

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

“Dr. Luis Felipe Moncada “

UNAN- MANAGUA



Trabajo monográfico para optar al Título de:

Licenciatura en Bioanálisis Clínico

Título

Identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), en cepas aislada de procesos infecciosos en los pacientes internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de abril a julio 2014.

Autores

Br. Ortiz Machado Darling Auxiliadora

Br. Rodríguez Orozco Marlú Isamar

Br. Urbina Leiva José Javier

Tutor:

Msc. Oscar Arbizú Medina.

Lic. BAC, Msc. Microbiología Médica.

Asesor Metodológico:

Lic. Benjamín Castillo Gómez.

Lic. Bioanálisis Clínico.

Managua, Nicaragua Marzo del 2015

DEDICATORIA A:

DIOS por llenarme de fe y mantenerme de pie ante todos los obstáculos que se me presentan en la vida, para alcanzar cada una de mis metas planteadas.

Mis padres Rosa Yolanda Machado y William Roger Ortiz, por darme educación y hacerme una persona de bien, por enseñarme a luchar por lo que quiero y brindarme todo su amor, confianza y esfuerzo para poder culminar mis estudios.

Mi familia por darme ánimos para poder salir adelante y de una u otra forma brindarme su apoyo.

Mi hijo Anderson David, por ser la razón de mi vida, mi inspiración y mis fuerzas para salir a delante.

Darling Auxiliadora Ortiz Machado

DEDICATORIA A:

Dios por darme la vida, por estar a mi lado en todo momento y fortalecerme para poder superar todas las pruebas de la vida.

Mi abuelita Rosario Blandón, por ser un pilar fundamental en mi vida y por haberme dado los mejores consejos, que me han servido a lo largo de la carrera y por qué estoy segura que desde el cielo cuida de mí.

Mi tía Nancy Rodríguez, por ser mi madre, mi amiga, mi consejera y mi guía para seguir alcanzando todos mis sueños.

Todos mis maestros que con amor compartieron sus conocimientos y sus vivencias, que de una u otra manera formaron en mí una nueva profesional.

Todas las personas que me ayudaron de manera desinteresada a cumplir mis metas en la vida.

Marlú Isamar Rodríguez Orozco.

DEDICATORIA A:

Dios que en medio de todos los obstáculos, que se me presentaron supo darme fuerza y sabiduría para poder concluir este trabajo y permitirme llegar hasta el final llenándome de bendiciones.

Mis padres por darme todo su amor y apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

Mi familia que de una u otra forma me apoyo.

José Javier Urbina Leiva

AGRADECIMIENTOS A:

*Nuestro tutor Msc. Oscar Arbizu Medina y Asesor metodológico Lic. Benjamín Castillo,
por dedicarnos su tiempo y darnos sus conocimientos.*

*Hospital Antonio Lenin Fonseca y Al laboratorio, por permitirnos elaborar la monografía en
este centro.*

*Laboratorio del Hospital Solidaridad, por su apoyo incondicional para la realización de este
estudio.*

*Las licenciadas del laboratorio clínico de la UNAN-Managua, por toda la ayuda que nos
brindaron en el transcurso de este estudio y en especial a la Lic. Sofía Flores Sandino.*

VALORACION DEL TUTOR

A pesar de que la resistencia bacteriana es un fenómeno evolutivo natural, la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos en los últimos 70 años ha acelerado su ritmo mucho más que lo ocurrido en millones de años anteriores. Las bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia en su evolución; producción de enzimas inactivadoras, mutación de sitios de acción, bomba de expulsión, etc. La producción de carbapenemasas, enzimas inactivadoras de carbapenémicos, es uno de los mecanismos más recientes, pero de los más preocupantes, ya que inactivan prácticamente al último escalón terapéutico frente a microorganismos Gram negativos multirresistentes.

Considero que el trabajo monográfico, Identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan de Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE), en cepas aislada de procesos infecciosos en los pacientes internos del hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de abril a julio 2014. Es de gran importancia por la situación de los hospitales a nivel nacional.

Este trabajo monográfico, reúne todo los requerimientos científicos y metodológicos.

Tutor:

Msc. Oscar Arbizú Medina.

Lic. BAC, Msc. Microbiología Médica.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar fenotípicamente Enterobacterias productoras de Carbapenemasa y genes que portan de β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), en cepas aislada de procesos infecciosos en los pacientes internos del Hospital Antonio Lenín Fonseca, en los meses de Abril a Julio 2014. El estudio fue descriptivo de corte transversal, con una muestra de 13 cepas de Enterobacterias, con halos menor o igual a 22mm para imipenem. Para la identificación y determinación del perfil de resistencia se utilizó el sistema VITEK 2 Compact, en el que se identificaron 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y 1 cepa de *Escherichia coli*, donde se encontró que las 13 cepas son resistentes a los antibióticos β -lactámicos; cefalotina, cefotaxima, cefuroxima, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona y aztreonam, a los carbapenémicos (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem), a las fluoroquinolonas (ácido nalidixico, ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacino), y trimetoprima sulfametoxazol, 12 son resistentes a los aminoglucósidos (amikacina), 13 a gentamicina, y 9 a nitrofurantoina. Todas las cepas mostraron sensibilidad a tigeciclina. Se aplicaron las pruebas fenotípicas para la detección de enzimas carbapenemasas; test de sinergia con ácido fenil borónico (APB), en la cual resultaron negativas las 13 cepas, descartando la presencia de carbapenemasas tipo serinas y el test sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para la detección de enzimas de tipo Metallo- β -lactamasas (MLBs), en el cual dieron positivo las 13 cepas. Se realizó el test de Hodge como método complementario, resultando positivo las 13 cepas. En la detección de genes de BLEE por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, 9 cepas presentaron los 3 genes de BLEE (CTX, TEM Y SHV), 3 las siguientes combinaciones (CTX Y SHV), (TEM Y SHV), (CTX Y TEM), 1 solo (TEM) y OXA no se presentó.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
5. OBJETIVO GENERAL.....	6
6. MARCO TEÓRICO.....	7
6.1. <i>Enterobacterias</i>	7
6.2. <i>Patogenia</i>	7
6.3. <i>Antibióticos</i>	8
6.3.1. <i>β-lactámicos</i>	8
6.3.2. <i>Cefalosporinas</i>	9
6.3.3. <i>Penicilinas</i>	9
6.3.4. <i>Carbapenémicos</i>	9
6.3.5. <i>Monobactámicos</i>	10
6.3.6. <i>Aztreonam</i>	10
6.3.7. <i>Aminoglucósidos</i>	11
6.3.8. <i>Quinolonas</i>	11
6.3.9. <i>Inhibidores de βlactamasas</i>	11
6.4. La Resistencia bacteriana puede ser natural o adquirida	12
6.4.1. <i>Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos β-lactámicos</i>	13
6.4.2. <i>Mecanismo de Resistencia de Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae.</i>	14
6.4.3 <i>Resistencia adquirida a los β-lactámicos</i>	15
6.5 Clasificación de las β-lactamasas.....	16

6.5.1. Resistencia a Carbapenemes.....	16
6.5.2. Serino Carbapenemasas.....	17
6.5.3. Carbapenemasas tipo KPC, por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
6.5.4. Carbapenemasas tipo Serina de clase D.....	17
6.5.5. Metalo- β -lactamasas (MBLs).....	18
6.5.6. Enzimas BLEE más destacadas: TEM, SHV, CTX-M y OXA.....	18
6.6 Elementos genéticos de transferencia horizontal en Enterobacterias.....	19
6.7. Epidemiología de las Carbapenemasa.....	20
6.8. Sistema Automatizado VITEK.....	21
6.9. Pruebas fenotípicas para la Identificación de Carbapenemasas.....	22
6.10. Metodo Molecular.....	23
6.11. Electroforesis en gel por Campo Pulsado.....	24
7. DISEÑO METODOLÓGICO.....	26
8. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	34
9. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
10. CONCLUSIONES.....	46
11. RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	55

1. INTRODUCCIÓN

El surgimiento de Enterobacterias resistente a carbapenémicos, es un problema serio de salud pública y privada, que involucra a todos los países alrededor del mundo, se caracteriza por una resistencia de los microorganismos al efecto del antibiótico, asociado a altas tasas de mortalidad y elevado potencial de diseminación, debido a su codificación en plásmidos. Esta resistencia es adquirida, puesto que no son propias de las bacterias, involucran acción contra las cefalosporinas, aminoglucocidos, fluoroquinolonas y finalmente a los carbapenem, es así como disminuyen las alternativas terapéuticas.

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

En los últimos años en Nicaragua se han identificado cepas con resistencia a los carbapenem, con mayor frecuencia de tipo Metalo- β -lactamasas y en menor cantidad la de tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPCs), en el 2012 de 36 cepas de ocho hospitales del país, con sinergia positiva a ácido borónico, 33 resultaron con el gen KPC. En el presente estudio se describen herramientas fenotípicas, útiles para la detección de enzimas carbapenemasas en microorganismos Gram-negativos, y la detección de genes BLEE por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

2. ANTECEDENTES

Un estudio realizado por Nastro, M.et.al.(2012), en un hospital de Argentina, en 169 Enterobacterias sin AmpC inducible, detectó el fenotipo BLEE en 152 (90%) aislamientos, mientras que la presencia de AmpC y de KPC se registraron en una medida mucho más baja, en 12(7 %) y 5(3 %). Este último fenómeno se presentó en 5 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, en los que también se detectó la presencia de BLEE.

Quizhpe, J.et.al.(2013), realizó un estudio en Ecuador con muestras de 72 cultivos, donde encontró 21 (46.7%) cepas BLEE en hospitalización y 11 (24.4%) en UCI, el 15% fue de tipo AmpC (10%) en hospitalización y (5%) en UCI; el 20% restante son productoras de carbapenemasa, encontrándose el 10% en hospitalización y el 10% en UCI. Los datos denotan que a nivel hospitalario existe una alta prevalencia de multirresistencia.

Pacheco, R.et.al.(2014), realizó un estudio de bacterias Gram-negativas portadoras del gen bla_{KPC} en hospitales de Colombia, donde fueron analizados 273 aislamientos de Enterobacterias, resultando el 31.1 % positivo para el gen bla_{KPC}, este gen se encontró con mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* seguido de *Pseudomona aeruginosa* y otras Enterobacterias.

García, M.M. (2012) idéntico en Guatemala, una cepa de *Klebsiella pneumoniae* tipo NDM-1, por tal motivo la Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitió una alerta para la vigilancia y detección de estas cepas.

En Julio del 2014 Jiménez, A.et.al. Reveló el segundo caso en Costa Rica de carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa New Delhi, importado de Nicaragua por un adolescente, con una infección urinaria por *Klebsiella pneumoniae*, mostró resistencia no sólo a β -lactámicos, sino también a Amikacina, Ciprofloxacina y Nitrofurantoina.

Ávila, A.J.(2012), realizó un estudio de carbapenemasa en 8 hospitales de Managua, capital de Nicaragua, durante el periodo de 2009-2012, en el que analizó 47 aislados y confirmó la presencia del gen blaKPC en 33 cepas de las cuales 27(82%) fueron *Klebsiella pneumoniae* y 6 (18%) *Escherichia coli*. Al realizar la búsqueda de la clonalidad las 27 cepas de *Klebsiella pneumoniae* presentaron 13 clones, 7 (K), 3(B), 4(G) en esta se incluyen dos subtipos G1, 3(I) subgrupo (II), 2(M), 1(A, C, D, E, F, H, J y L). En las 6 cepas de *Escherichia coli* se encontró 4(A) Y 2 clon (B). La mayoría de las cepas que presentaron el gen KPC provienen de la unidad de cuidados intensivos.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos plantea una amenaza cada vez mayor para la salud a nivel mundial, ya que con frecuencia las cepas resistentes están ascendiendo de forma progresiva en el control de enfermedades infecciosas y no están respondiendo al tratamiento, lo que da lugar a una enfermedad prolongada. Uno de los principales problemas que han centrado la atención del mundo académico, autoridades sanitarias y de la comunidad en general son las infecciones producidas por Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, ya que por el mal manejo de estos antibióticos este problema ha duplicado la tasa de mortalidad.

Nuestro interés por llevar a cabo esta investigación, surge de la necesidad que presentan los hospitales de realizar un diagnóstico rápido, en el cual se identifiquen los mecanismos enzimáticos y genes causantes de la multiresistencia bacteriana y así obtener una mejor visión para que se elaboren nuevos protocolos de medicamentos, con el objetivo de que las terapias antimicrobianas sean de forma acertada.

Con este estudio se aportará información que será de mucha utilidad, al personal médico del hospital Antonio Lenin Fonseca, al Comité de Infecciones Intrahospitalarias y a las Autoridades del Ministerio de Salud y a la UNAN-Managua como fortalecimiento del conocimiento tanto a nivel de docencia como a nivel estudiantil.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia de Enterobacterias productoras de Carbapenemasa, y genes que portan de Betalactamasa, en cepas aisladas de procesos infecciosos en los pacientes internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de Abril a Julio 2014?

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar fenotípicamente Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan de β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), en cepas aislada de procesos infecciosos en los pacientes internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de Abril a Julio 2014.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificación bacteriana y determinación del perfil de resistencia a través del sistema VITEK 2 Compact de las cepas en estudio.
2. Aplicar el Test de sinergia con EDTA y Test de sinergia con Ácido Borónico para la detección fenotípica de carbapenemasa.
3. Determinar genes BLEE por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en las cepas en estudio.

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Enterobacterias

Las Enterobacterias son un grupo extenso, cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales, son bacilos Gram-negativos, móviles con flagelos peritricos no móviles; poseen la capacidad de multiplicarse en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros suplementos; pero dan un mejor resultado en agar MacConkey, éstas se proliferan en medios aerobios y anaerobios (son anaerobios facultativos); fermentan la glucosa, a menudo producen gas, catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitratos a nitrito. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). Jawetz, E.et. al (2012).

6.2. Patogenia

Las Enterobacterias presentan numerosos factores de virulencia, la mayoría se adhieren a las superficies mucosas y colonizan mediante de fimbrias, poseen toxinas como la hemolisina que potencia la acción de las fimbrias, presentan una capsula antifagocitaria, tienen la capacidad de secuestrar factores nutricionales como el hierro por la producción de sideroforos; que son compuestos quelantes de hierro extracelulares (enterobactina, aerobactina). Son capaces de variar la fase antigénica; la expresión del antígeno capsular K y del antígeno flagelar H están bajo el control del microorganismo, Estos pueden o no expresarse, siendo una de las características que protege a la bacteria de la acción celular mediada por anticuerpos. Nava, V.E. (2014).

Género *Klebsiella*: El principal factor de virulencia, es la cápsula de polisacáridos que la protege de la acción fagocítica de los neutrófilos y de la acción bactericida del suero mediada por el complemento y además le proporciona el aspecto mucoide a las colonias aisladas, presenta tres tipos de fimbrias, siendo las de tipo I las responsables de la unión al mucus y células epiteliales del tracto gastrointestinal, secretan quelantes de hierro de bajo peso molecular denominados sideróforos, que son capaces de competir con las proteínas del huésped en la captura del hierro. *Klebsiella pneumoniae* suele comportarse como un patógeno oportunista, que sobre todo ocasiona infecciones en pacientes hospitalizados, con enfermedades subyacentes o inmunosupresión, previamente colonizados por el microorganismo, pueden llegar producir una

neumonía lobular primaria adquirida en la comunidad, las neumonías producidas por las distintas especies de *Klebsiella* llevan generalmente a la destrucción necrótica de los espacios alveolares, la formación de cavidades y la producción de esputos hemoptísicos. Generalmente se aíslan de infecciones como: heridas, de partes blandas, del aparato urinario e infecciones relacionadas con dispositivos intravasculares y otros dispositivos invasivos, infecciones de las vías biliares, peritonitis y meningitis. Una forma emergente de *Klebsiella* son los abscesos hepáticos piogénicos con o sin metástasis sépticas. Moreno, P.O.(2011).

