-5661-4752">https://orcid.org/0000-0002-5661-4752</a> |
| <b>Datos de coasesor</b>         |   |
| Nombres y apellidos              | Maria Jesús Pons Casellas   |
| Tipo de documento de identidad   | Pasaporte   |
| Número de documento de identidad | ES / AAI671023  |
| URL de ORCID                     | <a href="https://orcid.org/0000-0001-8384-2315">https://orcid.org/0000-0001-8384-2315</a> |
| <b>Datos del jurado</b>          |   |
| <b>Presidente del jurado</b>     |   |
| Nombres y apellidos              | Víctor Crispín Pérez  |
| Tipo de documento                | DNI   |
| Número de documento de identidad | 07363013  |
| <b>Miembro del jurado 1</b>      |   |
| Nombres y apellidos              | Karim Lizeth Jiménez Aliaga   |

|  |   |
|--|---|
| Tipo de documento                                      | DNI   |
| Número de documento de identidad                       | 40957382  |
| <b>Miembro del jurado 2</b>                            |   |
| Nombres y apellidos                                    | Elizabeth Liz Chávez Hidalgo  |
| Tipo de documento                                      | DNI   |
| Número de documento de identidad                       | 41354431  |
| <b>Miembro del jurado 3</b>                            |   |
| Nombres y apellidos                                    | Julio Reynaldo Ruiz Quiroz  |
| Tipo de documento                                      | DNI   |
| Número de documento de identidad                       | 07760326  |
| <b>Datos de investigación</b>                          |   |
| Línea de investigación                                 | B.2.8.3 Resistencia bacteriana  |
| Grupo de investigación                                 | Biofilms Bacterianos en el Perú - BIOBACT   |
| Agencia de financiamiento                              | Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica - CONCYTEC. FONDECYT - Banco Mundial. 008-2019-FONDECYT-BM.  |
| Ubicación geográfica de la investigación               | Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM<br>País: Perú<br>Departamento: Lima<br>Provincia: Lima<br>Distrito: Cercado de Lima<br>Latitud: -12.054562191590417<br>Longitud: -77.02330675707579   |
| Año o rango de años en que se realizó la investigación | 2021-2022   |
| URL de disciplinas OCDE                                | Biología molecular, Microbiología<br><a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01</a><br>Salud Pública, Salud Ambiental<br><a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05</a> |



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA A CARBAPENEMS DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* Y *Acinetobacter baumannii* AISLADAS DEL HOSPITAL MARIA AUXILIADORA – SAN JUAN DE MIRAFLORES**

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

**FERNANDO ENRIQUE GUIBERT CHIPOCO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

**VEINTE (20) APROBADO CON MAXIMOS HONORES**

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

**JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR (R.D. N.º 000458-2022-D-FFB/UNMSM)**

- Dr. Víctor Crispín Pérez
- Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga
- Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo
- Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Lima, 04 de julio de 2022.

  
**Dr. Víctor Crispín Pérez**  
**Presidente**

# DEDICATORIA

A mi familia por acompañarme y apoyarme siempre, en especial a mi madre, Rosa Chipoco y mi abuela Martha Argumé, quienes fueron el principal soporte y motivación para el desarrollo del presente trabajo.

A quien me guio y encaminó durante mucho más que mi etapa universitaria, la Dra. Maria Elena Salazar Salvatierra, quien hoy en día es mi asesora y amiga.

A mi co-asesora la PhD Maria Pons, y al PhD Joaquín Ruiz, por su apoyo, confianza y sobre todo la enorme oportunidad de desarrollar mi tesis junto a ellos.

A personas importantes cuyo pasaje en distintas etapas de mi vida resultó significativo para el cumplimiento de mis metas.

Finalmente, este trabajo se lo dedico a mi tía, Silvia Guibert, quien falleció a causa de una infección intrahospitalaria por una bacteria fármaco-resistente. Ella es el motivo por el cual espero que mi trabajo pueda ayudar a que nadie más pase por una pérdida como la que tuve.

# AGRADECIMIENTOS

A CONCYTEC por el financiamiento a través del contrato N°008-2019-FONDECYT-BM con el aval del Banco Mundial, lo cual permitió el desarrollo del presente trabajo.

A la universidad Científica del Sur, por facilitarme sus instalaciones y equipamiento, al igual que el Centro de Investigación Biomédica de la Rioja en Logroño – España, por la gran oportunidad de aprendizaje, junto a grandes mentoras, como la PhD. María de Toro y la PhD. Yolanda Sáenz, con las buenas personas que conforman el CIBIR.

A mis compañeros de grupo de investigación, Bárbara, Karen, Rocío, Kathya, Alex, Luciano y Angie, que hicieron muy amena esta travesía en el laboratorio, así como al personal de la universidad, Marcos y Roxana, que siempre estuvieron allí para brindarme su apoyo.

.

## INDICE

|         |   |    |
|---------|---|----|
| I.      | INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| I.1.    | Planteamiento del problema.....   | 1  |
| I.2.    | Objetivos.....  | 3  |
| I.2.1.  | Objetivo general .....  | 3  |
| I.2.2.  | Objetivos específicos.....  | 3  |
| I.3.    | Importancia y alcance de la investigación.....                              | 4  |
| I.4.    | Limitaciones de la investigación.....                                       | 4  |
| II.     | REVISIÓN DE LA LITERATURA.....  | 5  |
| II.1.   | Marco teórico.....  | 5  |
| II.1.1. | Antecedentes del estudio.....   | 5  |
| II.1.2. | Bases teóricas .....  | 8  |
| II.1.3. | Glosario de términos .....  | 18 |
| III.    | HIPÓTESIS Y VARIABLES .....   | 20 |
| III.1.  | Hipótesis.....  | 20 |
| III.2.  | Variables.....  | 20 |
| III.3.  | Operacionalización de variables .....                                       | 20 |
| IV.     | MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 20 |
| IV.1.   | Área de estudio .....   | 20 |
| IV.2.   | Diseño de investigación.....  | 20 |
| IV.3.   | Microorganismos de estudio .....  | 20 |
| IV.4.   | Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información ..... | 21 |
| IV.5.   | Análisis estadístico.....   | 25 |
| V.      | RESULTADOS.....   | 26 |
| V.1.    | Presentación y análisis de los resultados .....                             | 26 |
| V.1.1.  | Diagrama de flujo.....  | 26 |
| V.1.2.  | Descripción de las muestras .....   | 27 |
| V.1.3.  | Determinación de la sensibilidad antimicrobiana .....                       | 30 |
| V.1.4.  | Detección molecular de genes de resistencia .....                           | 31 |
| VI.     | DISCUSIÓN .....   | 36 |
| VII.    | CONCLUSIONES .....  | 41 |
| VIII.   | RECOMENDACIONES.....  | 42 |
| IX.     | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 43 |
| X.      | ANEXOS .....  | 52 |

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Bacterias ESKAPE
- Tabla 2.** Puntos de corte de los antibióticos evaluados en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Tabla 3.** Genes de resistencia a carbapenems evaluados en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Tabla 4.** Distribución de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Tabla 5.** Niveles de resistencia a antimicrobianos de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Tabla 6.** Agrupación por genotipos de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Tabla 7.** Prevalencia de genes de resistencia identificados en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Grupo betalactámico y sus detalles estructurales.
- Figura 2.** Clasificación de los antimicrobianos según su mecanismo de acción.
- Figura 3.** Línea de tiempo de la resistencia a antibióticos.
- Figura 4.** Mecanismos de resistencia de las bacterias frente a agentes antimicrobianos.
- Figura 5.** Mecanismo de acción de las betalactamasas.
- Figura 6.** Clasificación de las carbapenemasas según la estructura de su sitio activo.
- Figura 7.** Mecanismos de transmisión de genes de resistencia por las bacterias.
- Figura 8.** Diagrama de flujo del procesamiento de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Figura 9.** Porcentaje de resistencia a carbapenems de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Figura 10.** Distribución por tipo de muestra de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aisladas del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

- Figura 11.** Procedencia de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Figura 12.** Distribución según sexo y rango etario de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Figura 13.** Niveles de resistencia a antimicrobianos de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021
- Figura 14.** Visualización UV del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021.
- Figura 15.** Visualización UV del gen *bla*<sub>OXA-24</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021.
- Figura 16.** Visualización UV del gen *bla*<sub>IMP</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021.
- Figura 17.** Visualización UV del gen *bla*<sub>VIM</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021.
- Figura 18.** Visualización UV del gen *bla*<sub>PER</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021.

**Figura 19.** Visualización UV del gen *bla*<sub>PER</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021.

## INDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Operacionalización de variables.
- Anexo 2.** Aprobación por Comité de ética UCSUR.
- Anexo 3.** Hoja de información - Enzima Taq Polimerasa marca Canvax “Horse PowerTaq DNA Polymerase”.
- Anexo 4.** Hoja de información - Colorante de ácidos nucleicos marca ABM “Safeview™ Nucleic acid stains”.
- Anexo 5.** Hoja de información – Escalera de ADN 100 pb marca Canvax “100 bp BRIGHTMAX™ DNA Ladder”
- Anexo 6.** Hoja de información – Escalera de ADN 100 pb marca ABM “100 bp Plus Opti-DNA Marker”

## RESUMEN

**Antecedentes:** *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos oportunistas de gran relevancia clínica en las infecciones relacionadas con la atención en salud, mostrando altos niveles de resistencia a varios antimicrobianos incluyendo los carbapenems, considerados como uno de los grupos de antimicrobianos de último recurso. El estudio tuvo como objetivo caracterizar de modo molecular las cepas resistentes a carbapenems de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aisladas del Hospital María Auxiliadora.

**Métodos:** Los aislados fueron recolectados en el periodo enero-febrero de 2021 siendo incluidos en el estudio si presentaban resistencia a imipenem y/o meropenem. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana y su identidad mediante VITEK 2. Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa para identificar los genes de las carbapenemasas (*bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-23G</sub>*, *bla<sub>OXA-24G</sub>*, *bla<sub>OXA-48G</sub>*, *bla<sub>OXA-58G</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>IMI</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>*) así como *bla<sub>PER</sub>*.

**Resultados:** Fueron incluidos 42 aislados de *A. baumannii* y 23 de *P. aeruginosa* con sensibilidad reducida a carbapenems. Todas las cepas de *A. baumannii* fueron resistentes a cefalosporinas, ciprofloxacino, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam, no encontrándose ningún aislado resistente a colistina. Por su parte, *P. aeruginosa* fueron resistentes a más del 90% a piperacilina-tazobactam, mientras que 60,9% fueron clasificadas como intermedias para colistina. Para *A. baumannii* se determinó la presencia de los genes *bla<sub>OXA-23G</sub>* y *bla<sub>OXA-24G</sub>*, representando 14,29% y 92,86% respectivamente. Mientras que las cepas de *P. aeruginosa* albergaron los genes *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* en 56,52% y 26,09%, según corresponda.

**Conclusiones:** Los niveles de resistencia a los fármacos de último recurso fueron elevados en ambas especies, la resistencia a los carbapenems puede atribuirse a la presencia de los genes *bla<sub>OXA-23G</sub>* y *bla<sub>OXA-24G</sub>* para *A. baumannii*, y *bla<sub>IMP</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* para *P. aeruginosa*.

**Palabras clave:** *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, RAM, resistencia a carbapenems, carbapenemasas.

## ABSTRACT

**Background:** *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* are opportunistic pathogens of great clinical concern in nosocomial infections, showing high levels of resistance to several antimicrobials including carbapenems, considered as one of the last-resort treatments in hospitals. The study aimed to molecularly characterise carbapenem non-susceptible strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolated in the hospital Maria Auxiliadora (Lima, Peru).

**Methods:** The isolates were collected in the period January-February 2021 being included in the study in case they exhibit resistance to imipenem and/or meropenem, the antimicrobial susceptibility and identity were determined by VITEK 2. The polymerase chain reaction was used to identify carbapenemase genes (*bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-23G</sub>, *bla*<sub>OXA-24G</sub>, *bla*<sub>OXA-48G</sub>, *bla*<sub>OXA-58G</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, and *bla*<sub>IMP</sub>) and *bla*<sub>PER</sub> as appropriate, corroborated by sequencing.

**Results:** Forty two isolates of *A. baumannii* and 23 isolates of *P. aeruginosa* were included as carbapenem-resistant strains. All the *A. baumannii* strains were resistant to cephalosporins, ciprofloxacin, ampicillin-sulbactam and piperacillin-tazobactam, while  $\geq 90\%$  to tigecycline, although no colistin-resistant isolate was found. Meanwhile, *P. aeruginosa* were resistant to more than 90% for piperacillin-tazobactam, for colistin 60,9 % were categorized as intermediate. For *A. baumannii* the presence of *bla*<sub>OXA-23G</sub> and *bla*<sub>OXA-24G</sub> were noticed, with 14,29% and 92,86% respectively. Whereas *P. aeruginosa* harboured mostly *bla*<sub>IMP</sub>, and *bla*<sub>VIM</sub> genes, with 56,52% and 26,09%.

**Conclusion:** The levels of resistance to drugs of last resort were vastly high in both species, resistance to carbapenems can be attributed to the presence of *bla*<sub>OXA-23G</sub> and *bla*<sub>OXA-24G</sub> genes for *A. baumannii*, whilst *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> for *P. aeruginosa*.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, AMR, Carbapenem resistance, carbapenemases.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Planteamiento del problema

La investigación y control de la resistencia a antimicrobianos (RAM) es considerada una prioridad global, afectando principalmente a países de ingresos bajos y medios<sup>1</sup>. Perú, como parte de este grupo, no es una excepción a esta problemática, reportando niveles en aumento de la RAM desde algunas décadas atrás<sup>2,3</sup>.

El aumento en los niveles de RAM agota las opciones de tratamiento eficaz para infecciones de origen bacteriano<sup>4</sup>, en consecuencia, 4,95 millones de muertes fueron atribuidas a dicho problema solo en 2019<sup>5</sup>. Se prevé, en el caso de no tomar acciones, que para el año 2050 la resistencia a antimicrobianos será la primera causa de muerte en el mundo, con un valor estimado de 10 millones de muertes anuales, superando a las causas de muerte predominantes como: el cáncer, afecciones cardíacas y las respiratorias, suponiendo un costo económico en salud que bordearía aproximadamente los 1,2 trillones de dólares<sup>6,7</sup>.

Para Lodise y su equipo<sup>8</sup> las pérdidas en vida y dinero se atribuyen a un retraso en el tratamiento efectivo de las enfermedades, incrementando los tiempos de estancias hospitalarias y los costos del tratamiento adheridos, asociándolos a su vez a un incremento en la mortalidad de los pacientes que padecen infecciones por bacterias resistentes a antimicrobianos.

En este escenario, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, dos microorganismos patógenos oportunistas que encabezan los reportes por infecciones relacionadas con la atención en salud<sup>9</sup>, fueron catalogados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como patógenos de alta prioridad para el estudio de alternativas de tratamiento debido a los elevados niveles de resistencia a antimicrobianos que vienen mostrando en los últimos años, por lo tanto, el estudio de dichos patógenos y la consecuente obtención de datos relacionados a sus perfiles de resistencia resulta de gran interés a nivel global<sup>10</sup>.

La resistencia a antimicrobianos no es un fenómeno que esté limitado a nuestros tiempos. Se han detectado genes de resistencia en muestras fósiles de hace más de 30 000 años<sup>11</sup>. No obstante, el uso indiscriminado de los antibióticos en los últimos años ha aumentado de manera preocupante, tanto en humanos como en animales. En humanos, el uso irracional de antibióticos se relaciona al consumo sin prescripción médica y su uso empírico en diferentes afecciones, muchas veces sin completar el tiempo indicado para su tratamiento<sup>12</sup>. En la industria de producción animal, los antimicrobianos son usados como promotores de crecimiento y profilácticos, ya sea por carecer de regulación específica o por el bajo cumplimiento de las leyes vigentes<sup>13,14</sup>.

En concreto, estas condiciones favorecen que bacterias resistentes se diseminen en diferentes ambientes, incluyendo zonas agrícolas, aguas, fauna silvestre, suelo, entre otros; conformando un reservorio latente de mecanismos de resistencia a antimicrobianos<sup>14,15</sup>.

## **Preguntas de investigación:**

- ¿Cuáles son las características moleculares de las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora?
- ¿Cuáles son las características moleculares de las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora?

## **I.2. Objetivos**

### **I.2.1. Objetivo general**

Caracterizar de modo molecular las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora en el periodo enero - febrero 2021.

### **I.2.2. Objetivos específicos**

1. Determinar los perfiles de sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora.
2. Identificar los genes de resistencia a carbapenems presentes en las cepas aisladas del Hospital María Auxiliadora.
3. Determinar los genotipos de mayor frecuencia en las cepas aisladas del Hospital María Auxiliadora

### **I.3. Importancia y alcance de la investigación**

Se obtuvo información relevante sobre resistencia a antimicrobianos y los genes implicados en la resistencia a carbapenems que poseen las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* circulantes en el Hospital María Auxiliadora, de este modo se podrá implementar mejoras en el manejo de los esquemas terapéuticos, facilitando la toma de decisiones para la contención y prevención de las infecciones de origen bacteriano en dicho hospital.

