



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA

UNAN - MANAGUA

**RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD “LUIS FELIPE MONCADA”**

MONOGRAFÍA

Para optar al título de Licenciado en Microbiología

Tema:

Determinación de genes de resistencia en cepas de *Enterobacterias* (OXA-48) y *Acinetobacter baumannii* (OXA23 & OXA 58) aisladas en muestras clínicas de los hospitales pertenecientes a la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, durante el período de enero 2016 – diciembre 2018.

AUTORAS:

Br. Lisseth Argentina Boniche Sánchez

Br. Adriana Dolores Garay Hernández

Br. Estrella Caridad Miranda Gómez

TUTORA:

Licda. Julissa Ávila Acuña (Docente, CNDR-MINSA)

ASESOR METODOLÓGICO:

Msc. Francisco Romero Oviedo (Docente: POLISAL- UNAN, MANAGUA)

Managua, Nicaragua abril 2021

GLOSARIO

A

Amplicon: Fragmento de ADN o ARN.

Antimicrobianos: Agente que mata microorganismos o detiene su crecimiento.

Aerobios: las que requieren oxígeno.

Anaerobios: las que tienen dificultades para vivir o crecer en presencia de oxígeno.

Antibioticoterapia: Terapia que usa antibióticos, administrándolos por vía intravenosa para tratamientos a medio-largo plazo de determinadas patologías.

B

Bacteriófago: Son virus que infectan exclusivamente a los organismos procariotas.

Betalactámicos: amplia clase de antibióticos, cualquier agente antibiótico que contenga un anillo β -lactámico en su estructura molecular.

Betalactamasa: Son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas,

cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos).

C

Carboxipeptidasa: Enzimas peptidasas o proteasas que hidrolizan un enlace peptídico.

Carbapenemasa: Son enzimas capaces de inactivar a los carbapenems.

Carbapénemicos: Fármacos carbapenémicos son antibióticos de amplio espectro. Es decir, son eficaces frente a muchos tipos de bacterias, incluyendo bacterias que son resistentes a muchos otros antibióticos.

Cefalosporinas: Las cefalosporinas son antibióticos amplio espectro. Su actividad incluye mayoría de los cocos Gram positivos.

E

Electroforesis: La electroforesis es una técnica utilizada para separar el ADN, el ARN, o moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través de un gel. Los poros del gel actúan como un

colador, permitiendo que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las grandes.

Endotoxina: Toxina presente en las membranas externas de algunas bacterias que solo se libera después de la destrucción de la pared celular.

F

Farmacocinética: Es la rama de la farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo.

Farmacodinamia: Es el estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y de sus mecanismos de acción y la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de este sobre un organismo

G

Gen: Unidad de información¹ en un locus de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto génico, ya sea proteínas o ARN.

Genoespecies: Una especie (grupo de organismos que pueden cruzarse) identificada y caracterizada por medio de la genética.

Glucocálix: Es un término genérico que se refiere al material exudado polimérico extracelular compuesto por proteínas y carbohidratos producido por algunas bacterias y células como las epiteliales de las superficies mucosas.

H

Hibridación: proceso de unir dos hebras complementarias de AND.

I

Integron: mecanismo genético en las bacterias que permite que se adapten y evolucionen rápidamente.

Inhibidores: Son moléculas que se unen a enzimas y disminuyen su actividad. Puesto que el bloqueo de una enzima puede matar a un agente patógeno o corregir un desequilibrio metabólico.

K

Kirby Bauer: El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico.

L

Lisis: Es el proceso de ruptura de la membrana celular de células o bacterias que produce la salida del material celular, provocado por lisinas

M

Monobactámicos: son un grupo de medicamentos clasificados dentro de los antibiótico betalactámicos.

Morbilidad: Es el número de personas que enferman en una población y período determinados

Mortalidad: es el número de defunciones en una población y período determinados.

Multidrogoresistente: infecciones resistente a los antibióticos de primera línea.

P

Panrresistente: resistencia a todos los antibióticos.

Plásmidos: Los plásmidos son moléculas de ADN extra cromosómico generalmente circular que se replican de manera autónoma y se transmiten (esto último por un proceso llamado conjugación)

independientemente del ADN cromosómico.

Q

Quimioorganótrofos: Organismo que obtiene su energía de reacciones de oxidorreducción y utiliza sustratos orgánicos.

S

Secuenciación: determinación de nucleótidos.

Síntesis proteica: Es el proceso anabólico mediante el cual se forman las proteínas.

T

Transglucosidasa: enzimas que hidrolizan a las glucosidasas.

Transposones: elementos genéticos transponible en la secuenciación de ADN.

Test de Hodge: El test de Hodge modificado es la prueba fenotípica más empleada para la detección de carbapenemasas.

Toxicidad: Es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.

ABREVIATURAS

A

ADN: Acido desoxirribonucleico.

APB: Acido Fenil Borónico.

ATM: Aztronam.

ANK: Amikacina.

AMP: Ampicilina.

AB-MR: *Acinetobacter baumannii*
multirresistentes.

B

BHI: Infusión de cerebro y corazón

C

CLSI: Instituto de estandarización clínica
y laboratorios.

CNDR: centro nacional de diagnóstico y
referencia.

CHDLs: Carbapenem hydrolyzing Class
D β -Lactamasa (inglés).

CAZ: Ceftazidime.

CRO: Ceftriaxone.

CIP: Ciprofloxacina.

CEF: Cefaloridina.

COL: Colistina

CAS: Colistin Agar SPOT

CIM: Concentración mínima inhibitoria.

D

DNTPs: desoxirribonucleótidos
trifosfatos.

E

EDC: Elusión de disco de colistina.

EDTA: Acido Etilendiaminotetraacético.

F

FEP: Cefepime.

G

GEN: Gentamicina.

I

IMP: Imipenem.

L

LVX: Levofloxacina.

LPS: Lipopolisacárido

M

MH: Mueller Hinton.

MBL: Métalo- β -lactamasa.

MEM: Meropenem.

MINO: Minociclina

MALBRÁN: Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos Malbrán

N

NIT: Nitrofurantoina.

O

OXA: Oxacilinasas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P

PCR: Reacción en cadena a la polimerasa.

PBPs: Proteínas fijadoras de penicilina.

PIP: Piperacilina.

S

SD: Sin datos.

SXT: Trimetropim- sulfametoxazol.

SAM: Ampicilina-sulbactam

T

TZP: Piperacilina tazobactam.

TIG: Tigeciclina.

TSA: Agar de Tripticasa Soya.

TBE: Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA

THG: Transferencia horizontal genética.

U

UCI: Unidad de cuidados intensivos.

UFC: Unidad Formadora de Colonias.

AGRADECIMIENTOS

Dios por darnos la vida, por ser nuestra fuerza, nuestro guía, y sobre todo por acompañarnos durante estos años de formación profesional. A nuestros padres por ser nuestros principales apoyos, por sus enteros esfuerzos para que nuestros sueños de ser profesionales sean hoy realidad.

*A nuestra tutora **Licda. Julissa Ávila Acuña** por mostrarnos desde el primer día su apoyo y el haber asumido con tanto empeño y dedicación la conducción de este trabajo. Nuestro respeto y admiración.*

*A nuestro Asesor metodológico **Msc. Francisco Romero Oviedo**, por su valiosa orientación para culminar este estudio, por su apoyo y comprensión. Gracias.*

*Al **Laboratorio Nacional de Diagnóstico y Referencia “Concepción Palacios” (CNDR-MINSA)** en especial al departamento de Bacteriología por abrirnos las puertas para que nosotros pudiéramos realizar nuestro estudio, por brindar sus conocimientos, su apoyo y colaboración en la realización de esta monografía. A ustedes gracias.*

*A **nuestros maestros** que a lo largo de la carrera nos inculcaron conocimientos los cuales adoptamos como nuestros, por su paciencia y dedicación durante estos cinco años, nuestros más sinceros sentimientos de gratitud. Infinitas gracias.*

*Finalmente, **a todas aquellas personas** que a lo largo de estos cinco años de formación académica nos brindaron su apoyo de manera desinteresada para que hoy lográramos culminar una de nuestras mayores metas que hemos tenido en la vida.*

DEDICATORIA

*Primeramente, a **Dios** por haberme brindado vida, salud, sabiduría e inteligencia y permitirme llegar hasta este punto tan importante en mi vida como es la finalización de mi carrera universitaria.*

*A **Mi Familia** por ser pilar fundamental en mi formación como una persona integral en la sociedad.*

*A mi **Abuela** Juana Ramona Méndez Vargas (Q.E.P.D) por brindarme todo su amor y comprensión durante mis primeros pasos en la vida, por enseñarme cosas tan básicas como: leer, escribir y a luchar por mis sueños más anhelados.*

*A mi **Madre** Argentina Concepción Sánchez Méndez por estar a mi lado siempre en cada una de mis batallas, por los sacrificios económico que ha hecho para mi educación, su amor incondicional y por todas las fuerzas que me ha dado durante cada momento de mi vida.*

*A mi **Padre** Luis Agustín Boniche Suazo por su amor y apoyo durante el transcurso de mi formación profesional.*

*A mis **Compañeros Universitarios** a quienes quiero con el corazón y estuvieron a mi lado durante todos estos años de carrera universitaria.*

*Al **Personal de Salud** de los diversos centros asistenciales que me acogieron durante mis áreas prácticas y de profesionalización, por cada uno de las enseñanzas compartidas y consejos brindados durante este período de aprendizaje.*

*Y finalmente a cada uno de mis **Maestros**, esos seres maravillosos que compartieron sus conocimientos durante cada una de mis etapas académicas para que hoy pueda culminar esta meta tan anhelada.*

Br. Lisseth Argentina Boniche Sánchez

DEDICATORIA

*A **DIOS** Por darme la vida, salud, por reconfortarme en los momentos de tribulación, por estar presente durante los años de mi formación profesional y permitirme llegar hasta acá.*

*A **mi mamá** Edda Hernández por todo su amor incondicional, por su entero sacrificio que hoy se ve premiado en mí, por ser el motor que me inspiraba cada día en seguir adelante y ser mejor cada día, gracias mamá.*

*A **mi hermano** Moisés David Paizano por brindarme siempre su apoyo, por acompañarme en los momentos de alegría y tristeza, por ser mi mayor ejemplo, de que todo en la vida se puede lograr con empeño y dedicación.*

*A **mi papá** Orlando Garay por su amor, cariño y por ayudarme en lo que estaba siempre a su alcance para poder finalizar mi carrera.*

*A **todo el personal de salud** que encontré en mi largo camino de aprendizaje práctico que me acogieron y me compartieron sus enseñanzas y finalmente a esos **amigos** que de manera desinteresada me apoyaron durante estos cinco años de carrera universitaria en especial a Javier, Ignacio, que hicieron que este reto fuera aún más fácil de superar, gracias.*

Br. Adriana Dolores Garay Hernández

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico primeramente a Dios por haberme permitido llegar al final de esta etapa, por darme salud, por haberme dado entusiasmo, valentía y no dejarme sola en cada uno de mis pasos.

*A **mis padres** Verónica Gómez Machado y Leonel Miranda Blanco por darme su amor, apoyo incondicional, por hacer de mí una persona de bien y alentarme a seguir hasta llegar a la meta,*

*A **mi hermana** Tatiana Selena Miranda por estar junto a mí, motivándome a iniciar mis estudios, ser parte del proceso y un ejemplo a seguir.*

*A **los docentes** de mí querida universidad que a lo largo de la carrera formaron en mí una profesional con ética y valores.*

*A **todo el personal de salud** donde realice mis prácticas de profesionalización, ya que me brindaron su tiempo, sus conocimientos, sus consejos y me acogieron como parte de la familia laboral.*

Br. Estrella Caridad Miranda Gómez

VALORACIÓN DEL TUTOR

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial, siendo la mayor preocupación las bacterias multidrogorresistente asociadas a infecciones intrahospitalarias. El uso irracional de los antimicrobianos, es uno de los factores que ha contribuido al surgimiento de estos microorganismos productores de carbapenemasas, limitando las opciones terapéuticas a pacientes que sufren infecciones bacterianas con este tipo de resistencia.

Como tutora de este trabajo considero necesario y de mucha relevancia la Determinación de genes de resistencia en cepas de Enterobacterias (OXA-48) y Acinetobacter baumannii (OXA23 & OXA 58) aisladas en muestras clínicas de los hospitales pertenecientes a la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, durante el período de enero 2016 – diciembre 2018, ya que en Nicaragua existen solo datos de otros mecanismos. Esta investigación se encuentra lista y cumple con los requisitos establecidos para defender los resultados, dichos resultados permitirán ampliar el panorama epidemiológico acerca de los genes que codifican para estas enzimas que afectan a los Betalactámicos y brindará datos a los tomadores de decisiones para su prevención y control.



Licda. Julissa Ávila Acuña
Especialista en laboratorio de Salud-CNDR-Minsa
Departamento de Bacteriología

RESUMEN

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos, ha generado una amenaza para la salud pública e individual de los pacientes, lo que requiere la detección de los mecanismos para orientar las estrategias antimicrobianas. Los betalactámicos como los Carbapenemes son ampliamente utilizados en infecciones complicadas debido a su amplio espectro, baja toxicidad y su efecto bactericida; debido a su constante uso se debe de mantener una vigilancia permanente a los microorganismos asociados a este tipo de infecciones. Entre las enzimas que confieren resistencia a los Carbapénemicos están las Oxacilinasas, es por ello que se planteó como objetivo determinar fenotípicamente y genotípicamente carbapenemasas de tipo OXA en cepas de *Enterobacterias* (OXA-48) y *Acinetobacter baumannii* (OXA23 & OXA 58). El estudio fue descriptivo, retrospectivo, de corte transversal, se analizaron 190 cepas bacterianas, 113 correspondían a la familia de *Enterobacterias* (59%) y 77 cepas de *Acinetobacter baumannii* (41%), se evaluó el perfil de susceptibilidad, en las cepas de *Enterobacterias* estas presentaron resistencia a casi todos los antibióticos que fueron testados, encontrándose como única opción terapéutica Colistina (COL). *Acinetobacter baumannii* presentó susceptibilidad a Colistina (COL) y Minociclina (MINOC). El gen con mayor frecuencia detectado mediante la técnica de PCR-Convencional fue OXA- 23 en 6 cepas y en OXA-58 2 cepas para *Acinetobacter baumannii* de igual manera para la familia de *Enterobacterias* la identificación del gen OXA-48 en una cepa de *Escherichia coli* de los aislados del año 2018.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 2 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 6 |
| 4. PREGUNTAS DIRECTRICES | 7 |
| 5. OBJETIVOS | 8 |
| 5.1. Objetivo General: | 8 |
| 5.2. Objetivos Específicos:..... | 8 |
| 6. MARCO TEÓRICO | 9 |
| 6.1. Bacilos Gram Negativos | 9 |
| 6.1.1. <i>Enterobacterias</i> | 9 |
| 6.1.2. <i>No Fermentadores</i> | 11 |
| 6.2. Antimicrobianos | 15 |
| 6.3. Resistencia Antimicrobiana | 16 |
| 6.3.1. <i>Resistencia a los Carbapenems</i> | 16 |
| 6.3.2. <i>Transferencia Genética</i> | 16 |
| 6.3.3. <i>Genes de Resistencia Enzimática a Carbapenemicos</i> | 18 |
| 6.4. Métodos de Detección de Susceptibilidad Antimicrobiana | 18 |
| 6.4.1. <i>Difusión de Disco o Método de Kirby Bauer</i> | 18 |
| 6.4.2. <i>Concentración Mínima Inhibitoria</i> | 19 |
| 6.4.3. <i>Métodos Moleculares</i> | 19 |
| 6.5. Genotipificación para la detección de Carbapenemasa de tipo OXA | 20 |
| 6.5.1. <i>Oxacilinasas</i> | 20 |

| | |
|----------------------------------------------------|-----------|
| 7. DISEÑO METODOLÓGICO | 22 |
| 7.1. Tipo de Estudio | 22 |
| 7.2. Área de Estudio | 22 |
| 7.3. Universo | 22 |
| 7.4. Muestra..... | 22 |
| 7.5. Tipo de Muestreo | 22 |
| 7.6. Criterios de Inclusión | 22 |
| 7.7. Criterios de Exclusión | 23 |
| 7.8. Métodos y Recolección de la Información..... | 23 |
| 7.9. Procesamiento de la información | 23 |
| 7.10. Ética de la Investigación | 23 |
| 7.11. Procedimientos y Análisis..... | 24 |
| OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES | 33 |
| 8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 36 |
| 9. CONCLUSIONES | 54 |
| 10. RECOMENDACIONES..... | 55 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |

ÍNDICE DE IMÁGENES

| | |
|---------------------------------|----|
| 1. Anexo N° 2: Imagen N°1..... | 66 |
| 2. Anexo N°7: Imagen N° 2..... | 70 |
| 3. Anexo N° 8: Imagen N° 3..... | 71 |
| 4. Anexo N° 9: Imagen N° 4..... | 72 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|-----------------------------------|----|
| 5. Anexo N° 2: Tabla N°1..... | 65 |
| 6. Anexo N° 4: Tabla N° 2..... | 67 |
| 7. Anexo N° 5: Tabla N° 3..... | 67 |
| 8. Anexo N° 6: Tabla N° 4..... | 67 |
| 9. Anexo N° 7: Tabla N°5..... | 68 |
| 10. Anexo N° 8: Tabla N° 6..... | 68 |
| 11. Anexo N° 9: Tabla N°7..... | 69 |
| 12. Anexo N° 10: Tabla N° 8..... | 69 |
| 13. Anexo N° 17: Tabla N° 9..... | 76 |
| 14. Anexo N° 18: Tabla N°10..... | 77 |
| 15. Anexo N° 19: Tabla N° 11..... | 78 |
| 16. Anexo N° 20: Tabla N° 12..... | 79 |
| 17. Anexo N° 21: Tabla N° 13..... | 80 |
| 18. Anexo N° 22: Tabla N° 14..... | 81 |
| 19. Anexo N° 23: Tabla N° 15..... | 82 |
| 20. Anexo N° 24: Tabla N° 16..... | 83 |
| 21. Anexo N° 25: Tabla N° 17..... | 84 |
| 22. Anexo N° 26: Tabla N° 18..... | 84 |