Género *Escherichia*: Comprende solo una especie de importancia médica (*Escherichia coli*) y son capaces de producir infecciones del tracto urinario y entéricas tales como: diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico o extraintestinales (infecciones urinarias, septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, etc.).Muñoz, A.et.al.(2006).

6.3 Antibióticos

Son sustancias utilizadas para impedir el desarrollo de bacterias en el cuerpo humano suprimiendo su crecimiento y originando su destrucción. Por el tipo de actividad letal, se dividen en antibióticos bactericidas, estos actúan destruyendo a todas los microorganismos, siendo muy útiles en pacientes inmunocomprometidos y en infecciones graves, que producen septicemias. Antibióticos bacteriostáticos, inhiben transitoriamente la multiplicación bacteriana sin llegar a destruirlos, por lo que el huésped necesita de un sistema inmunitario en buen estado, para que el mismo logre controlar el proceso infeccioso. Núñez, F.B.et.al (2008).

6.3.1 β -lactámicos

Amplia familia de antibióticos que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis del peptidoglucano a partir de la inhibición de la transpeptidasas, conocida como proteínas ligadoras de penicilina (PBP). Este proceso en los Gram-positivos es facilitado por presentar gran cantidad de peptidoglucano, el cual posee una característica más hidrofílica. En cambio para algunos Gram-negativos el proceso se torna más difícil, puesto que presenta lipopolisacáridos en su membrana externa y en algunos casos carecen de porinas de alta permeabilidad lo que dificulta la penetración del fármaco dentro de la célula. Escalante, G.E. (2012).

6.3.2 Cefalosporinas

Constituyen uno de los grupos de antibióticos más conocidos en la actualidad dentro de los β -lactámicos, poseen baja toxicidad intrínseca e inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. Las cefalosporinas se clasifican en función de su actividad antibacteriana como: Cefalosporina de primera generación, Cefalosporina de segunda generación, Cefalosporina de tercera generación y Cefalosporina de cuarta generación todas con el propósito de actuar frente a bacterias Gram-positivas y Gram- negativas. Sabin, R. (2001).

6.3.3 Penicilina

Son un grupo de antibióticos utilizados en la terapéutica por poseer una importante actividad bactericida, presentan un núcleo químico común conocido como ácido 6-aminopenicilínico, que con diferentes modificaciones origina las distintas penicilinas. Su mecanismo de acción se da por inhibición de la biosíntesis de mucopéptidos de la pared celular, siendo más efectiva durante la multiplicación activa de la bacteria. Sánchez, S.L.et.al. (2004).

6.3.4 Carbapenémicos

Constituidos por antibióticos β -lactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las β -lactamasas, son altamente potentes contra bacterias Gram- negativas y Gram- positivas lo que los vuelve imprescindibles para el tratamiento de numerosas infecciones nosocomiales graves, incluso algunas de origen comunitario. Monge, M.K.et.al. (2013).

Familia de los Carbapenémicos

Imipenem

Es caracterizado por presentar un potente espectro de actividad bactericida contra la mayoría de patógenos Gram-positivos, Gram-negativos, aerobia y anaerobia inhibiendo la síntesis de la pared celular. Monge, M.K.et.al. (2013).

Doripenem

Muestra más actividad intrínseca que otros carbapenémicos en Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido y AmpC; *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter spp* y otros no fermentadores. Chinchilla, A.M, et.al. (2013).

Meropenem

Posee un amplio espectro con mayor actividad bactericida frente a las Enterobacterias, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomona aeruginosa*. Este antibiótico es menos activo contra *Estafilococos* y *Enterococos* que el imipenem. Sánchez, S.L. et. al (2004).

Ertapenem

Es el único carbapenem de la lista sin actividad reseñable frente a *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter*, por lo que su papel va dirigido a infecciones intrahospitalarias producidas por Enterobacterias BLEE+ cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido. Losa, F.F.(2013).

Mecanismo de Acción de los carbapenémicos

Estos antibióticos muestran una elevada selectividad por las diferentes enzimas de proteínas unidoras de penicilinas (PBPs), en bacterias Gram-negativas, el carbapenémico ejerce su función al atravesar la membrana externa a través de porinas inespecíficas denominadas OMPs (outer membrane protein). Una vez en el sitio, inhibe la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, ya que al unirse a residuos de serina que forman parte de las PBPs, impide que la pared bacteriana se ensamble adecuadamente, debilitándola y provocando la lisis de la célula bacteriana. La capacidad antimicrobiana del carbapenémico va a depender de la estructura y tiempo de acción de cada uno de ellos. Monge, M.K.(2013).

6.3.5 Monobactámicos

Fueron los primeros antibióticos β -lactámicos monocíclicos obtenidos de bacterias, aunque en la actualidad son producidos sintéticamente. El Aztreonam fue el primer antibiótico monobactámico disponible comercialmente, seguido por el carumonam y el tigemonan.

6.3.6 Aztreonam

Es un antibiótico bactericida que actúa sobre la síntesis de la pared celular; su espectro está limitado a microorganismos aerobios Gram-negativos tales como Enterobacterias, y otros microorganismos con resistencias múltiples. Está indicado fundamentalmente en infecciones por

Pseudomona aeruginosa y no posee actividad frente a Gram-positivos y anaerobios, por lo que preserva la flora normal del tracto digestivo y por consiguiente no produce diarrea. Sánchez, S.L.et.al.(2004).

6.3.7 Aminoglucósidos

Son antibióticos naturales o semisintéticos, de estructura heterocíclica, bactericidas de amplio espectro (con excepción de la espectinomicina). Se utilizan para tratar infecciones por bacterias aeróbicas Gram- negativas o en combinación sinérgica con antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared celular contra algunos Gram-positivos resistentes, como *Enterococcus spp.* Prat, S. (2004).

Mecanismo de acción

Actúan sobre bacterias sensibles principalmente en Gram-negativas aerobias, pasando a través de las porinas, luego son transportadas por moléculas de oxígeno hasta el sitio de acción, inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel de las subunidades 30_s de los ribosomas (encargados de la lectura del código genético), formando proteínas defectuosas no funcionales que modifican la traducción del ARNm.Rubio, O.D.(2012).

6.3.8 Quinolonas

Son un grupo de antimicrobianos sintéticos, de las cuales cabe destacar el ácido nalidixico y las quinolonas fluoradas, como: norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, cuyo espectro de actividad se centra en las bacterias Gram-negativas aunque se han ido ampliando sobre los Gram-positivos, anaerobios e incluso micobacterias con las nuevas fluoroquinolonas como moxifloxacino. Navarro, F. et.al.(2010).

6.3.9 Inhibidores de β -lactamasas

Son compuestos farmacológicos con poca actividad antimicrobiana intrínseca, pero inhibidores de muchas β -lactamasas, por lo que combinados a los antibióticos β -lactámicos restauran la propiedad antimicrobiana que estas han perdido debido a la presencia de las enzimas β -lactamasas. Estos son el ácido clavulánico, sulbactam y el tazobactam.

Mecanismo de acción de inhibidores de β -lactamasas.

Estos actúan por dos mecanismos:

- a) Ligándose de manera irreversible por su alta afinidad con el sitio catalítico de las β -lactamasas, previniendo de esta manera la hidrólisis de las penicilinas.
- b) Mediante la fijación directa a las PBP bacteriana, lo cual incrementa la actividad antibacteriana de la penicilina.

Es por tal razón que se les denominó en un principio antibióticos suicidas, ya que poseen inhibidores potentes de la mayor parte de betalactamasa plasmídica y algunas β -lactamasas cromosómicas. Nuñez, F.B. et.al. (2011).

6.4. La resistencia bacteriana puede ser natural o adquirida.

Resistencia Natural

Las bacterias poseen patrones propios de resistencia a los antimicrobianos, esta depende de funciones o estructuras codificadas generalmente en el cromosoma bacteriano. Se caracteriza por ser inherente a una especie en particular, ya que dichos microorganismos pueden perder los sitios blancos o poseer barreras naturales, evitando que el agente antibacteriano actúe al no poder alcanzar su objetivo. Es una propiedad innata de la bacteria y pueden estar involucrados uno o varios mecanismos de resistencia.

Resistencia Adquirida

Es un verdadero cambio en la composición genética de la bacteria de tal manera que si un antibacteriano alguna vez tuvo actividad sobre ella, al adquirir resistencia éste ya no es más efectivo. Este tipo de resistencia es muy frecuente debido al abuso masivo de los antibióticos.

La tolerancia debe ser considerada como un tipo de resistencia adquirida a pesar que el organismo permanece sensible a la droga. Freile, N.B et.al.(2008). Las bacterias pueden adquirir genes de resistencia de un microorganismo vecino, siendo o no este de la misma especie. Dicho intercambio genético puede darse durante tres procesos:

Transformación

El ADN es adquirido directamente a partir de una bacteria que ha liberado su material genético al exterior y es tomado por la bacteria receptora, dentro de ella el ADN podrá mantenerse como tal, cuando se trate de un elemento autónomo, o bien integrarse en el genoma del huésped por recombinación.

Transducción

Un bacteriófago interviene en el proceso, transfiriendo los genes de resistencia entre bacterias compatibles.

Conjugación

Vía principal de diseminación de genes de resistencia, entre las poblaciones bacterianas que consiste en la transferencia de genes entre dos células que están en contacto. Villanueva, D.K.(2010).

6.4.1 Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos β -lactámicos

- A. **Modificación enzimática del antibiótico:** Las bacterias producen enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico, haciendo que este pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son proteínas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos. De igual forma las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos, mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación.
- B. **Bombas de expulsión:** Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción, este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas.
- C. **Alteraciones del sitio de acción:** Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria, para interrumpir una función vital de esta, este

mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram- positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas (PBP). Tafur, J.D. et. al (2008).

- D. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, principalmente por cambios en las porinas, que son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Lo anterior puede llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplasmático. Apaza P.R. et.al.(2008).

6.4.2 Mecanismo de Resistencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Escherichia coli: Este microorganismo tiene la capacidad de producir enzimas β -lactamasas cromosómicas o extracromosómicas (mediadas por plásmidos). Confiere resistencia a los β -lactámicos excepto cefamicinas y carbapenémicos, además los plásmidos que codifican las BLEE portan genes de resistencia (transposones) a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol, es por esto que el fenómeno de resistencia cruzada es muy frecuente y el tratamiento de las infecciones producidas por esta cepa tiene una mayor dificultad. Algunos autores han demostrado en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*, que la presencia de β -lactamasas sumado a fenómenos de impermeabilidad o pérdida de porinas produce resistencia a carbapenem. Garcia, M. (2013).

Klebsiella pneumoniae: Las cepas de este género presentan, como única resistencia natural, la producción de una β -lactamasa de espectro ampliado (BLEA). Prácticamente todas las *Klebsiella pneumoniae* producen cromosómica y constitutivamente bajos niveles de esta enzima, se trata de SHV-1 (clase A de Ambler, grupo 2b de Bush). El espectro de actividad de esta β -lactamasa incluye amino y carboxipenicilinas, es por ello que a pesar de los bajos niveles de enzima producidos, *Klebsiella pneumoniae*, es naturalmente resistentes a ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), carbenicilina (CAR) y ticarcilina (TIC). Villar, E.H.et.al.(2014).

6.4.3 Resistencia adquirida a los β -lactámicos

a) Hiperproducción de β -lactamasa de Espectro Ampliado (BLEA)

Son producidas casi siempre por codificación plasmídica y transferibles a otras bacterias por conjugación. Dado a que estas β -lactamasa ampliaban el espectro de hidrólisis de las penicilinas, se les denominó β -lactamasas de Espectro Ampliado (BLEA). Estas actúan rompiendo el puente amida del anillo β -lactámico, por lo que el antibacteriano no puede unirse a las PBP, y no genera el impedimento de la síntesis de la pared celular. Casellas, J. M.(2011).

b) Hiperproducción de AMP-C.

Es denominada derrepresión, se trata de enzimas elaboradas por cepas de Enterobacterias, siendo el *Enterobacter spp* el género que tiene mayor significación clínica, particularmente *Enterobacter cloacae*. Las cepas salvajes productoras de AmpC, lo hacen a bajos niveles, pero cuando estas bacterias se exponen a β -lactámicos se induce su expresión y generan resistencia a la cefalosporinas de 1^{ra}, 2^{da}, 3^{ra} generación, cefamicinas, penicilinas, combinación con inhibidores de β -lactamasas y monobactámicos. Únicamente no se ven afectadas por las cefalosporinas de cuarta generación y carbapenémicos, a menos que posean otros mecanismos de resistencia como: pérdida de porinas, BLEE, carbapenemasas entre otros.

Según la localización y expresión del gen, las AmpC pueden ser: Cromosómicas inducibles, cromosómicas no inducibles constitutiva y plasmídicas inducibles, plasmídicas constitutivas. Rojas, D. D.(2009).

c) β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Son enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos, pero no las cefamicinas, ni los Carbapenémicos. Se encuentran mediadas generalmente por plásmidos y derivan de otras enzimas con menor espectro

hidrolítico. La aparición de las BLEE ha dificultado enormemente el tratamiento de numerosas infecciones bacterianas, porque estas cepas presentan, además de resistencia a la gran mayoría de los β -lactámicos, altas tasas de resistencia a antimicrobianos de otras familias. Diaz, M.A. et.al (2009).

6.5 Clasificación de las β -lactamasas

Han sido clasificadas de acuerdo a dos esquemas generales: la clasificación molecular de Ambler basada en la similitud de la secuencia de aminoácidos y la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros, que tiene en cuenta los perfiles del inhibidor y el sustrato. El esquema de Ambler clasifica a las β -lactamasas en 4 grupos nombrados con las letras de la A-D.

Clase A: penicilinasas (encontradas en *Staphylococcus aureus*), TEM-1, SHV-1, β -lactamasas cromosomales de *Proteus*, *Klebsiella* y carbapenemasas.

Clase B: Metalo β -lactamasas que requieren un ion bivalente para su actividad (Zinc²⁺).

Clase C: β -lactamasas usualmente tipo cromosomal, AmpC propia de la mayoría de Enterobacterias.

Clase D: β -lactamasas plasmidial tipo OXA.

Dentro de esta clasificación se encuentran las carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar la mayor parte de β -lactámicos, incluidos los carbapenémicos, las de clase B o Metalo- β -lactamasas por ejemplo: VIM o IMP no presentan actividad frente a aztreonam y su acción es inhibida con EDTA. Las de clase D tienen actividad frente a oxacilinas, siendo OXA-48 la más frecuentemente reportada y por último las clase A, que suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico y presentan una menor actividad frente a meropenem que a imipenem, de estas la KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) es la más ampliamente diseminada en todo el mundo en sus variantes KPC-2 y KPC-3. Jacoby, B.K. et.al (2010).

6.5.1 Resistencia a carbapenemes

Las enzimas carbapenemasas representan la familia más versátil de las β -lactamasas, ya que tienen la capacidad de hidrolizar carbapenémicos y β -lactámicos. Además poseen la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas y pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles.

6.5.2 Serino carbapenemasas

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

6.5.3 Carbapenemasas del tipo KPC, por *Klebsiella pneumoniae*

Son las más frecuentes en el mundo, presentan una importante actividad hidrolítica frente a prácticamente todos los antibióticos β -lactámicos, y solo son inhibidas parcialmente por el ácido clavulánico y el tazobactam. Estas confieren grados variables de resistencia a los carbapenemes y debido a su asociación frecuente con otros mecanismos de resistencia, las cepas portadoras aparecen como multirresistentes a los β -lactámicos y otras familias de antibióticos. Velásquez, J. et.al (2013).

6.5.4 Carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas)

Las carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas) se han caracterizado principalmente en *A. baumannii*, el espectro de actividad entre todas las oxacilinasas es bastante similar, puesto que hidrolizan débilmente imipenem y meropenem, no hidrolizan ni cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam, a excepción de OXA 27, y todas son predominantemente penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a oxacilina. Además, pueden o no ser inhibidas por el ácido clavulánico, a excepción de OXA 23 que es resistente.