Del mismo modo que, se pone a disposición información importante sobre epidemiología molecular en Perú para la oportuna divulgación de los datos concernientes a resistencia a carbapenems en nuestro país, ofreciendo un punto de partida para la continuidad de este tipo de estudios aplicado a diferentes locaciones del Perú, debido a que en los últimos años se ha visto un incremento de los estudios orientados a determinar los niveles de resistencia a antimicrobianos, sin embargo, se mantiene bajo el número de estudios enfocados a los mecanismos de resistencia y sus relaciones clonales.

### **I.4. Limitaciones de la investigación**

Se considera como principal limitación el tamaño de la muestra, ya que no se pudo recepcionar mayor número de cepas ni ampliar el espacio temporal de recolección de estas debido a la coyuntura por la pandemia COVID-19. A pesar de ello los hallazgos fueron relevantes debido a los pocos estudios disponibles en el país.

Adicionalmente, el considerar la información de solo un hospital restringe el poder generalizar los hallazgos, se necesitaría disponer de datos de otros hospitales bajo condiciones de investigación análogas, de este modo los resultados obtenidos podrían ser aplicables a un mayor número de escenarios, aun así, la información obtenida podría ser de utilidad para la contención y prevención de infecciones bacterianas en el Hospital María Auxiliadora.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### II.1. Marco teórico

#### II.1.1. Antecedentes del estudio

En 2019 la OMS remarcó la importancia de tomar acciones para hacer frente a las infecciones causadas por bacterias resistentes a antimicrobianos, también llamadas superbacterias<sup>12,16</sup>, conformando un punto de agenda recurrente debido a que, los expertos pronostican que a futuro se tendrán grandes pérdidas en vidas humanas y económicas, que afectarían especialmente países en vías de desarrollo como el nuestro<sup>6,7</sup>.

La persistencia de estas superbacterias en los distintos ambientes clínicos se debe en su mayoría a los múltiples mecanismos de resistencia que estos microorganismos poseen, se listan dentro de ellos: la sobreexpresión de bombas de eflujo, cambios en la permeabilidad de membrana, mutación de porinas, modificación de dianas moleculares y la producción de enzimas capaces de modificar a los antimicrobianos<sup>17</sup>. Dentro de este último, se destaca la presencia de betalactamasas, enzimas capaces de hidrolizar enlaces en la estructura de los fármacos betalactámicos, los cuales son vitales para su eficacia, inactivándolos como consecuencia. En los últimos años ha sido preocupante la aparición de cepas poseedoras de carbapenemasas, subgrupo dentro de las citadas betalactamasas, las cuales afectarían a los fármacos carbapenems<sup>18</sup>.

Los carbapenems son un grupo de fármacos considerados como de último recurso para el tratamiento de infecciones bacterianas, esto quiere decir que están relacionados a escenarios donde la vida del paciente se ve muy comprometida<sup>19</sup>. A pesar de que su uso pueda considerarse muy limitado comparado al resto de antibióticos, la resistencia a carbapenems se ha incrementado desproporcionalmente en las últimas dos décadas, incluso en países de primer mundo como Estados Unidos que, en cuestión de pocos años, tuvo incrementos del 9% al 40% en el periodo 1994-2005<sup>2</sup>.

Estudios recientes reportan que el aumento de la resistencia a antimicrobianos sigue dándose en distintas partes del mundo. En 2019 Brink<sup>20</sup> presentó una revisión orientada a la epidemiología y a los mecanismos de resistencia involucrados con la mortalidad en hospitales, él planteó que *A. baumannii* y *P. aeruginosa* son de los patógenos más frecuentes relacionados a resistencia a carbapenems<sup>21</sup>, Se muestra, además que la diseminación de estas bacterias afecta a países de rentas elevadas, y genera gran alarma sobre países de pequeño y mediano ingreso pues los sesgos existentes en estos países no permiten ver un escenario real<sup>14</sup>.

Hamidian y Nigro<sup>22</sup> en su estudio del año 2019, coinciden con dicha conclusión, aunque ellos lo orientaron solo a *A. baumannii*, refiriendo información importante sobre la resistencia a carbapenems. En sus hallazgos, señalaron a los clones 1 y 2 como los de mayor prevalencia en el mundo, ambos codificantes del gen *bla<sub>oxa23</sub>*, además indicaron que alrededor del 70% de los clones analizados pertenecían a solo 5 países: Estados Unidos, China, Australia, Tailandia y Pakistán, todos ellos considerados dentro del grupo de países con mayor tasa de reportes anuales<sup>20</sup>.

Para América Latina la situación es bastante similar, y notoriamente preocupante, los hallazgos de LaBarca<sup>23</sup> dan a conocer que *A. baumannii* y *P. aeruginosa* vienen esparciéndose de forma independiente en distintos países de América Latina. Según indican, en el periodo 2002-2013 la prevalencia de cepas resistentes a carbapenems fue de 66% para *P. aeruginosa* y de hasta 90% para *A. baumannii*, y aunque la información a veces fue escasa de países de este grupo, los estudios recopilados muestran información consistente que permite afirmar su preocupante diseminación en nuestra región<sup>15</sup>.

En un estudio más reciente, García-Bentancur<sup>24</sup> y colaboradores revelaron que Argentina, Brasil, Chile, Colombia y México fueron los países con mayor número de reportes de bacterias resistentes a carbapenems, siendo *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas spp.* los patógenos de mayor mención en dichos reportes. Según indicaron, el aumento en el número de reportes de bacterias con carbapenemasas ha ido en aumento desde el año 2016, y a pesar de las limitaciones, los hallazgos son suficientes para generar gran alarma respecto a la silenciosa diseminación de genes de resistencia entre especies coexistentes en los ambientes hospitalarios. A esto se suma el aumento de reportes de coexpresión de distintas carbapenemasas en *A. baumannii*, tales como: *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, en combinación con las carbapenemasas clásicamente reportadas *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> y *bla*<sub>OXA-143</sub><sup>23,24</sup>.

El Perú no es ajeno al problema del aumento de la resistencia antimicrobiana, y en especial a la resistencia a carbapenems; en un estudio titulado "Panorama de las carbapenemasas en el Perú", se realizó la revisión sistemática de literatura local que abarcó del año 2000 al 2019, con un total de 14 estudios, dentro de los cuales el número de reportes de carbapenemasas encontradas fue de 84 en *P. aeruginosa* (79 corresponden a *bla*<sub>IMP</sub>, 4 a *bla*<sub>VIM</sub>, y 1 a *bla*<sub>GES</sub>) y de 126 en *A. baumannii* (55 corresponden a *bla*<sub>OXA-23</sub>, 66 a *bla*<sub>OXA24</sub>, 3 a *bla*<sub>NDM</sub> y 2 a *bla*<sub>OXA-143</sub>). Destacando que estos dos microorganismos reunían en conjunto más del 67% del total de reportes analizados<sup>25</sup>. Según indican los autores, la mayor parte de estos reportes provenían de la capital del país, dejando en evidencia que uno de los problemas que acompaña a la resistencia a antibióticos es la falta de información respecto a la situación de otras locaciones del país y el sesgo correspondiente debido a la poca cultura en divulgación científica. Para superar este problema se busca incrementar el número de estudios que proporcionen una visión más real del escenario que enfrenta cada país en cuanto a resistencia a antibióticos<sup>12</sup>.

## II.1.2. Bases teóricas

### Bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNF)

Son un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen como características principales la reacción negativa a tinción de Gram y que no utilizan la fermentación como vía principal para la utilización de azúcares. En su mayoría son aerobios obligados, crecen con facilidad en muchos tipos de medios de cultivo, incluso en los selectivos, este grupo enmarca a patógenos oportunistas de gran relevancia clínica como: *A. baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. aeruginosa*, entre otros<sup>21</sup>.

### *Acinetobacter baumannii*

Es un cocobacilo Gram negativo, no móvil, aerobio estricto, con reacción oxidasa negativa y catalasa positiva. Es un microorganismo ubicuo, patógeno oportunista de humanos, animales y plantas. Tolera con facilidad condiciones adversas, sobreviviendo incluso a condiciones de sequedad y de baja disponibilidad de nutrientes<sup>26,27</sup>.

En su morfología se destaca por formar colonias viscosas, convexas y con un color blanco grisáceo. Su identificación suele ser el principal problema para esta especie, siendo insuficiente las pruebas fenotípicas, en consecuencia, para referirse a *A. baumannii* es necesario la utilización de pruebas moleculares, comúnmente orientado a la búsqueda del gen intrínseco *bla<sub>OXA-51</sub>*, sin embargo, algunos autores señalan que la sola presencia de este gen no asegura su identificación pues se vienen encontrando cepas *Acinetobacter spp.* Portadoras de este gen<sup>28</sup>.

A pesar de que es posible encontrarse ambientalmente en agua y suelos, su importancia radica en la colonización de una gran variedad de superficies. Esta característica es relevante en el ambiente hospitalario, donde coloniza superficies de sus instalaciones, dispositivos médicos e infecta a pacientes

hospitalizados en estado crítico, siendo muy frecuente en unidades de cuidados intensivos y de quemados<sup>26,29</sup>.

Esta problemática se atribuye a su gran capacidad para sobrevivir y su rápida propagación en ambientes, valiéndose de mecanismos de resistencia propios y adquiridos, situándola como un gran problema del ámbito clínico. A nivel global innumerables estudios lo catalogan como uno de los microorganismos más comunes, así como de los más peligrosos en los hospitales<sup>22,23</sup>.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Es un bacilo Gram negativo de forma abastionada, posee flagelo polar, es anaerobio facultativo y tiene reacción oxidasa y catalasa positivas. Es un microorganismo ubicuo, patógeno oportunista y de gran dispersión en múltiples entornos<sup>30</sup>. Se diferencia de otras especies de *Pseudomonas* por ser capaz de crecer a 42°C<sup>31</sup>; en su morfología se aprecia la formación de colonias planas con bordes difusos, de color blanco grisáceo, azul verdoso o verde amarillento. Comúnmente está relacionado a la producción de pigmentos como: piocianina (azul-verde), pioverdina (amarillo-verde), piorrubina (rojo-marrón) y fluoresceína (amarillo)<sup>31</sup>.

Los pigmentos pioverdina y fluoresceína son fluorescentes a luz UV, para algunos autores la producción de estos pigmentos tiene una relación con su patogenicidad; pioverdina y piorrubina, del tipo fenazinas, son relacionadas a la señalización del “quorum sensing” y su implicancia en la gravedad de la fibrosis quística y heridas por quemadura, mientras que pioverdina funge como sideróforo, quelando el hierro disponible en su entorno<sup>32,33</sup>.

*P. aeruginosa* posee una elevada persistencia en ambientes hospitalarios, en gran medida esto se debe a sus múltiples factores de virulencia (intrínsecos al microorganismo y los asociados a secreciones) y su vasto repertorio de resistencia a antimicrobianos<sup>30</sup>. Lo antes mencionado la

responsabiliza de ocasionar de 10 a 15% de las infecciones bacterianas a nivel mundial, situándola como el patógeno con mayor relevancia a nivel clínico. Las infecciones más comunes causadas por este microorganismo son: infección del tracto respiratorio, infección urinaria, infección de heridas quirúrgicas, sepsis generalizada, fibrosis quística, entre los más comunes<sup>34</sup>.

### **Bacterias ESKAPE**

Son un grupo de bacterias patógenas de gran importancia clínica, debido a que “escapan” de las alternativas de tratamiento convencionales, siendo cada vez más resistentes y de mayor prioridad. A pesar que algunos autores consideren más o menos microorganismos como miembros en este grupo (Tabla 1) hay algo en lo que todos concuerdan, y es la mortalidad que acarrea su diseminación en los ambientes hospitalarios, este grupo de patógenos engloba el mayor porcentaje de infecciones reportadas a nivel mundial, siendo las más representativas *A.baumannii* y *P. aeruginosa*, debido a los múltiples factores de virulencia que estos microorganismos poseen<sup>35</sup>.

Tabla 1. Bacterias ESKAPE

|          |   |
|----------|---|
| <b>E</b> | <i>Enterococcus faecium</i> (VRE)   |
| <b>S</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)   |
| <b>K</b> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i><br>productoras de BLEE |
| <b>A</b> | <i>Acinetobacter baumannii</i>  |
| <b>P</b> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |
| <b>E</b> | <i>Enterobacter spp</i>   |

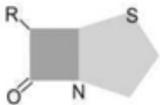
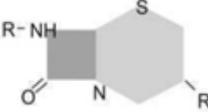
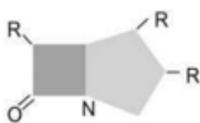
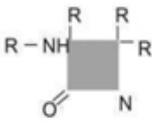
**Nota.** La tabla lista las bacterias pertenecientes al grupo ESKAPE. Traducido de Boucher H, Talbot G, Bradley J, et al.<sup>36</sup>

## **Descubrimiento del primer antimicrobiano**

Con el descubrimiento casual de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 se dio origen a uno de los hitos más importantes para los tiempos modernos, a pesar de ello, la penicilina no tuvo la importancia que se esperaría hasta cerca de dos décadas, en pleno curso de la segunda guerra mundial, donde la gran cantidad de heridos y la consecuente muerte por necrosis bacteriana obligaba a iniciar la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, en este escenario aquella sustancia olvidada pasó de ser un descubrimiento únicamente destacable para la comunidad científica a ser la responsable de la reducción la mortalidad por gangrena hasta casi 50 %, desde entonces, los antimicrobianos han contribuido al beneficio de la salud de las personas, permitiendo salvar una gran cantidad de vidas y proporcionando un mejor pronóstico para las personas que padecen infecciones bacterianas<sup>37</sup>.

## **Fármacos antimicrobianos**

Sin embargo, con el pasar de los años, el uso indiscriminado de los antimicrobianos y la elevada adaptabilidad de los microorganismos ocasionó que las infecciones fueran cada vez más complejas, en consecuencia, la mejora de los grupos antimicrobianos disponibles y el descubrimiento de nuevas moléculas con propiedades antimicrobianas se convertía en una urgencia. El grupo con mayor número de moléculas y el más utilizado en la farmacoterapia infecciosa es el de los betalactámicos (Figura 1), siendo su grupo farmacóforo el núcleo betalactámico, conformado a su vez por una estructura inmutable, el anillo betalactámico, y una estructura variable, dicha estructura dota de un espectro de acción diferente conformando un nuevo subgrupo<sup>38</sup>.

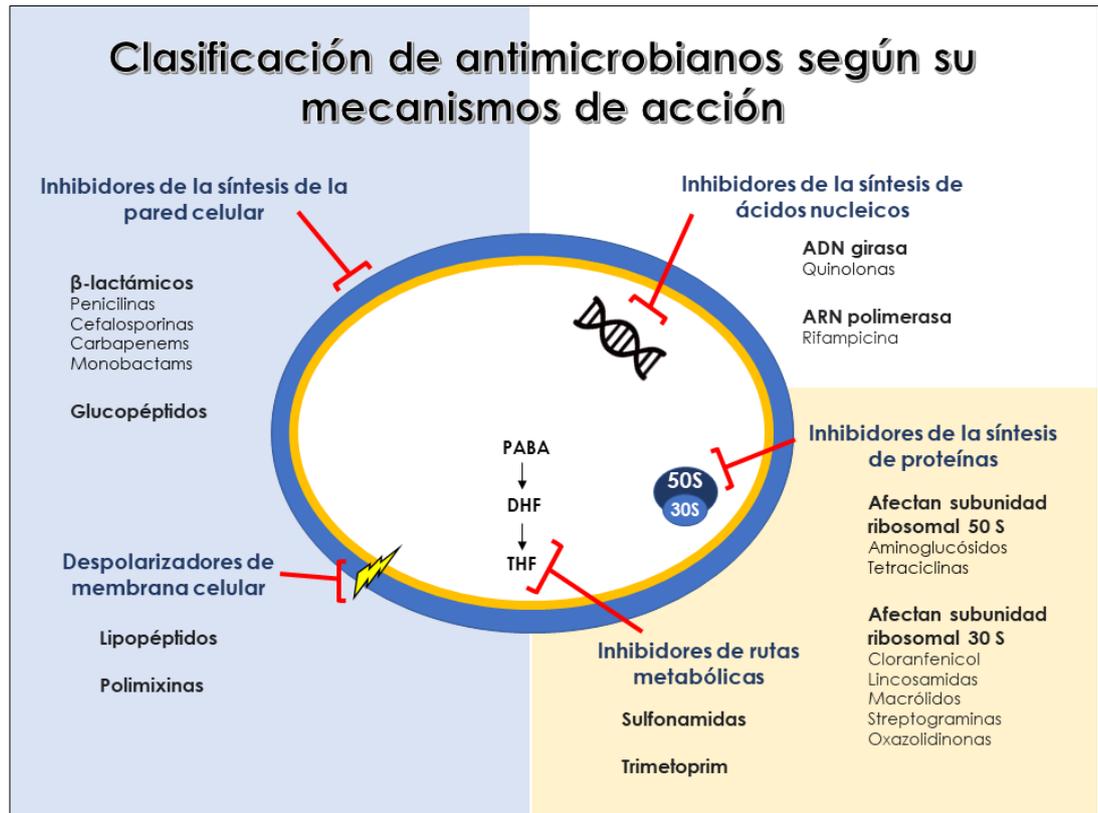
| BETALACTÁMICOS  |                         |                        |
|---|-------------------------|------------------------|
| Núcleo betalactámico = Anillo betalactámico (inmutable) + Anillo secundario* (variable) |                         |                        |
| Estructura  | Anillo secundario       | Subgrupo betalactámico |
|        | Anillo tiazolidínico    | PENICILINAS            |
|        | Anillo dihidrotiacínico | CEFALOSPORINAS         |
|        | Anillo pirrolínico      | CARBAPENEMS            |
|       | Ninguno                 | MONOBACTAMS            |

\*El subgrupo de los monobactams es el único que no posee un anillo secundario.