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia combinada a múltiples antibióticos en algunas de las principales bacterias patógenas en humanos está aumentando en los últimos años. Este hecho está generando una importante amenaza para la salud pública y para la salud individual de los pacientes, debido a que limita de manera importante las alternativas terapéuticas frente a las infecciones producidas por estos patógenos, las cuales constituyen un reto para la salud pública, tanto en las instituciones sanitarias como en la comunidad. (Arevalo, 2015)

En los últimos años se ha producido una gran alarma y preocupación por la gran dispersión de los bacilos Gram negativos, resistentes a los carbapenémicos en los que el mecanismo implicado es la producción de betalactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos transferibles. Estas enzimas se denominan genéticamente carbapenemasas y tienen un directo impacto en la disponibilidad de alternativas terapéutica. (González, 2018)

Entre las diversas clases moleculares genéticas productoras de carbapenemasas, las oxacilinasas, también denominadas de tipo OXA, tiene la particularidad fenotípica de no afectar a los monobactámicos y presentan una baja eficiencia hidrolítica frente cefalosporinas de tercera y de cuarta generación y frente a las carbapenems, por lo que en muchas ocasiones aparecen como sensibles a estos antimicrobianos. (Cercenado, 2015)

Por otro lado, *Acinetobacter baumannii*, microorganismo Gram negativo no fermentador de la glucosa que en las últimas dos décadas ha escalado posiciones como un importante patógeno oportunista nosocomial, asociado a neumonía, bacteriemia, meningitis, infecciones del tracto urinario, peritonitis e infecciones de piel y tejidos blandos. Posee una gran variedad de mecanismos de resistencia de tipo enzimático y no enzimático que tienen acción sobre un amplio espectro de antimicrobianos que incluye a drogas tan activas como los carbapenémicos, razón por la cual son asociados a infecciones que aumentan la mortalidad año con año. (Diomedi, 2005)

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que aqueja, a nivel global, a diferentes casos de salud. Los primeros brotes de carbapenemasas empezaron en 1996 en la ciudad de New York (Blanco, Labarca, Villegas , & et al, 2014) y desde entonces el comportamiento de esta resistencia ha ido pasando de país a país por la migración de pacientes, portadores de cepas que expresan una enzima que le confiere a la bacteria la capacidad de hidrolizar las moléculas de antibióticos de la familia de Carbapenems. (Castellas, 2011)

El problema grave de esta clase de enzimas es la fácil dispersión de las cepas positivas para estas enzimas y que se encuentran no sólo en el género *Enterobacteriaceae* sino también en los bacilos Gram negativos no fermentadores – *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* Con serios mecanismos de resistencia bacteriana que con lleva tratamientos agresivos como la Tigeciclina, Colistin, Tetraciclina y Gentamicina para su resolución. (Aguado, 2010)

Por tanto, se vuelve de suma importancia analizar las cepas en sus características fenotípicas para saber la incidencia de la clase de carbapenemasas, y la genotipificación, para poder evaluar la presencia de uno o más tipos de resistencia que están presentes en una misma cepa, sobre todo, la clase D que comprende a las enzimas tipo OXA.

Debido a lo anterior surge la pregunta:

¿Cuáles son los genes de resistencia de carbapenemasa tipo OXA que presentan las cepas de *Enterobacterias* y *Acinetobacter baumannii* aisladas en los hospitales pertenecientes a la red nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianas durante el período de enero 2016 – diciembre 2018?

2. ANTECEDENTES

Se recopiló información para la respectiva investigación; en el cual se aborda la **“Determinación de genes de resistencia en cepas de Enterobacterias (OXA-48) y *Acinetobacter baumannii* (OXA23 & OXA 58) aisladas en muestras clínicas de los hospitales pertenecientes a la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, durante el período de enero 2016 – diciembre 2018.”**, se obtuvieron estudios tanto en el ámbito nacional como internacional donde se aborda el problema de salud pública causado por la gran problemática de la resistencia antimicrobiana.

Cuaical et al (2012) realizaron la determinación de carbapenemasas de tipo OXA en 60 aislados de *Acinetobacter baumannii* en diferentes centros de salud de la ciudad de Caracas, Venezuela; en donde aplicaron el método de Kirby Bauer para evaluar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, método de sinergia para la detección del fenotipo y la técnica de PCR punto final para la identificación del gen de resistencia (*bla_{oxa-23-like}*, *bla_{oxa-51-like}* y *bla_{oxa-58-like}*). Encontraron que el 96,6% de los aislados presentaban resistencia de carbapenemasa de tipo OXA; de estos, el 93,4% presentó *bla_{oxa-23-like}*, 6,6% *bla_{oxa-58-like}* y el 3,3 % de los aislados positivos tenían coexistencia de *bla_{oxa-23-like}* y *bla_{oxa-58-like}*; concluyeron que en *A. baumannii* se puede detectar más de un gen que codifica para carbapenemasas tipo OXA, los que presenta de forma intrínseca (*bla_{OXA-51-like}*) y aquellos que se encuentran a nivel plasmídico (*bla_{OXA-23-like}* y *bla_{OXA-58-like}*), los cuales facilitan la diseminación vertical y horizontal de este mecanismo de resistencia.

Rodríguez (2014) identificó la presencia de carbapenemasas en aislamientos clínicos multiresistentes de *Acinetobacter baumannii*, a partir de 58 aislamientos clínicos, provenientes de cuatro hospitales de la ciudad de Cuernavaca, México. En el 100% de los aislamientos resistentes a carbapenémicos se detectó el gen *bla_{OXA-51-like}*; en el 74.1% de los aislamientos se detectó el gen *bla_{OXA-24}*; en el 56.8% el gen *bla_{OXA-58}* y solo un aislamiento (1.7%) el gen *bla_{OXA-23}*.

Rodríguez, Nastro y Famiglietti (2017) evaluaron la diseminación de Carbapenemasa en *Acinetobacter baumannii* y su diseminación en América Latina. Las carbapenemasas descritas con mayor frecuencia de *A. baumannii*, está asociado a OXA-23, la cual ha sido

aislada en todos los países de la región, siendo relacionada a clones endémicos CC113/CC79, CC104/CC15, CC110/ST25 y CC109/CC1. Argentina (2013/2014) presentó el 100% de OXA23, Brasil (2014) 75% OXA-23 y el 25% OXA-72, Bolivia (2013/2014) 100% OXA-23, Chile (2014) 100% OXA-23, Ecuador 88% OXA-72 y 12% OXA-23, Paraguay y Uruguay presentaron el 100% de OXA-23. A nivel de la región centroamericana se reportaron resistencia a carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii*, pero no de tipo OXA, en su mayoría fueron de tipo metalo-betalactamasa (NDM, VIM e IMP).

Cerda, Martínez y Pérez (2017) analizaron los genes productores de enzimas carbapenemasa de tipo metalo- β - lactamasa, KPC y OXA mediante la técnica de PCR convencional en *Enterobacterias* aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense (HAN). No encontraron genes con la presencia del gen tipo KPC, pero si identificaron la presencia de los genes de tipo: IMP con una prevalencia de 18.43%, SPM con 21.06%, VIM con 2.63%, SIM con un 13.15% y genes de tipo Oxacilinasas: OXA 23 con 5.26%, OXA 40 con 21.05%, OXA 51 con 13.16% y OXA 58 con un 5.26%.

Dretler, Ávila y Sandoval (2018) presentaron su investigación titulada: “High rates of NDM-carbapenemase genes in multi-drug resistant Gram negative rods in Nicaragua” en la que destacan la prevalencia de cepas productoras de carbapenemasas multidrogorresistentes en Nicaragua, ellos realizaron la extracción del ADN bacteriano mediante el instrumento eMag® y todos los aislamientos fueron analizados para detectar la presencia de genes de resistencia a la β -lactamasa blaKPC, blaOXA-48, blaVIM, blaIMP y blaNDM. En el estudio fueron analizados 50 cepas de *Klebsiella pneumoniae* el 92% (n=46) tenían el gen blaNDM y el 8% (n=4) restante presentaron blaKPC, el 100% de *Escherichia coli* (n=4) tenían blaNDM y el 33% de las cepas en estudio de *Acinetobacter baumannii* (n=30) poseían blaNDM; los genes blaVIM y blaIMP se presentaron en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (n=16) en las cuales el 68.8 % (11) correspondían a blaVIM y el 62.5% (10) blaIMP. El gen de blaOXA-48 no fue identificado en ninguno de los aislados en estudio.

Pintos et.al (2019) en su investigación titulada “Epidemiología clínica de las infecciones y colonizaciones causadas por *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Madrid, España”. Tomaron 316 muestras a 272 pacientes de la unidad de cuidados intensivos, El 63,2% de las infecciones en estudio fueron adquiridas a

nivel intrahospitalario, el 35,3% los asociaron a los cuidados sanitarios (ACS). Presentaron infección el 55,1%, siendo la más frecuente la infección del tracto urinario (ITU) (58,7%). Las especies más frecuentes fueron *Klebsiella pneumoniae* (62,7%) y *Enterobacter cloacae* (10,1%). Los tipos de carbapenemasa más frecuente fueron OXA-48 (53,8%) y VIM (43%).

Gijón (2019) en la ciudad de Madrid, España verificó el comportamiento microbiológico y epidemiológico de cepas de *Enterobacterias* de productoras de carbapenemasa de tipo OXA-48 y VIM, analizó 71 aislados productores de OXA-48 de 57 pacientes (61 *K. pneumoniae*, 5 *E. coli*, 2 *Klebsiella aerogenes* y uno de *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter amalonaticus*). El gen de blaOXA-48 se localizó principalmente en plásmidos (≥ 50 kb) pertenecientes a los grupos IncFIIk y/o IncL/M. La secuenciación del genoma completo de la cepa F64-ST11-OXA-48 identificó el gen blaOXA-48 como parte del transposón Tn1999.2 insertado en el gen tir dentro de un plásmido IncL/M de 74,686 pb.

Guevara (2019) investigó los genes de carbapenemasas KPC y OXA-48, en cultivos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, en la ciudad de Trujillo, Perú. Aisló 73 *E. coli* y 27 *K. pneumoniae* del Hospital Regional Docente de Trujillo, de los cultivos en estudio el 20% corresponde a cepas productoras de BLEE, del cual el 17.8% son *E. coli* y 25.9% *K. pneumoniae*; 13.7% *E. coli* y 7.4 % *K. pneumoniae* presentaron resistencia a los carbapenemes, en relación a los genes de KPC y OXA-48 fue del 0% tanto en cultivos de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia microbiana se ha convertido en un problema de salud pública dado su crecimiento exponencial en todo el mundo en los últimos años. La importancia de este fenómeno se entiende por el aumento en la morbilidad y mortalidad asociadas a infecciones producidas por microorganismos multirresistentes.

Dada la importancia de los genes codificadores de enzimas carbapenemasas responsables de la alta resistencia a la familia de los Carbapenems, quienes representan la última línea de antimicrobianos de amplio espectro ante las *Enterobacterias*, así como su facilidad de diseminación entre familias de bacterias ha provocado el incremento alarmante por la posible superposición de otros mecanismos de resistencia (alteración de la permeabilidad, modificación de PBPs o expresión de otras betalactamasas) que incrementan los valores de las CMI.

En Nicaragua se han realizado pocas investigaciones sobre la situación actual de la multiresistencia a los antimicrobianos en *Enterobacterias* y *Acinetobacter baumannii* atribuidas a las carbapenemasas tipo OXA. La utilización de técnicas moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la caracterización genotípica de la resistencia farmacológica, ha sido de gran ayuda. La implementación de esta técnica tiene un gran impacto en el control epidemiológico por los datos obtenidos en las investigaciones sobre farmacoresistencia gracias a las ventajas que provee dicho sistema, las cuales son su gran especificidad y la selectividad, además de la rapidez del análisis.

Ante este hecho surge la necesidad de nuestro estudio monográfico que trasciende el interés de contribuir con información basada en métodos moleculares en donde se revela la incidencia de estas enzimas como problema trascendental en la salud, aportar con datos epidemiológicos de gran relevancia para esta institución de la medicina y diagnóstico clínico en donde los principales beneficiados son los pacientes así como también proponer recomendaciones que permitan disminuir la adherencia de bacterias resistentes y por ende la prevención de la resistencia bacteriana y de las pautas para promover el uso adecuado de los antibióticos.

4. PREGUNTAS DIRECTRICES

- 1) ¿Qué género y especie de las cepas en estudio fueron identificadas?

- 2) ¿Cuáles son los patrones de susceptibilidad antimicrobiana presentados por los microorganismos en estudio?

- 3) ¿Qué genes codificantes para Carbapenemasas de tipo OXA presentaron las cepas en estudio?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

Determinar los genes de resistencia de carbapenemasa tipo OXA en *Enterobacterias* (OXA-48) y *Acinetobacter baumannii* (OXA23 & OXA 58) aisladas en muestras clínicas de los hospitales pertenecientes a la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, durante el período de enero 2016 – diciembre 2018.

5.2. Objetivos Específicos:

- 1) Identificar género y especie de las cepas en estudio.
- 2) Evaluar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos en estudio.
- 3) Detectar la presencia de los genes que codifican la producción de carbapenemasas de tipo OXA en *Enterobacterias* (OXA-48) y *Acinetobacter baumannii* (OXA23 & OXA- 58).

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Bacilos Gram Negativos

El gran grupo de bacilos Gram negativos no exigentes incluye diferentes familias y géneros muchos de ellos muy frecuentes en patología médica. Comparten algunas características tales como poseer en su pared externa un lipopolisacárido (LPS), que les otorga características patogénicas particulares, tóxicas, la llamada endotoxina de las bacterias Gram negativas

En otro orden de cosas muchos de ellos son ubicuos, encontrándose muy difundidos entre los animales y la naturaleza, pudiendo causar enfermedad en el hombre y los animales. (Algorta, 2009)

6.1.1. *Enterobacterias*

Son bacilos Gram negativos rectos, con un diámetro de 0.3 a 1.5 micras. Si son móviles, presentan flagelos peritricos. No forman esporos. Desarrollan en presencia o en ausencia de oxígeno (aerobios-anaerobios facultativos).

Algunos desarrollan en glucosa o lactosa como única fuente de carbono, mientras otros requieren el agregado de vitaminas y/o minerales en el medio de cultivo. Son quimioorganótrofos, poseen metabolismo fermentativo y respiratorio. Son catalasa positivos y oxidasa negativos; reducen los nitratos a nitritos. En los medios de cultivo forman colonias lisas, convexas y circulares de bordes definidos. Algunas especies desarrollan colonias más mucoides que otras. (Baggini, 2017)

6.1.1.1. *Etiología*

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo heterogéneo y extenso de bacilos Gram negativos, cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más) (Carroll, 1954)

6.1.1.2. *Taxonomía*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativos que comprende más de 50 géneros y cientos de especies. Hasta 29 géneros distintos han sido aislados en muestras de origen humano (Carrascoso, 2015)

6.1.1.3. *Características Generales*

Bacilos Gram negativos; no esporulados; las móviles lo son por flagelos peritricos; crecen en medios de cultivo simples de peptona o extracto de carne sin el agregado de suplementos como cloruro de sodio, vitaminas, factores de crecimiento; crecen bien en agar Mac Conkey; son aerobios y anaerobios facultativos; fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas; son catalasa positivos y oxidasa negativos; reducen nitrato a nitrito y tienen un contenido de G+C del 39-59% (Carroll, 1954)

6.1.1.4. *Factores de Virulencia*

Algunas de las características estructurales de las *Enterobacterias* constituyen importantes factores de virulencia como son la presencia de fimbrias, cápsula y el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular. La mayoría de las especies son capaces de producir fimbrias o pili que son responsables de la unión a otras bacterias y a las células del huésped; además hay especies que producen cápsula de naturaleza polisacarida, ésta puede ser rígida y organizada o laxa y de límites mal definidos (glucocálix), y evita la activación del complemento y la fagocitosis.

El LPS está formado por un oligosacárido de repetición con capacidad antigénica conocido como antígeno O y una parte lipídica que constituye un importante factor de virulencia denominado lípido A o endotoxina (Carrascoso, 2015)

6.1.1.5. *Patogenicidad*

La presencia de *Enterobacteriaceae* dentro del organismo es anormal y determina la aparición de infecciones, cuya gravedad depende del punto de entrada. Introducidas por los alimentos, provocan problemas intestinales al adherirse y atravesar la barrera de la mucosa gastrointestinal, manifestada por diarreas y deshidratación.

Las *Enterobacteriaceae* incluyen a organismos que resultan patógenos para el ser humano como la *Escherichia coli* o la *Salmonella*, especialmente importantes en la mortalidad infantil en países en desarrollo y patógenos para las plantas como *Erwinia*, en la mayor parte de los casos causando infecciones oportunistas. Todos los bacilos de *Enterobacteriaceae* son resistentes a antimicrobianos comunes, tales como la Penicilina, la Meticilina y la Clindamicina, entre otro (Carballo, 2011).