A pesar de que hasta la fecha las oxacilinasas no han recibido tanta atención como las Metallo- β -lactamasas, es importante considerarlas como potencialmente peligrosas, aunque su actividad carbapenemasa es pobre, se incrementa si otros mecanismos de resistencia están presentes (como bombas de eflujo o disminución en la permeabilidad ocasionada por cambios en las porinas o por modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas). Chinchilla, P.A.et.al.(2013).

6.5.5 Metalo β-lactamasas (MBLs) o Carbapenemasas clase B

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

Existen dos tipos de MBL: Las residentes; que se encuentran codificadas como parte de la carga cromosómica de algunas especies bacterianas, y Las adquiridas; codificadas por genes heterólogos que se adquieren por transferencia genética horizontal, entre los más importantes desde el punto de vista de la relevancia clínica y la diseminación epidemiológica son los tipos IMP, VIM, SPM y NDM. Cornaglia, G.H. et.al (2011).

6.5.6 Enzimas β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) más destacadas: TEM, SHV, CTX-M y OXA.

- **TEM:** La enzima TEM-3 fue la primera BLEE tipo TEM descrita en 1984 fruto de una mutación puntual de la enzima TEM-2. Aunque la mayoría de β-lactamasas tipo TEM han sido descritas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, también se han observado en otros géneros de Enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Salmonella entérica* y *Providencia rettgeri*.
- **SHV:** Son pocos los derivados de SHV, algunas enzimas SHV presentan actividad hidrolítica preferente por Cefotaxima y ceftacidima (SHV-2 y SHV-12), otras hidrolizan más rápidamente la Cefotaxima, la ceftacidima o el aztreonam como el SHV-3 y las que muestran la preferencia por ceftacidima (SHV-4, SHV-6). La mayoría de SHV se han encontrado en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aunque estas enzimas se han descrito en, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.
- **CTX:** Descritas principalmente en *Escherichia coli*, aunque se han encontrado en otras Enterobacterias. Las cepas de *Escherichia coli*, a menudo presentan corresponsión a trimetropim-sulfametoxazol, tetraciclina, gentamicina, trobamicina y ciprofloxacino. La

presencia de estas enzimas, se han descrito en diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* y en zonas geográficas muy distintas, la mayoría de sus genes son de codificación plasmídica. Se cree que algunas de las β -lactamasas plasmídica tipo CTX-M derivan de la β -lactamasa cromosómica de *Kluyvera ascorbata* o *K cryocrescens* con las cuales muestran una alta homología.

- OXA: Presenta alta afinidad por la Oxacilina y la Cloxacilina y son poco inhibidas por el Ácido clavulánico. Se dividen en 9 grupos, dentro de las cuales algunas enzimas presentan actividad frente a las cefalosporinas de 3^{ra} y 4^{ta} generación y/o aztreonam. Estas β -lactamasas plasmídica de espectro extendido raras veces se han encontrado en Enterobacterias y son predominantes en *Pseudomona aeruginosa*. Villanueva, D.K. (2010).

6.6 Elementos genéticos de transferencia horizontal en Enterobacterias.

La transferencia horizontal parece tener un papel crucial en la adaptación bacteriana a nichos ecológicos específicos, en la diseminación y persistencia de la resistencia a antibióticos entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La transferencia horizontal está más favorecida por la proximidad entre microorganismos que comparten características genéticas como el tamaño del genoma o su contenido en G+C.

Plásmidos: Se componen de una región constante que posee los genes responsables de funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la transferencia, y una región variable donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas (resistencia a antibióticos, factores de virulencia, o producción de bacteriocinas). Amorim, D.A. (2010).

Transposones: Son secuencias de ADN que llevan información para una transposasa y en los extremos secuencias repetidas, conocidas como de inserción, en medio de esta secuencia puede encontrarse la inserción de genes de virulencia, como toxinas o genes de resistencia a antibióticos. Éstos se pueden integrar en el cromosoma de las bacterias o insertarse en fagos.

Integrones: Elementos de ADN móviles que pueden capturar genes de resistencia o virulencia, los cuales están en casetes y como acarrean una integrasa, pueden introducirse en el cromosoma, es por esta razón que los transposones y los plásmidos de bacterias; de esta manera, pueden replicarse y expresar la información que llevan. Lopez, A.M.(2011).

6.7. Epidemiología de las carbapenemasas

La prevalencia de la Enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE) primordialmente en *Klebsiella pneumoniae* en zonas de endemidad, puede variar entre el 20 y 40%. Inicialmente pareció causar infecciones adquiridas en los hospitales, sobre todo en pacientes de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Recientemente se ha extendido en diferentes contextos sanitarios, incluido los servicios de atención a largo plazo.

Varios investigadores han evaluado los factores asociados con un mayor riesgo, en Israel y han demostrado que la situación fundamental del huésped, tratamiento de antibiótico previo, y la estancia en la UCI, son factores de riesgo independientes para la colonización o infección por carbapenemasas, otros factores que se han asociados incluyen órganos sólidos y trasplantes de células madres, la presencia de un catéter biliar, múltiples dispositivos invasivos, antes de la cirugía y la presencia de heridas. La presión de selección de antibióticos puede ser un factor adicional que influye en la colonización con estos organismos. Estudios de casos y controles han demostrado que casi todas las clases de antibióticos pueden seleccionar para Enterobacterias Productoras de Carbapenemasa (CPE).

Dado a que las Enterobacterias forman parte de la flora entérica humana, una colonización prolongada de CPE significa el depósito más grande de pacientes colonizados, ejerciendo más presión de colonización que a su vez dará lugar a mayores tasas de transmisión de paciente a paciente. La transmisión cruzada se produce de manera más eficiente en los centros sanitarios donde las prácticas de control de infecciones son pobres.

En una unidad quirúrgica donde el cumplimiento de higiene de manos fue del 21%, la probabilidad de que un paciente sea colonizado por Enterobacterias productoras de carbapenemasa (CPE) fue de 7.1% por semana de hospitalización y la incidencia de nuevas

colonizaciones fue de 9.1/1.000 pacientes por día. Se estima que una porción de pacientes colonizados (10 a 30%) va a desarrollar infección por carbapenemasa, esta proporción esta probablemente relacionada con la severidad de la enfermedad de base y parece ser mayor en los pacientes inmunocomprometidos (paciente en quimioterapia de inducción para la leucemia mieloide aguda o post-trasplante alogénico de células madre). Tzouveleki, L.S.et.al (2012).

En los últimos 10 años, se reportó un incremento de Carbapenemasas en Enterobacterias, en E.E.U.U y Grecia reportándose una marcada endemicidad por *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasa, las metaloenzimas, también se han reportado en todo el mundo, con una mayor prevalencia en el sur de Europa y Asia, carbapenemasas del tipo de oxacilinasas-48 han sido identificados, en su mayoría, en los países Mediterráneos, Europeos y en India. Recientemente se han identificado Enterobacterias productores de Metallo-B-lactamasas-1 de Nueva Delhi, originales del reino unido, india, Pakistán y ahora en todo el mundo. Nordmann, P.et.al (2009).

6.8. Sistema automatizado VITEK.

Es un sistema automatizado para identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias en este sistema se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por CLSI. Romeu, B. (2010).

Trabaja a través de un sistema de tarjetas con micro pocillos que contiene sustratos, determina la susceptibilidad microbiana por CIM, utiliza estándares establecidos por la CLSI y tiene la capacidad de procesar 60 tarjetas. La identificación microbiana se da través de colorimetría avanzada.

Detecta bacilos Gram-negativos Enterobacterias y no fermentadores clínicamente relevantes, trabaja con una suspensión bacteriana de 0.5-0.63 McFarland en 3 ml de salina, identifica 135 especies y emite resultados entre $3 \leq 10$ horas, posee un sistema experto avanzado que valida automáticamente todos los resultados. Gómez. C.B.(2014).

6.9. Prueba de sinergia para la identificación fenotípica de carbapenemasas

Test de sinergismo con triple disco, utilizando ácido fenil borónico y ácido etilendiaminotetraacético.

Se fundamenta en la potenciación del halo de inhibición, que se genera alrededor del disco del antibiótico, cuando este se enfrenta a un disco cargado con un inhibidor de la acción enzimática. Por tanto, se considera resultado positivo cuando se observa una potenciación del halo de inhibición, generado entre ambos discos. Machado, M.F.et.al.(2010).

Los discos de Ácido Fenil Borónico son utilizados para la detección fenotípica de enzimas AmpC y carbapenemasas de clase A de Ambler, mediante la prueba de sensibilidad a los microbianos.

El disco de EDTA, es empleado en la detección fenotípica de Metallo- β -lactamasa (MBLs), por el método de triple disco, el cual consiste en colocar, sobre una placa de agar Mueller-Hinton inoculado con la cepa problema, un disco que contiene un agente quelante (EDTA, SMA, ácido dipicolínico o ácido 2-mercaptopropiónico) rodeado por un disco de imipenem (10 μ g) y otro de meropenem (10 μ g). Esta prueba es positiva si se observa un aumento del halo de inhibición o la presencia de una zona de inhibición entre el imipenem y/o el meropenem y el agente quelante. Machado, M.F..et.al.(2010).

Test de Hodge

Consiste en demostrar el crecimiento de una bacteria susceptible a carbapenémicos, alrededor de otra sospechosa de producir carbapenemasas, por la difusión de ésta en el medio de cultivo en el cual se ha colocado un disco con una concentración estandarizada, de alguno de los carbapenémicos. Si bien la sensibilidad de este test es buena, presenta falsos positivos en casos de altas prevalencias de enzimas tipo BLEE o AmpC con hiperproducción. De la Lastra, V. et.al (2010).

La inactivación del carbapenem (meropenem o ertapenem) de la carbapenemasa producida por la cepa problema, permite el crecimiento de *Escherichia coli* sensible (ATCC 25922) a los lados de la estría efectuada con la cepa problema. Moreno, O.P. (2013).

6.10. Método Molecular

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena a la Polimerasa, es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, dura varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células. Tamay, D.D.et.al.(2013)

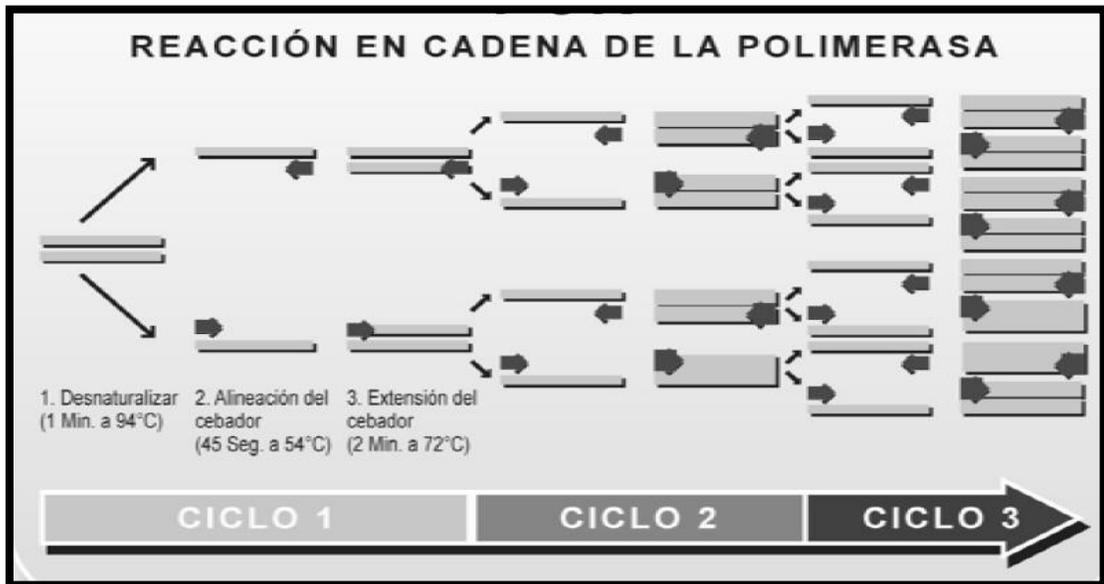
Etapas de cada ciclo de PCR

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

Hibridización: Annealing o apareamiento de los cebadores o “primers” a las regiones flanqueantes de la secuencia de ADN a amplificar, en el rango de 55-65°C (Estrada, 2013). La hibridación del cebador, inicia cuando la mezcla de reacción se enfría y los cebadores oligonucleótidos que se encuentran a los lados de la zona por amplificar, se hibridan con las hebras simples de la molécula de DNA molde. Koneman, W.E. et.al. (2008).

Extensión: Durante esta etapa la ADN polimerasa termoresistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de

72°C ya que es la temperatura a la que la “Taq polimerasa” alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica y después de 20 ciclos ya tenemos aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas molde iniciales ADN. Estrada, L.C.(2013).



Chinchilla,P.A.et.al.(2013)

6.11. Electroforesis en gel por campo pulsado

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas, consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso.

La separación de las macromoléculas depende de dos variables: carga y masa. Cuando una muestra biológica, como por ejemplo el ADN, se mezcla en una solución tampón y

se aplica a un gel, esas dos variables actúan conjuntamente. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como tamiz molecular, separando las moléculas en función de su tamaño. Durante la electroforesis, las macromoléculas son empujadas a través de los poros, dependiendo su tasa de migración por el campo eléctrico de los siguientes factores: Fuerza del campo, Tamaño y forma de las moléculas, Hidrofobicidad relativa de las muestras, Fuerza iónica y temperatura del tampón en que se desplazan las moléculas. Somma, M.et. al.(2007)

7. DISEÑO METODOLÓGICO

Área de estudio

El estudio se realizó en el área de bacteriología del Hospital Antonio Lenin Fonseca, ubicado en Managua. Siendo este un hospital de referencia, donde se atienden pacientes de todos los departamentos por contar con una diversidad de especialidades.

Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en el cual se llevó a cabo la identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan de β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), en cepas aisladas de procesos infecciosos en los pacientes internos del hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de Abril - Julio 2014.

Universo

El universo estuvo conformado por 730 cepas de Enterobacterias, aisladas de pacientes atendidos por procesos infecciosos en el hospital Antonio Lenin Fonseca, las cuales representa el 100% del universo.

Muestra

La muestra de estudio fue de 13 cepas de Enterobacterias que equivalen al 1.8% del universo de las muestras remitida al área de bacteriología del hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de abril a julio 2014.

Tipo de muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

Para la selección de la muestra se utilizaron los siguientes criterios

Criterios de inclusión:

1. Pacientes atendidos en la consulta interna del Hospital Antonio Lenin Fonseca y que tuviesen procesos infecciosos.
2. Que las cepas presentaran halos de inhibición ≤ 22 mm para imipenem.

Criterios de exclusión:

1. Todas las cepas contaminadas.

Recolección de datos

Se solicitó autorización para el acceso a los expedientes, que el hospital lleva de los pacientes que presentan β -lactamasa y que son sospechosos de carbapenemasa, de donde fueron extraídos los datos de cada paciente.

Procesamiento y Análisis

La información fue extraída de registros de laboratorio y se aseguró que las muestras fueran previamente procesadas, por el hospital Antonio Lenin Fonseca en el programa WHONET Versión 5.6.

El Transporte de las cepas, del hospital Antonio Lenin Fonseca al laboratorio del POLISAL, se realizó en caldo leche, en microviales de 1500 ul y sellado con glicerina, cada muestra con su respectivo código, con el cual fueron procesadas en el hospital, almacenándolas a una temperatura de -4 a -20 °C.

Se realizó el método de Kirby Bauer, evaluando la sensibilidad de las cepas al imipenem, ya que según los protocolos del CLSI, un halo para imipenem ≤ 22 mm es sospechoso de la presencia de carbapenemasa. Posteriormente fueron transportadas en caldo leche al hospital Metrópolis Xolotlán “Solidaridad” para su respectivo análisis.

Se realizó control de calidad al caldo leche, en agar sangre de carnero, con el cual confirmamos que nuestro caldo estaba libre de contaminantes.

- 1) La identificación del género, especie y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el sistema VITEK 2 compact.