**Figura 1.** Grupo betalactámico y sus detalles estructurales. Figura adaptada de “Antibióticos betalactámicos” por Suárez y Gudíol<sup>38</sup>.

## Mecanismos de acción de los antimicrobianos

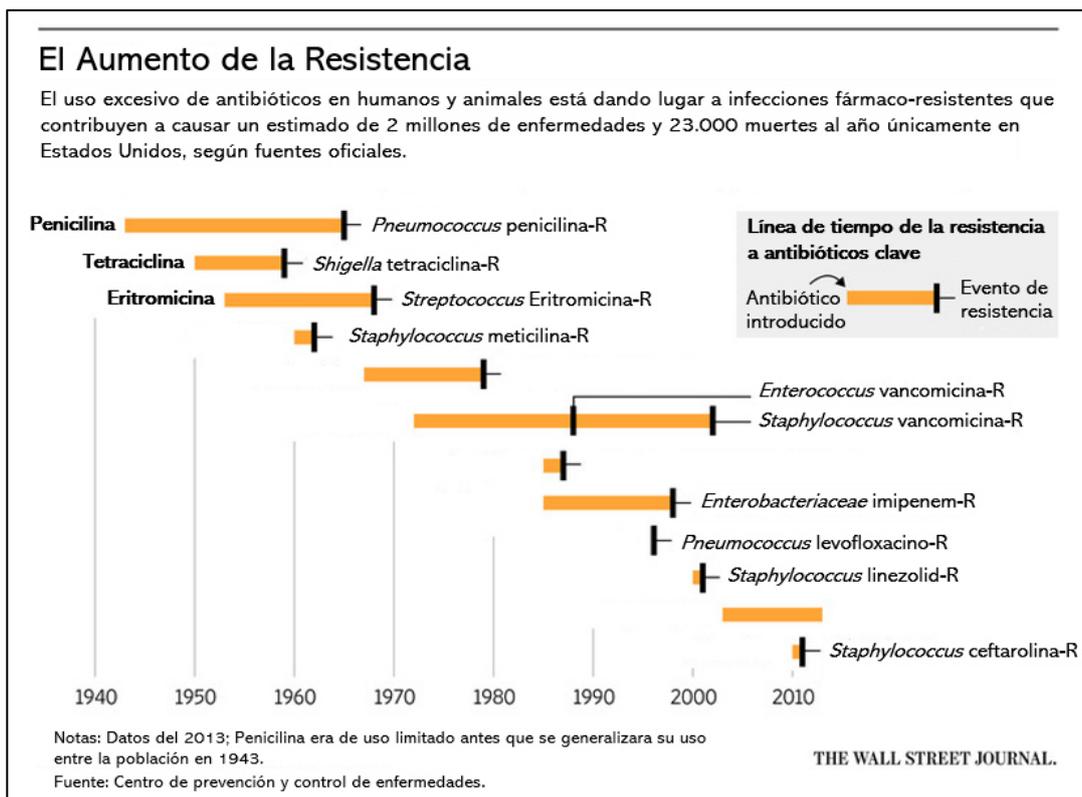
Los mecanismos de acción de los antimicrobianos son diversos, desde los inespecíficos que provocan la lisis de la bacteria hasta los que se dirigen a objetivos clave, vitales para la supervivencia de la bacteria<sup>17</sup>. A su vez estos mecanismos permiten clasificar a los antimicrobianos de una mejor manera, según se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Clasificación de los antimicrobianos según su mecanismo de acción. Figurada modificada de SpotlightMed adaptando la información de “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria” por Reygaert W<sup>17</sup>.

### Resistencia a antimicrobianos

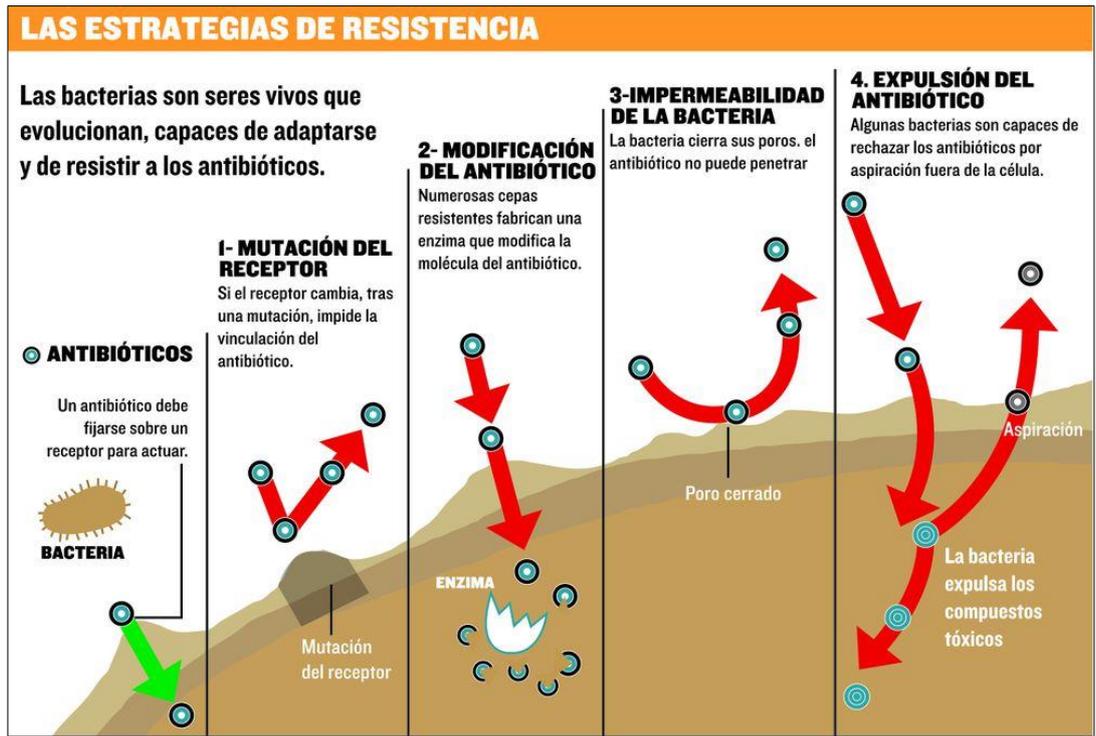
La resistencia a los antimicrobianos es el resultado de un proceso completamente natural, todo organismo vivo hace frente a una condición adversa, en el caso de las bacterias durante los millones de años en su proceso fueron forzadas al desarrollo de mecanismos de resistencia ante un gran número de sustancias nocivas, de esta manera asegurando su permanencia en sus respectivos nichos ecológicos, la Figura 3 muestra una línea de tiempo del aumento de la resistencia a antimicrobianos<sup>35</sup>.



**Figura 3.** Línea de tiempo de la resistencia a antibióticos. Traducido de “The Rise of antibiotic resistance” por The Wall Street Journal<sup>39</sup>.

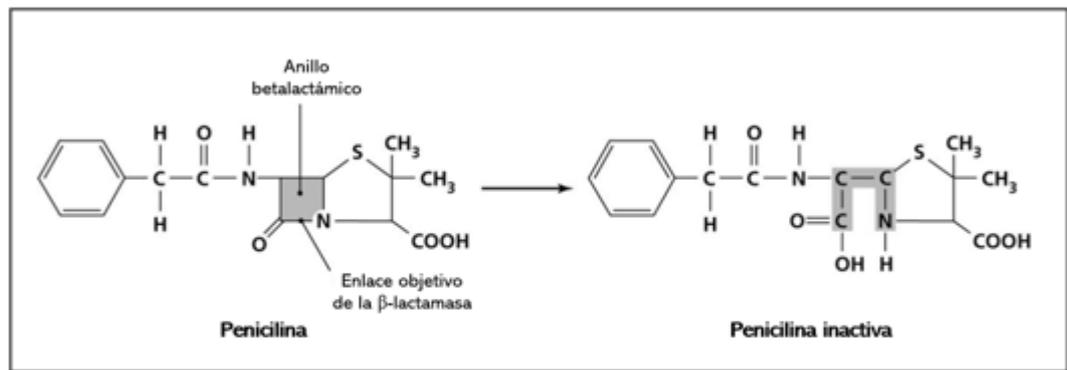
La resistencia a los antimicrobianos se divide por lo general en dos: natural y adquirida. La natural, cuando la resistencia es propia de toda la especie, puede deberse a una resistencia intrínseca, por genes de resistencia o cambios en el estado fisiológico de la bacteria, mientras que la adquirida, se debe principalmente a mutaciones puntuales en genes cromosomales o a la adquisición de elementos móviles como los plásmidos<sup>40</sup>.

Los mecanismos de resistencia son vastos en número, pudiendo agruparse según como la bacteria interactúa con un agente antimicrobiano ya sea por: mutación del receptor diana, modificación del antimicrobiano, alteración de la permeabilidad de la membrana celular o la expulsión activa por bombas de eflujo (Figura 4). El uso de uno o varios mecanismos está determinado por: la bacteria, del repertorio de mecanismos que posea y de las características fisicoquímicas del agente antimicrobiano al cual se enfrenta<sup>9</sup>.



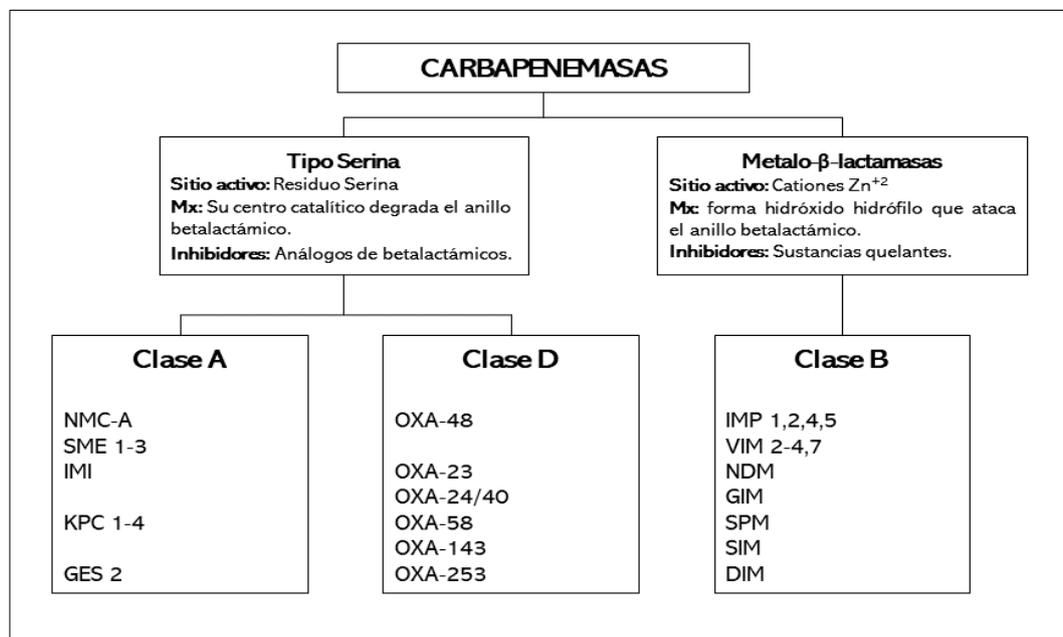
**Figura 4.** Mecanismos de resistencia de las bacterias frente a agentes antimicrobianos. Figura elaborada por diario La Prensa a partir de la información provista por la OMS/OPS<sup>41</sup>.

El mecanismo de resistencia con más relevancia clínica hoy en día es el de la inactivación de antimicrobianos por acción enzimática, pues al afectar su estructura impide que el número de moléculas activas disponibles alcance la concentración necesaria para alcanzar su objetivo terapéutico. Dentro de este grupo se encuentran las betalactamasas, enzimas que poseen la capacidad de inactivar fármacos betalactámicos por la degradación del anillo betalactámico (Figura 5). Según la clasificación de Ambler, estas se dividen en cuatro clases de la A a la D, las de clase A, engloba las betalactamasas de espectro amplio y las de espectro extendido, las de clase B, a las metalobetalactamasas, las de clase C, a las del tipo AmpC y la clase D, las del tipo OXA<sup>38</sup>.



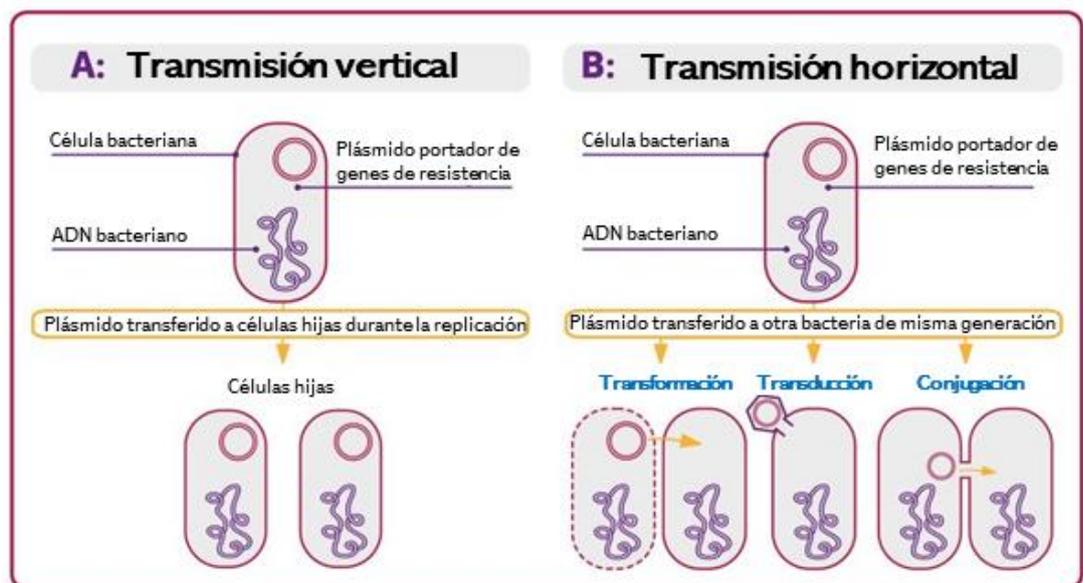
**Figura 5.** Mecanismo de acción de las betalactamasas. Figura traducida de “Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un hospital de tercer nivel en nuevo león” por Bocanegra, P.<sup>42</sup>

Las carbapenemasas son aquellas enzimas dentro del grupo de las betalactamasas que como su nombre lo indica, son específicas para los betalactámicos del subgrupo carbapenems. Según la estructura de su sitio activo estas se dividen en dos, las del tipo Serina, que poseen un aminoácido serina en su centro catalítico, y las del tipo metalobetalactamasas, con cationes divalentes de zinc a manera de cofactor, los cuales promueven la formación de un hidróxido nucleofílico que ataca el anillo betalactámico (Figura 6)<sup>18,19</sup>.



**Figura 6.** Clasificación de las carbapenemasas según la estructura de su sitio activo. Figura modificada de “Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas” por Tafur J & Torres J.<sup>43</sup>, con aportes de “Carbapenemasas. Growing and Handling of Bacterial Cultures” por Bedenic B & Sardelic S<sup>44</sup>.

La preocupación por este grupo de enzimas se debe a la capacidad de las bacterias de propagar los genes de resistencia que las codifican. Estos se transmiten de bacteria a bacteria por dos vías principales: transmisión vertical y transmisión horizontal. En la primera, los genes cromosomales o plasmídicos se transmiten de una célula madre a las células hijas, mientras que la segunda se subdivide en tres vías: 1) transformación, donde una bacteria sensible capta los genes de resistencia a partir de su entorno, 2) la transducción, donde se utiliza un bacteriófago que transporte la resistencia a una bacteria sensible, y 3) la conjugación, donde una bacteria sensible recibe la resistencia a partir de una bacteria resistente mediado por pili sexual, según se ilustra en la Figura 7<sup>45</sup>.



**Figura 7.** Mecanismos de transmisión de genes de resistencia por las bacterias. Figura traducida de “State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance” por Sansaverino I., et al<sup>45</sup>.