6.1.1.6. *Manifestaciones Clínicas*

La familia de las *Enterobacterias* (*Enterobacteriaceae*) incluye múltiples géneros y especies de bacilos Gram negativos, algunos de los cuales son patógenos para el ser humano. Tienen una amplia distribución: en el agua, el suelo, las plantas y la flora intestinal de muchos animales y del hombre. Algunas especies (*Shigella spp.*, varias serovares de *Salmonella*, *Yersinia pestis*) se ha adaptado al ser humano y se consideran patógenos primarios, mientras que otras (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Serratia spp.*, etc.) forman parte del microbiota normal, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas. El principal mecanismo de transmisión de estos microorganismos se produce a través de las manos del personal sanitario, que se coloniza cuando entra en contacto con pacientes que a su vez están colonizados. (Farinas, 2013).

6.1.1.7. *Métodos Diagnósticos*

Existen métodos de diagnóstico muy variados, a partir del aislamiento del microorganismo en medios sólidos selectivos o diferenciales, la observación microscópica mediante la tinción de Gram para clasificar en Gram positivos y negativos, además la realización de pruebas bioquímicas para determinar la actividad enzimática y los metabolitos producidos por la bacteria y la determinación del serotipo de la bacteria.

Sin embargo, algunos microorganismos no pueden observarse al microscopio y otros no crecen en los medios de cultivos por lo que hay que recurrir a otros métodos. Estos incluyen las técnicas genotípicas (moleculares) y el diagnóstico indirecto o serológico, llamado así porque se realiza sobre el suero del paciente.

6.1.2. *No Fermentadores*

Los bacilos Gram negativos no fermentadores constituyen un complejo conjunto de microorganismos aerobios estrictos, de distribución universal, con gran resistencia a factores ambientales severos, lo que les permite propagarse rápidamente y desarrollar resistencia a todos los antimicrobianos convencionales. (Pestaña, 2018).

6.1.2.1. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii, es un bacilo Gram negativo no fermentador, Este microorganismo se ha convertido en los últimos años en un agente problemático asociado a infecciones intrahospitalarias en pacientes que se encuentran en terapia intensiva y que han tenido pérdida en la integridad de la piel o se encuentran con intubación oro traqueal, aunque recientemente, también se han descrito casos de infección en sistema nervioso central, piel, tejidos blandos y hueso. En Europa, ocupan el noveno lugar en bacteriemias en el periodo de 1997-1999. En Latinoamérica, representan 5.3% de los aislamientos de bacteriemias nosocomiales (Jiménez, 2010).

6.1.2.1.1. *Etiología*

Acinetobacter fue descrito por primera vez en 1911. *Acinetobacter* es fácilmente identificado en el laboratorio. *A. calcoaceticus*, *A. Iwoffii*, *A. baumannii* y son las especies más frecuentes. Esta especie es, dentro de su género, la más frecuentemente implicada en infecciones. (López S. y., 2000).

6.1.2.1.2. *Taxonomía*

Los miembros del género *Acinetobacter* han sufrido una gran cantidad de cambios taxonómicos a lo largo de la historia, lo cual ha impedido su estudio adecuado. La última definición taxonómica de *Acinetobacter* corresponde a Bouvet y Grimont e incluye 17 géneros y especies, siendo *A. baumannii* la más frecuentemente aislada y con mayor importancia clínica. Se han definido 19 biotipos de *A. baumannii*, de los cuales los biotipos 1, 2, 6 y 9 son los más frecuentemente hallados en nuestras clínicas. Los grupos 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 y 13 poseen características bioquímicas similares (Marcos, 2015).

6.1.2.1.3. *Características Generales*

Acinetobacter spp es un cocobacilo Gram-negativo no fermentador, aerobio, oxidasa negativa, que sobrevive con gran facilidad en superficies inanimadas, colonizando con frecuencia la piel humana. Miden de 1,5 a 2,5 por 1 a 1,5 micras cuando las poblaciones se encuentran en una fase logarítmica de crecimiento. Son más esféricos cuando alcanzan la fase estacionaria.

La bacteria *A. baumannii* no es fermentadora de la glucosa; es aerobia estricta, es decir, que requiere de oxígeno para su metabolismo. Las especies del género *Acinetobacter* son las únicas de la familia *Moraxellaceae* que carecen de citocromo c oxidasa, por lo cual arrojan resultados negativos en las pruebas oxidasa. (Gomez, 2016).

6.1.2.1.4. Factores de Virulencia

A. baumannii se considera como patógeno de bajo grado, con limitada virulencia. Sin embargo, este microorganismo tiene ciertas características que le permiten incrementar la virulencia de aquellas cepas implicadas en infecciones.

La invasividad de la bacteria puede estar en relación con sustancias de su superficie que la protegen de la fagocitosis, como es la cápsula polisacárida. La presencia de fimbrias, junto con la cápsula, le permite adherirse a las células epiteliales humanas. Se ha observado que las cepas de *Acinetobacter* productoras de slime incrementan la virulencia de otras bacterias gramnegativas, cuando éstas aparecen en infecciones mixtas. La producción del lipopolisacárido puede tener efecto endotoxigénico a través del lípido A. (López S. y., 2000)

6.1.2.1.5. Patogenicidad

Acinetobacter es un patógeno de climas calurosos y húmedos, ambiente característico de unidades de cuidados intensivos (UCI). El interés de *A. baumannii* como patógeno nosocomial cada vez es mayor; La colonización o infección por este microorganismo va a depender principalmente de los factores predisponentes inherentes al hospedero y de los factores de virulencia de la bacteria. Algunas cepas pueden sobrevivir en el ambiente hospitalario durante años debido a su resistencia a los antibióticos o a la supervivencia en ambientes secos inanimado (Salazar, 2005).

6.1.2.1.6. Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la neumonía asociada al respirador y las infecciones hematógenas. Los catéteres vasculares y en el tracto respiratorio han sido fuentes frecuentes de bacteriemias por *Acinetobacter*, con una mortalidad semejante a la producida por otros bacilos Gram negativos.

La neumonía por *Acinetobacter* ocurre predominantemente en pacientes de UTI que requieren ventilación mecánica; es de comienzo tardío. Los pacientes afectados permanecen más tiempo en UTI y con ventilación mecánica antes de obtener la información de la positividad del cultivo que los pacientes con neumonías por otros bacilos Gram negativos o no infectados. Los pacientes infectados con cepas multirresistentes tienen mayor mortalidad que los pacientes infectados con cepas sensibles, dependiendo también de la gravedad de la enfermedad. (Munoz, 2008)

6.1.2.1.7. Métodos de Diagnóstico

A. baumannii es un cocobacilo que tiende a retener el cristal violeta, por lo que puede ser identificado erróneamente como una bacteria Gram positiva. Con respecto a las pruebas de sensibilidad, el E-test ha presentado falencias en la detección de la resistencia a Tigeciclina, uno de los antibióticos usados para el tratamiento de cepas resistentes a Carbapenémicos, Sin embargo, el CHROMagar *Acinetobacter* es un método comercial que ha sido utilizado para la identificación de *A. baumannii* multirresistentes y ha demostrado ser selectivo para esta bacteria y para aquellas cepas resistentes a Carbapenémicos

La carencia de técnicas fenotípicas estandarizadas para la detección de mecanismos de resistencia en *A. baumannii*, ha llevado a que las técnicas basadas en biología molecular constituyan una excelente alternativa. Así, mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden ser detectadas no solo las oxacilinasas OXA-51, OXA-58, OXA-23 y OXA-24, también las carbapenemasas NDM y KPC y la secuencia de inserción ISAbal.

La epidemiología molecular, que combina los métodos de biología molecular con la epidemiología tradicional, ha sido un buen instrumento para el estudio de la diseminación de esta bacteria en el ambiente hospitalario. El uso de electroforesis en gel de campo

pulsado, la tipificación de secuencias de múltiples locus y la tipificación por amplificación de secuencias repetidas, han sido útiles en estudios de brotes y como herramientas fundamentales para conocer el comportamiento de estas infecciones en el ámbito clínico. (Vanegas, 2014)

6.2. Antimicrobianos

Los antimicrobianos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones, y la toxicidad es selectiva con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, colaborando con el sistema inmunológico en la eliminación de los mismos.

Existen distintos tipos de clasificación y agrupación de estas moléculas:

▪ *Según la Interacción Germen- Antibiótico:*

Estos fármacos pueden dividirse en:

- Bactericidas: Su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana.
- Bacteriostáticos: A las concentraciones que alcanza el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana sin causar su destrucción.

▪ *Espectro de Acción:*

- Antibióticos de Espectro Amplio: Como aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes (Aminoglucósidos y Carbapenemes).
- Antibióticos de Espectro Reducido: Antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies (penicilinas).

▪ *Mecanismo de Acción:*

Es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del DNA, inhibidores de la membrana citoplasmática, e inhibidores de vías metabólicas. (Bado, y otros, 2004)

6.3. Resistencia Antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones dejen de ser eficaces. Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes. El fenómeno es muy preocupante porque las infecciones por microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad. La resistencia antimicrobiana es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. Sin embargo, el proceso se ve acelerado por el mal uso y el abuso de los antimicrobianos. (OMS, 2013)

6.3.1. Resistencia a los Carbapenems

La resistencia a los Carbapenémicos muestra una elevada afinidad por las diferentes enzimas que participan en el ensamblaje del péptidoglucano, estructura esencial en la pared celular de las bacterias. Estas enzimas se denominan como PBPs y según su función se clasifican en transglicosilasas, transpeptidasas y carboxipeptidasas.

Los mecanismos de resistencia mejor estudiados incluyen: cambios en proteínas de la membrana externa, bombas de eflujo inespecíficas, producción de enzimas tipo β -lactamasas y modificaciones del sitio blanco. Los tres primeros mecanismos han sido bien descritos en bacterias gram negativas mientras que el último en bacterias gram positivas y casos puntuales en bacterias gram negativas. La adquisición de estos mecanismos origina que la resistencia con frecuencia sea cruzada, pero hay excepciones donde una bacteria puede ser sensible a un carbapenémico y resistente a otro, como ocurre con cepas de *P. aeruginosa* que son sensibles a Imipenem y resistentes a Meropenem y Doripenem, de ello se deriva la necesidad de incluir en el antibiograma a todos los carbapenémicos que se requieran. (Monge, 2013)

6.3.2. Transferencia Genética

La Transferencia Horizontal Genética (THG) o Transferencia Lateral de Genes, es el evento por el cual un organismo adquiere material genético de otra célula que no es su progenitor. Por el contrario, la transferencia vertical ocurre cuando un organismo recibe material genético de

sus ancestros, como en el caso de las bacterias en las cuales la Transferencia Vertical ocurre por fisión binaria cuando las bacterias se duplican. (Flores, 2020).

6.3.2.1. *Transformación*

En la transformación la bacteria receptora acepta moléculas desnudas de ADN que penetran por su pared desde el medio externo. Estos eventos ocurren de forma natural cuando las bacterias receptoras comparten su ecosistema con una población de bacterias donadoras que muere y cuyos cromosomas o plásmidos se fragmentan. El ADN desnudo es destruido rápidamente por DNAsas que son enzimas muy frecuentes en muchos medios, por lo que la probabilidad de que ocurran transformaciones naturales es pequeña. (Flores, 2020)

6.3.2.2. *Conjugación*

Para que dos bacterias puedan conjugarse, tiene que existir contacto físico entre la bacteria donadora de ADN y la receptora. La capacidad de donar la proporciona el poseer un plásmido conjugativo que también se denomina factor de fertilidad o plásmido sexual. El acercamiento entre dos bacterias se da a través de pili sexuales codificados por el plásmido conjugativo. Las bacterias que lo poseen sintetizan 2 o 3 pili, que son adhesinas fímbricas, con los que contactan con bacterias receptoras y se acercan a ellas. Entonces el plásmido conjugativo se rompe por un lugar fijo, que es el llamado origen de transferencia, y una de sus cadenas pasa a través del puente citoplásmico creado por el SSTIV, también codificado por el plásmido conjugativo, hasta el citoplasma de la célula receptora. (Flores, 2020)

6.3.2.3. *Transducción*

En la transducción son los bacteriófagos los que llevan un fragmento de ADN de una bacteria donadora hasta el citoplasma de la receptora. Para infectarlas inyectan su ADN en el citoplasma dejando fuera la cápside del fago. Para producir su progenie, los fagos detienen la replicación de la bacteria, cuyo ADN comienza a degradarse, replican el ADN del virus y traducen la información precisa para sintetizar nuevas cápsides que se ensamblan rodeando a las copias de ADN fágico. Para liberar los nuevos bacteriófagos lisan la bacteria infectada. A veces, durante estos ciclos líticos se introduce por error en una cápside de bacteriófago ADN de la bacteria infectada. Estas partículas pueden iniciar

la infección de otra bacteria y le inyectan de forma automática el ADN que portan. (Flores, 2020).

6.3.3. Genes de Resistencia Enzimática a Carbapenemicos

Los genes que codifican carbapenemasas, usualmente se encuentran en plásmidos o en otros elementos genéticos móviles. Estos, permiten al microorganismo adquirir resistencia a los antimicrobianos. Los resultados son aislamientos multirresistentes, extensivamente resistentes, o panresistentes. Las carbapenemasas descritas en las *Enterobacterias* pertenecen a las cuatro clases de betalactamasas (A, B, C y D), según la clasificación de Ambler basadas en las secuencias moleculares:

- Clase A, Serina carbapenemasas, principalmente enzimas del tipo KPC.
- Clase B o metalo- β -lactamasas (MBL) dependientes de zinc, principalmente enzimas del tipo: IMP, VIM, SPM, GIM.
- Clase C, AmpC hiperexpresada
- Clase D o carbapenemasa tipo OXA (principalmente OXA-48). (Sacsquispe, 2013)

6.4. Métodos de Detección de Susceptibilidad Antimicrobiana

6.4.1. Difusión de Disco o Método de Kirby Bauer

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. (OPS, 2016)

6.4.2. Concentración Mínima Inhibitoria

Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). (R. Taroco, 2008)

6.4.3. Métodos Moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde, la enzima, los oligonucleótidos o Primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. (Tamay de Dios L, 2013)

El procedimiento más común para el análisis de los fragmentos obtenidos en la PCR es la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida. La electroforesis permite separar fragmentos de acuerdo a su tamaño. Los fragmentos de ADN (cargados negativamente) se desplazan por el gel a través de un campo eléctrico hacia el polo positivo. Los fragmentos más pequeños migran más rápido y son los que vemos más abajo en el gel. La elección de la matriz (agarosa o acrilamida) y el porcentaje en la cual separar los productos, dependerá del tamaño de los mismos y los largos diferentes que deseemos separar. Generalmente, los geles de agarosa se visualizan agregando Bromuro de etidio, un agente que se intercala en el ADN y fluoresce cuando es expuesto a la luz UV, y en el caso de los geles de acrilamida, la tinción se realiza con nitrato de plata, que por interacciones electrostáticas se une al ADN. (Greif, 2012)

6.5. Genotipificación para la detección de Carbapenemasa de tipo OXA

6.5.1. Oxacilinasas

Las carbapenemasas de la familia OXA son β -lactamasas que pertenecen a la clase molecular D del grupo funcional 2df y fueron entre las primeras β -lactamasas en ser descritas. Estas enzimas tenían un perfil de sustratos limitado a penicilinas sin embargo ahora son capaces de hidrolizar cefalosporinas de primera generación, combinaciones β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa y Carbapenémicos. Inicialmente el nombre OXA hacía referencia a la capacidad de esta enzima de hidrolizar Oxacilina y Cloxacilina más rápido que las penicilinas convencionales. En la actualidad esta denominación con respecto a su función ya no es válida ya que estas enzimas tienen una baja tasa hidrolítica frente a estos antibióticos.

Inicialmente el nombre OXA hacía referencia a la capacidad de esta enzima de hidrolizar Oxacilina y Cloxacilina más rápido que las penicilinas convencionales. En la actualidad esta denominación con respecto a su función ya no es válida ya que estas enzimas tienen una baja tasa hidrolítica frente a estos antibióticos. (Rodríguez, 2014)

Esta Enzima fue identificada por primera vez en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en 2004. Son un amplio grupo de enzimas con un espectro hidrolítico muy desigual que generalmente están codificadas por genes integrados en plásmidos o integrones, el cual tiene como característica no se inhibirse con Ácido clavulánico, Sulbactam o Tazobactam, con la excepción de OXA-18, lo que dificulta su detección en el laboratorio. (López, Tórres, & Prada, 2015)

En la actualidad, estas enzimas representan una de las clases moleculares con mayor número de variantes ya que se han reportado 418 enzimas de OXA β -lactamasa hasta la fecha.

6.5.1.1. OXA-23 & OXA-58

En *Acinetobacter baumannii* la resistencia a los carbapenémicos se debe a la presencia de CHDLs y constituyen la principal fuente de resistencia adquirida a estos antibióticos. Se encuentran agrupadas en 5 familias: OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like y OXA-143-like. Las CHDLs OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like y OXA-143-like se han identificado principalmente en estructuras genéticas móviles como

plásmidos o transposones que contribuyen a su diseminación entre especies del género *Acinetobacter*. (Rodríguez, 2014)

6.5.1.2. OXA-48

OXA-48 es una enzima que tiene una mayor actividad carbapenemasa que el resto de las OXA, con las cuales comparte menos de un 50% de homología en su secuencia de aminoácidos. El primer productor de OXA-48 identificado fue una enterobacteria, *K. pneumoniae*, en Turquía en el año 2004. Desde entonces ha sido extensamente identificado en brotes nosocomiales. Su distribución mundial incluye países de Europa y África. Hay una creciente identificación de OXA-48 en brotes nosocomiales iniciados por el traslado de pacientes desde áreas endémicas. (Zaro, 2017)

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Tipo de Estudio

Descriptivo, retrospectivo, de corte transversal. En el presente estudio se determinó la presencia de genes de carbapenemasas tipo OXA en cepas de *Enterobacterias* [OXA-48] y *Acinetobacter baumannii* [OXA23 & OXA 58] procedentes de los 18 hospitales afiliados a la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos desde enero 2016 – diciembre 2018.