Para la preparación del inóculo, se tomó una UFC de MacConkey de la cepa problema, luego se realizó una suspensión homogénea en un tubo de ensayo

conteniendo 3ml de solución salina al 0.45%, para las dos tarjetas restantes se pasaron 145ul en tubos con 3ml de solución salina, posteriormente ajustamos la turbidez en el equipo DenSiCheK Plus al del estándar 0.5-0.63 de McFarland, que es con la que trabaja el VITEK 2.

Se procedió a montar en tres tarjetas de plástico (GN, AST -XN06 y AST- GN69), se utilizó una escala McFarland para cada tarjeta, se procesó en el VITEK, donde cada tarjeta es llenada por el equipo con el inóculo bacteriano estandarizado, mediante una bomba de vacío y luego las tarjetas son selladas herméticamente, se introducen a un incubador a 35°C y cada 10 minutos el sistema hace una lectura y se mide la concentración del inóculo bacteriano. Cada tarjeta tiene un pozo control positivo de crecimiento y es en este pozo, donde se construye una curva normal de crecimiento bacteriano.

Se utilizaron las siguientes tarjetas:

- **GN: 64** pruebas bioquímicas
- **AST XN06:** AN, ATM, CF, CTX, CTT, FOX, CPD, CZX, CXM, DOR, MEM, MXF, NA, NOR, PIP, TE, TIC, TCC, TGC.
- **AST GN69:** AMC, AM, SAM, CZ, FEP, CAZ, CRO, CIP, ETP, GM, IPM, LEV, FT, TZP, TM, SXT.

Control de calidad de las tarjetas

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 35218
- *K. Pneumoniae* ATCC 700603

Control de calidad de MacConkey

<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25923			
lactosa	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Crecimiento
Positivo	18 hrs	35°C	Excelente
<i>Proteus mirabilis</i>			
Negativo	18 hrs	35°C	Excelente

2) Tets de Sinergia con ácido borónico

Se preparó la escala McFarland 0.5 de las cepas a evaluar a partir de Mueller-Hinton de 18-24 horas; se tomó una UFC de colonias con un asa recta y se realizó una suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85%, ajustamos la turbidez del inóculo a la escala 0.5 McFarland.

Se inculó sobre la superficie del agar Mueller-Hinton en tres direcciones, se dejó secar la placa por 5 minutos, se colocó un disco de Ácido Aminofenilborónico de 300ug a 1,5 cm entre un disco de IMI y un disco de MEM, se incubó a 35°C en aerobiosis durante 16-18 horas.

Un resultado positivo se evidencia por una sinergia o deformación de los halos (efecto huevo) en cualquiera de los dos antibióticos hacia el ácido borónico, este indicaría la presencia de enzimas clase A y un resultado negativo no presenta sinergia o deformación de los halos.

3) Test de sinergia con EDTA

Se preparó una suspensión 0.5 McFarland de las cepas ya purificadas a evaluar a partir de Mueller-Hinton de 18-24 horas, se tomó una UFC con un asa recta y se realizó una suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85%, se ajustó la turbidez del inóculo a la escala 0.5 McFarland.

Se inculó sobre la superficie del agar Mueller-Hinton en tres direcciones, se dejó secar la placa por 5 minutos, colocamos un disco de EDTA de (10ug) a 1,5 cm entre un disco de IMI y un disco de MEM, se incubó a 35°C en aerobiosis durante 16-18 horas.

El resultado positivo se evidenció por la sinergia o deformación de los halos (efecto huevo), en cualquiera de los dos antibióticos hacia el EDTA, indicando la presencia de Metallo- β -lactamasas y un resultado negativo no presenta sinergia o deformación de los halos.

Control de calidad de Mueller Hinton

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC- 29212				
PH	Profundidad	Tiempo de incubación	Temperatura incubación	Timina/Timidina
7	4.5	18 hrs	35°C	32mm
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC-27853				
7	4.5	18 hrs	35 °C	Ca* y Mg*
				19mm

4) Test de Hodge utilizado como prueba complementario.

Se preparó una suspensión 0.5 McFarland de la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 en solución salina al 0.85%, se inoculó en la superficie del agar Mueller-Hinton en tres direcciones, se dejó secar la placa por 5 minutos, seguidamente se colocó un disco de IMP (10ug) en el centro del agar, se tomó una colonia de un cultivo de 18 a 24 horas de los aislamientos a evaluar y se estrió desde el borde del disco hacia la periferia, incubando a 35°C en aerobiosis durante 16-18 horas.

Un test de Hodge positivo se evidencia por el crecimiento de ATCC de *Escherichia coli* en el punto de intercepción entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa problema, formando una hendidura en la parte proximal del disco y un test negativo no presenta crecimiento en el punto de intercepción. Cárdenas, R.E. (2014).

Interpretación según Sinergia con EDTA, Acido fenil Borónico y test de Hodge complementario

- a. Inhibición con EDTA y Test de Hodge positivo: Alta sospecha de carbapenemasa de clase B (VIM, IMP, NDM).
- b. Inhibición con APB y Test de Hodge positivo: Alta sospecha de carbapenemasa de clase A (KPC).

- c. Inhibición con EDTA y Test de Hodge negativo: Sospecha de carbapenemasa de clase B que, con frecuencia, pueden dar un falso negativo en el test de Hodge.
 - d. Ausencia de inhibición con EDTA+ Test de Hodge negativo: No producción de carbapenemasa. Cárdenas, R.E. (2014).
- 4) El Reaislamiento, Extracción, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Convencional y Electroforesis por campo pulsado en gel de agarosa, se realizó en el laboratorio de Biotecnología, ubicado en el edificio del POLISAL de la UNAN-MANAGUA.

Reaislamiento y Extracción de ADN

Las cepas y los controles se reaislaron en agar sangre por 24 horas a 37°C, se realizó una suspensión de colonias de cada cepa en microviales que contenían 100ul de agua sigma, se mezcló en vórtex, seguidamente se llevó ebullición por 10 minutos, se bajó la temperatura en hielo por 5 minutos, se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm, seguidamente se separó de cada vial 70ul del sobrenadante y se dispensó en otro vial estéril.

Reacción en cadena de la polimerasa

Para ello se utilizó un Termociclador de PCR, marca Eppendorf AG, Modelo: 22331, Número de serie: 5341-005452, Voltaje: 100-130, Potencia: 800 watt, Frecuencia: 50/60 H. Para la amplificación del ADN molde se utilizó puRe Taq Ready-To-Go PCR beads, la concentración corresponde a Tris- HCl 10 mM, (pH 9.0), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPa 200 uM y de Taq polimerasa 2.5 ul.

Secuencias de iniciadores y tamaño del producto amplificado

Iniciadores	Secuencias 5'-3'	Gen	Tamaño	Condiciones del Termociclador
SHV-F	CTT TAT CGG CCC TCA CTC AA	SHV	273 pb	<p>Desnaturalización 94°C por 5min;;1 ciclo</p> <p>94°C 30 seg-50°C 30 seg-72°C 60 seg ; 30-35 ciclos</p> <p>Extensión final: de 72°C por 10 min; 1 ciclo</p>
SHV-R	AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG			
TEM-F	CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA	TEM	445 pb	
TEM-R	ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT			
CTX-F	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	CTX	593 pb	
CTX-R	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG			
OXA-F	ACACAATACATATCAACTTCGC	OXA	813 pb	
OXA-R	AGTGTTTAGAATGGTGATC			

Por cada Microvial de PCR se agregaron las cantidades de la mezcla de PCR como se detalla a continuación en el siguiente cuadro. Posteriormente se llevaron al Termociclador por un periodo de 1 hora y 30 minutos, donde se realizaron un total de 30 ciclos para la obtención del ADN amplificado.

Mezcla de PCR Material	Ul por reacción	Concentración final
Bla CTX-Mf 10 uM	2 ul	0.2 uM
Bla CTX-Mr 10 uM	2 ul	0.2 uM
Bla TEM-Mf 10 uM	2 ul	0.2 uM
Bla TEM-Mr 10 uM	2 ul	0.2 uM
Bla SHV -f 10 uM	2 ul	0.2 uM
Bla SHV- f 10 uM	2 ul	0.2 uM
Bla OXA- f 10 uM	2 ul	0.2 uM
Bla OXA-r 10 uM	2 ul	0.2 uM
Agua MilliQ	7 ul	
ADN molde	2 ul	
VT	25 ul	

Preparación de gel de agarosa al 1%

Se pesó 1.5 gr de agarosa, se disolvió en buffer (TBE 0.5X), seguidamente se llevó a un microondas un periodo de 3 a 5 minutos, transcurrido este periodo de tiempo la disolución se pasó a un recipiente que contenía agua para bajar la temperatura hasta un punto que fuese soportable al tacto, se agregó 12ul de bromuro de etidio, mezclándose de manera circular.

Preparación de la cámara de corrida

Se dispensó la disolución de agarosa lentamente en la cámara de corrida por uno de los extremos de la bandeja, se dejó polimerizar, seguidamente se le agregó buffer TBE 0.5X hasta cubrir el gel, posteriormente se procedió a montar el marcador, los controles y las muestras. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se graduó el voltaje a 120 v, para la corrida de las muestras por un periodo de 45 minutos.

Los Genes investigados fueron: CTX, TEM, SHV y OXA, siguiendo el procedimiento de Pitout, J.D.et.al.(2004). Los genes se expusieron a luz ultravioleta, fueron analizados según su peso molecular y fotografiados, Se utilizó una cepa control positivo de *Escherichia coli* ATCC 25922.

La información recopilada de los registros de laboratorio y los resultados de los análisis fueron procesados en Excel 2010, el informe final se realizó en Word 2012.

8. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLES	SUB-VARIABLES	INDICADORES		VALORES	CRITERIOS
Sistema VITEK	Identificación Bacteriana	64 pruebas colorimétricas		Enterobacterias	135 Especies
				No Fermentadores	
	Perfil de Resistencia	Cefalosporinas	Cefalotina	SI/NO	Sensible
			Cefuroxima		
		Ceftazidima			
		Ceftriaxona			
		Cefepime			
	Cefamicinas	Cefoxitina			
	Carbapenem	Monobactámicos	Meropenem	SI/NO	Intermedio
			Imipenem		
Ertapenem					
Fluroquinolonas	Aztreonam	Ácido Nalidixico	SI/NO	Intermedio	
		Ciprofloxacino			
		Levofloxacino			

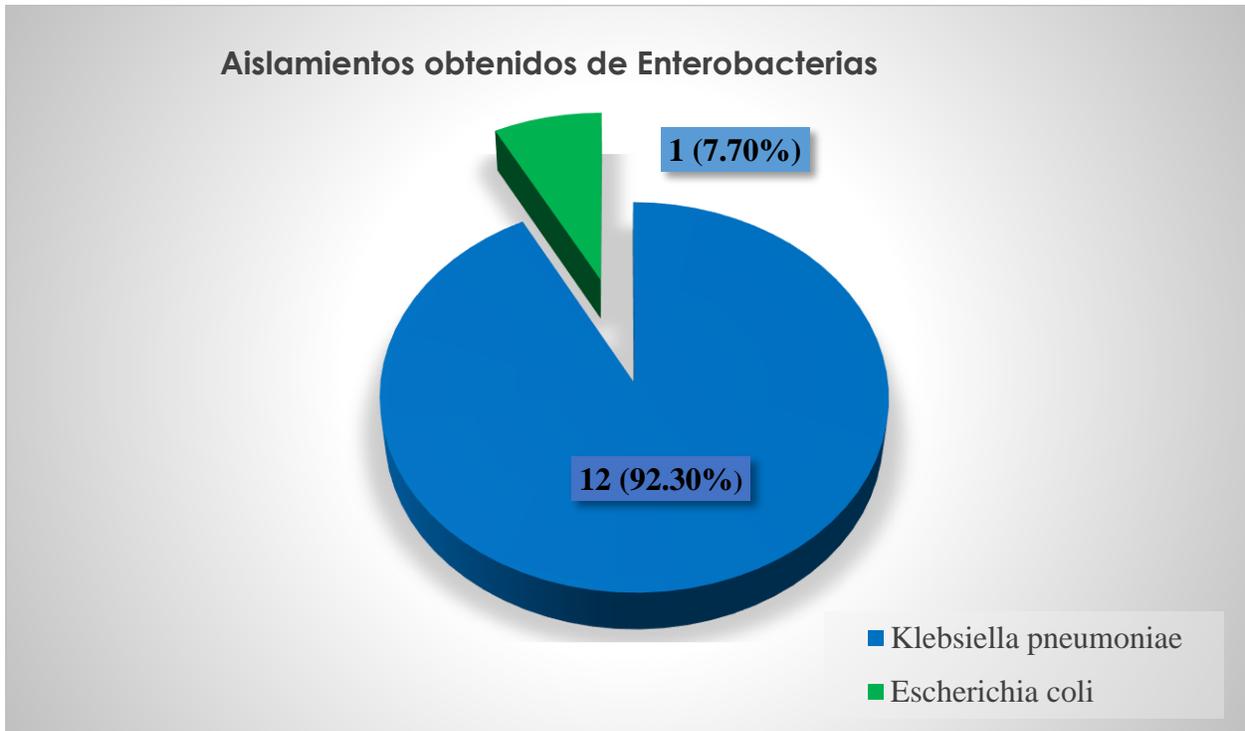
Identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de Carbapenemasa y genes que portan β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE).

			Norfloxacino		
		Aminoglucósidos	Amikacina Gentamicina		Resistente
		Glicilciclinas	Tigeciclina		
		Nitrofuranos			
		Sintéticos	Nitrofurantoina		
		Cotrimoxazol	Trimetropim/Sulfametoxazol		
Test de Sinergismo		Utilizando Ácido Borónico		Sinergismo Positivo	
		Utilizando EDTA		Sinergismo Negativo	
Técnica de PCR		Gen blaCTX Gen blaTEM Gen blaSHV Gen blaOXA		SI/NO	

Según Lineamientos de la CLSI 2014

9. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Grafico 1. Número de aislamientos con halos iguales o menores a 22mm para imipenem en cepas del Hospital Antonio Lenin Fonseca analizadas en los meses Abril – Julio 2014.



Fuente: Resultados de Laboratorio.

Se aislaron 13 cepas sospechosas de Carbapenemasas con halos ≤ 22 mm para Imipenem, siguiendo los lineamientos del CLSI 2,014. *Klebsiella pneumoniae* se presentó con mayor frecuencia en 12 cepas, y *Escherichia coli* en una cepa.

Klebsiella pneumoniae se obtuvo con mayor frecuencia, debido a que este microorganismo está muy adaptado al ambiente hospitalario y sobrevive mucho tiempo en las manos del personal de salud, lo que facilita su transmisión entre personas, como en diferentes sitios, ya que este microorganismo es tolerante a la desecación en el medio, sobrevive en la piel debido a su cápsula hidrofílica, presenta adhesinas y fibrinas que le permiten adherirse a la superficies y mantener el contacto con el huésped, posee una endotoxina que facilita su multiplicación en los tejidos del hospedero. Incluso aparece implicado en procesos de origen comunitario, principalmente en pacientes que ya han sido previamente hospitalizados, adquiere con cierta facilidad plásmidos

conjugativos, que en la mayoría de los casos, portan genes que codifican resistencia para múltiples antimicrobianos altamente estables.