### II.1.3. Glosario de términos

#### ***Patógenos de prioridad crítica***<sup>10</sup>

Grupo de bacterias multirresistentes que posee especial interés por la OMS debido a lo peligroso que resulta su presencia en hospitales, asilos y en ambientes donde se encuentren pacientes inmunosuprimidos. Las infecciones por parte de este grupo de bacterias comprometen gravemente la salud y el pronóstico de vida del paciente.

#### ***Antimicrobianos***<sup>46</sup>

Sustancias de origen biológico o sintético con capacidad de eliminar microorganismos, ya sea por inhibición de su desarrollo o por la inducción a su muerte.

#### ***Microorganismo ubicuo***<sup>18</sup>

Microorganismo cuya presencia se cataloga como de amplia distribución, es decir que está en todas partes.

#### ***Quorum sensing***<sup>17,48</sup>

Es el resultado de la interacción de una comunidad bacteriana, es considerado un mecanismo mediante el cual un grupo de bacterias obtiene la capacidad de reconocer su presencia en un ambiente. Ante determinado estímulo este grupo actúa como un conjunto desarrollando una respuesta prácticamente simultánea, como si se tratase de un solo organismo, dicha respuesta posee características distintas a lo que se obtendría a partir de una bacteria sola

**Sideróforo**<sup>47</sup>

Molécula capaz de captar hierro, facilita el transporte de este en los microorganismos. Es específico de cada microorganismo, se le atribuye un efecto antibiótico por dicho motivo.

**Virulencia**<sup>47</sup>

Expresión de la patogenicidad de un microorganismo, refiere a la capacidad de un microorganismo de ocasionar enfermedad.

**Betalactamasas**<sup>38</sup>

Enzimas producidas por las bacterias para inactivar a los antibióticos betalactámicos, por ruptura del anillo betalactámico mediado por un proceso de hidrólisis, cuando se trata de un carbapenems estas enzimas reciben el nombre de carbapenemasas.

**Metalobetalactamasas**<sup>38</sup>

Enzimas dentro del grupo de las carbapenemasas que poseen en su sitio catalítico un átomo metálico divalente, por lo general zinc, que funciona como cofactor.

**Cofactor**<sup>17,47</sup>

Componente no proteico necesario para catalizar una reacción enzimática, se dividen en inorgánicos e inorgánicos, en el primero se ubican los iones metálicos y el segundo se subdivide en coenzimas y grupos prostéticos.

### **III. HIPÓTESIS Y VARIABLES**

#### **III.1. Hipótesis**

Las cepas de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora poseen uno o más genes codificantes de carbapenemasas.

#### **III.2. Variables**

- Variable dependiente: Característica molecular
- Variables independientes: Cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora

#### **III.3. Operacionalización de variables**

Ver Anexo 1

### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **IV.1. Área de estudio**

Las muestras fueron procedentes del Hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores (12°09'40"S 76°57'23"O).

#### **IV.2. Diseño de investigación**

Estudio del tipo observacional, prospectivo y transversal.

#### **IV.3. Microorganismos de estudio**

Cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* resistentes a carbapenems aisladas en el hospital de categoría III-1 "Hospital María Auxiliadora" en el periodo enero - febrero 2021.

#### **IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información**

##### **Consideraciones éticas**

El presente trabajo forma parte de un proyecto general, el cual ha sido evaluado por el comité de investigación de ética del Hospital María Auxiliadora y el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur (Ver Anexo 2).

De forma general se contempla la utilización de muestras clínicas, las cuales al ser muestras utilizadas en diagnóstico, califica según las buenas prácticas de investigación como riesgo mínimo, de este modo, la información clínica relevante para el estudio fue levantada de manera anónima, salvaguardando los principios de confidencialidad.

##### **Identificación y conservación de los microorganismos**

Las cepas fueron identificadas como *P. aeruginosa* o *A. baumannii* mediante el sistema automatizado de identificación bacteriana VITEK 2, luego fueron conservadas en crioviales conteniendo leche descremada y para luego ser almacenadas a -80°C hasta su utilización

##### **Prueba de sensibilidad antimicrobiana**

La sensibilidad antimicrobiana se determinó mediante el sistema automatizado VITEK 2, siguiendo las directrices del "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2021"<sup>49</sup> para la interpretación de los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se determinó la sensibilidad a 12 antibióticos: imipenem, meropenem ciprofloxacino, gentamicina, amikacina, ampicilina/sulbactam, tigeciclina, cefepime, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, cotrimoxazol y colistina, según era aplicable para cada microorganismo.

**Tabla 2.** Puntos de corte de los antibióticos evaluados en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

| Microorganismo                 | Antibióticos evaluados y punto de corte resistencia ( $\mu\text{g/mL}$ ) |           |                         |              |
|--------------------------------|--|-----------|-------------------------|--------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Imipenem   | $\geq 8$  | Cefepime                | $\geq 32$    |
|                                | Meropenem  | $\geq 8$  | Ceftazidima             | $\geq 32$    |
|                                | Ciprofloxacino   | $\geq 4$  | Ampicilina/sulbactam    | $\geq 32/16$ |
|                                | Gentamicina  | $\geq 16$ | piperacilina/tazobactam | $\geq 128/4$ |
|                                | Amikacina  | $\geq 64$ | cotrimoxazol            | $\geq 76/4$  |
|                                | Tigeciclina*   | $\geq 8$  | Colistina               | $\geq 4$     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Imipenem   | $\geq 8$  | Cefepime                | $\geq 32$    |
|                                | Meropenem  | $\geq 8$  | Ceftazidima             | $\geq 32$    |
|                                | Ciprofloxacino   | $\geq 2$  | Piperacilina/tazobactam | $\geq 128/4$ |
|                                | Gentamicina  | $\geq 16$ | Colistina               | $\geq 4$     |
|                                | Amikacina  | $\geq 64$ |                         |              |

\*Valor de CMI con evidencia insuficiente, valor propuesto.

### Extracción de ADN bacteriano

El ADN bacteriano se extrajo a través del método de shock térmico descrito por Holmes y Quigley<sup>50</sup>. A partir de aislados puros se suspendió 3-4 colonias en 800  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas en tubos de 1.5 mL, posteriormente se sometió a calentamiento a 100°C por 10 minutos, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente para finalmente centrifugarse a 13 000 RPM por 10 minutos. El ADN bacteriano obtenido fue almacenado a -20°C para los pasos posteriores<sup>50</sup>.

### PCR para genes de resistencia

Para amplificar los genes de resistencia se utilizó la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>51</sup>.

Se amplificaron las carbapenemasas de tipo Serina: las de Clase A (GES, KPC, IMI) y las de Clase D (similares a OXA-23, OXA-24, OXA-48, y OXA-58), así como las metalo- $\beta$ -lactamasas (IMP, VIM y NDM). Adicionalmente, también se detectó por PCR la presencia del gen *bla*<sub>PER</sub>, codificante para una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido.

Se preparó la mezcla de reactivos para la PCR siguiendo las indicaciones del fabricante del kit “Horse-Power™ Taq DNA Polymerase” (Ver anexo 3), adicionándose 1,0 uL de la muestra de ADN, para luego colocarse en un termociclador que llevó a cabo el proceso de la PCR. Los cebadores y las condiciones de cada uno de los genes se detallan en la **tabla 3**.

Para la visualización de los amplicones obtenidos, se tomó 15 µL a partir de los productos de la PCR obtenidos y se cargó en un gel de agarosa al 1,5 % teñido con “Safeview™ Classic DNA” siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante (Ver Anexo 4). El gel se corrió en una cubeta de electroforesis a 100 V por 45 minutos y, posteriormente, se hizo lectura de las bandas resultantes en un captador de imágenes (Major Science, Smartview Pro-1100, Estados Unidos).

Los resultados fueron establecidos como como positivo o negativo según el tamaño de las bandas obtenidas (en pb) y la comparación con los respectivos controles para cada gen de interés, las escaleras de ADN utilizadas fueron de 100 pb, según se detalla en los Anexos 5 y 6.

**Tabla 3.** Genes de resistencia a carbapenems evaluados en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

| gen                           | Cebadores | Secuencia (5' →3')            | Amplicón (pb) | Condiciones PCR   | Referencia  |   |   |   |   |    |
|-------------------------------|-----------|-------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|----|
| <i>bla</i> <sub>OXA-23G</sub> | OXA23 - F | CCC CGA GTC AGA TTG TTC AAG G | 330           | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ | 52  |   |   |   |   |    |
|                               | OXA23 - R | TAC GTC GCG CAA GTT CCT GA    |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>OXA-24G</sub> | OXA24 - F | GCA GAA AGA AGT AAA RCG GGT   | 271           |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ | 52  |   |   |   |    |
|                               | OXA24 - R | CCA ACC WGT CAA CCA ACC TA    |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>OXA-48G</sub> | OXA48 - F | ATG CGT GTA TTA GCC TTA TCG   | 265           |   |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ | 52  |   |   |    |
|                               | OXA48 - R | CAT CCT TAA CCA CGC CCA AAT C |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>OXA-58G</sub> | OXA58 - F | GGG GCT TGT GCT GAG CAT AGT   | 668           |   |   |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ | 52  |   |    |
|                               | OXA58 - R | CCA CTT GCC CAT CTG CCT TT    |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>VIM</sub>     | VIM - F   | TGT CCG TGA TGG TGA TGA GT    | 437           |   |   |   |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ | 52  |    |
|                               | VIM - R   | ATT CAG CCA GAT CGG CAT C     |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>GES</sub>     | GES - F   | CTG GCA GGG ATC GCT CAC TC    | 600           |   |   |   |   |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ | 52 |
|                               | GES - R   | TTC CGA TCA GCC ACC TCT CA    |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>IMI</sub>     | IMI - F   | CTA CGC TTT AGA CAC TGG C     | 482           | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ |   |   |   |   |   | 53 |
|                               | IMI - R   | AGG TTT CCT TTT CAC GCT CA    |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>IMP</sub>     | IMP - F   | ACA YGG YTT RGT DGT KCT TG    | 387           |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ |   |   |   |   | 52 |
|                               | IMP - R   | GGT TTA AYA AAR CAA CCA CC    |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>PER</sub>     | PER - F   | AGT GTG GGG GCC TGA CGA T     | 725           |   |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ |   |   |   | 52 |
|                               | PER - G   | GCA ACC TGC GCA ATR ATA GCT T |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>NDM</sub>     | NDM - F   | ACT TGG CCT TGC TGT CCT T     | 603           |   |   |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ |   |   | 52 |
|                               | NDM - R   | CAT TAG CCG CTG CAT TGA T     |               |   |   |   |   |   |   |    |
| <i>bla</i> <sub>KPC</sub>     | KPC - F   | GTA TCG CCG TCT AGT TCT GC    | 636           |   |   |   |   | 94°C, 5 min<br>94°C, 30 seg<br>57°C, 1:30 min<br>72°C, 1:30 min<br>(30 Ciclos)<br>12°C, ∞ |   | 54 |
|                               | KPC - R   | GGT CGT GTT TCC CTT TAG CC    |               |   |   |   |   |   |   |    |

**Nota.** Las PCR fueron ejecutadas de forma individual para facilitar la interpretación de los resultados.

#### **IV.5. Análisis estadístico**

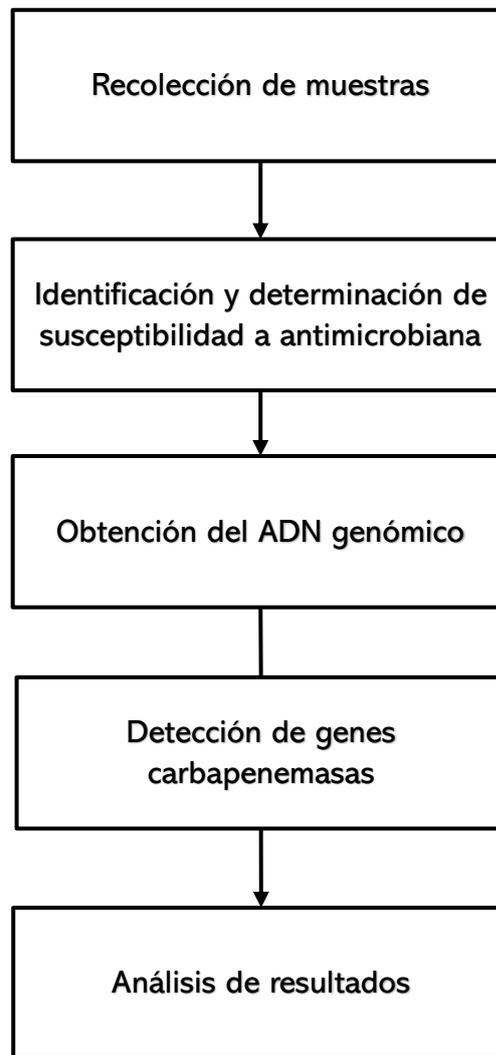
Se realizó un análisis descriptivo de las variables del estudio. Las variables cuantitativas se presentan según su media y desviación, y mientras que las cualitativas según su frecuencia absoluta y relativa. Se utilizó el programa Microsoft Excel 2021 para obtener las frecuencias, promedios y desviación estándar correspondientes. Se elaboró una tabla con los niveles de resistencia a cada antimicrobiano y los genes correspondientes detectados<sup>55</sup>.

## V. RESULTADOS

### V.1. Presentación y análisis de los resultados

#### V.1.1. Diagrama de flujo

Se presenta el diagrama de flujo empleado en el presente trabajo, resumiendo los apartados cruciales de la metodología aplicada, según se muestra en la Figura 8.



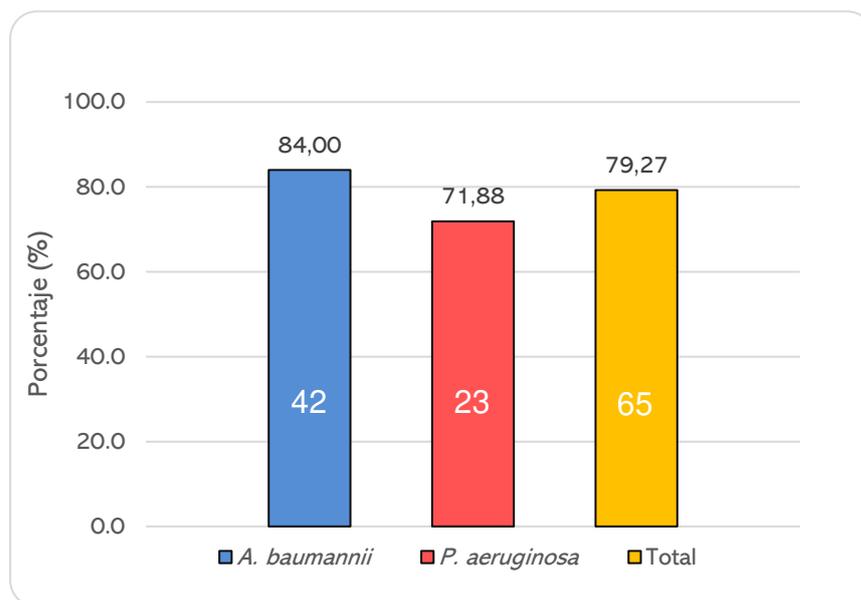
**Figura 8.** Diagrama de flujo del procesamiento de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

### V.1.2.Descripción de las muestras

Los aislados clínicos se obtuvieron de pacientes del Hospital María Auxiliadora. Estos fueron recolectados en el periodo enero a febrero 2021. Conformando un total de 82 cepas entre *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, estando distribuidas según la **tabla 4** y **Figura 9**. Las cepas resistentes a carbapenems fueron incluidas en los pasos posteriores, como resultado 85,96% (42 aislados) de las *A. baumannii* y 76,92% (23 aislados) de las *P. aeruginosa* tenían el fenotípico carbapenem-R, conformando un total de 65 aislados clínicos incluidos en este estudio.