7.2. Área de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR-MINSA) “Concepción Palacios” ubicado en el Costado Oeste de la Colonia Primero de Mayo, Managua, Nicaragua.

7.3. Universo

El universo estuvo comprendido por 800 cepas resistentes a Carbapenémicos remitidas por los diferentes laboratorios de la Red Nicaragüense para Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (Ver Tabla N°1).

7.4. Muestra

Para la muestra se seleccionaron 200 cepas bacterianas equivalentes al 25%, de estas solamente el 23.75% se encontraban viables para el estudio dejando un total de **190 cepas** bacterianas para el análisis.

7.5. Tipo de Muestreo

No probabilístico, por Conveniencia.

7.6. Criterios de Inclusión

- Cepas que presenten resistencia a los Carbapenémicos remitidas por la Red Nicaragüense para Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos durante el período de enero 2016 a diciembre 2018.

7.7. Criterios de Exclusión

- Cepas que no pertenezcan al género de *Enterobacterias* y que no sean *Acinetobacter baumannii*.
- Cepas no pertenecientes a la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos.

7.8. Métodos y Recolección de la Información

La información del Perfil de susceptibilidad antimicrobiano se obtuvo de los Libros de Registros del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia “Concepción Palacios” de los años 2016, 2017 y 2018.

7.9. Procesamiento de la información

Se empleó el programa de **Microsoft Office Excel (2016)** para la elaboración de la Base de Datos guiada por los libros de registro del Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA) (Base de Datos 2016-2018). En la construcción del protocolo monográfico se implementó **Microsoft Office Word (2016)**.

7.10. Ética de la Investigación

Se elaboró una *carta de solicitud para aprobación de tema monográfico* dirigida a la directora del *Departamento de Bioanálisis Clínico; Msc. Ligia Lorena Ortega Valdés*.

Posteriormente a la aprobación de nuestra investigación, se remitió una *Carta de Solicitud por parte de la directora académica del Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada”, Dra. Zeneyda Quiroz* a la *Dra. Natalia Vanessa Salgado* directora del **Departamento de Docencia del Ministerio de Salud “Dra. Concepción Palacios”**.

La *Dra. Natalia Vanessa Salgado* emitió una petición al director del Centro **Nacional de Diagnóstico y Referencia “Concepción Palacios”** (CNDR-MINSA) el *Dr. Carlos Sáenz* para poder realizar el proceso experimental en el área de Bacteriología de esta institución con el apoyo de la *Licda. Julissa Ávila* (Tutora investigativa-Docente MINSA).

Finalmente, para la *Aprobación del Estudio Investigativo en dicha institución* se nos brindó la *Carta de Aceptación por parte del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia “Concepción Palacios” (CNDR-MINSA) para dar inicio a nuestra investigación.* (Ver imagen N°1)

7.11. Procedimientos y Análisis

Elaboración de Base de Datos (2016-2018, *Enterobacterias y Acinetobacter baumannii*)

Se construyó una Base de datos en **Microsoft Excel** a base de los Libros de Registros de las cepas bacterianas que presentaron carbapenemasas de tipo MBL, provenientes de la Red de nicaragüense de vigilancia a la resistencia antimicrobiana, de donde se obtuvieron los resultados sobre el *Perfil de Susceptibilidad antimicrobiana*.

Reconstitución de las Cepas

Procedimiento:

- ❖ Se esterilizó el área de trabajo y el material implementado en la reconstitución de las cepas.
- ❖ Se atemperaron los medios de cultivo, evaluamos consistencia; si estos se encontraban deshidratados o se detectaba la presencia de colonias contaminantes era necesario su descarte para evitar la contaminación del cultivo. El objetivo era obtener un buen crecimiento del inóculo y colonias puras para el análisis.
- ❖ Con el asa estéril, próximo al mechero se tomaron tres asada (Asa Redonda) del Caldo Leche o BHI + Glicerol y se puso el inóculo en el Agar Mc Conkey; se dejó reposar para que el agar absorbiera el inóculo, se realizó un estriado por agotamiento.
- ❖ Se incubó a una temperatura de 37°C, durante un período de 16-24 hrs.
- ❖ Pasadas las 24 horas se revisó el crecimiento en el Agar Mc Conkey, seleccionamos una Unidad Formadora de Colonias (UFC) y se hizo una estría en Agar TSA
- ❖ Se incubó durante 16 -24 horas a una temperatura de 37°C.
- ❖ Se evaluó la pureza mediante la identificación de colonias u otros agentes contaminantes en

el cultivo para poder realizar los procedimientos posteriores.

Identificación del Agente Etiológico VITEK® 2 Compact (bioMérieux) (Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba, 2010)

El **VITEK® 2 Compact** es un sistema que utiliza tarjetas colorimétricas las cuales, deben de ser inoculadas con una suspensión de un cultivo microbiano puro y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática.

Procedimiento:

- ✓ Esterilización del área de trabajo.
- ✓ Calibración del Densichek se elaboró una suspensión de 0.5 McFarland:
- ✓ Selección de la cantidad de tubos de ensayos a utilizar, se suministró 3ml de Solución salina estéril en los tubos de ensayos.
- ✓ Con un hisopo estéril se tomó una pequeña cantidad de inóculo.
- ✓ Se suspendió cuidadosamente el inóculo en la solución salina, se verificó la concentración del inóculo presente en el tubo de ensayo con el Densichek. Está no debía de ser menor o mayor que 0.5 McFarland.
- ✓ Después de haber elaborado la suspensión se procedió a la inserción de las tarjetas de identificación del VITEK® 2 Compact:
 - Primeramente, se insertó la tarjeta de identificación de Gram Negativos (VITEK® 2 GN).
 - Para el Perfil de Resistencia Antimicrobiana se introdujeron las siguientes tarjetas:
 - VITEK® 2 AST-N279
 - VITEK® 2 AST-XN06
- ✓ Se insertaron los datos del paciente o pacientes en el sistema VITEK® 2 Compact,

se archivaron los datos clínicos; se seleccionó el casete en el cual fueron insertadas las suspensiones.

- ✓ Se registró el código de barras e inició el escaneo de las tarjetas de identificación; posteriormente la identificación de cada tarjeta con el código del paciente, guardar todos los datos e insertar el casete en el VITEK[®] 2; se presionó el botón de iniciar llenado, al terminar el llenado se transfirió a la segunda bandeja del equipo. Realización de lectura por el equipo automatizado.

- ✓ Con el objetivo de tener control de las muestras insertadas se imprimió el protocolo de trabajo del casete insertado.

Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana (Kirby Bauer y CIM)

Método de Kirby Bauer o Difusión de Disco

Para el perfil de Susceptibilidad antimicrobiano se empleó en cada uno de los centros asistenciales pertenecientes a la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, el ***Método de Kirby Bauer o Difusión de Disco***.

Extracción de ADN (Laboratorio de Biología Molecular-Alimentos/Bacteriología- CNDR, MINSA)

Procedimiento:

- Se preparó en un vial cónico de 1.5 mL con 100 µl de Agua de calidad molecular (libre de nucleasas).

- Se realizó un pool de célula/UFC a partir del cultivo obtenido del medio de TSA en el vial cónico con 100 µl de agua de calidad molecular.

- Se dio Vortex para homogenizar la suspensión

- Se colocó el tubo de eppendorf en el Thermomix a una temperatura de 98° / 99°C durante 10 min a 240 rpm.

- Se retiró el vial y dejar enfriar en hielo durante 5 minutos.
- Fue centrifugado a 14,000 rpm por un período de 5 minutos, con una temperatura de 4°C.
- Fue preparado un tubo de Eppendorf con 450µl de agua de calidad molecular
- Se trasegaron 50 µl del vial donde se realizó la extracción de ADN al tubo preparado con 450 µl de agua de calidad PCR.
- Fueron descartado los 50µl restante del tubo de eppendorf ocupado para la extracción de ADN.
- Se almacenó a una temperatura de 4°C. (Alejos, Aragón y Cornejo, 2004)

Caracterización genotípica por medio de la técnica de PCR convencional (OXA)

Para la realización de la parte genotípica de las cepas en búsqueda de genes que codifiquen la producción de carbapenemasa de tipo OXA por medio de **PCR Convencional- Simple** se implementaron los Primers para OXA-23(Ver tabla N°2), OXA-48 (Ver tabla N°3) & OXA-58 (Ver tabla N° 4).

Preparación de la Mezcla de Reacción para Carbapenemasa de tipo Oxacilinasas (OXA-23 & OXA-58) (OXA-48)

- ✓ Rotulado de tubos de eppendorf de 1mL para mezcla de Reacción.
- ✓ Se prepararon los viales donde será distribuida la Mezcla de Reacción según Protocolo para PCR. Incluir un vial para evaluar la mezcla de reacción.
- ✓ Se agregaron 17,5 µl de H₂O libre de nucleasas en el vial para la Mezcla de Reacción.
- ✓ Posteriormente fueron suspendidos 2,5 µl de Buffer 10X.
- ✓ Se agregaron 0,75 µl de MgCl₂
- ✓ Se añadió 0,5 µl de los dNTPs [10 µM]

- ✓ Se pusieron 0,5 µl de cada Iniciador con una concentración de [10 µM] cada uno (*forward & reverse*).
- ✓ Finalmente, fueron adicionados 0,15 µl de Taq pol [5U/ µl]

Nota: OXA 23 (Ver Tabla N° 5), OXA 48 (Ver Tabla N° 6), OXA 58 (Ver Tabla N°7)

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Realizada la Mezcla de Reacción se tomó una cantidad de 22.5 µl y se colocó en tubos de Eppendorf, rotulados previamente con el código de la respectiva cepa en estudio; posteriormente se agregó 2.5µl de ADN muestra y los controles positivos previamente extraídos; se llevó al termociclador para la amplificación.

Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo de ciclado:

- **OXA-23:** Desnaturalización por 5 min; seguido de 35 ciclos de Desnaturalización a 94°C durante 30 seg.; hibridación a 55°C durante 30seg.; amplificación 72°C durante 30seg y extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 min, temperatura de enfriamiento 4°C. (Ver Imagen N° 2)

Controles de Corrida:

- **Negativo:** *Escherichia coli ATCC 25922*
- **Positivo:** 57 CC 2020, 57 CC 2020 1/10, 58 CC 2020 y 60 CC 2020
- **OXA- 48:** Desnaturalización por 5 min; seguido de 35 ciclos de Desnaturalización a 94°C durante 30 seg.; hibridación a 52°C durante 30seg.; amplificación 72°C durante 30seg y extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 min, temperatura de enfriamiento 4°C. (Ver Imagen N° 3)

Controles de Corrida:

- **Negativo:** *Escherichia coli ATCC 25922*
- **Positivo:** OPS 204 A, OPS 244 y OPS 264

- **OXA-58:** Desnaturalización por 5 min; seguido de 35 ciclos de Desnaturalización a 94°C durante 30 seg.; hibridación a 54°C durante 30seg.; amplificación 72°C durante 30seg y extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 min, temperatura de enfriamiento 4°C. (Ver Imagen N° 4)

Controles de Corrida:

- **Negativo:** *Escherichia coli* ATCC 25922
- **Positivo:** OPS 222 A, OPS 222 A 1/10 y 59 CC 2020

Preparación de 500 mL TBE 10X

Procedimiento

✓ ***Pesaje:***

En una balanza analítica se pesó:

- 54 g de Tris [tris (hidroximetil) aminometano]
 - 27.5 g Ácido Bórico
 - 3.72 g de EDTA [Ácido Etilendiaminotetraacético]
- ✓ Se colocaron los solutos pesados en un matraz Erlenmeyer de 1000mL
- ✓ En una Probeta de 500 mL; se midieron 250 mL de Agua Destilada.
- ✓ Fueron trasegados 250 mL de Agua Destilada al matraz Erlenmeyer de 1000 mL que contiene los solutos.
- ✓ Se introdujo un magneto al Erlenmeyer que tiene la solución.
- ✓ Fue puesto en el Hot-Plate hasta que se encuentre disuelto totalmente el soluto, si es necesario aplicar un poco de calor (50°C) para disolverlo.
- ✓ Al encontrarse disuelto totalmente el soluto se pasaron los 250 mL de la solución a un

matraz aforado de 500 mL, y aforar con agua destilada.

- ✓ Se trasegó el TBE 10X al matraz Erlenmeyer de 1000 mL.
- ✓ Se rotuló con el nombre de la solución TBE 10X y su fecha de elaboración. Fue almacenado a temperatura ambiente.

Preparación de TBE 1 X

Procedimiento

- En una probeta se midieron 100 mL de TBE 10X
- Fueron trasegados a un matraz Erlenmeyer de 1000 mL
- Con una probeta de 500 mL se midió primeramente 500 mL de agua destilada y fueron trasegados al Erlenmeyer que contiene los 100 mL de TBE 10X, luego se midieron 400mL de agua destilada e igualmente fueron traspasados al Erlenmeyer para disminuir finalmente la concentración del TBE 10X a 1X.
- Se homogenizó la solución; fue rotulada con el nombre de la solución TBE 1X junto con su fecha de preparación esta de sé almaceno a temperatura ambiente.

Preparación del gel de Agarosa (1.0%) para la corrida de Electroforesis

Procedimiento

Para Cámara de Electroforesis de 10 pozos

- En la balanza analítica pesar 0.6 g de gel de Agarosa.
- Colocar en un matraz de 125 mL.
- Medir en una Probeta de 100 mL; 60 mL de agua Destilada.
- Calentar en el microondas dando pulsos de 30 segundos hasta que la agarosa se haya disuelto totalmente.

- Esperar que la solución se enfríe antes de verter en la bandeja de electroforesis.
- Con cinta adhesiva sellar los laterales de la cámara de electroforesis colocar el peine para la formación de los pozos donde se colocarán las muestras.
- Colocar la solución de agarosa en la cámara de electroforesis y esperar que gelifique.

Para Cámara de Electroforesis de 12 pozos

- En la balanza analítica se pesaron 0.9 g de gel de Agarosa.
- Se colocó en un matraz de 250 mL.
- Se midió en una Probeta de 100mL; 90 mL de agua Destilada.
- Fue calentado en el microondas dando pulso de 30 segundos hasta que la agarosa se haya disuelto totalmente.
- Se espero a que la solución se enfriará antes de verter en la cámara de electroforesis.
- Con cinta adhesiva fueron sellados los laterales de bandeja de electroforesis, se colocó el peine para la formación de los pozos donde se colocarán las muestras.
- Se colocó la solución de agarosa en la cámara de electroforesis y se esperó a que se gelificará.

Una vez enfriada y gelificada la agarosa se quitó la cinta adhesiva y fue ubicada la bandeja de electroforesis en la cámara. Se llenó la cámara de electroforesis con TBE 1X hasta que cubriera el gel de agarosa totalmente.

Electroforesis con gel de Agarosa

- Poner en cada vial que contiene el producto amplificado 5 µl de Buffer de carga.
- Por cada 25 µl de Marcador poner 5 µl de Buffer de Carga.
- Homogenizar muy bien cada solución.

- Colocar 8 μl de cada muestra en su posición correspondiente según el protocolo de corrida, incluyendo marcador molecular (4 μl) y controles positivos (8 μl), negativos (8 μl) y mezcla de reacción para poder validar la técnica.
- Cerrar la cámara de electroforesis conectar la fuente de poder y programar la potencia y el tiempo de corrida de acuerdo al número de muestras en el proceso, para la cámara de electroforesis que tiene capacidad de 10 pozos, emplear un voltaje de 120 V durante 45 min; para la cámara con capacidad de 12 pozos, emplear una potencia de 120 V durante 80 minutos. (Ver Tabla N° 8).