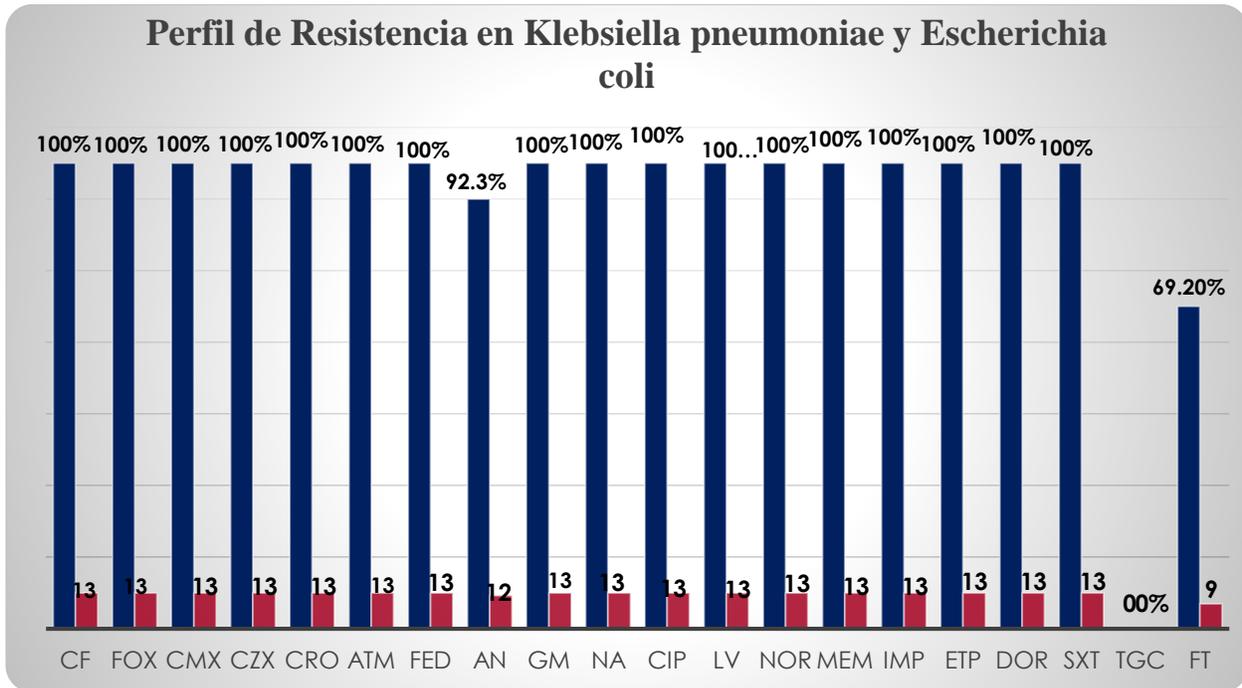
Escherichia coli, se presentó en menor frecuencia en nuestra investigación, debido a que pertenece a la flora normal, por ende prevalece más en los pacientes de la comunidad y afecta en menor proporción a nivel hospitalario, se puede prevenir usando las normas de higiene.

El simple hecho de que tenga una frecuencia baja, no significa que no tenga relevancia, ya que en Latinoamérica, es el segundo microorganismo causante de infecciones nosocomiales después de *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo hay estudios de hospitales que reflejan que *Escherichia coli* tiene mayor prevalencia que *Klebsiella pneumoniae*.

Nuestros resultados difieren con un estudio realizado en Guatemala Gordillo R.M.et.al. (2012), donde *Escherichia coli* fue aislado como el principal microorganismo causante de infecciones intrahospitalarias y *Klebsiella pneumoniae* como el segundo.

Se relaciona con un estudio en Cuba realizado por Martínez, M.G. (2011), donde de 139 cepas, fueron aisladas 71 de *Klebsiella pneumoniae* y 68 de *Escherichia coli*, predominando *Klebsiella pneumoniae*.

Gráfico 1.1. Perfil de resistencia antimicrobiana en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, analizadas en los meses Abril a Julio del 2014.



Fuente: Resultados de Laboratorio.

CF: Cefalotina, FOX: cefoxitina, CMX: cefuroxima, CAZ: ceftazidime, CRO: ceftriaxone, ATM: Aztreonam, FEP: Cefepime, AN: Amikacina, GM: Gentamicina, NA: Ácido Nalidixico, CIP: ciprofloxacina, NOR: Norfloxacina, LV: Levofloxacina, ETP: Ertapenem, DOR: Doripenem, IMP: Imipenem, SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol, TGC: Tigeciclina, FT: Nitrofurantoina.

La sensibilidad antimicrobiana se determinó mediante el sistema VITEK 2 compact, donde se encontró que las 13 cepas son resistente a la mayoría de los antibióticos β-lactámicos; cefalotina, cefotaxima, cefuroxima, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona y aztreonam, a las fluoroquinolonas (ácido nalidixico, ciprofloxacina, levofloxacina y norfloxacina), a los carbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem), a trimetoprima/ sulfametoxazol; a 12 son resistentes a los aminoglucósidos amikacina y 13 a gentamicina, y 9 a nitrofurantoina. Las 13 mostraron sensibilidad a tigeciclina.

Nuestros resultados no difieren de un estudio realizado en Nicaragua por Ávila, A.J.(2012), donde las cepas del hospital Antonio Lenin Fonseca presentaron resistencia a la mayoría de los antibióticos, mostrando sensibilidad total a colistina y en menor medida a amikacina.

Otro estudio en Buenos Aires Argentina , en el 2012 de *Klebsiella pneumoniae* revela resistencia a betalactámicos, fluroquinolonas, aminoglucósidos, conservando sensibilidad a colistina y tigeciclina. Estos antibioticos estan indicados en complicaciones de la piel y tejidos blandos. Córdovaa, E.et.al.(2012).

Un análisis de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* de Metallo- β -lactamasa tipo VIM en España, ya mostraba en el 2005 una cierta similitud con nuestros datos, resistencia a Imipenem, Meropenem, ciprofloxacino, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, gentamicina, amikacina y trobamicina. Lavilla, S.et.al.(2005).

Se aisló una cepa de *Escherichia coli* con sensibilidad a tigeciclina, este perfil es igual presentado por las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, lo que indica que ambas especies bacterianas han adquirido los mismos mecanismos de resistencia. Se relaciona con los datos aportados por Avila, A.J.(2012) en cepas de *Escherichia coli* del Hospital Roberto Calderón, donde se encontró resistencia a la mayoría de los antibióticos y sensibilidad total a colistina, en nuestro estudio no se incluyó colistina, por que no contabamos con este antibiótico, pero es un farmaco efectivo en infecciones por multiresistentes, localizadas y generalizadas.

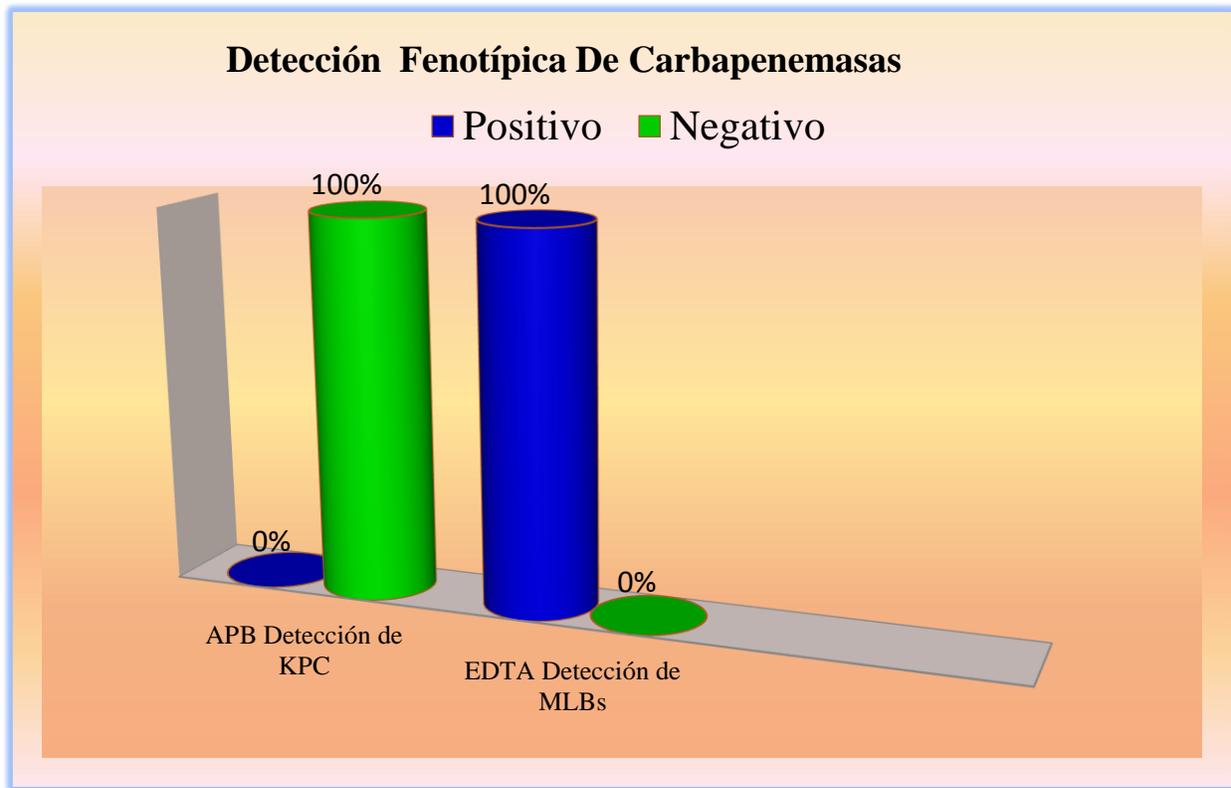
El Centro Nacional de Referencia de Bacteriología en Costa Rica a inicios del 2014 aisló una cepa de *Escherichia coli* procedente de Nicaragua la cual presento resistencia a los β -lactámicos, también a ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol y sensibilidad a nitrofurantoina. CNRB, (2014).

En todos lo aislamientos la única opción terapéutica es tigeciclina, se considera como una potencial alternativa frente a los carbapenemasa, esta indicada en el tratamiento de infecciones complicadas de piel y tejidos blandos e Infecciones intra-abdominales. Su excreción se da por

vía biliar, lo que limita su indicación en infecciones urinarias, debido a la baja concentración de fármaco alcanzado. Seral, C.et.al.(2012).

La problemática de las infecciones por microorganismos multirresistente en los hospitales del País, es posible que este asociada a la presión ejercida por el uso indiscriminado de los antibióticos y la falta de un buen control de infecciones, estos factores van de la mano con las altas estancias en el hospital y el hacinamiento, lo que conlleva a la fácil diseminación de las bacterias, tomando en cuenta que no se practican las medidas correctas de contacto entre cada paciente.

Grafica 2. Análisis fenotípico de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en cepas remitidas del Hospital Antonio Lenin Fonseca en los meses de Abril a Julio del 2014



Fuente: Resultados de Laboratorio.

IMP: Imipenem 10ug, MEM: Meropenem 10 ug, EDTA: Etilen-diamino-tetra-acetico 10ug, APB: Ácido Fenil Borónico APB 300 ug.

Se realizó la detección fenotípica de enzimas carbapenemasas tipo KPC, por medio del test de sinergismo con ácido borónico (APB), resultando negativo a los 13 aislamientos y se buscó enzimas de tipo Metallo- β -lactamasas, por medio del test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dando un resultado positivo al 100% de los aislamientos. Al comparar entre los resultados de las dos pruebas, se observa que existe una buena correlación y se puede concluir que los 13 aislados son resistente a los carbapenemes, por producción de carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa. Se realizó el método de hodge para complementar los resultados, el cual dio positivo a las 13 cepas.

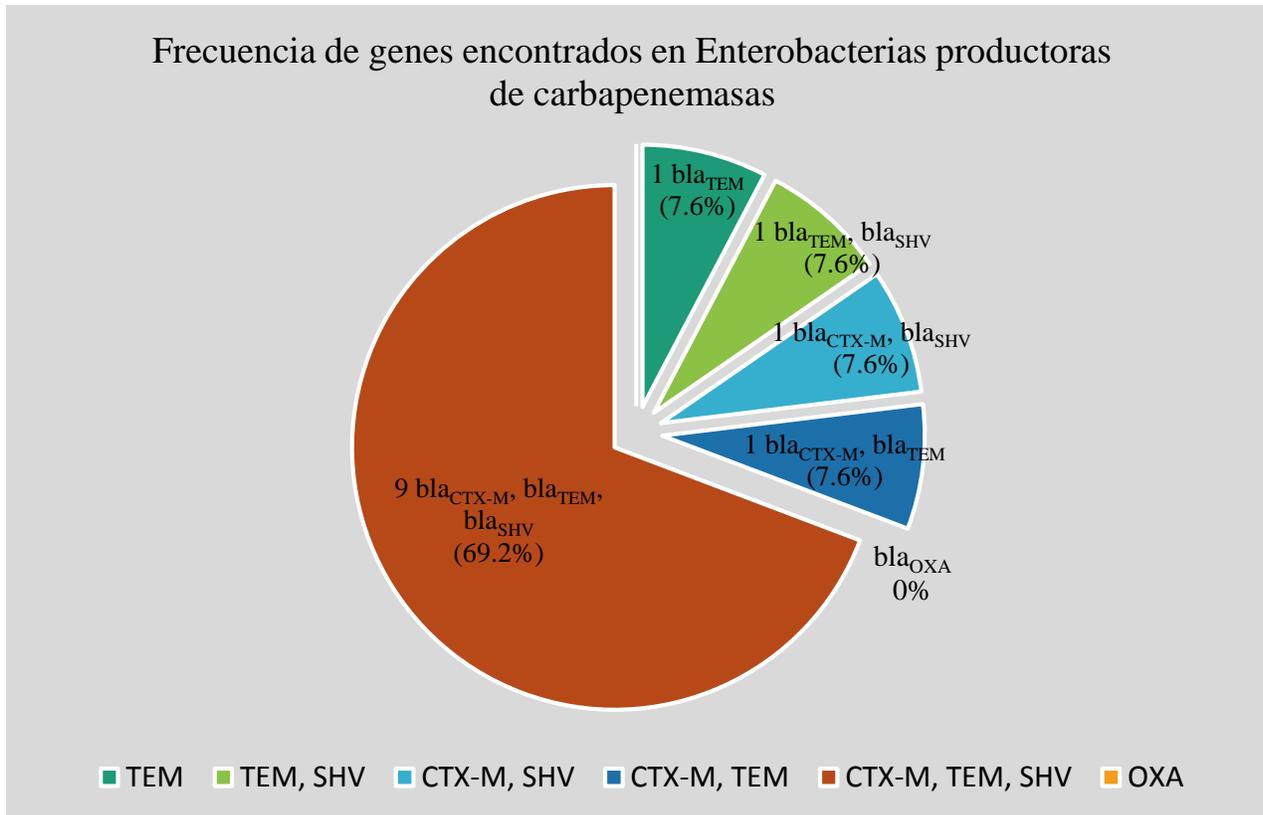
Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Bora. A. (2014), donde fueron analizados 216 aislamientos, 41 eran de *Escherichia coli* y 185 de *Klebsiella pneumoniae*, donde se sospechaba de un total de 39 aislamientos como productor de carbapenemasa, curiosamente se encontró que todos los sospechosos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resultaron ser positivos al método de hodge y al método de discos combinados con EDTA y el total de los aislamientos con Metalo- β -lactamasas eran resistentes a múltiples antimicrobianos.

Un estudio en Guatemala por Chinchilla. P.A.Et.al, (2013), donde fueron analizadas 118 cepas de Enterobacterias, de las cuales el 58% fueron *Escherichia.coli* y 42% *Klebsiella pneumoniae* , los resultados fenotipicos por el metodo de Kirby Bauer, demostraron que la presencia de Metalo- β -lactamasas (MBLs) fue superior con un 33%, a la de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas (KPC) con un 2.5% , sobre la totalidad de las muestras. Según la literatura las carbapenemasas tipo KPC se encuentran en mas del 50% de los aislamientos de Enterobacterias, lo que las convierte en las carbapenemasas mas frecuentes en el mundo, no obstante en Guatemala la carbapenemasa de mayor frecuencia es la de tipo MBLs.

Los tres tipos de MBLs que se han encontrados en *Klebsiella pneumoniae* también se han identificado en numerosas ocasiones en otras especies de Enterobacterias, incluyendo *Escherichia coli* (VIM, IMP, NDM), las Metalo- β -lactamasas poseen actividad contra los carbapenemes, no hidrolizan los monobactámicos como el aztreonam, son inhibidas por quelantes como el EDTA, además de esto las M β Ls no son inhibidas por los antibióticos como: ácido clavulánico, sulbactan y tazobactan. Tzuvelekis. L.S.et.al. (2012).