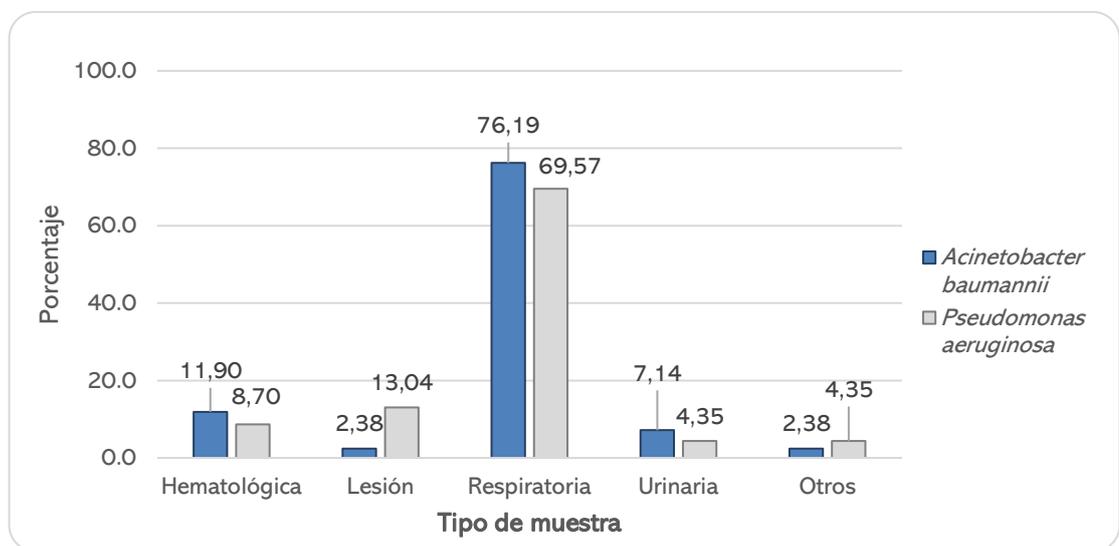
**Tabla 4.** Distribución de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

| Aislados clínicos    | Recolectados (n) | Incluidos (n) | carbapenem-R (%) |
|----------------------|------------------|---------------|------------------|
| <i>A. baumannii</i>  | 50               | 42            | 84,00            |
| <i>P. aeruginosa</i> | 32               | 23            | 71,88            |
| <b>TOTAL</b>         | <b>82</b>        | <b>65</b>     | <b>79,27</b>     |



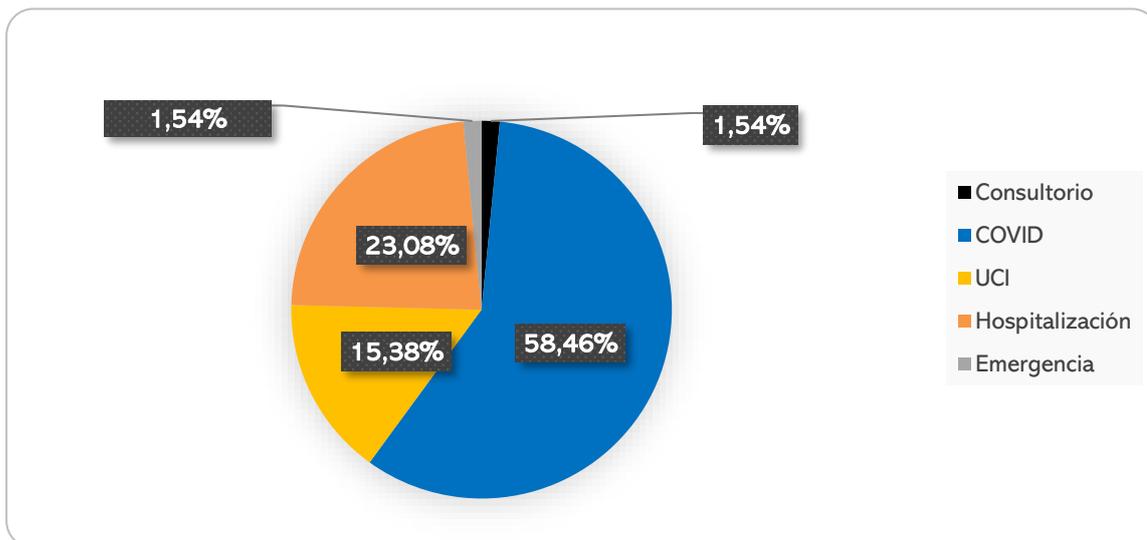
**Figura 9.** Porcentaje de resistencia a carbapenems de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

De los 65 aislados incluidos, el mayor porcentaje de estos eran a partir de muestras del tipo respiratorio, con valores de 76,19% y 69,57% para *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, respectivamente, siendo en su mayoría muestras de secreciones traqueales y bronquiales. Además, el tipo de muestra más relevante para *A. baumannii* después de las respiratorias fueron las del tipo hematológico con 11,90% mientras que para *P. aeruginosa* fueron las obtenidas a partir de lesiones con un 13,04%, el detalle completo se muestra en la **figura 10**.



**Figura 10.** Distribución por tipo de muestra de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aisladas del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021.

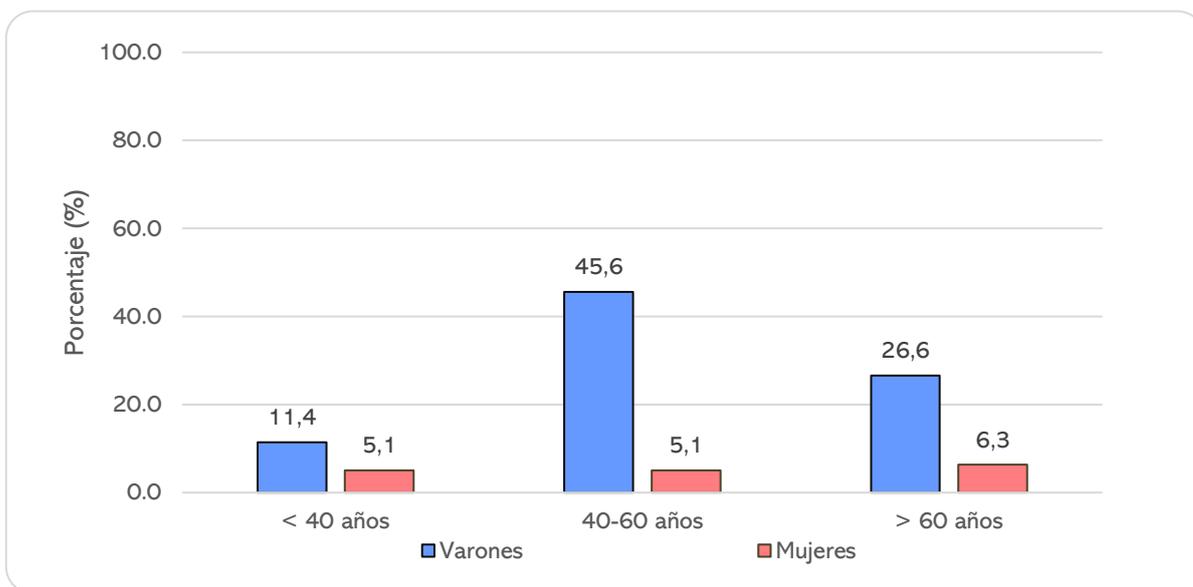
Considerando el total de los aislados incluidos, se obtuvo que por amplia mayoría estos procedían del área COVID del Hospital María Auxiliadora (58,46%), seguido por el área de Hospitalización (23,08%) y por último la Unidad de Cuidados Intensivos (15,38%) (Ver **figura 11**).



**Figura 11.** Procedencia de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

En adición, la mayor parte de estos aislados fueron obtenidos a partir de pacientes varones, representando el 81,54%. Los varones y mujeres se distribuyeron según el siguiente criterio mostrado en la **figura 12**:

- **A:** Menores de 40 años
- **B:** Entre 40-60 años
- **C:** Mayores a 60 años



**Figura 12.** Distribución según sexo y rango etario de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

### V.1.3. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

Para la prueba de sensibilidad se determinó la resistencia a 10 antibióticos para el caso de *A. baumannii* y 7 antibióticos para *P. aeruginosa*, según se detalla en la **Tabla 2**, utilizando los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresada en µg/mL siguiendo las indicaciones del CLSI 2021.

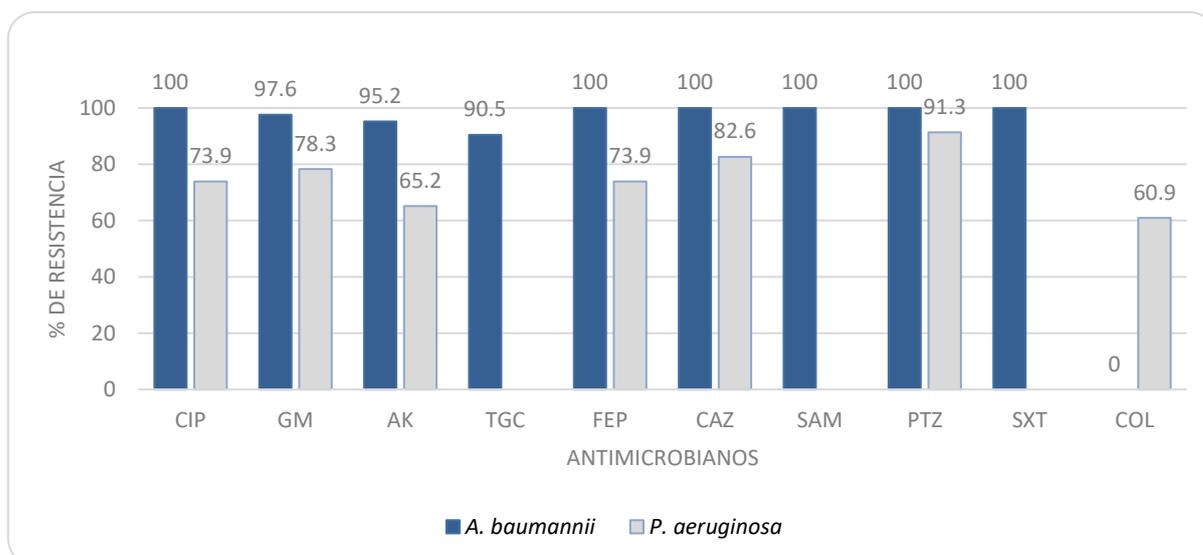
Se determinó que todas las cepas de *A. baumannii* eran resistentes a ciprofloxacino, cefepime, ceftazidima, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y cotrimoxazol, más del 90% lo eran a gentamicina, amikacina y tigeciclina, la excepción fue colistina, donde todas las cepas fueron sensibles. Con *P. aeruginosa*, todas las cepas fueron resistentes a tigeciclina, más del 80% a ceftazidima y piperacilina/tazobactam, más del 70% a ciprofloxacino, cefepime y gentamicina, 65,2 % lo fueron a amikacina, mientras que colistina tuvo 60,9% de aislados categorizados como Intermedios con una CMI  $\geq 2$  µg/mL, el detalle de los porcentajes es apreciable en la **Tabla 5**, y su comparación gráfica en la **Figura 13**.

**Tabla 5.** Niveles de resistencia a antimicrobianos de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

| Microorganismo                 | CIP   | GM   | AK   | TGC  | FEP   | CAZ   | SAM   | PTZ   | SXT   | COL* |
|--------------------------------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| <i>A. baumannii</i><br>(n=49)  | 100,0 | 97,6 | 95,2 | 90,5 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0,0  |
| <i>P. aeruginosa</i><br>(n=30) | 73,9  | 78,3 | 65,2 | NA   | 73,9  | 82,6  | NA    | 91,3  | NA    | 60,9 |

**CIP:** ciprofloxacino; **GM:** gentamicina; **AK:** amikacina; **TGC:** tigeciclina; **FEP:** cefepime; **CAZ:** ceftazidima; **SAM:** ampicilina/sulbactam; **PTZ:** piperacilina/tazobactam; **SXT:** cotrimoxazol; **COL\*:** Colistina, CMI  $\geq 2$  µg/mL.

Nota. Los valores mostrados son expresados en porcentaje. Además, las cepas de resistencia intermedia fueron incluidas en los valores mostrados



**Figura 13.** Niveles de resistencia a antimicrobianos de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

#### V.1.4. Detección molecular de genes de resistencia

La detección de genes codificantes de carbapenemasas (*bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-23G</sub>, *bla*<sub>OXA-24G</sub>, *bla*<sub>OXA-48G</sub>, *bla*<sub>OXA-58G</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, y *bla*<sub>IMP</sub>) así como *bla*<sub>PER</sub>) de las 42 cepas de *A. baumannii* y 23 cepas de *P. aeruginosa* se realizó mediante PCR simple.

El ensayo reveló que todas las cepas de *A. baumannii* y 15/23 (65.2%) de las de *P. aeruginosa* portaban genes de resistencia a carbapenems. El genotipo dominante en *A. baumannii* fue el genotipo 1, *bla*<sub>OXA24G</sub> con 36/42 (85.7%) de las cepas, por otro lado, para *P. aeruginosa* existían dos fenotipos dominantes, el genotipo 1, *bla*<sub>IMP</sub> y el genotipo 2, *bla*<sub>IMP</sub>/*bla*<sub>VIM</sub> ambos con 6/23 (26,1%) de las cepas. (Ver **tabla 6**)

**Tabla 6.** Agrupación por genotipos de los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

| <i>A. baumannii</i><br>n=42        |   |   |
|------------------------------------|---|---|
| <b>Genotipo 1</b><br>1 gen         | <i>bla</i> <sub>OXA23G</sub>  | <i>bla</i> <sub>OXA24G</sub>                  |
|                                    | 7,1% (3)  | 85,7% (36)                                    |
| <b>Genotipo 2</b><br>2 genes       | <i>bla</i> <sub>OXA23G/ bla</sub> <sub>OXA24G</sub>   |   |
|                                    | 4,8% (2)  |   |
| <b>Genotipo 3</b><br>3 o más genes | <i>bla</i> <sub>OXA23G/ bla</sub> <sub>OXA24G/ bla</sub> <sub>VIM/ bla</sub> <sub>NDM/ bla</sub> <sub>PER</sub> |   |
|                                    | 2,4% (1)  |   |
| <i>P. aeruginosa</i><br>n=23       |   |   |
| <b>Genotipo 1</b><br>1 gen         | <i>bla</i> <sub>OXA24G</sub>  | <i>bla</i> <sub>IMP</sub>                     |
|                                    | 8,7% (2)  | 26,1% (6)                                     |
| <b>Genotipo 2</b><br>2 genes       | <i>bla</i> <sub>OXA24G/ bla</sub> <sub>IMP</sub>  | <i>bla</i> <sub>IMP/ bla</sub> <sub>VIM</sub> |
|                                    | 4,3% (1)  | 26,1% (6)                                     |
| <b>Ningún gen</b>                  | Negativo para todos los genes evaluados   |   |
|                                    | 34,8% (8)   |   |

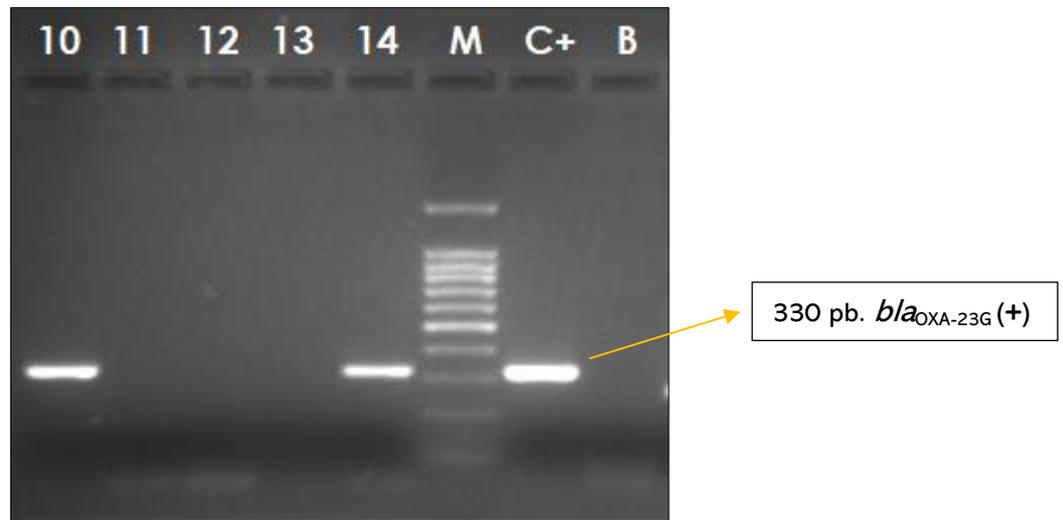
**Nota.** Los fenotipos son una propuesta para la organización de la información presentada.

Los genes con mayor prevalencia en el grupo de cepas analizadas fueron *bla*<sub>OXA-24G</sub> en *A. baumannii* con 39/42 (92.86%) y *bla*<sub>IMP</sub> en *P. aeruginosa* con 13/23 (56.52%), detalle según la **tabla 7**. No se encontraron cepas portadoras de los genes *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, ni *bla*<sub>IMI</sub>.