TINCIÓN DE GEL DE AGAROSA CON LAS MUESTRAS:

1. Se preparó la solución para la tinción: En un recipiente rectangular de 1000 mL con tapa, se depositaron 500 mL de agua destilada y se añadieron 40 μl de Gel RED.
2. Después de la corrida de Electroforesis, se ingresaron los Geles en el recipiente que contenía la solución de tinción, tapar el recipiente y poner una bolsa negra para evitar que los rayos de luz penetren el recipiente; por lo que el Gel Red es fotosensible.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

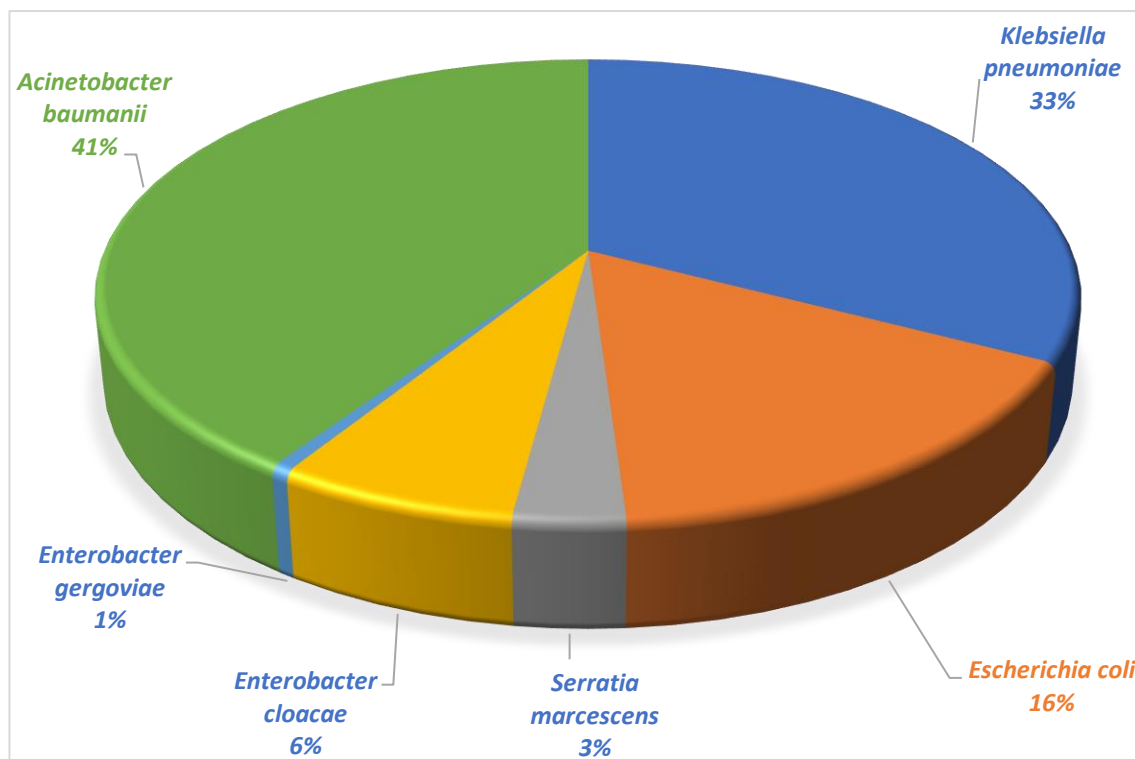
| N° | OBJETIVO | VARIABLE | SUB-VARIABLE | INDICADOR | VALOR | CRITERIOS | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------|------------------|
| 1 | Identificar género y especie de las cepas en estudio. | Agente Etiológico | VITEK® 2 Compact | <i>GENERO Y ESPECIE</i> | <i>Enterobacterias</i> | | - |
| | | | | | <i>Acinetobacter baumannii</i> | | - |
| 2 | Evaluar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos en estudio. | Perfil de susceptibilidad | <i>Enterobacterias</i> | Imipenem | Halo de Inhibición | S ≥ 23 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | I 20 -22 mm | | |
| | | | | | R ≤ 29 mm | | |
| | | | | Meropenem | Halo de Inhibición | S ≥ 23 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | | I 20 -22 mm | |
| | | | | | | R ≤ 29 mm | |
| | | | | Ceftriaxona | Halo de Inhibición | S ≥ 23 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | | I 20 -22 mm | |
| | | | | | | R ≤ 19 mm | |
| | | | | Ceftazidima | Halo de Inhibición | S ≥ 21 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | | I 18 -20 mm | |
| | | | | | | R ≤ 17 mm | |
| | | | | Cefepime | Halo de Inhibición | S ≥ 25 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | | I 19 - 24 mm | |
| | | | | | | R ≤ 18 mm | |
| | | | | Aztreonam | Halo de Inhibición | S ≥ 21 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | | I 18 -20 mm | |
| | | | | | | R ≤ 17 mm | |
| | | | | Gentamicina | Halo de Inhibición | S ≥ 15 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | | I 13-14 mm | |
| | | | | | | R ≤ 4 mm | |

| | | | | |
|----------------------------|--------------------|----------|--------------|------------------|
| Trimetoprim sulfametoxazol | Halo de Inhibición | S | ≥ 16 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 11-15 mm | |
| R | ≤ 10 mm | | | |
| Colistín | CIM | I | ≤ 2 | Normas CLSI 2020 |
| | | R | ≥ 4 | |
| Imipenem | Halo de Inhibición | S | ≥ 22 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 19 -21 mm | |
| | | R | ≤ 18 mm | |
| Meropenem | Halo de Inhibición | S | ≥ 18 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 15 -17 mm | |
| | | R | ≤ 14 mm | |
| Ceftriaxona | Halo de Inhibición | S | ≥ 21 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 14 -20 mm | |
| | | R | ≤ 13 mm | |
| Cefepime | Halo de Inhibición | S | ≥ 18 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 15 -17 mm | |
| | | R | ≤ 14 mm | |
| Piperacilina | Halo de Inhibición | S | ≥ 21 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 18 -20 mm | |
| | | R | ≤ 17 mm | |
| Piperacilina + Tazobactam | Halo de Inhibición | S | ≥ 21 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 18 -20 mm | |
| | | R | ≤ 17 mm | |
| Ampicilina+ Sulbactam | Halo de Inhibición | S | ≥ 15 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 12 -14 mm | |
| | | R | ≤ 11 mm | |
| Gentamicina | Halo de Inhibición | S | ≥ 15 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | I | 13 -14 mm | |
| | | R | ≤ 12 mm | |

| | | | | | | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|--------------|------------------|
| | | | Trimetroprim sulfametoxazol | Halo de Inhibición | S | ≥ 16 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | I | 11 -15 mm | |
| | | | | | R | ≤ 10 mm | |
| | | | Minociclina | Halo de Inhibición | S | ≥ 16 mm | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | I | 13 -15 mm | |
| | | | | | R | ≤ 12 mm | |
| | | | Colistín | CIM | I | ≤ 2 | Normas CLSI 2020 |
| | | | | | R | ≥ 4 | |
| 3 | Detectar la presencia de los genes que codifican la producción de carbapenemasas de tipo OXA en <i>Enterobacterias</i> (OXA-48) y <i>Acinetobacter baumannii</i> (OXA23 & OXA- 58). | Gen de tipo OXA | OXA 23 | 513 pb | Banda de Electroforesis Presencia/Ausencia | | - |
| | | | OXA 48 | 775 pb | Banda de Electroforesis Presencia/Ausencia | | - |
| | | | OXA 58 | 383 pb | Banda de Electroforesis Presencia/Ausencia | | - |

8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gráfico N° 1: Identificación de género y especie de *Enterobacterias* y *Acinetobacter baumannii*, 2016-2018 (n=190)



Fuente: TABLA N° 9

Se realizó el aislamiento de 190 cepas bacterianas correspondientes al período de 2016-2018, en el Departamento de Bacteriología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia “Concepción Palacios”. El 59% de los aislados corresponden al grupo de *Enterobacterias* (n=113) de este grupo el 33% pertenecía a *Klebsiella pneumoniae* (n=62), 16% *Escherichia coli* (n=31), 3 % *Serratia marcescens* (n= 6), 6% *Enterobacter cloacae* (13) y el 1% a *Enterobacter gergoviae* (n=1). El 41% restante de los microorganismos en estudio correspondía a *Acinetobacter baumannii* (n=77).

Los resultados del presente estudio se correlacionan con el estudio realizado por Echeverri, et.al (2012) en donde refiere que las enterobacterias comprenden universalmente el 50% de los aislados encontrados en infecciones adquiridas en los hospitales y 80% de todos los aislados Gram negativos.

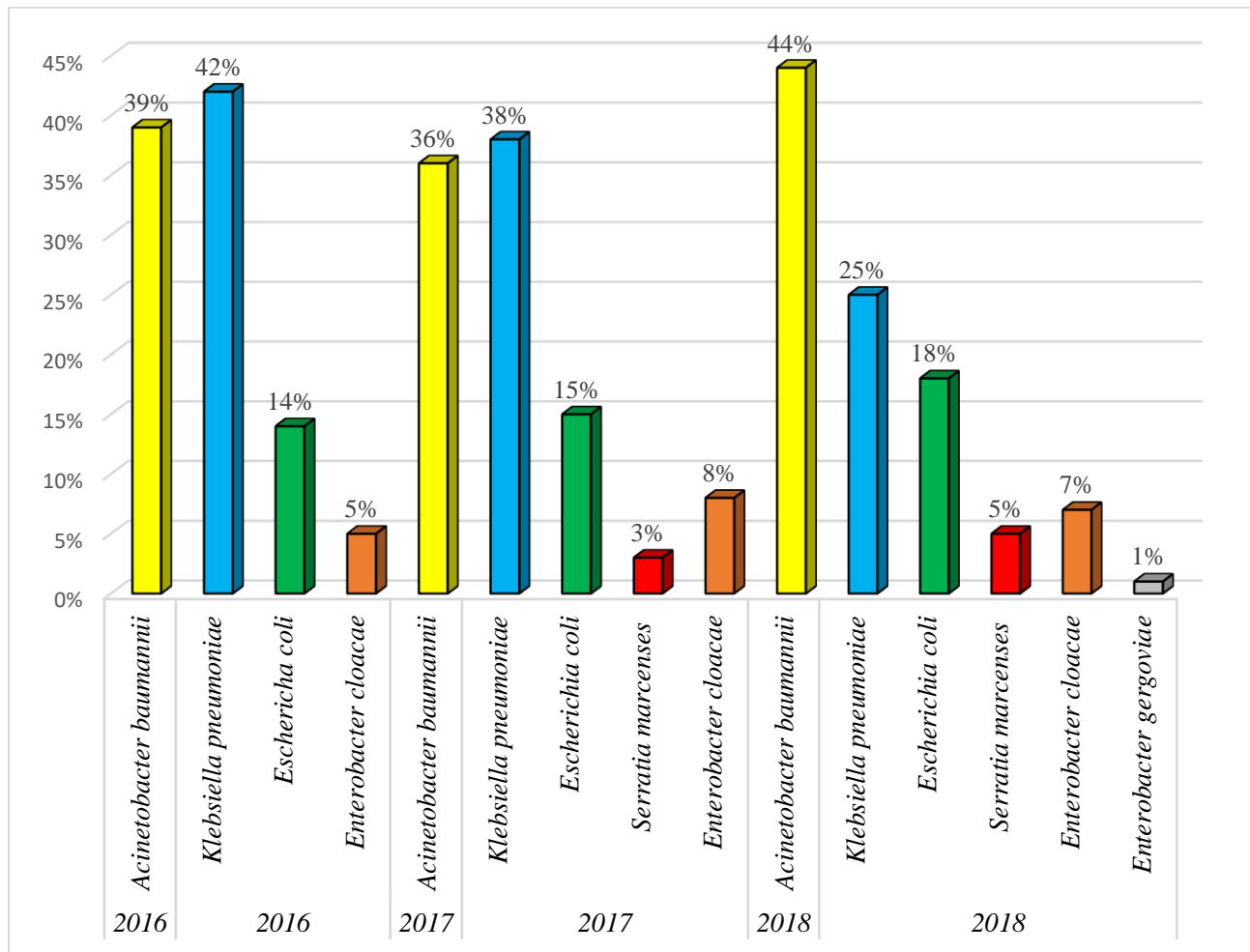
Los hallazgos de nuestra investigación son similares a los resultados presentados por Pérez (2016) donde los microorganismos aislados con mayor frecuencia pertenecían al grupo de Enterobacterias con un 64% (n=88), 18% (n=25) Gram negativos no fermentadores de estos el 17% eran *Acinetobacter baumannii* (n=24). Dentro del grupo de Gram negativos predomina mayormente *Klebsiella pneumoniae* con un 36% (n=50), seguido de *Enterobacter cloacae* 5% (n=7) y finalmente 3% de *Escherichia coli* (n=4) a diferencia de nuestros datos donde *E. coli* ocupa el segundo lugar con una mayor cantidad de aislados.

Vera, et.al (2017) afirma que *Klebsiella pneumoniae* es predominante a nivel mundial dentro de las principales especies de enterobacterias relacionadas con infecciones intrahospitalarias, su prevalencia se debe a: hospitalización prolongada, estadía en unidades de cuidados intensivos, pacientes inmunodeprimidos, dispositivos invasores, terapia antimicrobiana previa, recepción de trasplantes y ventilación mecánica. Por otra parte, el segundo agente involucrado en infecciones intrahospitalarias es *Escherichia coli*, este germen por lo general se encuentra como parte del microbiota normal del intestino siendo este una vía idónea para su transporte en el personal de salud facilitando su rápida proliferación en las unidades hospitalarias.

Estos datos concuerdan con datos a nivel mundial donde *Klebsiella pneumoniae* es la mayor causante de infecciones resistentes a carbapenemasas con una prevalencia del 70% seguida por *E. coli* con un 20% (OMS,2013).

Otros de los bacilos Gram negativos incluidos en este estudio fue *Acinetobacter baumannii* el cual se ha convertido en uno de los microorganismos más frecuentemente aislados en infecciones asociadas a la atención de la salud a nivel de la región latinoamericana, producto de su rápida diseminación de aislamientos multiresistente, siendo uno de los principales causantes de las infecciones intrahospitalarias. Rodríguez (2014) afirma que el éxito de *Acinetobacter baumannii* de mantenerse endémico es su capacidad de combinar ciertos mecanismos de resistencia ya sea enzimáticos o no enzimáticos, como: modificación de la permeabilidad mediada por porinas, el incremento de bombas de eflujo y sus posibilidades de generar hidrólisis enzimática.

Gráfico N° 1.1: Identificación de género y especie de *Enterobacterias* y *Acinetobacter baumannii*, Año 2016- 2018, (n=190)



Fuente: TABLA N° 10

Del año 2016 se analizaron 36 cepas bacterianas, el 61% pertenecientes a la familia de *enterobacterias* (n=22) donde se detectó como principal agente causal de infecciones intrahospitalarias a *Klebsiella pneumoniae* (n=15) con un 42%, seguido con 14% *Escherichia coli* (n=5), 5% *Enterobacter cloacae* (n=2). 39% *Acinetobacter baumannii* (n=14).

El grupo de estudio de 2017 agrupó a 66 cepas bacterianas, identificando el 64% como *enterobacterias*(n=42): 38% *Klebsiella pneumoniae* (n=25), 15% *Escherichia coli* (n=10), 3% *Serratia marcescens* (n=2) y 8% *Enterobacter cloacae* (n=5). Siendo el 36% *Acinetobacter baumannii* (n=24).

De los 88 aislados del año 2018, el 56% de estas corresponde a la familia de *enterobacterias* (n=49): 25% *Klebsiella pneumoniae* (n=22), 18% *Escherichia coli* (n=16), 5% *Serratia marcescens* (n=4), 7% *Enterobacter cloacae* (n=6) y 1 % de *Enterobacter gergoviae*. En este año el 44% fue de *Acinetobacter baumannii* (n=39).

Analizando el comportamiento de *Klebsiella pneumoniae* como el principal agente causal de infecciones intrahospitalarias, perteneciente a la familia de *Enterobacteriaceae* para 2016 se aislaron 15 cepas de *K. pneumoniae* aumentando el número de aislados para 2017 con 25 y disminuyendo a 22 para el año 2018, que a diferencia de *Escherichia coli* nuestro segundo agente causal de infecciones nosocomiales, que ha aumentado su incidencia de 5-6 aislados más por año. En relación a *Enterobacter cloacae* se pudo observar un comportamiento constante en su incidencia que no difiere de (+/-) 2 o 3% por año.

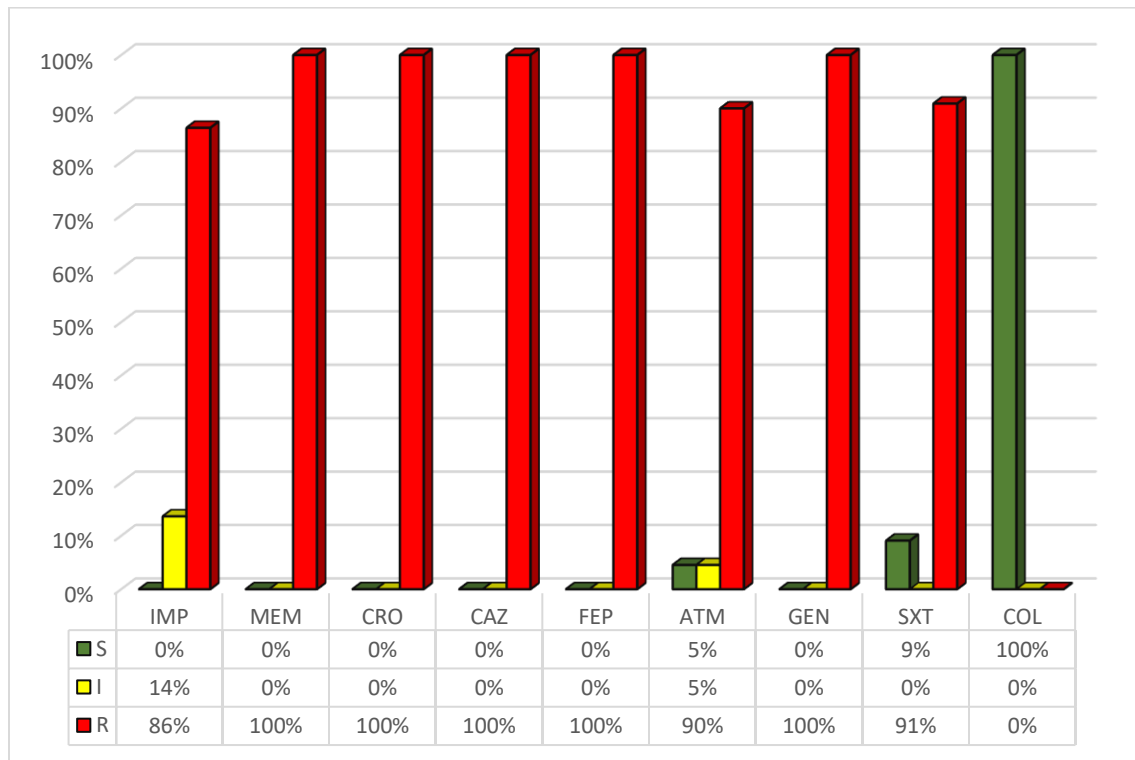
En la gráfica anterior, se observa que en el año 2017 y 2018 se aisló *Serratia marcescens* en los laboratorios de la red como microorganismo causante de infecciones asociadas al servicio hospitalario, con un 3% y 5% respectivamente, en este último año otro de las bacterias asociadas a estos padecimientos fue *Enterobacter gergoviae* con el 1% de incidencia hospitalaria.