La OMP y la OPS en el 2011 emitieron la alerta de la circulación de una nueva carbapenemasa tipo Metalo- β -lactamasa llamada “New Delhi”, diseminada tanto en distintas especies bacterianas como a nivel geográfico, la OMS subraya la importancia de reforzar la vigilancia y establecer estrategias de control para prevenir la diseminación de este mecanismo de resistencia.

Grafico 3. Genes BLEE encontrados en Enterobacterias productoras de Carbapenemasa, aisladas de procesos infecciosos en pacientes internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca, en los meses de Abril a Julio del 2014.



Fuente: Resultados del Laboratorio.

El grafico muestra los genes BLEE, determinados a través del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa, en las cepas productoras de carbapenemasas, en el cual 9 de las trece cepas presentaron los tres genes (TEM; SHV y CTX), 3 de ellos presentaron las combinaciones (TEM, SHV) y (TEM, CTX), (CTX y SHV), una solo un gen (TEM) y el gen OXA no se presentó en ninguno de los aislamientos. Estos datos demuestran una vez más que, la presencia de BLEE no excluye la presencia de carbapenemasa, ni la presencia de carbapenemasas no excluye la presencia de BLEE.

Los genes expresados por estas cepas estudiadas en el HALF coinciden con un estudio realizado en León por, Amaya, E.et.al. (2008), donde de 26 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 23 de ellas presentaron los tres genes simultáneamente y difieren en tres cepas, ya que dos de ellas

presentaron un solo gen y una no presento ningún gen; En este estudio no incluyeron *Escherichia coli*. Estos datos indican que la multiresistencia sigue predominando en nuestro país desde que se realizó este estudio, lo cual tiene gran relevancia clínica debido a que los pacientes se están quedando sin opciones terapéuticas.

En otro estudio realizado en Brasil por Adriane et.al en el 2012, fueron aisladas 24 cepas 15 fueron no productores de BLEE por el método de doble disco, pero todas presentaron al menos uno de los tres genes, se observaron combinaciones como blaSHV y blaCTX-M , blaSHV y blaTEM, y la combinación de los tres genes se dio en 5 cepas, lo cual indica que no solo Nicaragua como país en vía de desarrollo tiene esta problemática, sino también países desarrollados, el hecho de que *Escherichia coli* no se incluya en estos estudios citados no significa que no sea una amenaza para la salud de los pacientes, tiene mucha relevancia a nivel hospitalario y en la comunidad. La prevalencia de BLEE en *Klebsiella pneumoniae* es más frecuente oscila entre 45.5% – 51.9% y *Escherichia coli*, en 8.5 – 18.1%, respectivamente. Abreu, S.et.al. (2014).

El perfil de resistencia concuerda con el perfil genético, debido a que el gen SHV tiene actividad solo contra penicilinas de amplio espectro (ampicilina, ticarcilina, piperacilina), pero por mutaciones puntuales su efecto ha sido ampliado a cefalosporinas de tercera generación, TEM hidroliza penicilina y cefalosporinas de primera generación como Cefazolina, CTX-M tiene actividad hidrolítica frente a cefotaxima, hidrolizan también Ceftazima y Cefepimas, en este gen la actividad frente a aztreonam es variable. Estas enzimas están asociadas con plásmidos transferibles, que codifican frecuentemente resistencia transferida a aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y trimetoprim-sulfametoxazol. Álvarez, H.E. (2009).

Los datos encontrados en este estudio son de mucha relevancia, ya que cada año mueren millones de personas, a causas de una infección por bacterias multiresistentes, la Organización Mundial de la Salud y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), estiman que las bacterias resistentes a los antibacterianos son responsables en Europa de alrededor de 400.000 infecciones, generando 2,5 millones de días adicionales de hospitalización y 25.000 muertes por año, con un gasto superior a los 1.500 millones de euros,

por los costos de la atención sanitaria. Según el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Estados Unidos, cada año mueren en ese país más de 23.000 personas por infecciones causadas por bacterias resistentes, y generan unos costes sanitarios alcanzando los 20.000 millones de dólares. Farmacología.(2014).

10. CONCLUSIONES

1. En el análisis por el sistema VITEK 2 Compact se identificaron 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y una de *Escherichia coli*, en el perfil de sensibilidad se encontró que las 13 cepas son resistente a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos (cefalotina, cefotaxima, cefuroxima, ceftazidima, cefepime, ceftriaxona y aztreonam); fluoroquinolonas (ácido nalidixico, ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacino); carbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem), y trimetropim/ sulfametoxazol; 12 son resistentes a los aminoglucósidos amikacina y 13 gentamicina) y 9 a nitrofurantoina. Las 13 cepas mostraron sensibilidad a tigeciclina.
2. En las pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas, el test de sinergia con ácido borónico dio negativo en los 13 aislamientos, descartando la presencia de enzimas KPC y en el test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), todas las cepas resultaron positivo, indicando la presencia de enzimas tipo Metallo- β -lactamasas y se realizó el test de Hodge como método complementario, donde se encontró que las 13 cepas estudiadas dieron positivo.
3. En el análisis genotípico por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, se encontró que 9 de los 13 aislamientos presentaron tres genes de BLEE (CTX, TEM y SHV), este perfil fue el predominante, las cepas restantes presentaron las siguientes combinaciones (CTX y SHV), (TEM y SHV), (CTX y TEM), (TEM) y el gen OXA no se presentó en las 13 cepas, confirmando que la presencia de BLEE no excluye la presencia de carbapenemasa, ni la presencia de carbapenemasas no excluye la presencia de BLEE.

11. RECOMENDACIONES

Al Ministerio de Salud

1. Mantener la vigilancia activa a la resistencia antimicrobiana.

Al Hospital

2. Darle importancia y seguimiento a los hallazgos en el laboratorio.
3. Abastecer al laboratorio de materiales necesarios para la detección de mecanismos de resistencia.

Al Personal del Laboratorio

1. Elaborar documentos de forma periódica sobre la resistencia bacteriana y entregarlos al comité de infecciones intrahospitalarias, para que exista un control de la evolución que este problema está teniendo en las distintas áreas del hospital.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

1. Divulgar la información de este tipo de estudios, para instruir a los estudiantes de la importancia que tiene el buen uso de los antimicrobianos.
2. Promover investigaciones de este tipo para así informarse sobre los cambios que van adquiriendo las bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu, S., Varela, Y., Millan, Beatriz & Araque, M. (2014). *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un Hospital Universitario. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Pág. 93.
2. Álvarez, H.E. (2009). *Escherichia coli* productores de BLEE aisladas de urocultivos: implicaciones en el diagnóstico y el tratamiento de la infección urinaria. Revista E-prints Complutense, Pág. 38.
3. Amaya, E., Cáceres, M., Fang, F., Ramírez, T.A., Palmgren, A.C., Carl, E & Weintraub N.A. (2,008). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in León, Nicaragua. Revista International Journal Of Antimicrobial Agents, Pág.2.
4. Amorim, D.A. (2010). Unidad de captura y dispersión génica en la evolución de las β -lactamasas de espectro extendido. Revista Salud Madrid, Pág. 6-22.
5. Apaza, P.R & Garcia, O.M. (2008). Resistencia a los antibióticos. Revista Infec Vol. 12 no.3, Bogotá infecto, Pág. 11.
6. Ávila, A.J. (2012). Caracterización Fenotípica y genotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasa tipo KPC, Monografía Pág. 59.
7. Bora, A., San Juana, R., Mahaseth, N.S & Pokarel, K. (2014). Incidence of Metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. Revista PubMed, Pág.6.
8. Britania. (2011). Monodisco de ácido borónico 300ug. Revista Britania, Pág.1.
9. Casellas, J.M. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina. Revista panamericana de salud pública, Pág. 523.

10. Casellas, J.M. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de salud pública*, Pág.524.
11. Cárdenas, R.E. (2014). Caracterización genética de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, resistentes a carbapenémicos, remitidos al grupo de resistencia bacteriana de Bogotá Grebo por hospitales del distrito, en un periodo de 3 años. *Revista de la Universidad Nacional de Colombia*, Pág.24.
12. Córdova, E., Lespadaa, M.I., Gómez, B.N., Pasteran, F & Oviedoa. (2012). Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Revista Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012; 30(7):376–379, Pág. 2.
13. Córdovaa, E., Lespadaa, M.I., Gómez, B.N., Pasteran, F & Oviedoa. (2012). Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae*, productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Revista Elsevier España*, Pág.377.
14. Cornaglia, G.H & Rossolini, G. (2011). Metallo- β -lactamasas. *Revista BAGÓ*, Pág.2.
15. CNRB. (2014). Segundo caso importado de infección por enterobacteria carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa New Delhi (MBL-NDM) positiva. *Revista Instituto costarricense de investigación y enseñanza de nutrición y Salud (INCIENSA)*. Pág.1.
16. Chinchilla, P.A., Tomas, B.B & Morales, S.R., (2013). Detección de carbapenemasa tipo NDM-1 y KPC-2 en Enterobacterias BLEE positiva " .evaluación fenotípica con confirmación genotípica". *Revista Universidad de san Carlos de Guatemala (USAC)*, Pag.8, 28,40.
17. Díaz, M.A., Hernández, J.R., Martínez, M.L., Rodríguez, B.J & Pascual, A. (2009). *Enfermedades Microbiológicas*. *Revista Elsevier España*, Pág.10.

18. De la Lastra, V., Ulloa, M.T., Pinto, M.E., Vidal, M & Silva, F.(2010). Serino carbapenemasas de clase A. Revista hospital clínico Universidad de Chile, Pág.234.
19. Díaz, M.A., Hernández, J.R., Martínez, M.L., Rodríguez, B.J & Pascual, A. (2009). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas. Revista Elsevier España, Pág.1.
20. Escalante, G.E. (2012). Metallo- β -lactamasas: ¿el fin de los β -lactámicos?. Revista Peruana de epidemiología, Pág.1.
21. Estrada, L.C. (2013). Reacción en Cadena de la Polimerasa. Revista de la facultad de química, bioquímica y farmacia, Pág. 3.
22. Farmacología. (2014). Evolución de la resistencia bacteriana. Revista Consejo general de colegios oficiales de farmacología, Pág. 1.
23. Garcia, M. (2013). Extended spectrum β -lactamase positive *Escherichia coli*. Resistance. Revista scielo, Pág.3.
24. García, M.M. (2012). Carbapenemasa una amenaza actual. Revista de Biomeriux, Pág.3.
25. Gómez, C.B. (2014). Evaluación del diagnóstico de laboratorio manual y automatizado del área de bacteriología del hospital solidaridad. Presentación de Power point Pág. 8.
26. Gordillo, R.M., Cortes, L.R., Mejía, R.C & Matheu, R.J. (2012). Presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), y Enterobacterias portadoras de carbapenemasas, en Enterobacterias en el Hospital Roosevelt, 2011 y 2012. Revista de Medicina Interna de Guatemala, Pág.8.

27. Jacoby, B.K & George, A. (2010). Clasificación funcional de β -lactamasas. Revista ASM Society. Pág.3.
28. Jawezt, E., Melnick J.L & Adelberg E.A. (2012). Microbiología Médica. Javier de León Fraga. China. Pág. 213.
29. Jiménez, A & Tijerino, A.M. (2014). Primer hallazgo de carbapenemasas-tipo Metallo- β -lactamasas New Delhi en Costa Rica. Revista del Centro Nacional de Referencia de Bacteriología (inciensa), Pág.1,3.
30. Koneman, W.E., Stephen, D.A., Janda, M.W., Schereckenbergen, C.P & Whashintong C.W, Ch. (2008). Diagnostico Microbiológico Buenos Aires Argentina. Revista Médica Panamericana S.A. Pág.138.
31. López, A. M. (2011). Genética bacteriana. Revista Microbiología oral home, Pág.4.
32. Losa, F. F. (2013). Carbapenémicos: Tipos y Mecanismos de Resistencia Bacterianos. Revista infectos.com, Pág. 3. Martínez, M.G. (2011). Aislamiento de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido en tres unidades de cuidados intensivos. Revista científica Villa Clara, Pág.2.
33. Machado, M.F., Ortega, V & Jose, M. (2010). Efectividad de ácido etilendiaminotetraacético y del mercaptoacetico de sodio en la detección de Metalobetalactamasa en *Pseudomona aeruginosa*. Revista Ciudad Bolívar, Pág. 19-20.
34. Monge, M.K. (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. Revista médica de Costa Rica y Centro América Lxx, Pag.1.
35. Moreno, P.O. (2011). Resistencia antibiótica asociada a integrones de clase 1 en aislados humanos de Enterobacterias, de dos contextos epidemiológicos: zoonosis por

Salmonella enterica e infección por *Klebsiella pneumoniae* adquirida en un centro socio sanitario. Revista de Universidad de Barcelona, Pág.56.

36. Moreno, O.P. (2013). Reconocimiento y técnicas microbiológicas de detección de fenotipos de resistencia relevantes en bacilos gram negativos: Enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas. Revista de la Asociación Catalana de control de infecciones, VI jornada, Pág. 17.
37. Muñoz, A & López, R.L. (2006). Patógenos oportunistas por excelencia. Revista del Centro de Investigaciones Científicas, Pág. 246.
38. Nastro, M., Montoto, L., Piazza., Saposnik, E., Garcia, S., Barberis, C., Vay, C., Rodríguez, C.H., & Famiglietti, A. (2012). Resistencia a cefalosporinas de espectro extendido en Enterobacterias sin AmpC inducible. Revista Argentina de Microbiología, Pág.5.
39. Nava, V.E & Zaragoza, H.E. (2014). Generalidades de las Enterobacterias. Presentación en Prezi, Pág.13.
40. Navarro, F., Miro, E & Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de Enterobacterias. Revista Elsevier, Pág.644.
41. Núñez, F.B & Salazar, I. (2008). Uso racional de los antibióticos. Revista Línea antibiótica, Pág.4.
42. Núñez, F.B. (2011). Inhibidores de las betalactamasas. Presentación de Scribd, Pag.4
43. Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L. (2009). Propagación mundial de Enterobacterias productoras de carbapenemasas.
Recuperado http://www.css.gob.pa/KPC%20Global%20Spread_SPA.pdf. Pag.1.

44. Pacheco, R., Osorio, L., Adriana, M., Correa & Villegas, M.V. (2014). Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen blaKPC en Hospitales de Colombia. Revista Científica electrónica (Scielo), Pág.86.
45. Pitout, J.D., Hossain, A & Hanson, N.D. (2004). Phenotypic and molecular detection of CTX-Metallo-betalactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* Revista Journal Of Clinical Microbiology. Pág.2.
46. Prat, S. (2004). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar, Revista del Instituto de salud Pública de Chile (ISPCH), Pág.3.
47. Quizhpe, J & Rivera, R. (2013). Resistencia bacteriana en bacilos gram-negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes hospitalizados en el Hospital Manuel Ignacio Montero. Revista Scielo. Pág, 43.
48. Rojas, D.D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica, Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología.Pág.79.
49. Romeu, B. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulce acuícolas. Red de Revistas Científicas de América Latina.Pág.4.
50. Rubio, O.D. (2012). Mecanismo de acción de los antibióticos más usado en medicina general. Revista de Universidad Javeriana slideshare, Pág.20.
51. Sabin, R. (2001). Los Antibióticos. Revista Monografias.com, Pág. 8.
52. Sánchez, S.L & Saenz, A.E, (2004). Antibióticos sistémicos en dermatología primera parte: β -lactámicos, carbapenems, aminoglucósidos, macrólidos. Revista de Educación Médica Continua, Pág.9.