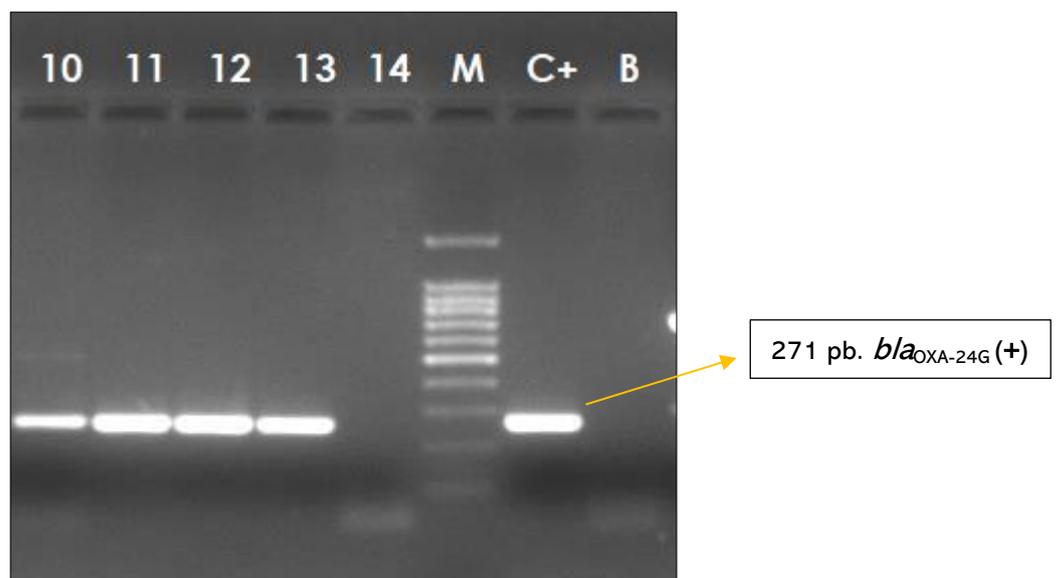
**Tabla 7.** Prevalencia de genes de resistencia identificados en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021

| Microorganismo                 | <i>bla</i> <sub>OXA-23G</sub> | <i>bla</i> <sub>OXA-24G</sub> | <i>bla</i> <sub>IMP</sub> | <i>bla</i> <sub>VIM</sub> | <i>bla</i> <sub>PER</sub> | <i>bla</i> <sub>NDM</sub> |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>A. baumannii</i><br>(n=42)  | 6 (14,29%)                    | 39 (92,86%)                   | 0 (0,0%)                  | 1 (2,38%)                 | 1 (2,38%)                 | 1 (2,38%)                 |
| <i>P. aeruginosa</i><br>(n=23) | 0 (0,0%)                      | 3 (13,04%)                    | 13 (56,52%)               | 6 (26,09%)                | 0 (0,0%)                  | 0 (0,0%)                  |

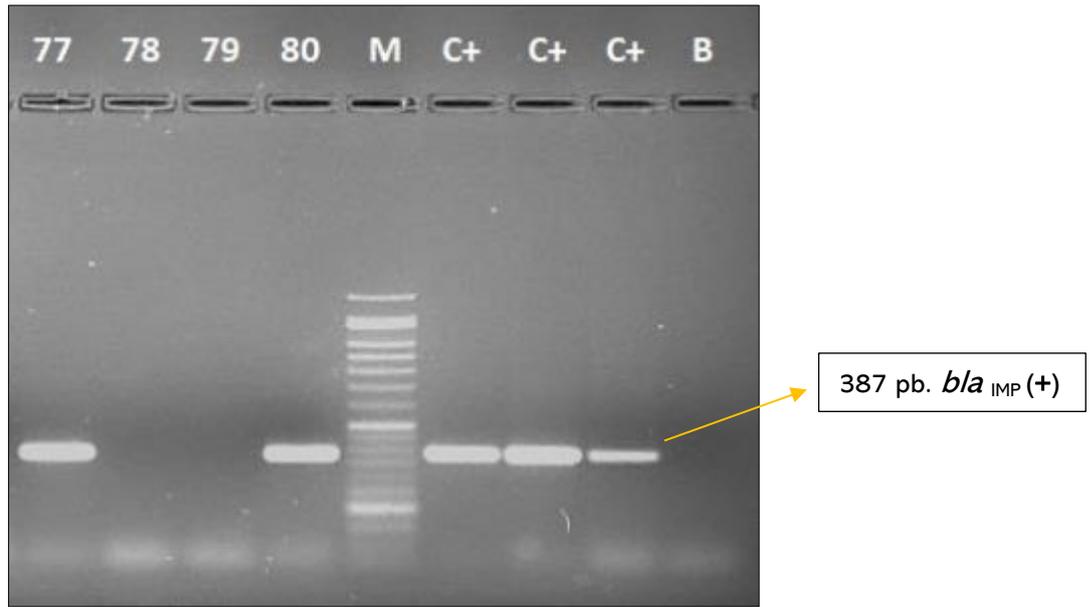
Los genes identificados *bla*<sub>OXA-23G</sub>, *bla*<sub>OXA-24G</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, y *bla*<sub>PER</sub>, se muestran en las **figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19**, según corresponda.



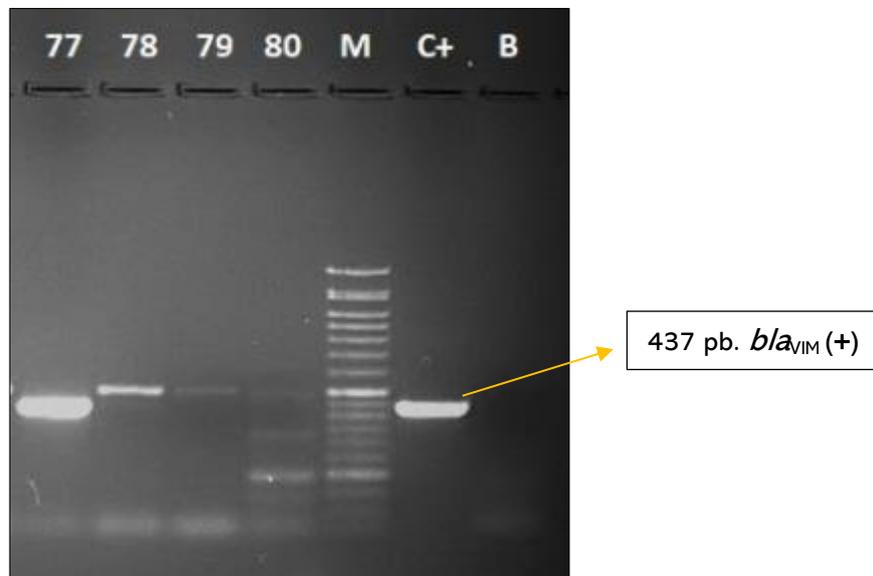
**Figura 14.** Visualización UV del gen *bla*<sub>OXA-23</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021. Muestras 10 y 14: positivo (330 pb); Muestras: 11, 12 y 13: negativo. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Canvax), C+: Control positivo, B: Blanco de muestra.



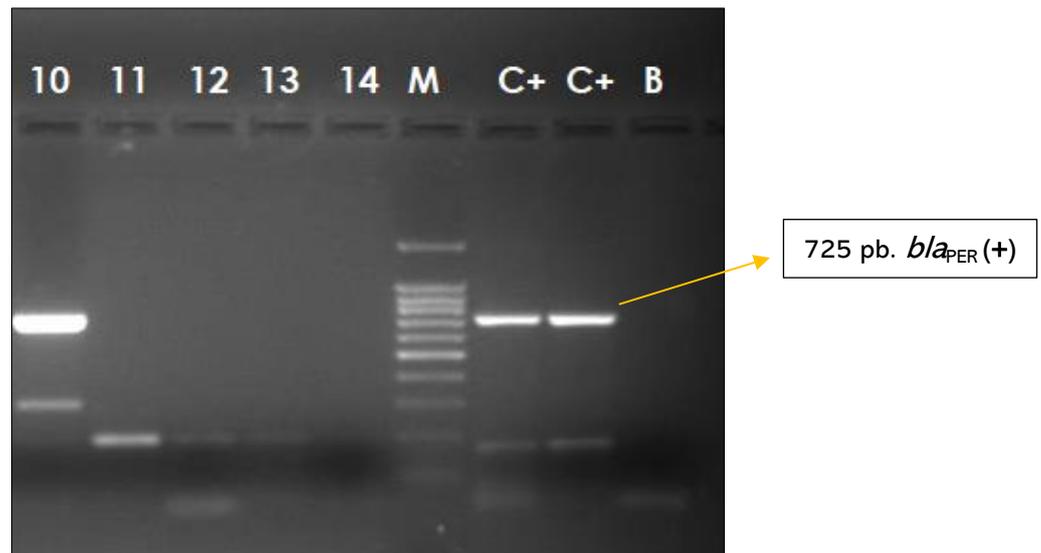
**Figura 15.** Visualización UV del gen *bla*<sub>OXA-24</sub> identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021. Muestras 10, 11, 12 y 13: positivo (271 pb); Muestra: 14: negativo. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Canvax), C+: Control positivo, B: Blanco de muestra.



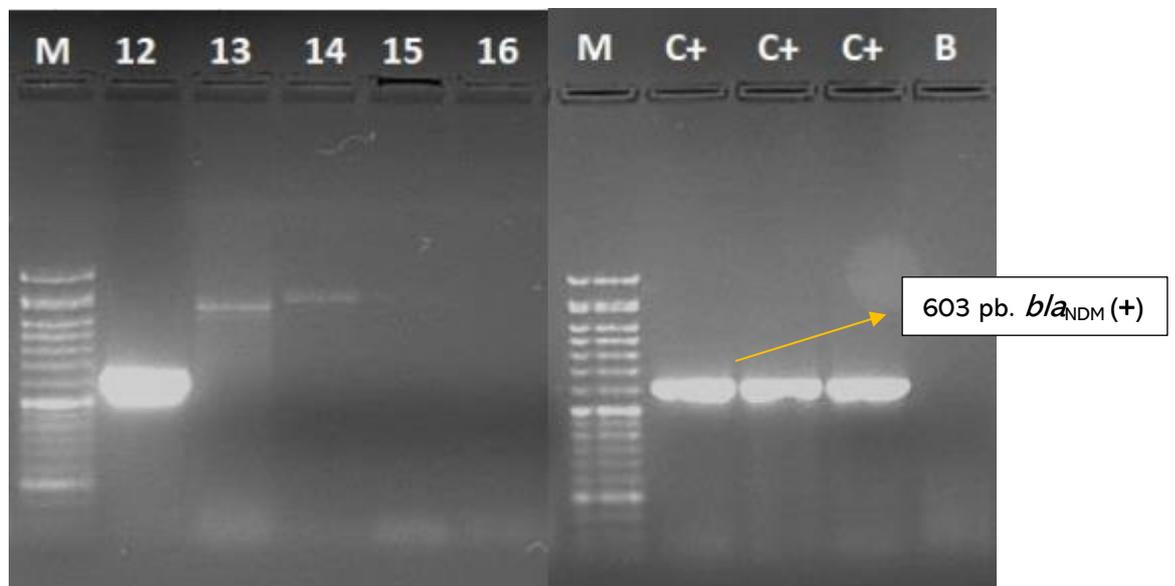
**Figura 16.** Visualización UV del gen *bla<sub>IMP</sub>* identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021. Muestras 77 y 80: positivo (387 pb); Muestras: 78 y 79: negativo. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (ABM), C+: Control positivo, B: Blanco de muestra.



**Figura 17.** Visualización UV del gen *bla<sub>VIM</sub>* identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021. Muestra 77: positivo (437 pb); Muestras: 78, 79 y 80: negativo. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (ABM), C+: Control positivo, B: Blanco de muestra.



**Figura 18.** Visualización UV del gen *bla<sub>PER</sub>* identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021. Muestra 10: positivo (725 pb); Muestras: 11, 12, 13 y 14: negativo. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Canvax), C+: Control positivo, B: Blanco de muestra.



**Figura 19.** Visualización UV del gen *bla<sub>NDM</sub>* identificado en los aislados clínicos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aislados del hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores, 2021. Muestra 12: positivo (603 pb); Muestras: 13, 14, 15 y 16: negativo. M: Marcador de peso molecular de 100 pb (Canvax), C+: Control positivo, B: Blanco de muestra.

## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró detectar la presencia de genes codificantes de carbapenemasas en cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems, aisladas del Hospital María Auxiliadora. Es importante destacar que en 92,86% de los *A. baumannii* se detectó *bla*<sub>OXA-24</sub> como gen mayoritario, seguido de *bla*<sub>OXA-23</sub> con 14,29%. Mientras que para *P. aeruginosa* se obtuvo una mayor variedad, siendo 56,52% de las cepas portadoras del gen *bla*<sub>IMP</sub>, 26,09% de *bla*<sub>VIM</sub> y 13,04% de *bla*<sub>OXA-24</sub>.

En la detección de las carbapenemasas se utilizó la técnica molecular PCR para establecer la presencia/ausencia de los genes implicados, dicha técnica es de amplia utilización, reproducibilidad y vigencia para la detección e identificación de genes de resistencia en bacterias, esto debido a su alta especificidad y sensibilidad<sup>56</sup>. La muestra estuvo conformada por 96 cepas entre *A. baumannii* y *P. aeruginosa* recolectadas de forma no aleatoria en el periodo enero a febrero 2021, de estas, 65 fueron resistentes a imipenem y/o meropenem, en consecuencia, procesadas en la etapa preliminar del presente estudio. La resistencia a carbapenems alcanzó 49/57 (86,96%) para *A. baumannii* y 30/39 (76,92%) para *P. aeruginosa*. Diversos autores<sup>15,23,24</sup> de estudios en América Latina y el Caribe señalan que estos valores son bastante habituales en cepas clínicas, por lo general en áreas de hospitalización, UCI y de quemados, siendo congruente con el presente trabajo ya que 38,46% de las cepas provinieron de las áreas de hospitalización y UCI, sin embargo, el mayor porcentaje de obtuvo a partir del servicio COVID, con 58,46%, siendo algo circunstancial a la pandemia COVID-19.

Asimismo, para el análisis y expresión porcentual de los resultados posteriormente expuestos, no se tomó en consideración aquellos aislados clínicos que pertenecieran a una misma historia clínica, y cuyo fenotipo y genotipo de resistencia fuese idéntico.

De lo cual se obtiene, que para ambas especies el tipo de muestra de mayor relevancia fueron las de origen respiratorio, con 76,19% y 69,57% para *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, respectivamente, coherente con lo señalado por Pendleton<sup>35</sup> y Boucher<sup>36</sup>, pues estas bacterias oportunistas colonizan con facilidad

las vías respiratorias de pacientes intubados debido a su gran variedad de mecanismos de resistencia, adaptabilidad y capacidad de supervivencia<sup>57</sup>.

Considerando la información relacionada a los pacientes, en cuanto a la distribución por sexo, es importante notar que la mayor cantidad de muestras provenían de pacientes varones, comprendiendo 81,54%, situándose en mayor proporción dentro del rango etario B, personas entre 40-60 años. Esta situación puede deberse a que el estudio se situó temporalmente durante la segunda ola de la pandemia COVID-19 en Perú, momento en el cual el número de varones que desarrollaban un estado severo de la enfermedad era mayor que el de las mujeres y por tanto significaba un mayor número de ingresos a hospitalización y UCI, como sostiene Peckham<sup>58</sup> que en un metaanálisis de estudios publicados durante el año 2020, determinó que el ratio de ingresos a UCI y muerte como consecuencia de la COVID-19 era mayor para los varones.

A manera de soporte, Zhou<sup>59</sup> y Kim<sup>60</sup>, con sus respectivos equipos, sostuvieron que la incidencia de infecciones secundarias ocasionadas por bacterias aumentó drásticamente como consecuencia de la COVID-19, siendo el caso que coinfecciones bacteria/SARS-COV2 devinieron en 96% de mortalidad en China, ellos atribuyeron esta cifra a la resistencia a antimicrobianos, dando la posibilidad que las cepas de estudio estuviesen estrechamente relacionadas con este fenómeno.

La sensibilidad a antimicrobianos se obtuvo mediante la técnica de la CMI, tanto para imipenem y meropenem, utilizados en el criterio de selección preliminar, como en los 10 antimicrobianos evaluados adicionalmente para el abordaje de la información de resistencia (siendo solo 7 para *P. aeruginosa*).

Los resultados obtenidos mostraron que *A. baumannii* presenta mayores niveles de resistencia a antibióticos ya que 100% de las cepas fueron resistentes a cefalosporinas como cefepime y ceftazidima, fluoroquinolonas como ciprofloxacino también a betalactámicos en conjunto con inhibidores de betalactamasas como ampicilina/sulbactam y piperacilina/tazobactam, además de cotrimoxazol; para el

resto de antibióticos el resultado fue variado pero superando el 90% de resistencia en todo momento, tigeciclina con 90,5%, amikacina con 95,2% y gentamicina con 97,6%, a excepción de colistina donde todas las cepas fueron sensibles.

En Lima-Perú, Levy-Blitchtein<sup>61</sup> y su equipo, detallaron que la resistencia a cefalosporinas fue menor en comparación con los hallazgos de este estudio, sin embargo, sus valores reportados permanecían por encima del 90%. Esta tendencia se repitió con los antibióticos penicilínicos, quinolonas, tetraciclinas y macrólidos. Destacando en su trabajo el hecho que encontró cepas resistentes a colistina, que, aunque siendo 5%, resulta ser un valor mayor a lo reportado en este trabajo.

Para *P. aeruginosa*, se tuvo un menor número de cepas resistentes, pero con porcentajes de resistencia igualmente elevados. En los antimicrobianos evaluados se tuvo resultados diversos, piperacilina/tazobactam con 91,3% de resistencia, ceftazidima con 82,6%, gentamicina con 78,3%, ciprofloxacino y cefepime con 73,9%, amikacina con 65,2%, y por último colistina con 60.9% de cepas con resistencia intermedia.