Durante el estudio se determinó que el aislamiento de *Acinetobacter baumannii* se ha ido incrementando cada año, en 2016 fueron identificadas 14 cepas, en el año 2017 su incidencia fue en aumento, alcanzando un total de aislamientos de hasta 24 cepas, y para el año 2018 se obtuvo la mayor cantidad de *A. baumannii* con 39 aislamientos. Rodríguez (2014) afirma que este microorganismo ha sido incluido por la Organización mundial de la salud como un agente oportunista, por lo que debe de ser objeto de vigilancia epidemiológica a nivel hospitalario.

Según Vanegas, Roncancio y Jiménez (2014) Este es un agente capaz de sobrevivir a los ambientes hostiles y cuenta con mecanismos de resistencia a los antimicrobianos de forma intrínseca, como las ADC que es una cefalosporinasa de tipo AmpC y OXA-51, los cuales hidrolizan débilmente a Penicilinas y Carbapenémicos, lo antes descrito de *A. baumannii* son algunas de las razones por las que mantiene su prevalencia en las infecciones intrahospitalaria.

Gráfico N° 2: Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana “Enterobacterias 2016.”

Enterobacterias 2016 (n=22)



Fuente: TABLA N° 11

López et.al (2013) describe que la resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública, que día a día, se va incrementando. Por esta razón a nivel mundial ha sido necesaria la generación de redes de vigilancia. El propósito clínico de este es predecir cómo se comportará una cepa bacteriana al ser enfrentada o retada a un antibiótico administrado. Un resultado de sensibilidad definirá que la bacteria será eliminada y que el paciente responderá al tratamiento con el antibiótico. La resistencia a un antibiótico especial indicará que el proceso infeccioso continuará y que la bacteria no será eliminada.

Por lo antes mencionado en el presente estudio evaluamos los diferentes patrones de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Enterobacterias* y *Acinetobacter baumannii* las cuales poseen resistencia a los Carbapenémicos y a otra serie de antimicrobianos haciendo de estas, cepas multidrogosresistente y algunas extremadamente resistentes.

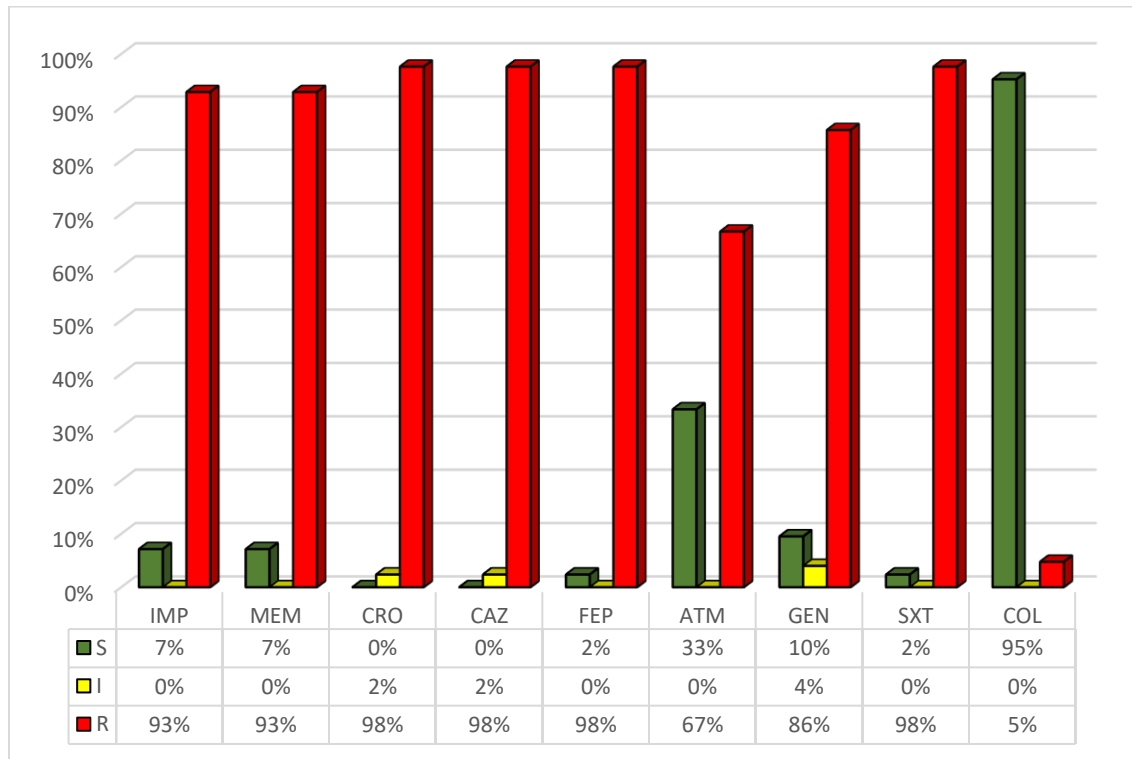
En el año 2016 las 22 cepas de *Enterobacterias* en estudio presentaron un 100% de resistencia a Cefalosporinas de 3era y 4ta generación (Ceftriaxona, Ceftazidima y Cefepime. En la familia de Carbapenémicos se apreció resistencia para Meropenem e Imipenem de 100% y 86% respectivamente. Para Aztreonam (ATM) se encontró 5% de susceptibilidad y 9% para Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT).

Dentro de nuestros hallazgos el 100 % de las cepas son sensibles a Colistín (COL), siendo tomado como una buena opción terapéutica para pacientes con microorganismo multidrogoresistentes o en este caso extremadamente resistente, sin embargo, este puede traer repercusiones en la salud de los pacientes por su alta nefrotoxicidad.

La problemática de las infecciones por microorganismos multirresistente en los hospitales del país, es posible que está asociada a la presión ejercida por el uso indiscriminado de los antibióticos, la mala implementación de los equipos de protección personal (EPP), un lavado de manos deficientes y el mantenimiento inadecuado que se le brinda los equipos hospitalarios, todos estos factores van de la mano con las largas estancias en el hospital y el hacinamiento, lo que conlleva a la fácil diseminación de estos patógenos y a la resistencias antimicrobianas cruzadas a través de plásmidos o integrones.

Gráfico N°2.1: Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana en Enterobacterias 2017.

Enterobacterias 2017 (n=42)



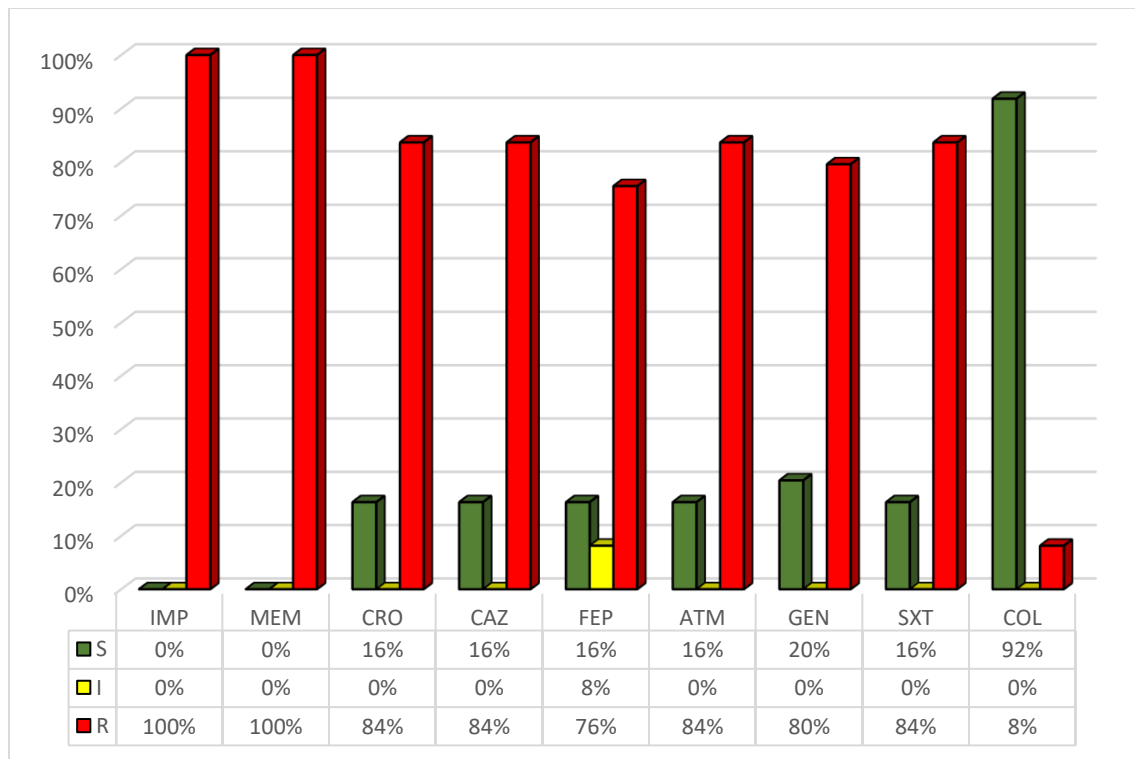
Fuente: TABLA N° 12

Para este año 2017 se estudiaron 42 cepas de *Enterobacterias* estas presentaron una resistencia mayor del 90% en Ceftriaxona (CRO), Ceftazidima (CAZ), Cefepime (FEP), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM) y Trimetroprim-Sulfametoxazol (SXT). Para Gentamicina (GEN) 86% de los aislados presentaron resistencia, en Aztreonam (ATM) 33% de sensibilidad y 2 % para Trimetroprim-Sulfametoxazol. También se observó un incremento de 5% en la resistencia de Colistín (COL), esto se debe al aislamiento de *Serratia marcescens* en los laboratorios de la red, este microorganismo posee resistencia natural a Colistina. Los datos antes mencionados se relacionan con el estudio de Ortíz (2015) realizado en el hospital Antonio Lenin Fonseca en el año 2014 donde las cepas de dicha investigación también presentaron resistencia a la mayoría de los antibióticos evaluados como Cefalosporinas, Aminoglucósidos, Sulfamidas y Carbapenémicos, dejando como única opción terapéutica Colistina.

Otro estudio que muestra una tendencia de resistencia farmacológica es la investigación realizada en Chiapas, México por Rincón y Navarro (2015), con datos que difieren de los nuestros. Ellos obtuvieron un incremento de resistencia en Ceftazidima del 85.4% en 2011 al 93.5% en 2012, a diferencia de nuestros hallazgos que del 100% de resistencia en 2016 paso a un 98% en 2017, el 2% restante son de microorganismo con una resistencia intermedia para este fármaco. En relación a la familia de Carbapenémicos en el estudio de Rincón y Navarro no hubo variaciones en la resistencia de estos, a diferencia del nuestro donde Imipenem muestra un aumento del 7% para el año 2017 y Meropenem paso de tener el 100% de resistencia en 2016 a un 93% en 2017.

Gráfico N^o2.2: Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana Enterobacterias 2018.

Enterobacterias 2018 (n=49)



Fuente: TABLA N^o13

En el año 2018 se analizó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana a 49 cepas del grupo de *Enterobacteriaceae*, estos mostraron una resistencia mayor del 80% en Cefalosporinas de 3era generación y un 76% en Cefepime (FEP). Gentamicina (GEN) presentó un 20% de sensibilidad y 16% para Aztreonam (ATM) y Trimetroprim-Sulfametoxazol (SXT). Imipenem y Meropenem presentaron un 100% de resistencia y para el grupo de las Polimixinas (Colistín) se apreció un 8%

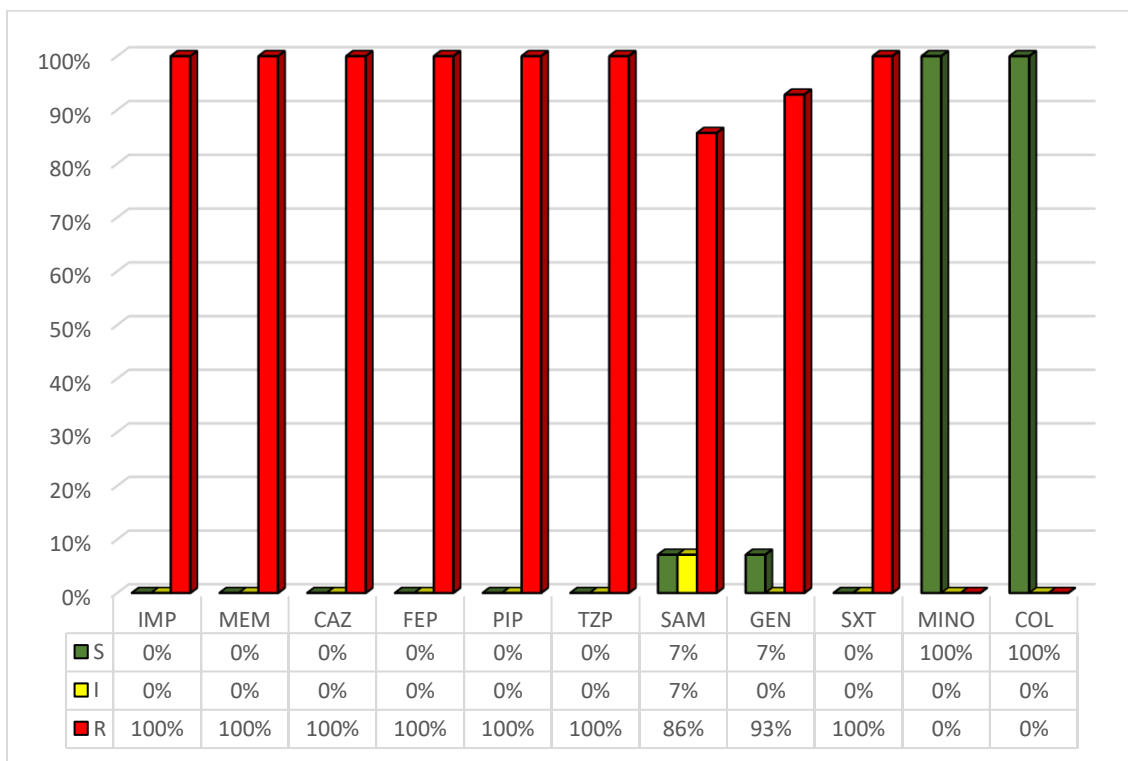
de resistencia, haciendo de este una buena opción terapéutica como lo afirma la OMS (2020), La Colistina es el único tratamiento de último recurso para infecciones potencialmente mortales por *Enterobacterias* (es decir, *E. coli*, *Klebsiella*, etc.) resistentes a los antibióticos Carbapenémicos. También se han detectado bacterias resistentes a la Colistina en varios países y regiones.

La mejor opción terapéutica es Colistín ya que en el comportamiento de los 3 años, la mejor eficacia contra las cepas debido a que la mayoría se presentó sensible a este antibiótico, es importante señalar que a pesar de la efectividad de estos fármacos como alternativas se debe tener especial atención en las dosis usadas por su alta nefrotoxicidad, este podría producir una complicación de la condición patológica del paciente.

Otras opciones terapéuticas para Gram negativos resistentes son: Aztreonam-Avibactam y Ceftazidima-Avibactam. Según Calbo y Salavert (2017) el Avibactam es empleado como un inhibidor incrementando la actividad de estas moléculas frente a enterobacterias productoras de enzimas de las clases A (TEM, SHV, CTX- M, KPC, GES, SME) y C (AmpC, FOX, CMY, LAT, ACC, DHA), pero solo con una acción parcial, probablemente no siempre suficiente in vivo, frente a betalactamasas de clase D (OXA-I, OXA-48, OXA-1). Es capaz de inhibir carbapenemasas tipo KPC y OXA-48, pero no las metalo- β -lactamasas (NDM, IMP, VIM, PER, VEB)

Gráfico N°2.3: Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii* 2016.