53. Seral, C., Gude, M.J & Castillo, F.J. (2012). Emergencia de β -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC o cefaminasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. Revista Española de quimioterapia, Pág.95.
54. Somma, M & Querci, M. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimento. Revista de la Comisión Europea, Pag.3. Seccion 5.
55. Tamay, D.D., Ibara, C & Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Revista Medigraphic, Pág.71.
56. Tafur, J.D a. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram - negativas. Revista del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM). Pag.2.
57. Tzouveleakis, L.S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M & PTT and GL Daikos. (2012). Carbapenemasas en *klebsiella pneumoniae* y otras Enterobacterias: Revista crisis en evolución de dimensiones globales.pag.26.
58. Velásquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo Y., Sacsquispe, R., Soares, L & Fernández, N. (2013). *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. Revista de la sociedad Peruana, Medicina interna, Pág.193.
59. Villar, E.H., Jugo, M.B., Visser, M., Hidalgo, M., Hidalgo, G & Maccallini, G.C. (2014). Rápida adquisición de resistencia in vitro al ertapenem en *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido. Revista Española de quimioterapia, Pág. 52.
60. Villanueva, D.K. (2010). Caracterización genética de genes bla_{BLEE} y plásmidos asociados en cepas circulantes de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en España. Revista universitaria de Barcelona.Pág.26.

ANEXOS

Imagen 1. Clasificación de las betalactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros.

GRUPO	CLASE MOLECULAR	SUSTRATO DE PREFERENCIA	INHIBICIÓN POR AC. CLAVULANICO	INHIBICIÓN POR EDTA	ENZIMAS REPRESENTATIVAS
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC de Gram-negativos MRI-1
2 ^a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de Gram-positivos
2b	A	Penicilinas y Cefalosporinas	+	-	TEM-1,TEM-2,SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas de espectro expandido y monobactames	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6 K-1
2br	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicilinas y carbenicilinas	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas y Cloxacilinas	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinasas de <i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas y Carbapenems	+	-	MNC-A de <i>E. cloacae</i> , Sme-1 de <i>S. marcescens</i>
3	B	La mayoría de β -lactamasas incluyendo Carbapenems	-	+	L-1 de <i>S. maltophilia</i> CcrA de <i>B. fragilis</i>
4	No Determinado	Penicilinas	-	?	Penicilinasas de <i>B. cepacia</i>

(tomado de Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 1995)

Imagen 2. Algoritmo de detección de carbapenemasa

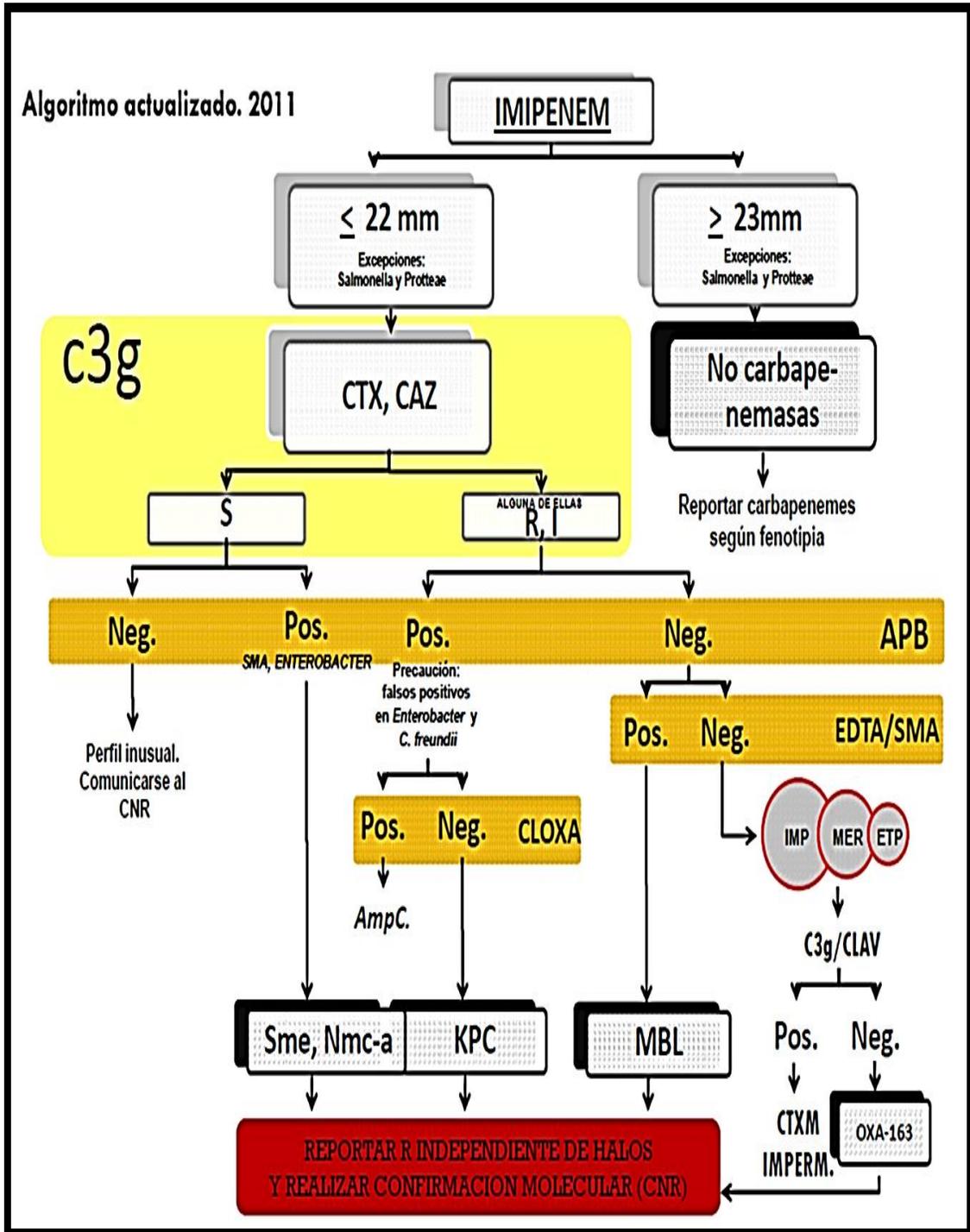


Imagen 3. Montaje en el VITEK 2 Compact



**Medición de la escala McFarland en el equipo
DenSiCheKPlus**

Montaje de las tarjetas

Imagen 4. Montaje de las tarjetas



Imagen 5. Registro de código y datos del paciente



Imagen 6. Pasaje en caldo leche



Imagen 7. Vista de los resultados VITEK 2 Compact, 64 Pruebas bioquímicas

View and Maintain Isolate Results

Home | Print | Refresh | Add | Edit | Delete | Help

View By: isolate | Filter By: Show All

Patient Name : Doo, Scooby

Lab ID: 333 | Organism: *K pneum pneumoiae* (98%)

AES Findings:
Phenotypes Selected for Review:

Review Status:
Bionumber: 6605735573564010
ID Confidence: Excellent identification
Analysis Status: 5.00 hr - Final

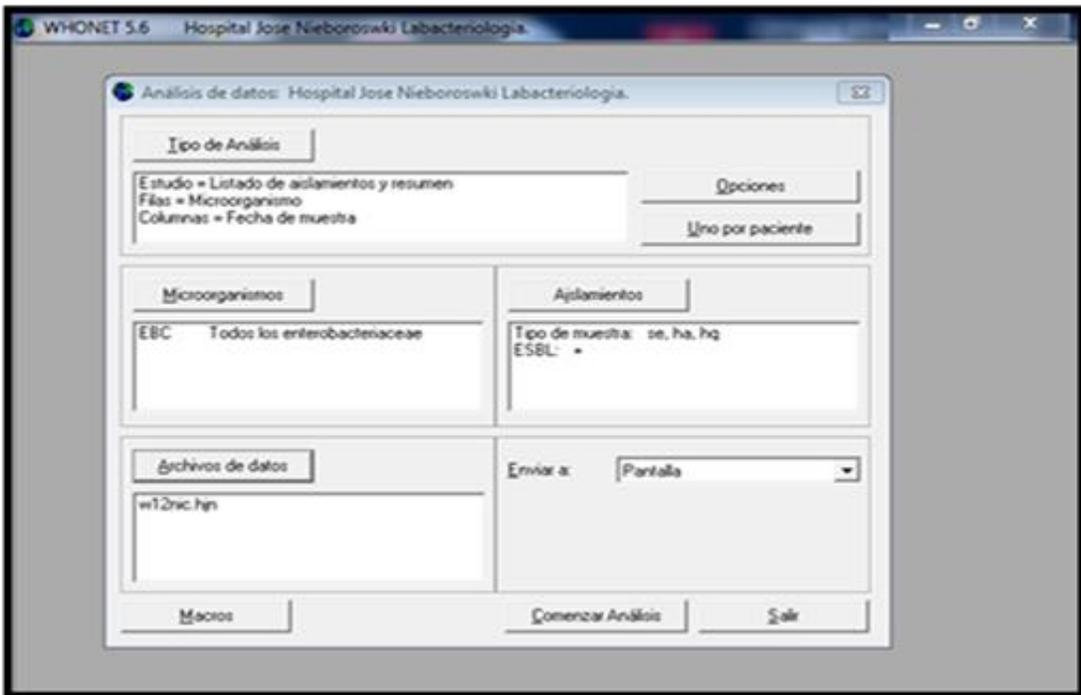
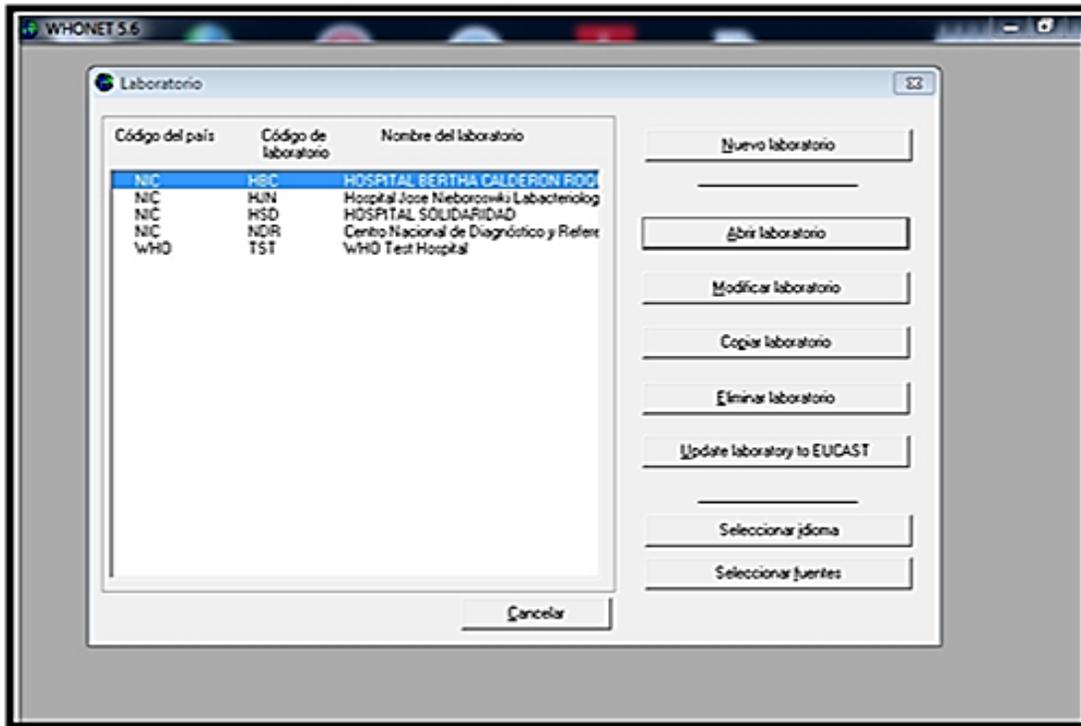
Analysis Messages:

AST Offline Tests:
Card Comment:

02	APPA	03	ADO	04	Pyra	05	IAPL	07	dCEL	09	BGAL	10	H2S	11	ENAG	12	AGLp
	-		+		+		-		+		+		-		-		-
13	dGLU	14	GGT	15	OFF	17	BGLU	18	dMAL	19	dMAN	20	dHNE	21	EXYL	22	BAIp
	+		-		+		+		+		+		+		+		-
23	ProA	26	LP	27	PLE	29	TyrA	31	URE	32	dSOR	33	SAC	34	dTAG	35	dTRE
	+		-		+		+		-		+		+		+		+
36	CIT	37	MNT	39	SKG	40	ILATk	41	AGLU	42	SUCT	43	NAGA	44	AGAL	45	PHOS
	+		+		-		+		-		+		-		+		+
46	GlyA	47	ODC	48	LDC	53	HSA	56	CMT	57	BCUR	58	O129R	59	GGAA	61	MLTa
	-		-		+		-		-		-		+		-		-
62	ELLM	64	ILATa														
	-		-														

11/16/05 8:50 AM | Lab Super | ELLMAN | VITEK 2 compact

Imagen 8. Programa WHONET versión 5.6



Utilizado para validación de resultados del VITEK y aseguramiento de que las muestras fueron procesadas anteriormente por el Hospital Antonio Lenin Fonseca.

Imagen 9. Hoja de Resultados VITEK

Nº de Cliente:

Informe clínico

Editado 08-ene-2015 09:31 CST

Nombre del paciente:

Nº paciente:

Localización: Hospital Antonio Lenin Fonseca

Médico:

Nº de examen: 551-Secrecion

Nº de aislamiento: 1

Organismo seleccionado: *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*

Origen:

Recogida:

Comentarios:	
---------------------	--

Información de identificación	Tiempo de análisis: 4,00 horas	Estado: Final
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Bionúmero: 6607734753164010	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>
Recuento:		
Mensajes de análisis de ID		

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis: 9,25 horas	Estado: Final			
	Tiempo de análisis: 7,75 horas	Estado: Final			
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
BLEE	NEG	-	Ceftriaxona	>= 64	R
Ampicilina	>= 32	R	Cefepima	16	I
Amoxicilina/Ácido clavulánico	>= 32	R	Aztreonam	>= 64	R
Ampicilina/Sulbactam	>= 32	R	Doripenem	>= 8	R
Ticarcilina	>= 128	R	Imipenem	>= 16	R
Ticarcilina/Ácido clavulánico			Meropenem	>= 16	R
Piperacilina	>= 128	R	Amicacina	>= 64	R
Piperacilina/Tazobactam	>= 128	R	Gentamicina	>= 16	R
Cefalotina	>= 64	R	Tobramicina	>= 16	R
Cefazolina	>= 64	R	Ácido nalidixico	>= 32	R
Cefuroxima	>= 64	R	Ciprofloxacino	>= 4	R
Cefuroxima Axetil	>= 64	R	Levofloxacino	>= 8	R
Cefotetan	>= 64	R	Moxifloxacino	>= 8	R
Cefoxitina	>= 64	R	Norfloxacino	>= 16	R
Cefpodoxima	>= 8	R	Tetraciclina	>= 16	R
Cefotaxima	>= 64	R	Tigeciclina	2	S
Ceftazidima	>= 64	R	Nitrofurantoína	64	I
Ceftizoxima	>= 64	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	>= 320	R

+ = Antibiótico deducido * = AES modificado ** = Usuario modificado

Imagen 10. Hoja de Resultados Whonet

HOSPITAL ESCUELA ANTONIO LENIN FONSECA

Departamento de Bacteriología

Número de identificación =	Localización = Medicina de mujeres
Nombre =	Cama = 201
Apellido =	Origen = Hospitalizado
Edad = 64	Tipo de muestra = Orina
Sexo = f	Diagnostico = Primario
Fecha de la muestra = 19-Mar-2014	Nosocomial infection =
Número de la muestra = 114	

Orina, conteo de colonia Mayor de 100,000 UFC x ml de orina
BLEE Positivo

Microorganismo = *Klebsiella pneumoniae* ss. *pneumoniae*

Amicacina	S	Cefepima	R
Cefotaxima	R	Ceftriaxona	R
Ciprofloxacina	R	Gentamicina	S
Imipenem	R	Meropenem	R
Nitrofurantoina	R		

Médico	MARIA REGINA NAVAS
Código del médico	33154
Analista	Lic. Tania Sequeira Torres
Código Minsa	30302

Carbapenems = No-Sensible

Non-susceptible isolates are rare.