Del trabajo de Flores<sup>62</sup> y su equipo, se obtiene información importante de la evolución de la resistencia a antimicrobianos por *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital de nivel IV a lo largo de 2 periodos, 2009-2010 y 2012-2014. Se desglosa que en sus hallazgos detectaron con asombro que los niveles de resistencia se mantenían o eran menores en comparación de lo esperado (la tendencia obtenida de los reportes previos en Perú detallaba valores de 50-75%), excepto para carbapenems y piperacilina/tazobactam, cuyo porcentaje de resistencia sí fue mayor a lo esperado, en todo momento los niveles reportados por este estudio así como la expectativa de resistencia basada en reportes previos<sup>63,64</sup> son superados por los niveles de resistencia hallados en el presente trabajo, resalta con gran importancia el elevado número de cepas de resistencia intermedia a colistina.

En contraste, autores como Fu<sup>65</sup> y su equipo mostraron porcentajes de resistencia menores para ambas cepas, sin embargo, para *P. aeruginosa* describe una resistencia mayor a *A. baumannii* y a su vez con valores fluctuantes a lo largo de los años, esto en un estudio en China que abarcó los años 2016 al 2020.

Es decir, los porcentajes de resistencia obtenidos para ambos microorganismos fueron elevados comparados a los reportados a nivel mundial<sup>2,5,14,20,22</sup>, regional<sup>15,23,24</sup> y local<sup>4,24,25</sup>. Posiblemente esto corresponda a las limitaciones propias del estudio, las relacionadas al número de muestra y al sesgo como consecuencia de la pandemia COVID-19.

Considerando el apartado molecular, para Brink<sup>20</sup> *Acinetobacter baumannii* viene exhibiendo mecanismos adquiridos por elementos genéticos móviles, principalmente carbapenemasas de gran diversos tipos, como: KPC, VIM, SIM, NDM, OXA-23G, OXA-24G, OXA-48, OXA-51, OXA-58 y OXA-235. En los hallazgos del presente trabajo el gen codificante de carbapenemasas encontrado con mayor frecuencia fue *bla*<sub>OXA-24G</sub> con 45/49 (91,8%), seguido de *bla*<sub>OXA-23G</sub> 6/49 (12,2%), *bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>NDM</sub> ambos con 1/49 (2,0%). Contrariamente, Hamidian y Nigro<sup>22</sup>, evidenciaron para *A. baumannii* a los clones 1 y 2 como los más prevalentes, ambos codificantes del gen *bla*<sub>OXA-23</sub>, siendo considerado el mayoritario en su trabajo. Además, se identificó el gen *bla*<sub>PER</sub> que se encontró en solo 1 de los aislados, en concordancia con que este gen es muy poco frecuente de hallar en estos microorganismos<sup>20</sup>.

*P. aeruginosa*, en cambio, muestra un repertorio de genes menos variado (los de dispersión global), como VIM, IMP y GES<sup>5,20</sup>. Los resultados obtenidos ratifican lo antes mencionado, ya que se encontraron los genes *bla*<sub>IMP</sub> con 15/30 (50,0%) y *bla*<sub>VIM</sub> con 7/30 (23,3%), exceptuando *bla*<sub>GES</sub> con ninguna cepa poseedora de este gen. Lo que es resaltante de los resultados es la presencia de 3/10 (10,0%) cepas poseedoras del gen *bla*<sub>OXA-24G</sub>, un gen propio de *A. baumannii* y muy raramente encontrado en *P. aeruginosa*<sup>66</sup>, a pesar de ello, desde algunos años atrás ciertos reportes vienen mostrando la aparición esporádica de *P. aeruginosa* portadoras de genes considerados propios de otras especies<sup>67,68</sup>.

Sin embargo, existen cepas de *P. aeruginosa* cuya resistencia a carbapenems no ha sido esclarecida por completo, ante esto se plantea la existencia de mutaciones en el gen codificante de la porina OprD, dicha porina está relacionada con el

transporte pasivo de carbapenems al medio interno, su inactivación provocaría que no se alcance la concentración necesaria para ejercer actividad antimicrobiana, este valor asciende al 30% de las cepas, algunos estudios muestran que la resistencia a carbapenems está ampliamente sustentada en este fenómeno, por lo que corroborar la integridad de dicho gen sería una tarea pendiente<sup>69</sup>.

En Perú, los estudios epidemiológico-moleculares de resistencia a carbapenems son bastante escasos, desde el año 2000 al 2019, se tuvieron solo 14 reportes de relevancia, traducándose como menos de un reporte al año<sup>25</sup>. Los genes reportados en mayor proporción para *A. baumannii* fueron *bla<sub>OXA-23</sub>* y *bla<sub>OXA24</sub>* con 43,7% y 52,4% de los reportes, respectivamente, aunque se tuvo la presencia de *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>OXA-143</sub>*. Por otro lado *P. aeruginosa* codificaba según reportes por amplia mayoría el gen *bla<sub>IMP</sub>* con 94,1%, y en menor medida *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>GES</sub>*. La consecuente comparación con lo obtenido en el presente trabajo resulta congruente con lo reportado en el escenario local<sup>20,22,25</sup>.

Es importante tener presente que las bacterias son microorganismos de gran adaptabilidad y capacidad evolutiva, esto implica que los genes reportados en las mismas no necesariamente son una constante en las especies, y esto se debe a que los genes predominantes en una bacteria están determinados por la especie, ubicación geográfica, y el tipo de interacción que tenga con su entorno cercano<sup>57</sup>.

Por lo antes mencionado resulta de gran importancia abordar desde distintas perspectivas el tema de la resistencia a antimicrobianos, que debido a su compleja naturaleza multifactorial se ha trabajado en cada uno de estos factores de forma aislada, y desde hace unos años atrás se ha puesto la mira en la interacción entre cada uno estos factores, concibiendo al problema como un todo, involucrando la salud humana, animal y ambiental, observándose la interacción de los microorganismos en cada uno de los entornos y entre los mismos, recibiendo el nombre de visión Una Salud, convirtiéndose en el curso de mayor interés para la investigación en microbiología<sup>70,71</sup>.

## VII. CONCLUSIONES

- ✓ Las cepas *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora mostraron una elevada resistencia a los antimicrobianos evaluados. *A. baumannii* destacó por mostrar niveles de resistencia superiores al 90%, excepto para colistina. Mientras que, *P. aeruginosa* destacó por tener 60,9% de cepas resistentes a colistina.
- ✓ Se identificó que los genes de resistencia a carbapenems de mayor prevalencia fueron *bla*<sub>OXA-24G</sub> con 39/42 (92,86%) para *A. baumannii* y *bla*<sub>IMP</sub> con 13/23 (56,52%) para *Pseudomonas aeruginosa*. No se detectó la presencia de los genes *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMI</sub> en ninguna especie.
- ✓ El genotipo más común en las cepas de *A. baumannii* fue el genotipo 1, conformando 92.8% de las cepas, mientras que para *P. aeruginosa* no existió diferencia significativa entre los genotipos 1 y 2, con 34,8% y 30,4%, respectivamente.
- ✓ Se detectó la presencia inusual de *bla*<sub>OXA-24</sub> en *P. aeruginosa*, alertando de la capacidad de este microorganismo para adquirir genes de resistencia clásicamente vinculados a otros microorganismos.

## VIII. RECOMENDACIONES

En primer lugar, se recomienda sostener este tipo de estudios con mayor frecuencia y en mayor número de hospitales del país, del mismo modo, se recomienda la oportuna divulgación de los resultados obtenidos con la finalidad de crear una base más robusta de la información disponible acerca de resistencia a antimicrobianos a nivel local, permitiendo mejoras en el manejo de esquemas terapéuticos, facilitando la toma de decisiones para la contención y prevención de infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a carbapenems.

Adicionalmente, sería relevante ampliar el número de genes codificantes de carbapenemasas estudiados, a fin de determinar los genes de resistencia de mayor prevalencia circulantes en los hospitales, en el caso de *P. aeruginosa* sería interesante apuntar a la identificación del gen *OprD* codificante de una porina relacionada a la difusión de carbapenems.

Es importante seguir promoviendo la ciencia en el Perú, facilitando a futuros investigadores desarrollar trabajos de investigación de alto valor mediante financiamiento y oportunidades idóneas.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Bank Group. Drug-resistant infections. A threat to our economic future. Final Report. Washington DC, USA: International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank. 2017.
2. Lemos E, de la Hoz F, Einarson T, McGhan W, Quevedo E, Castañeda C, Kawai K. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(5): 416–423.
3. Ugarte R, Olivo J, Corso A, Pasteran F, Albornoz E, Sahuanay Z. Resistencia a colistín mediado por el gen mcr-1 identificado en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Primeros reportes en el Perú. An Fac Med. 2018; 79(3): 213-217.
4. Gonzáles J, Maguiña C, Gonzáles FM. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. Acta Med Peru. 2019; 36(2): 145-151.
5. Murray C, Shunji K, Sharara F, Swetschinski L, Robles G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022; 399: 629-655.
6. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations [Internet]. Londres: Review on Antimicrobial Resistance, 2016. [Citado el 21 de enero de 2022]. Disponible en: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
7. O'Neill J. Review on antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations [Internet]. Londres: HM Government/Wellcome Trust; 2014. [Citado el 21 de enero de 2022]. Disponible en:

[https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

8. Lodise TP Jr, Patel N, Kwa A, Graves J, Furuno JP, Graffunder E, et al. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(10): 3510-3515.
9. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* 2016; 387: 176–187.
10. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [Internet] Geneva, Switzerland: WHO; 2017. [Citado el 30 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
11. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011; 477(7365): 457-461.
12. OMS. No podemos esperar: Asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes. Informe para el secretario general de las naciones unidas. [Internet] Ginebra, Suiza: OMS [Citado el 30 de enero de 2021]. Disponible en: <https://reliefweb.int/report/world/no-podemos-esperar-asegurar-el-futuro-contra-las-infecciones-farmacorresistentes>
13. Manyi-Loh, C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh, A. Antibiotic use in agriculture, and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules.* 2018; 23(4):795. doi: [10.3390/molecules23040795](https://doi.org/10.3390/molecules23040795)

14. Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Grisucolo N, et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science* 2019; 365: eaaw1944.
15. Quiñones D. Resistencia antimicrobiana: Evolución y perspectivas actuales ante el enfoque: “Una Salud”. *Rev Cub Med Trop.* 2017; 69(3): 1-17.
16. OMS. Antimicrobial resistance global report on surveillance 2014. Ginebra. World Health Organization, 2014.
17. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):482-501.
18. Hammoudi D, Ayoub C. The current burden of carbapenemases: review of significant properties and dissemination among Gram-negative bacteria. *Antibiotics.* 2020; 9(4):186. doi: [10.3390/antibiotics9040186](https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186)
19. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016; 3(1):15-21.
20. Brink A. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Op Infect Dis.* 2019; 32(6):609–616.
21. Arrondo H. Infección por bacilos gram-negativos no fermentadores: problemática en las unidades de cuidados intensivos. *Rev Haban Cienc Med.* 2010; 9(5): 680-687.
22. Hamidian M, Nigro S. Emergence, molecular mechanisms, and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial genomics.* 2019; 5(10): e000306. doi: [10.1099/mgen.0.000306](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000306)
23. Labarca J, Salles M, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol.* 2016; 42(2):276-292.

24. García-Betancur J, Appel T, Esparza G, Gales A, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021;19(2):197-213.
25. Angles-Yanqui E, Huaranga-Marcelo J, Sacsquispe-Contreras R, Pampa-Espinoza L. Panorama de las carbapenemasas en Perú. *Rev Panam Salud Publica.* 2020; 44: e61. doi: [10.26633/RPSP.2020.61](https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.61)
26. Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(2):61-74.
27. López S, López-Brea M. ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2000; 18(3):153-156.
28. Hu S, Niu L, Zhao F, Yan L, Nong J, Wang C, et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* and its carbapenem-resistant gene *bla<sub>OXA-23-like</sub>* by multiple cross displacement amplification combined with lateral flow biosensor. *Sci Rep.* 2019; 9(17888). doi:[10.1038/s41598-019-54465-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-54465-8)
29. Ibrahim ME. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia: risk factors, antimicrobial resistance patterns and mechanisms of carbapenem resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1):1. Doi: [10.1186/s12941-018-0301-x](https://doi.org/10.1186/s12941-018-0301-x)
30. Paz-Zarza V, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez S, Vázquez-López Rosalino. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev. Chil. Infectol.* 2019; 36(2): 180-189.
31. Ruiz L. Resistencia a antimicrobianos y virulencia en cepas no-clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis Doctoral]. Logroño: Universidad de la Rioja; 2018.

32. Mavrodi D, Bonsall R, Delaney S, Soule M, Phillips G, Thomashow L. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Bacteriol* 2001; 183(21):6454-6565.
33. Vilaplana L, Marco MP. Phenazines as potential biomarkers of *Pseudomonas aeruginosa* infections: synthesis regulation, pathogenesis, and analytical methods for their detection. *Anal Bioanal Chem*. 2020; 412(24): 5897-5912.
34. Hernández A, Yagüe G, García Vázquez E, Simón M, Moreno Parrado L, Canteras M, Gómez J. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Rev Esp Quimioter*. 2018;31(2):123-130.
35. Pendleton J, Gorman S, Gilmore B. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2013; 11(3), 297-308.
36. Boucher H, Talbot G, Bradley J, Edwards J, Gilbert D, Rice L, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious disease's society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 48(1):1-12.
37. Quinn R. Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. *Am J Public Health*. 2013;103(3):426-434.
38. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(2): 116-29.
39. Lee R. Scientists Unearth Hope for New Antibiotics. *The Wall Street Journal* [Internet]. 2018. [Citado el 17 de marzo de 2022] Disponible en: <https://www.wsj.com/articles/genetic-sequencing-unearths-hope-for-new-antibiotics-1518451201>
40. Durich O. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Med Integral*. 2000; 36(10): 367-370.

41. Resistencia a los antibióticos. La Prensa [Internet]. 2016. [Citado el 17 de marzo de 2022]. Disponible en: [https://www.prensa.com/impres/vivir/Resistencia-antibioticos\\_0\\_4498800135.html](https://www.prensa.com/impres/vivir/Resistencia-antibioticos_0_4498800135.html)
42. Bocanegra P. Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un hospital de tercer nivel en Nueva León. [Tesis de Maestría]. México: Universidad Autónoma de Nueva León; 2013.
43. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*. 2011; 12(3): 217-226.
44. Bedenić B, Sardelić S. Carbapenemases. Growing and handling of bacterial Cultures [Internet]. London: IntechOpen; 2018. [Citado el 18 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/62160>
45. Sanseverino I, Navarro A, Loos R, Marinov D, Lettieri T. State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance. Publications Office of the European Union. Luxemburgo; 2018.
46. Diccionario NCI. Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [Citado el 25 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/>
47. Diccionario médico. Universidad de Navarra [Internet]. [Citado el 25 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/>
48. March G, Eiros J. Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Med Clín*. 2013; 141(8): 353–357.
49. Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Disk diffusion and MIC testing. M100, 31th ed. MI: CLSI; 2021.