Acinetobacter baumannii 2016 (n=14)



Fuente: TABLA N° 14

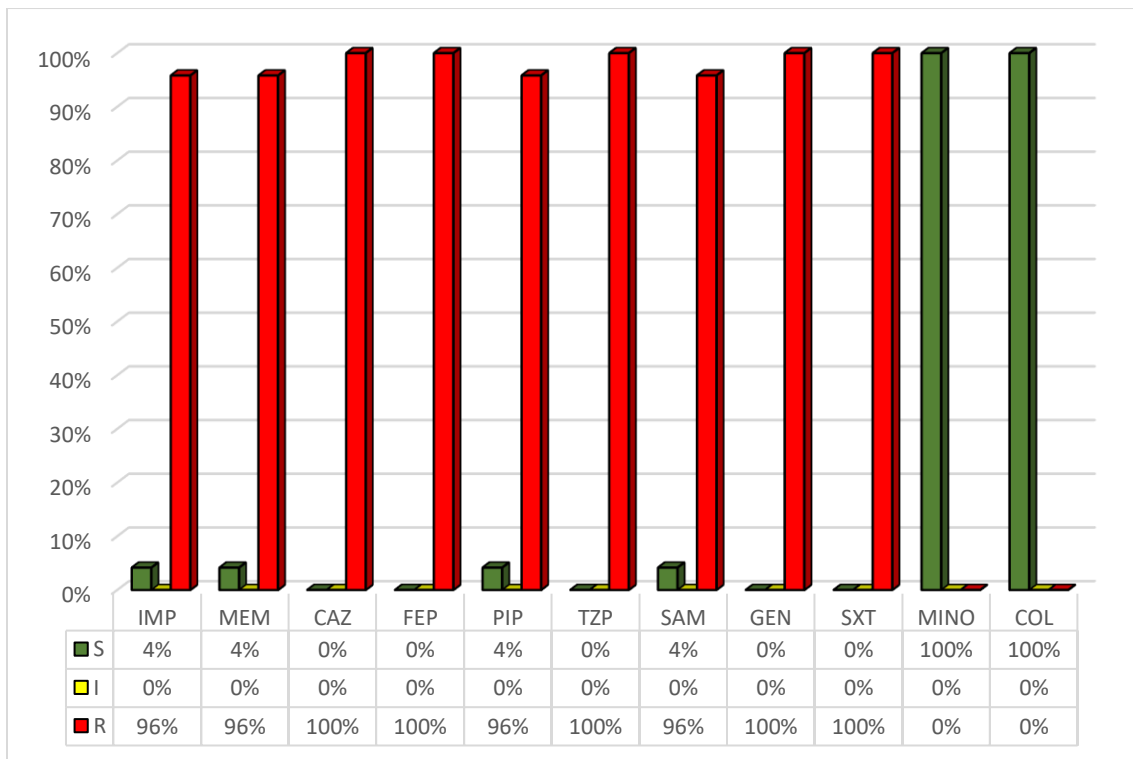
Acinetobacter baumannii es un agente patógeno oportunista asociado con graves infecciones intrahospitalarias, las cuales a menudo son tratadas con Carbapenémicos como única alternativa terapéutica. Sin embargo, se han observado aislados clínicos con disminución de susceptibilidad o resistencia a Carbapenémicos más comúnmente causadas por betalactamasas, tales como carbapenemasas; que se encuentran codificadas en elementos móviles como plásmidos, integrones o transposones (Rodríguez,2014).

En el año 2016 se analizó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana a 14 cepas de *Acinetobacter baumannii*, se apreció una resistencia del 100% para: Imipenem, Meropenem, Ceftriaxona, Cefepime, Piperacilina, Piperacilina-Tazobactam y Trimetoprim-Sulfametoxazol. Los antibióticos a los que presentaron 100% de sensibilidad fueron Minociclina (MINO) y Colistín (COL); nuestros descubrimientos difieren de los datos presentados por Pérez (2016) para

Acinetobacter baumannii donde encontró que el 33% de las cepas presentaban resistencia a CAZ, 29% fue resistente a FEP, IMI y MEM, al antibiótico que presentaron mayor sensibilidad fue a minociclina (MNO) con 100%.

Gráfico N°2.4: Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii* 2017.

Acinetobacter baumannii 2017 (n=24)



Fuente: TABLA N° 15

En definiciones de multiresistencia, encontramos desde la definición de *A. baumannii* multirresistentes como aquél que muestra resistencia al menos a dos de los antibióticos más utilizados (Cefalosporinas, Carbapenemes, Fluoroquinolonas, Aminoglucósidos, Sulbactam), hasta aquella en la que el término de *A. baumannii* multirresistentes describe aislamientos con resistencia a todos menos uno de los antibióticos testados habitualmente polimixinas (Hernández,2010).

La resistencia a los carbapenémicos ha incrementado globalmente en la última década y esto en parte se debe a la diseminación de OXA-β-lactamasas. Datos provenientes de Estados Unidos muestran que el porcentaje de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* resistente a Meropenem ha aumentado en un promedio del 10% entre 1999 y 2005 a 48% en el 2008 y la resistencia a Imipenem ha aumentado de 19% a 57.4% en el mismo periodo de tiempo (Rodríguez,2014).

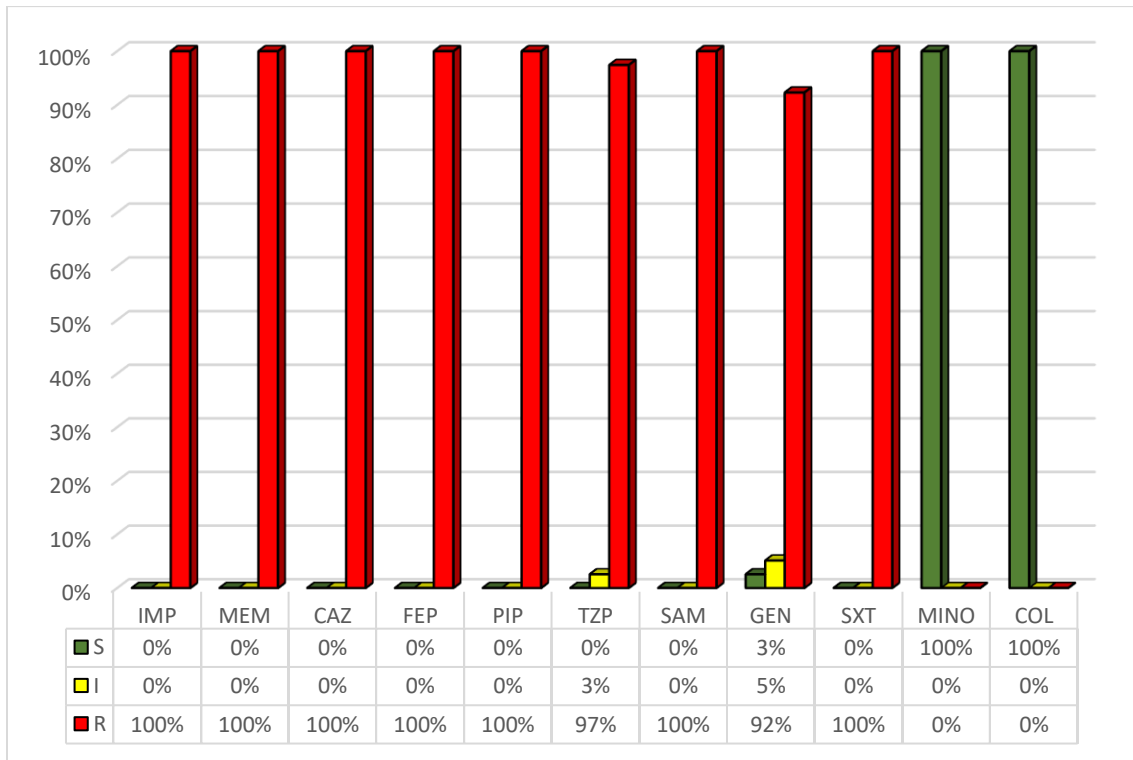
En este año (2017), se estudiaron 24 cepas de *Acinetobacter baumannii* las cuales presentaron 100% de sensibilidad para Minociclina y Colistín, para los demás fármacos testados (IMP, MEM, CAZ, FEP, PIP, TZP, SAM, GEN, SXT) tuvieron una resistencia por encima del 96%, estos datos difieren del estudio de Rodríguez (2014) en donde solo el 60.3% presentó sensibilidad a Colistín, pero en relación a la familia de Carbapenémicos todos fueron resistentes (MEM e IMP), de igual forma para CEF, CAZ y GEN.

Minociclina como antibiótico de elección, está aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos para uso en infecciones por *Acinetobacter*. Son limitados los datos clínicos acerca del uso de Minociclina. Estudios realizados por Wood y colaboradores, concluyeron que estas Tetraciclinas podrían ser eficaces para tratar neumonía asociada a ventilación mecánica por AB-MR. (Barletta, 2018)

La colistina (polimixina E) pertenece al grupo de las polimixinas. Fue aislada por primera vez en Japón, 1949, de *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. En los últimos años, la aparición de bacterias multirresistentes hizo reconsiderar a la colistina como una alternativa en pacientes con infecciones hospitalarias graves, debido a su actividad frente a bacilos gramnegativos multirresistentes y a su bajo perfil de resistencia bacteriana La colistina tiene un estrecho espectro antibacteriano y se utiliza principalmente en infecciones por *A. baumannii*, al exhibir un mecanismo bactericida dependiente de la concentración (Urrutia, 2015).

Gráfico N°2.5: Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii* 2018.

Acinetobacter baumannii 2018 (n=39)



Fuente: TABLA N° 16

Según Hart et.al (2010) *Acinetobacter baumannii* han aumentado significativamente su prevalencia y, con ella, los mecanismos de resistencia. Según el último Estudio Nacional de Vigilancia en Infección Nosocomial realizado por el Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC), ocupan los primeros lugares como causante de infecciones nosocomiales.

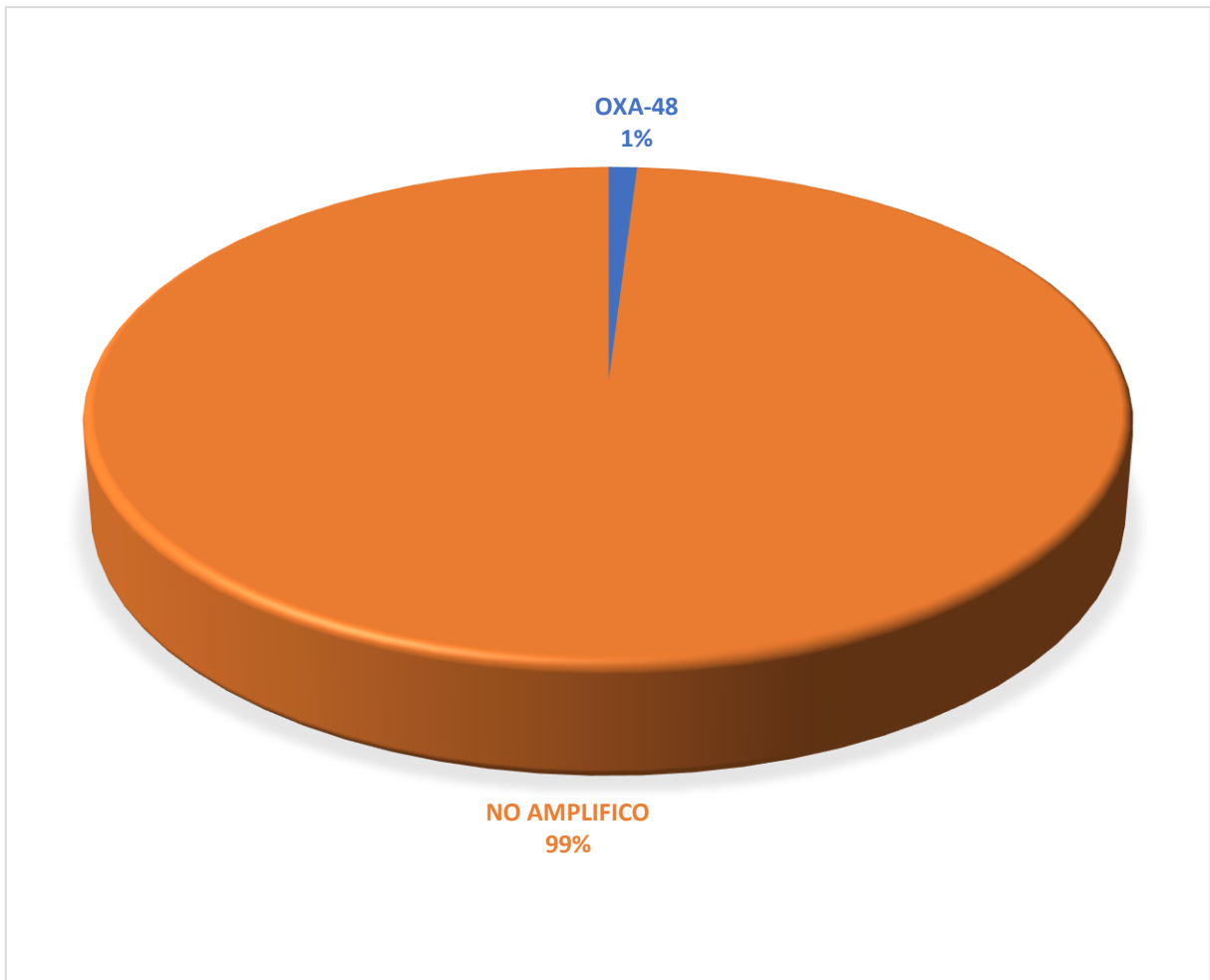
La resistencia a antimicrobianos entre las distintas especies de *Acinetobacter* se ha incrementado de manera sustancial en la última década. Su capacidad para adquirir resistencia a múltiples antimicrobianos puede deberse a la relativa impermeabilidad de su membrana externa y a la exposición ambiental a un gran reservorio de genes de resistencia (Caldera, 2017)

Para el año 2018, fueron analizadas 39 cepas de *Acinetobacter baumannii* las cuales mostraron una resistencia superior al 92% (IMP, MEM, CAZ, FEP, PIP, TZP, SAM, GEN y SXT) y una sensibilidad del 100% para Colistina y Minociclina, lo antes expuesto difiere de la investigación

realizada por Molina, García y Centeno (2019) en el cual el 50% de *A. baumannii* mostró sensibilidad a Gentamicina y en nuestro caso solo el 3% de estos presentó sensibilidad a Gentamicina, por otra parte el 100% tenía resistencia a CAZ, FEP, IMP, MEM y SXT, concordando con nuestros hallazgos de igual manera COL y MINO presentaron el 100% de sensibilidad.

Otro estudio que se relaciona con nuestros descubrimientos fue realizado en la Habana, Cuba por Hart et.al (2010) donde el 95% de las cepas de *Acinetobacter baumannii* presentaron un 95% de resistencia a Cefalosporinas de 3era y 4ta generación (CAZ y FEP) y de un 92,5% para Piperacilina-Tazobactam.

Gráfico N° 3: Frecuencia de OXA-48 en cepas de *Enterobacterias* (2016-2018)
Enterobacterias (n=113)



Fuente: TABLA N° 17

En el presente estudio se realizó la búsqueda de genes productores de carbapenemas de la Clase D según Ambler bla_{oxa-48-like} (775 pb) mediante la técnica de PCR convencional, en el 59% de los aislamientos de *Enterobacterias* (n=113).

Este gen según Gijón (2019) fue identificado por primera vez una cepa de *K. pneumoniae* en Turquía en 2001. Desde entonces, se ha ido diseminando a otros países europeos procedentes de aquellos considerados como reservorios como son Turquía y los países del norte de África. Ha causado brotes hospitalarios en países como Francia, Alemania, Suiza, España, Países Bajos y Reino Unido. Uno de los factores que contribuyen a su exitosa diseminación entre las distintas

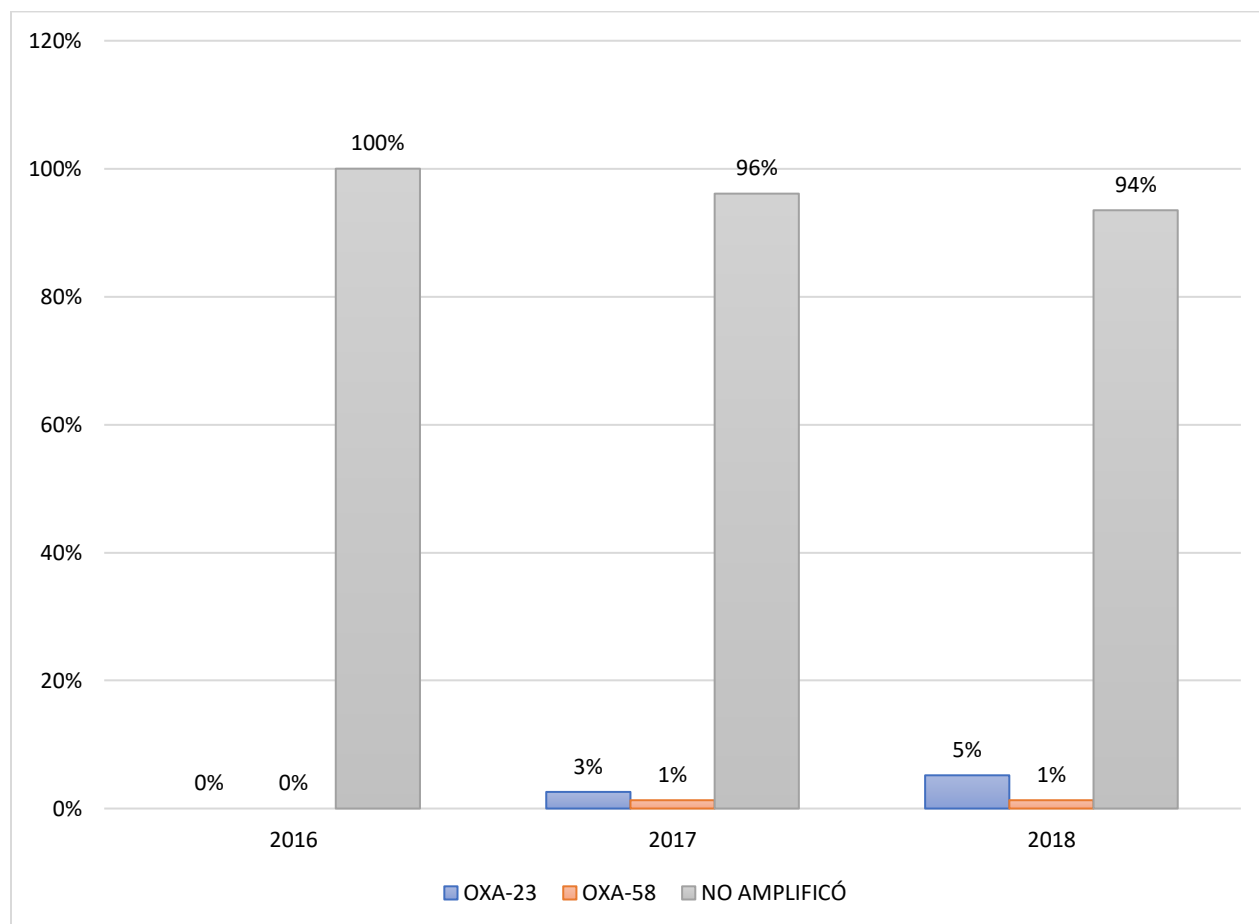
especies de enterobacterias es la facilidad del plásmido que contiene el gen bla_{OXA-48} en transferirse.