ESBL-producing Enterobacteriaceae

Depending on your area, resistant isolates may be uncommon.

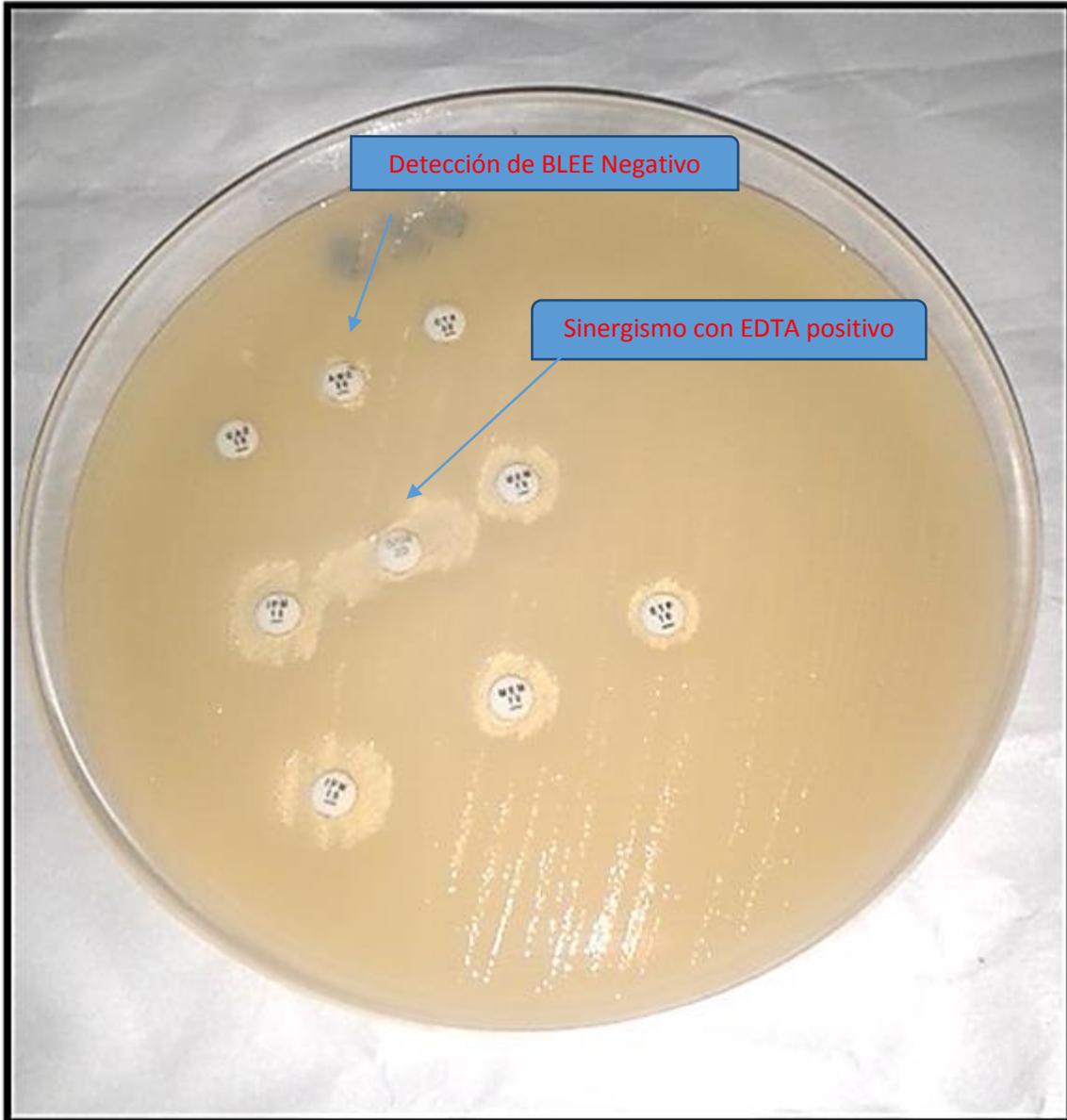
Fluoroquinolones = No-Sensible

Depending on your area, resistant isolates may be uncommon.

Possible ESBL-producing Enterobacteriaceae

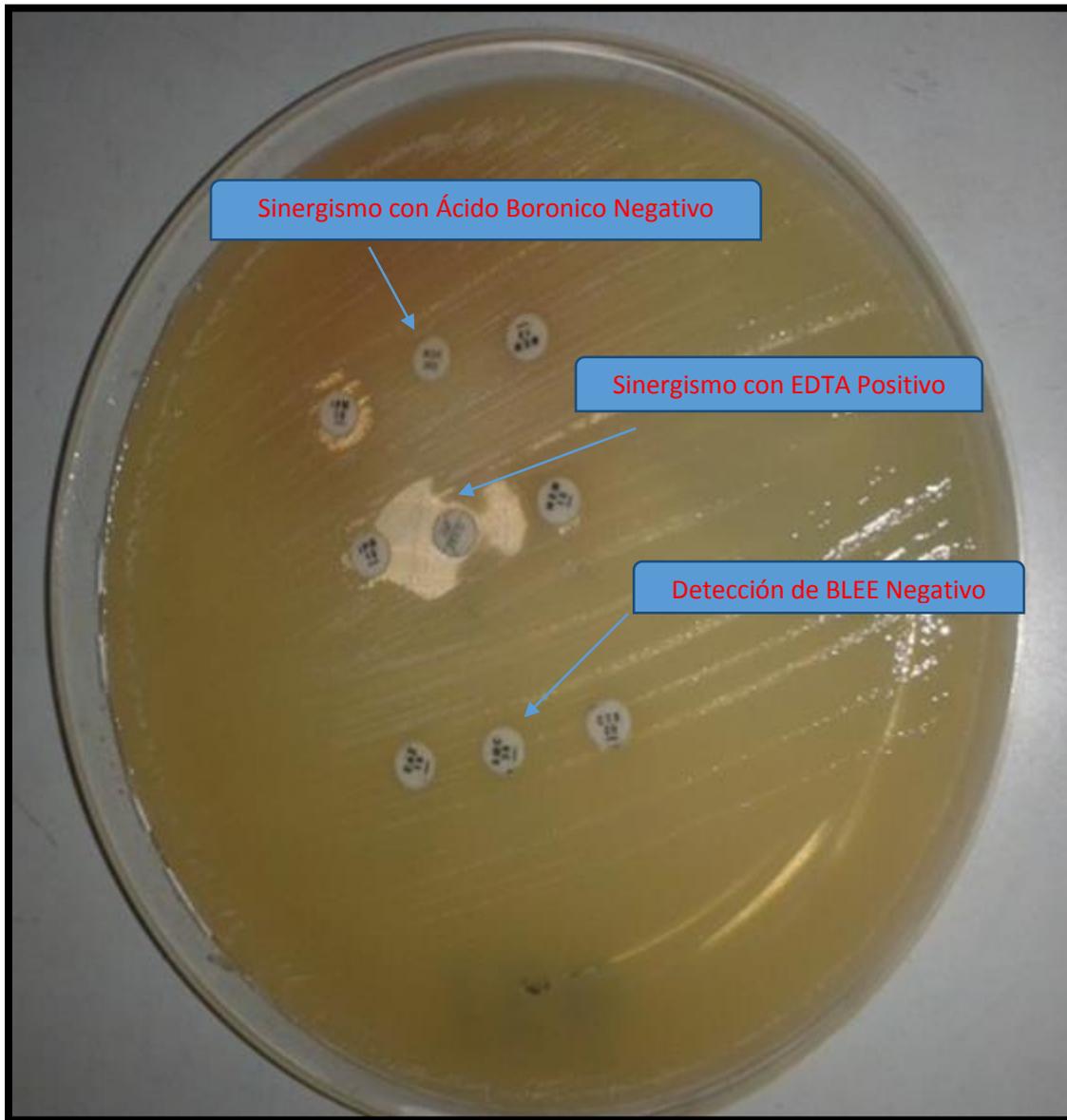
Depending on your area, resistant isolates may be uncommon.

Imagen 11. Métodos de discos combinados, Sinergia con EDTA.



Se puede apreciar que en el método de discos combinados, no hubo sinergia con el ácido clavulánico y se observa la deformación del halo entre los discos de imipenem, EDTA y meropenem.

Imagen 12. Sinergismo con ácido Borónico Negativo



En la imagen se observa el test de sinergismo con ácido borónico dando un resultado negativo y sinergia con EDTA resultando positivo

Imagen 13. Test de Hodge complementario positivo



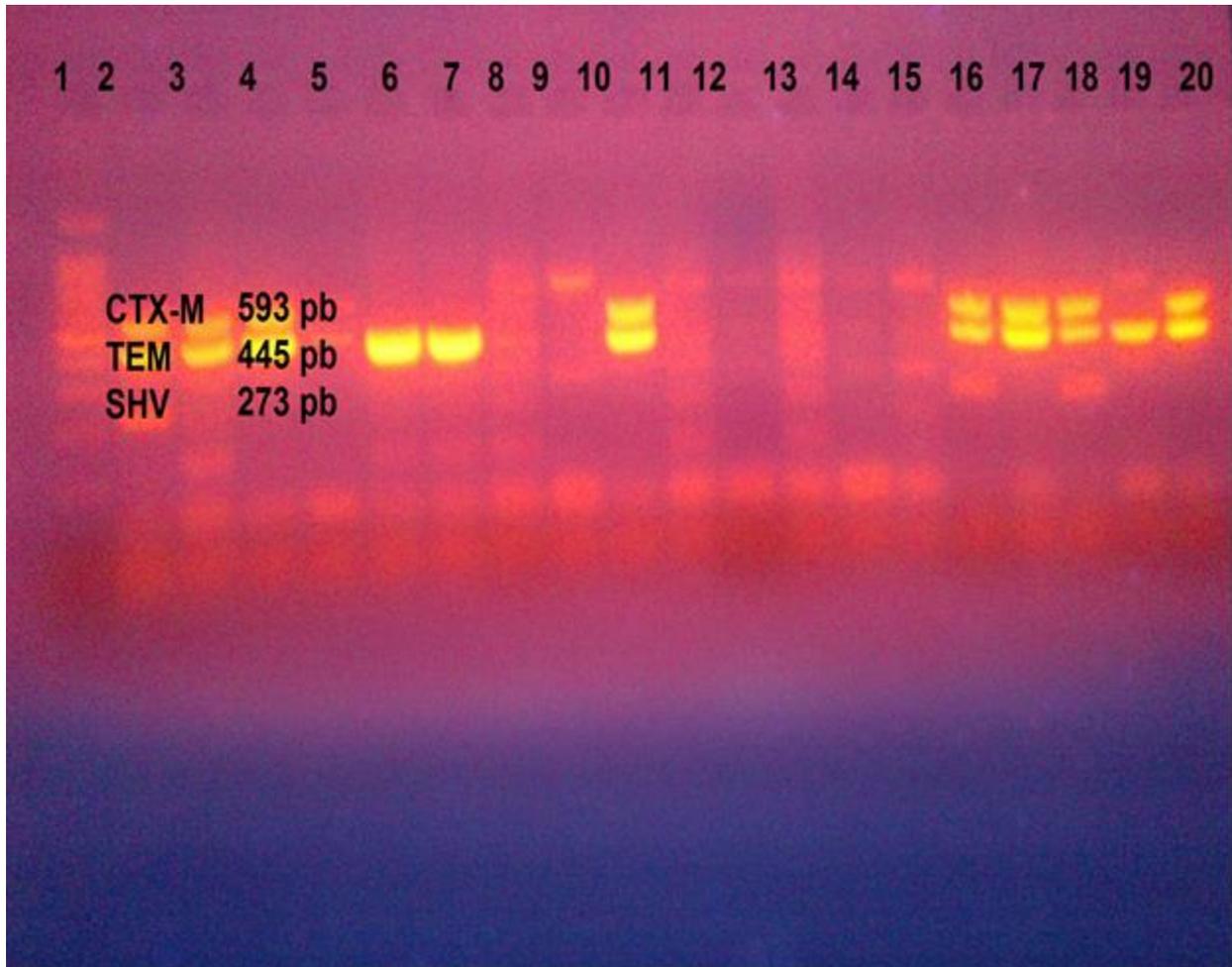
Nótese la deformación del halo de inhibición, que se produce en torno a una cepa productora de carbapenemasa.

Imagen 14. Termociclador Eppendorf



ADN Thermo Cycler Gene AmpR PCR sistem (appliedBiosystems, Forter City, CA)

Imagen 15. Genes bla_{TEM}, bla_{CTX}, bla_{SHV}. OXA no se encontró originan la resistencia a los β -lactámicos.



Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5 % en TBE
Carril 1 escalera, carril 2 control, carril 3-20 genes observados en la corrida electroforética

Tabla 1. Número de aislamientos con halos ≤ 22 mm para imipenem en cepas del hospital Antonio Lenin Fonseca analizadas en los meses Abril – Julio 2014.

Hospital	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli</i>		total	Porcentaje
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje		
HALF	12	92.30%	1	7.7	13	100%
Total	12	92.30%	1	7.7	13	100%

Fuente: Resultados de laboratorio.

Tabla 1.1. Perfil de resistencia antimicrobiana en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* analizadas en los meses Abril a Julio del 2014.

Antibióticos	Frecuencia	Porcentaje
CF	13	100%
FOX	13	100%
CMX	13	100%
CZX	13	100%
CRO	13	100%
ATM	13	100%
FED	13	100%
AN	12	92%
GM	13	100%
NA	13	100%
CIP	13	100%
LV	13	100%
NOR	13	100%
MEM	13	100%
IMP	13	100%
ETP	13	100%
DOR	13	100%
SXT	13	100%
TGC	0	0%
FT	9	69.20%

Fuente: Resultados de laboratorio.

Tabla 2. Análisis fenotípico de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en cepas remitidas del Hospital Antonio Lenin Fonseca en los meses de Abril a Julio del 2014.

Test de sinergismo	Sinergismo con APB		Sinergismo con EDTA	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Positivo	0	0%	13	100%
Negativo	13	100%	0	0%
Total	13	100%	13	100%

Fuente: Resultados de laboratorio.

Tabla 3. Genes BLEE encontrados en Enterobacterias productoras de Carbapenemasa, aisladas de procesos infecciosos en pacientes internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca en los meses de Abril a Julio del 2014.

Genes	Frecuencia	Porcentaje
bla_{TEM}	1	7.6%
bla_{TEM}, bla_{SHV}	1	7.6%
bla_{CTX}, bla_{TEM}	1	7.6%
bla_{CTX}, bla_{SHV}	1	7.6 %
bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX}	9	69.2%
bla_{OXA}	0	0%
Total	13	100%

Fuente: Resultados de Laboratorio.

GLOSARIO

Enterobacterias: Familia de bacilos gram negativos, que contienen más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos.

Peptidoglucano: Leda a las bacterias los diferentes tipos de formas y las protege de una ruptura osmótica.

Transposones: Secuencia de ADN, que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula.

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido, son enzimas que hidrolizan o inactivan a las cefalosporinas y monobactames.

PBPs: Proteínas unidoras de penicilina.

AmpC: Enzimas pertenecientes de forma natural en algunas enterobacterias y bacilos Gram-negativos, son capaces de resistir la inhibición por ácido clavulánico.

Bacteriostático: Antibióticos que inhiben la reproducción bacteriana sin llegar a destruirlos.

Carbapenemasa: Enzimas pertenecientes a la familia Betalactamasa que inactivan los carbapenemes, ocasionando una resistencia a todo este grupo de antimicrobianos.

Gen: Es un segmento corto de ADN, que informa a un microorganismo cuando producir una proteína específica.

Plásmidos: Son moléculas de ADN extracromosómico, circular o lineal que pueden replicarse de forma independiente en una bacteria.

MBL: Enzimas con iones de zinc en su sitio activo, caracterizadas por hidrolizar carbapenemes e inhibidores de β -lactámicos como ácido clavulánico y tazobactam pero susceptibles a la inhibición por agentes quelantes como EDTA.