50. Holmes D, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 1981; 114(1): 193–197.
51. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, Bou G. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist.* 2014; 20(4): 259-263.
52. Bogaerts P, Castro R, de Mendonça R, Huang T-D, Denis O, Glupczynski Y. Validation of carbapenemase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *Antimicrob Chemother.* 2013; 68(1): 1576-1582.
53. Mlynarcik P, Roderova M, Kolar M. Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(1): e29314. doi: [10.5812/jjm.29314](https://doi.org/10.5812/jjm.29314)
54. Wolter D, Khalaf N, Robledo I, Vázquez G, Santé M, Aquino E, Goering V, Hanson N. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(4): 1660–1664.
55. Elliott A, Hynan L, Reisch J, Smith J. Preparing Data for Analysis Using Microsoft Excel. *Journal of Investigative Medicine.* 2006; 54(6): 334–341.
56. Galhano B, Ferrari R, Panzenhagen P, Jesus AC, Conte-Junior C. Antimicrobial resistance gene detection methods for bacteria in animal-based foods: a brief review of highlights and advantages. *Microorganisms.* 2021;9(5):923. doi: [10.3390/microorganisms9050923](https://doi.org/10.3390/microorganisms9050923)
57. Moradali M, Ghods S, Rehm, B. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2017; 7(39). doi: [10.3389/fcimb.2017.00039](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039)

58. Peckham H, de Gruijter N, Raine C, Radziszewska A, Ciurtin C, Wedderburn L, et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission. *Nat Commun.* 2020; 11(6317). Doi: [10.1038/s41467-020-19741-6](https://doi.org/10.1038/s41467-020-19741-6)
59. Zhou P, Yang L, Wang X, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(1): 270-289.
60. Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah N, Brown I. Rates of infections between SARS-CoV-2 and other respiratory pathogens. *JAMA.* 2020; 323(20): 2085-2086.
61. Levy-Blitchein S, Roca I, Plasencia-Rebata S, Vicente-Taboada W, Velásquez-Pomar J, Muñoz L, Moreno-Morales J, Pons MJ, del Valle-Mendoza J, Vila J. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):119. doi: [10.1038/s41426-018-0127-9](https://doi.org/10.1038/s41426-018-0127-9)
62. Flores-Paredes W, Luque N, Albornoz R, Rojas N, Espinoza M, Pons MJ, Ruiz J. Evolution of antimicrobial resistance levels of ESKAPE microorganisms in a peruvian IV-level hospital. *Infect Chemother.* 2021;53(3):449-462.
63. Horna G, Quezada K, Ramos S, Mosqueda N, Rubio M, Guerra H, Ruiz J. Specific type IV pili groups in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Microbiol* 2019; 22:131-141.
64. García C, Horna G, Linares E, Ramírez R, Tapia E, Velásquez J, Medina V, et al. Antimicrobial drug resistance in Peru. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):520-521.
65. Fu P, Xu H, Jing C, Deng J, Wang H, Hua C, Chen Y, et al. Bacterial epidemiology, and antimicrobial resistance profiles in children reported by the

ISPED program in China, 2016 to 2020. *Microbiol Spectr.* 2021;9(3): e0028321. Doi: [10.1128/Spectrum.00283-21](https://doi.org/10.1128/Spectrum.00283-21)

66. Rouhi S, Ramazanzadeh R. Prevalence of *bla*<sub>oxacillinase-23</sub> and *bla*<sub>oxacillinase-24/40</sub>-type Carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* Species isolated from patients with nosocomial and non-nosocomial infections in the west of Iran. *Iran J Pathol.* 2018;13(3):348-356.
67. Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enf Infecc Microbiol Clín.* 2010; 28(1): 19–28.
68. Sarı AN, Biçmen M, Gülay Z. The first report on the outbreak of OXA-24/40-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(5): 439-442.
69. Horna G, López M, Guerra H, Saéñz Y, Ruiz J. Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2018; 8:16463.
70. McEwen S, Collignon P. Antimicrobial resistance: A one health perspective. *Microbiology Spectrum.* 2018; 6(2): ARBA-0009-2017. doi: [10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017)
71. What is One Health? One Health Commission [Internet]. 2018. [Citado el 01 de mayo de 2022] Disponible en: [https://www.onehealthcommission.org/en/why\\_one\\_health/what\\_is\\_one\\_health/](https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/)

## X. ANEXOS

### X.1. Anexo 1. Operacionalización de variables

| VARIABLE(S)  | TIPO DE VARIABLE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL  | DEFINICIÓN OPERACIONAL  | DIMENSIONES | INDICADOR                                   |   | UNIDAD DE MEDIDA            | OBSERVACIONES  |
|--|------------------|--|---|-------------|---|---|-----------------------------|--|
| Característica molecular   | Dependiente      | Rasgo genético identificado en células o tejidos que se estudia mediante el uso de marcados moleculares como el ADN. | Genes de resistencia a carbapenems identificados por técnicas moleculares           | -           | Molecular                                   | Presencia de genes de resistencia carbapenems | Tamaño de las bandas en pb  | Se evaluará la presencia/ausencia de los genes:<br><i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23G</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24G</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48G</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-58G</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>GES</sub> , <i>bla</i> <sub>IMI</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP</sub> y <i>bla</i> <sub>PER</sub> |
|  |                  |  |   |             |   | Ausencia de genes de resistencia carbapenems  |                             |  |
| Cepas de <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores  | Independiente    | Cepa de <i>A. baumannii</i> aislada por la aplicación de técnicas microbiológicas.                                   | Cepas identificadas como <i>A. baumannii</i> mediante sistema automatizado Vitek 2  | -           | Cepa identificada como <i>A. baumannii</i>  |   | Número de aislados clínicos | -  |
| Cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenems aisladas del Hospital María Auxiliadora – San Juan de Miraflores | Independiente    | Cepa de <i>P. aeruginosa</i> aislada por la aplicación de técnicas microbiológicas.                                  | Cepas identificadas como <i>P. aeruginosa</i> mediante sistema automatizado Vitek 2 | -           | Cepa identificada como <i>P. aeruginosa</i> |   | Número de aislados clínicos | -  |

## X.2. Anexo 2. Aprobación por Comité de ética UCSUR



UNIVERSIDAD  
**CIENTÍFICA**  
DEL SUR

**COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**

**CONSTANCIA N° 176-CIEI-CIENTÍFICA-2020**

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur (CIEI-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido aprobado por el CIEI-CIENTÍFICA.

Código de registro: **053-2019-PRO99**

Título: **Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos: visión *One Health***

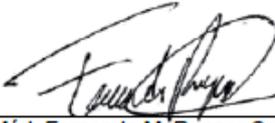
Investigador(a): **María Pons Casellas**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente. Adicionalmente, en el contexto de la pandemia de enfermedad por COVID-19, le recomendamos cumplir con las normas publicadas por el estado peruano.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (hasta el 08 de enero del 2021), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 09 de julio de 2020



Méd. Fernando M. Runzer Colmenares  
Presidente  
Comité Institucional de Ética en Investigación

Asesoría al postulante  
T // (51) 610 6738 | • Campus Villa 2 - Panamericana Sur km 19  
informes@cientificadesur.edu.pe | • Calle Centurias 398, Miraflores

### X.3. Anexo 3. Hola de información – Enzima Taq Polimerasa “Horse PowerTaq DNA Polymerase”.

# Data sheet

## Horse-PowerTaq DNA polymerase

Cat. No: P0023 500 U (5 U/μL)  
Cat. No: P0024 1000 U (5 U/μL)  
Cat. No: P0025 500 U (1 U/μL)

Cat. No: P0026 500 U (5 U/μL) + ultrapure dNTPs 2 mM each  
Cat. No: P0019 5000 U (1 U/μL)  
Cat. No: P0020 10000 U (5 U/μL)

All supplied with 25 mM MgCl<sub>2</sub> (1.5 mL) and 10X Buffer (1.5 mL)

---

#### Introduction

Horse-Power Taq DNA polymerase is a thermostable recombinant enzyme produced in an *E. coli* strain that carries the cloned pol gene from *Thermus aquaticus*. The enzyme has 5'→3' polymerase activity and a weak 5'→3' exonuclease activity but no 3'→5' exonuclease activity (proofreading).

#### Features

- Molecular Weight: 94 kDa.
- Thermostable (half-life at 94 °C is 40 minutes).
- Adds extra nucleotides (preferentially adenine) without template at 3' ends leaving 3' overhangs PCR fragments. This fact allows the popular TA-cloning or GC cloning.
- Incorporates modified nucleotides (biotinylated, fluorescently labelled, etc).

#### Applications

- Routine amplifications.
- Colony screening (see Red-Taq DNA polymerase).
- Amplifications up to 5 kb using plasmid, viral or genomic DNA as template.
- PCR fragments amplification for TA or GC cloning (preferably use a proofreading polymerase for cloning purposes combined with an efficient blunt cloning vector) (see pSpark® DNA Cloning System)

#### Assay conditions

25 mM Tris-HCl pH 9.0 at 25 °C, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/mL gelatine, 200 μM dATP, dGTP, dTTP, 100 μM [ $\alpha$ 32-P] dCTP (0.05 μCi/nmol) and 12.5 μg activated salmon sperm DNA.

**Unit definition:** One unit is defined as the amount of enzyme required to catalyse the incorporation of 10 nanomoles of dNTPs into acid-insoluble material in 30 minutes at 74 °C.

**Concentration:** 5 U/μL or 1 U/μL

#### Quality Certifications

- ✓ Functionally tested in PCR.
- ✓ Undetected bacterial DNA (by PCR).
- ✓ Undetectable nucleases activity (endo-, exo, and ribonucleases).

**Storage:** Store at -20 °C.

*(continued on reverse side)*

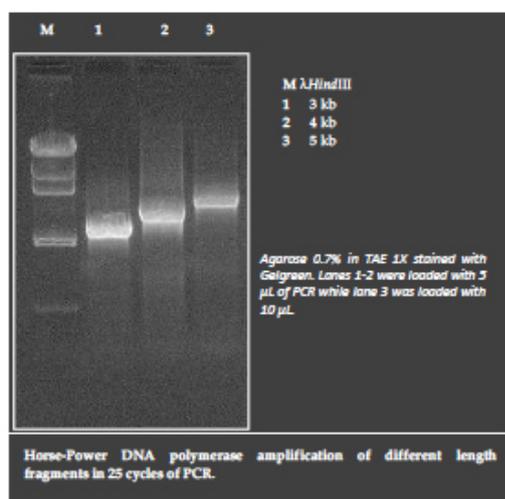
Canvax Biotech, S.L. C/Astrónoma Cecilia Payne. Edif. Canvax. 14014 Córdoba, Spain.  
☎ : +34 957 348 066  
☎ : +34 957 346 217  
✉ : [info@canvaxbiotech.com](mailto:info@canvaxbiotech.com)

**canvax**

### Recommended PCR assay (20 µl assay)

| Components                              | Volume    | Final con.     |
|---|-----------|----------------|
| 10X PCR buffer                          | 2 µL      | 1X             |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM                 | 2 µL      | 2.5 mM         |
| dNTPs 8 mM mixture                      | 2 µL      | 0.8 mM         |
| Primer Forward (15 mm)                  | 1 µL      | 0.75 µm        |
| Primer Reverse (15 mm)                  | 1 µL      | 0.75 µm        |
| Template DNA                            | 0.2-10 µL | 1.75-2.5 ng/µL |
| Horse-Power-Taq DNA polymerase (5 U/µL) | 0.2 µL    | 0.05 U/µL      |
| Autoclaved distilled water              | to 20 µL  | -              |

**Cycling instructions:** 94 °C 5:00, 25-30x (95 °C 0:30, Tm 0:30, 72 °C 1'/kb), 72 °C 10:00, 4 °C ∞



### PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, and is not suitable for administration to humans or animals. Please refer to [www.canvaxbiotech.com](http://www.canvaxbiotech.com) for the Material Safety Data Sheet of the product.

Canvax Biotech, S.L. C/Astrónoma Cecilia Payne, Edif. Canvax. 14014 Córdoba, Spain.

☎ : +34 957 348 066

☎ : +34 957 346 217

✉ : [info@canvaxbiotech.com](mailto:info@canvaxbiotech.com)

## X.4. Anexo 4. Hoja de información - Colorante de ácidos nucleicos "Safeview™ Nucleic acid stains



Applied Biological Materials Inc.  
Tel: 1-866-757-2414  
Email: info@abmGood.com  
Website: www.abmGood.com

### SafeView™ Nucleic Acid Stains

Store at 4°C

| Cat. No. | Description       | Quantity   |
|----------|-------------------|------------|
| G108     | SafeView™ Classic | 1.0 ml     |
| G108-G   | Safe-Green™       | 1.0 ml     |
| G108-R   | Safe-Red™         | 1.0 ml     |
| G108-W   | Safe-White™       | 1.0 ml     |
| G108-P   | Safe-Pack™        | G108-G,R,W |

#### Product Description

SafeView™ products represent a new and safe class of nucleic acid stains for the visualization of double-stranded DNA, single-stranded DNA, and RNA in agarose and polyacrylamide gels. The dyes are developed to replace toxic Ethidium Bromide (EtBr, a potent mutagen), commonly used in gel electrophoresis for visualization of nucleic acids in agarose and polyacrylamide gels.

SafeView™ products are non-carcinogenic by the Ames-test. The results are negative in both the mouse marrow chromophilous erythrocyte micronucleus and mouse spermary spermatocyte chromosomal aberration tests.

**NOTE:** SafeView™ Nucleic Acid Stains are non-carcinogenic, but may cause skin and eye irritations. Always wear gloves when working with the product.

#### SafeView™ Classic - Substitute for Ethidium Bromide in agarose gel

SafeView™ Classic is used the same way as Ethidium Bromide in agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. It emits green fluorescence when bound to dsDNA and ssDNA and red fluorescence when bound to RNA. This stain has one excitation (290 nm) and two emission spectra (490 nm and 605 nm).

#### Protocol

1. Prepare a 100 ml agarose or polyacrylamide solution.
2. Add 5 µl SafeView™ Classic to the gel solution.
3. Mix gently; the solution should have no air bubbles.
4. For agarose gel, let the solution cool down to 60 - 70°C and cast the gel.  
For polyacrylamide gel, add APS and TEMED and cast the gel according to regular polyacrylamide gel casting protocol.
5. Run gel electrophoresis with 5 µl SafeView™ Classic per 100 ml buffer.
6. View the results under UV or blue LED light.

#### Safe-Green, Red, White, Pack™ - Substitute for loading dye

With SafeView™ dyes (Safe-Green, Red, White, Pack™), you do not need to add any dyes to both gel matrix and running buffers. SafeView™ dyes are provided in a form of 6X sample loading dyes and they are to be added to your samples only. The SafeView™ dyes eliminate contamination risk of glassware or gel running tank as associated with EtBr. After the electrophoresis, view and document your results as you would do with EtBr staining protocols.

#### Protocol

1. Prepare a 100 ml agarose or polyacrylamide solution.
2. Mix gently without introducing any air bubbles.
3. For agarose gel, let the solution cool down to 60 - 70°C and cast the gel. For polyacrylamide gel, add APS and TEMED and cast the gel according to regular polyacrylamide gel casting protocol.
4. Mix samples and DNA marker with SafeView™ dye at a 1:5 (dye : sample) dilution rate.
5. Following electrophoresis, view the results under UV.

#### Note:

Safe-Green™ can also be visible under blue LED light.

For laboratory research only. Not for clinical applications.  
For technical questions, please email us at technical@abmgood.com  
Or visit our website at www.abmGood.com

## X.5. Anexo 5. Hoja de información – Escalera de ADN 100 pb marca canvax



# Data sheet

## DNA LADDERS

DNA size standards are a necessary reactive in any molecular biology lab for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis. Canvax Biotech produces five different DNA size standards for small and large DNA molecules. These standards are ready-to-use markers which contain loading dye with one or two migration visualization dyes

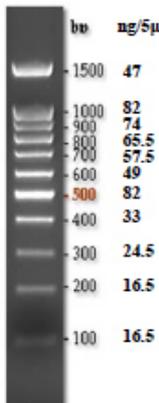
### 100-1500 bp DNA Ladder

**Cat. No: L0013** (50 µg)  
**Cat. No: L0014** (250 µg)

**Description:** The 100-1500 bp DNA ladder is suitable for sizing double-stranded DNA from 100 bp to 1.5 kb. The DNA ladder is ready to use and can be visualized on agarose gel. It is composed by 11 fragments ranging from 100-1500 base pairs, with 100 bp increments between bands. This DNA ladder was formulated by adding a unique DNA band, the 1500 bp, to the 100-1000 bp DNA ladder. The 500 bp fragment is at double intensity to serve as reference band. The resulting steps are shown in the figure. An exact amount of DNA in each band allows approximate quantification of DNA samples.

**Concentration:** 0.1 µg/µL

**Storage conditions:** Stable at room temperature. For long term storage, store at -20 °C.



| bp   | ng/5µl |
|------|--------|
| 1500 | 47     |
| 1000 | 82     |
| 900  | 74     |
| 800  | 65.5   |
| 700  | 57.5   |
| 600  | 49     |
| 500  | 82     |
| 400  | 33     |
| 300  | 24.5   |
| 200  | 16.5   |
| 100  | 16.5   |

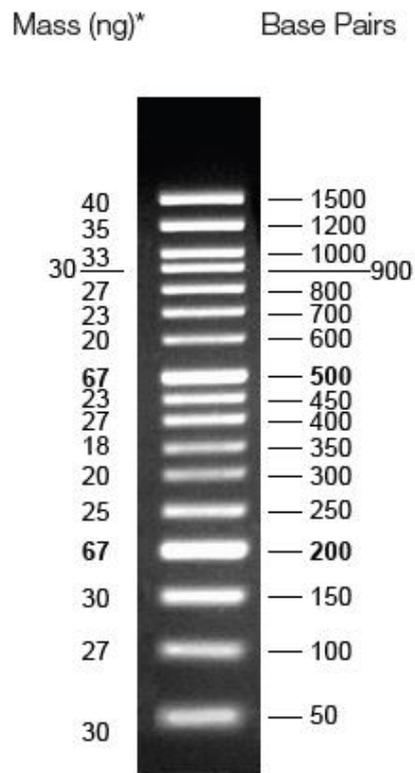
### PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, and is not suitable for administration to humans or animals. Please refer to [www.canvaxbiotech.com](http://www.canvaxbiotech.com) for the Material Safety Data Sheet of the product.

**X.6. Anexo 6.** Hoja de información – Escalera de ADN 100 pb marca ABM  
“Plus Opti-DNA Marker”

## 100bp / 100bp Plus Opti-DNA Marker

Cat.No.: G016



2% TAE agarose gel

\* Based on a 5 µl volume