También existen otras variantes de OXA-48 como: OXA-162, OXA-163, OXA 181 según Gijón (2019) se ha identificado una nueva variante OXA-204 en varias cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes procedentes de Argelia o Túnez. En comparación con OXA-48, tiene dos cambios aminoacídicos y su perfil hidrolítico es muy similar al OXA-232 derivada de OXA-181 y posee 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con OXA-48. Su actividad hidrolítica frente a los carbapenems es inferior a la de OXA-48. Recientemente se ha asociado a un aislado de *K. pneumoniae* productor de NDM-1.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio revelan el 1% de positividad para OXA-48 identificado en una *Escherichia coli* en el año 2018 la cual posee además una metalo-β-lactamasa (NDM), estos datos son muy similares a los resultados de Guevara (2019) en una investigación realizada en Trujillo, Perú para la determinación de OXA-48 en el cual ningún aislamiento tenía el gen en estudio.

En otro estudio realizado en Nicaragua por Dretler, Ávila y Sandoval (2018) se incluyeron 50 cepas de *Klebsiella pneumoniae* el 92%(n=46) tenían el gen bla_{NDM} y el 8%(n=4) restante presentaron bla_{KPC}, el 100% de *Escherichia coli* (n=4) tenían bla_{NDM} y el 33% de las cepas en estudio de *Acinetobacter baumannii* (n=30) poseían bla_{NDM}; los genes bla_{VIM} y bla_{IMP} se presentaron en las cepas de *Pseudomona aeruginosa* (n=16) en las cuales el 68.8 % (11) correspondían a bla_{VIM} y el 62.5% (10) bla_{IMP}. Nuestros resultados se asemejan a los obtenidos en la investigación citada, ya que en esta los aislados del grupo de *Enterobacterias* correspondientes a los años 2016 y 2017 no presentaron el gen de bla_{OXA-48}.

Gráfico N° 4: Frecuencia de OXA-23 & OXA-58 en *Acinetobacter baumannii* (2016-2018) (n=77)



Fuente: TABLA N° 18

Esta investigación se estudiaron los genes de resistencia bla_{OXA-23-like} y bla_{OXA-58-like} en 77 aislados de *Acinetobacter baumannii* (41%) mediante la técnica de PCR convencional OXA-23 tenía un peso molecular de 513 pb y OXA-58 con 383 pb.

Estos aislados corresponden a los años 2016, 2017 y 2018. En relación al año 2016 fueron estudiadas 14 cepas de *A. baumannii*, ninguna de ellas presentó los genes de interés (OXA-23 & OXA-58).

Posteriormente del año 2017 fueron evaluadas 24 cepas de *A. baumannii* de los cuales el 4% de ellos contenían los genes en estudio; de este 4% que amplificaron el 3% corresponde a OXA-23 y el 1% a OXA-58, el 96% de este no poseen los genes-estudiados.

Finalmente, en el año 2018 se realizó la genotipificación para OXA-23 & OXA-58 de 39 *Acinetobacter baumannii*, se pudo detectar en mayor cantidad el gen de OXA-23 con un 5%, el 1% para OXA-58 y el 94% de las demás cepas en estudio no amplificaron para estos dos tipos de oxacilinasas, sin embargo, puede presentar otras variantes de tipo OXA que no han sido incluidas en el estudio.

Nuestro estudio difiere de la investigación de Cerda, Martínez y Pérez (2017) realizada en el Hospital Alemán Nicaragüense en el período de agosto 2015 – octubre 2016, ellos tenían una muestra total de 45 cepas de las cuales 12 de estas correspondían a *Acinetobacter baumannii* de estos el 5.26% tenían OXA-23 y OXA-58, en nuestro caso para el año 2016 ninguna de las cepas analizadas presentó los genes de OXA-23 y OXA-58.

La presencia de Carbapenemasas adquiridas como OXA-23 puede explicar altos niveles de resistencia a los carbapénemicos, a nivel de la Región Latinoamericana se documentó la prevalencia de (OXA-23, OXA-24 & OXA- 58) en *Acinetobacter spp.* OXA-23 & OXA-24 se encuentra distribuido mayormente en el país de Argentina, Brasil cuenta mayormente con OXA-23, Chile ha destacado la presencia de OXA-58. (Rodríguez, 2014)

9. CONCLUSIONES

1. El universo estuvo comprendido por 800 cepas resistentes a los Carbapénemicos, se analizó el 23.75% del universo, equivalente a 190 cepas, las cuales fueron analizadas en el sistema automatizado VITEK 2 Compact ® BioMérieux, siendo identificadas 113 cepas de la familia de *Enterobacterias* (59%), distribuidas de la siguiente forma: 62 fueron *Klebsiella pneumoniae* esto corresponde a un 33% de la muestra total, 31 *Escherichia coli* siendo este el 16%, 6 *Serratia marcescens* (3%), 13 *Enterobacter cloacae* (7%) y 1 *Enterobacterias gergoviae* (1%). También fueron identificadas 77 cepas pertenecientes al grupo de No Fermentadores como *Acinetobacter baumannii* conformando así el 41% de las cepas en estudio.
2. Para la evaluación de los patrones de susceptibilidad, los centros asistenciales implementaron el método de Kirby Bauer o difusión de disco, las cepas de *Enterobacterias* presentaron en su mayoría resistencia a Cefalosporinas de tercera y cuarta generación, Aminoglucósidos, Sulfonamidas y Carbapénemicos, sin embargo, se encontró como una opciones terapéutica la Colistina (COL) la cual presentó una susceptibilidad del 100% en las 113 cepas de *Enterobacterias* en estudio, para *Acinetobacter baumannii* los antimicrobianos que presentaron susceptibilidad al 100% fueron Minociclina (MINOC) y Colistín (COL) siendo esto buenas alternativas para tratar las infecciones causadas por este microorganismo multidrogresistente.
3. Para la familia de *Enterobacterias* (n=113) se realizó la búsqueda del gen bla_{OXA-48-like} mediante la técnica de PCR- Convencional, en el año 2016 y 2017 ninguno de los aislados presentó el gen de OXA-48, de las cepas del año 2018 una de estas presentó el gen de OXA-48 está correspondía a una *Escherichia coli* que además posee una metalo-β-lactamasa (NDM). En *Acinetobacter baumannii* (n=77) se determinó la presencia de los genes bla_{OXA-23-like} y bla_{OXA-58-like} mediante la técnica de PCR-Convencional para OXA- 23: en 2016 ninguna cepa presentó este gen, 2017 fue identificado en 2 de los aislados (3%) y en 2018 en 4 de las cepas en estudio (5%). Para OXA-58: en 2016 no se detectó la presencia de este en los *A. baumannii* en estudio, 2017 se identificó en 4 aislados (5%) y finalmente en el año 2018 una cepa presentó este gen (1%).

10.RECOMENDACIONES

1. Al **Departamento de Bioanálisis clínico** para que incentive a sus estudiantes a realizar investigaciones en el área de la resistencia antimicrobiana, con el objetivo de mejorar el control epidemiológico nacional, en el diagnóstico de nuevos genes de resistencia a los antibióticos.
2. Al **Personal de Salud** de los diferentes centros asistenciales, los invitamos a tomar conciencia sobre la buena praxis de cuidados sanitarios, en los centros hospitalarios con el objetivo de reducir las infecciones intrahospitalarias.
3. Al **Ministerio de Salud (MINSA)** a realizar investigaciones de este tipo en todo el ámbito de salud, para así formar una conciencia acerca de la problemática que conlleva el uso irracional de los antibióticos.
4. Instamos a los **Hospitales pertenecientes a la Red** nicaragüense de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos a que promueva estudios de genotipificación para conocer mayormente la resistencia a carbapenémicos que enfrenta nuestro país.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, J. (2010). Papel de los nuevos carbapenémicos en la infección intraabdominal nosocomial. *Enfer Infecc Micro Clin.*, 28(2):65-68.
- Alejos, L., Aragón, M y Cornejo, A. (2004). Extracción y Purificación de ADN. Universidad Nacional Autónoma de México. 26 (7) pp. 5-11.
- Algorta, G. (23 de Mayo de 2009). Bacilos gram negativos no exigentes. Recuperado de <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2022.pdf>
- Arevalo, G., Chaves , F., & Palomo, A. (2015). Métodos microbiológicos para la Métodos microbiológicos para la de bacterias multirresistentes. ESPAÑA: SEIMC.
- Bado, I., Cordeiro, N., García, V., Robino, L., Seija, V., & Vignolio, R. (2004). Principales grupos de antibióticos. Recuperado el 23 de Noviembre de 2020, de <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20grupos%20de%20antibi%F3ticos.pdf>
- Baggini, S. p. (2017). Las enterobacterias. Argentina: Academia.edu.
- Bernal, M., & Gúzman, M. (1984). El Antibiograma en Disco, Normalización de la Técnica de Kirby Bauer (3 ed., Vol. 4). Bogotá, Colombia: BIOMEDICA.
- Blanco, M., Labarca, J., Villegas , M., & et al. (2014). Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. Brasil: *Rev. The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.
- Brink. A., Coetzee. J., Corcoran. C., Glay. C., Makan. D., ...Nordmann. P., (2013). Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *Revista de microbiologia clinica* 1000 (4), pp. 369-372. Doi:10.1128/JCM.02234-12

- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección de Mecanismos de Resistencia en Gram Negativos. (E. Cercenado, & R. Cantón, Edits.) Procedimientos en Microbiología Clínica, 16-19.
- Carballo, A. (07 de Abril de 2011). Blogger. Obtenido de <http://bactereqipo6.blogspot.com/2011/04/patogenia.htm>
- Carrascoso, G. R. (2015). Características microbiológicas y clínico-epidemiológicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa oxa-48 en el contexto de un brote hospitalario. Madrid: universidad Complutense de madrid.
- Carroll, K. C., Hobden, e. A., & Miller, S. e. (1954). Microbiología médica, 27edicion. California, Estados Unidos: Lange.
- Cercenado, E. (2015). *Detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio*. Revista Española de Quimioterapia, 8-11.
- Cerda, H., Martínez, W., Pérez, A., (2017). Genes productores de enzimas carbapenemasa de tipo Metallo- β -lactamasa, KPC y OXA mediante la técnica de PCR Convencional en Enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, en el período agosto 2015- octubre 2016. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua. Managua, Nicaragua.
- Cuaical, N., Delgado, Y., Anzola, Y., Zamora, D., Torres, L. (2012) Determinación de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 100(6), pp. 95-100.
- Castellas, j. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Panam Salud Publica, 30(6):519-28.
- Chediak, J., Santana, T., Águila, A., & Risco, C. (2005). Caracterización de las infecciones nosocomiales en pacientes con patología oncológica. La Habana, Cuba.

- De la Lastra J, V., Ulloa F., M., Pinto C, M., & et.al. (2010). Serinocarbapenemasas de clase A en enterobacterias. Hospital clinico, Universidad de chile, 234.
- Diomedi, A. (2005). *Infecciones por Acinetobacter baumannii pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado*. Revista Chilena de Infectologia, 298-330.
- Dretler, Ávila y Sandoval (2018) High rate NDM- carbapenemase genes in multi-drug resistant Gram-negative rods in Nicaragua. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. doi: [10.4269/ajtmh.19-0561](https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0561)
- Farinas, M. C., & Martinez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. España: Elsevier .
- Flores, K. (2020) Genética Bacteriana y Mecanismos de la transferencia horizontal genetica Obtenido de <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2020-07/T2%20Texto%20Clase%202-Gen%C3%A9tica%20y%20Transm%20Horiz-Centron%202020.pdf>
- Gijón, Desirée. (2019). Estudio microbiológico y epidemiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo VIM y OXA- 48. (Tesis Doctoral). Universidad de Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Gomez, V. (17 de Mayo de 2016). Lifeder.com. Obtenido de <https://www.lifeder.com/acinetobacter-baumannii/>
- González, A. y. (2018). Frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense. Enero septiembre, 2017. Managua: Unan-Managua.
- Guevara, Gladys. (2019). Determinación de carbapenemasas KPC y OXA-48, que fenotípicamente pertenecen al grupo de serinocarbapenemasa, en cultivos de Escherichia coli y Klebsiella

- pneumoniae mayo- julio, Trujillo 2018. (Tesis de Posgrado) Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Greif, G. (Octubre de 2012). Unidad de Biología Molecular. Institut Pasteur Montevideo. Obtenido de file:///D:/User/Documents/reaccion_en_cadena_polimerasa.pdf
- J. Pires, Â. N. (2013). Blue-Carba, una prueba bioquímica sencilla para la detección de diversos productores de carbapenemasas directamente a partir de cultivos bacterianos. *Journal of clinical microbiology*, 4281–4283.
- Jiménez, V. D. (2010). *Acinetobacter baumannii*: actualidades. Mexico : Revista de Enfermedades Infecciosas en PediatrÍ.
- Khan, A., Maryam, L., & Zarrilli, R. (2017). Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM). *BMC Microbiol*, 17:101.
- López, D., Tórres, M., & Prada, C. (15 de Julio de 2015). Genes de Resistencia en Bacilos Gram Negativos: Impactos en la Salud Colombiana. *Universidad y Salud: Sección de Revisión de tema* , 13. Recuperado el 30 de Noviembre de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v18n1/v18n1a18.pdf>
- López, S., & López-Brea, M. (2000). ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*. En e. Rivero A, *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*. (págs. 153-156). Madrid: Elsevier.
- Marcela Nastro, N. C. (2013). Emergencia de la resistencia a colistina en *Klebsiella pneumoniae*. Caracterización microbiológica y epidemiológica de aislamientos productores y no productores de carbapenemasa de tipo KPC. Elsevier, 185-190.
- Marcos, M. Á. (2015). *Acinetobacter baumannii*. Barcelona: Control calidad SEIMC.
- Medina, J., Paciel, D., Noceti, O., & Rieppi, G. (2017). Actualización acerca de colistina (polimixina E). *revista medica uruguaya*, 197.
- Molina, A., García, F y Centeno, B. (2019). Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a los Carbapénemicos,

aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en las salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 -febrero 2018. (Tesis para Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Nicaragua.

Monge, K. M. (2013). CARBAPENÉMICOS: TIPOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANOS. REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXX , 599-605. Obtenido de REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXX .

Mónica Chávez, R. F. (2015). Patrones de resistencia a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* en un hospital de Colombia. Colombia: Facultad de medicina hospital de Colombia.

Munoz-Pricen, S., & Weinstein, R. (16 de Abril de 2008). Intra Med. Obtenido de <https://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoid=52499>

OMS. (Junio de 2013). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de https://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/#:~:text=La%20resistencia%20a%20los%20antimicrobianos,los%20medicamentos%2C%20como%20los%20antibi%C3%B3ticos.

OPS. (10 de Junio de 2016). organización panamericana de la salud. Obtenido de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-jun-10-alerta-epi-enterob-resist.pdf>

Pestaña, M. Í., & J.L. del Pozo. (10 de febrero de 2018). Medicine online. Obtenido de <https://www.medicineonline.es/es-infecciones-por-bacilos-gram-negativos-articulo-S0304541218300337>

Pintos, I., Cantero, M., Muñoz, E., Sánchez, I., Asensio, A. y Ramos, A. Epidemiología y clínica de las infecciones y colonizaciones causadas por Enterobacterias productoras de carbapenemasa en un hospital de tercer nivel. Revista Española de Quimioterapia. 33(2) pp 122-129. doi: [10.37201/req/086.2019](https://doi.org/10.37201/req/086.2019)

R. Taroco, V. S. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. temas de bacteriología y virología médica, 665.

- Roberto Carlos Barletta Farías, L. J. (2018). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapéutica actual. Cuba: Medisur.
- Rodríguez, N. (2014). Identificación de Carbapenemasas en aislamientos Clínicos Multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*. Cuernavaca, México: Insituto Nacional de Salud Pública de México . Recuperado el 1 de Diciembre de 2020, de <https://catalogoinsp.mx/files/tes/054175.pdf>
- Rodríguez, C., Nastor, M y Famiglietti. (2017). Carbapenemase in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin American. Revista Argentina de Microbiología. 50 (3) pp. 327- 333. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.006>
- Sacsquispe, R. &. (2013). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú. revista peruana de medicina experimental y salud publica , 128.
- Salazar de Vegasa, E., & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. Merida: Universidad de Los Andes.
- Tamay de Dios L, I. C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphy, 75. Obtenido de Fundamentos de la reacción en cadena.
- VANEGAS-MÚNERA, J., R.-V. G., & , et.al. (2014). *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. CES Med, 233-246.
- Vila, J., & Marco, F. (2010). Este trabajo aborda un problema actual de resistencia a antibióticos los cuales son gramnegativos no fermentadores. Enferm Infecc Microbiol Clin, Enferm Infecc Microbiol Clin.
- Zaro, M. (2017). Carbapenemasas: Un Mecanismo de Resistencia Bacteriana Frente a Carbapenemes, Antibióticos de Último Recurso. Madrid, España. Recuperado el 4 de Diciembre de 2020, de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUELA%20MURO%20DE%20ZARO%20ALCALA.pdf>

12. Anexos

12.1. ANEXO N° 1 BOSQUEJO

1. Bacilos Gram negativos

1.1. *Enterobacterias*

- 1.1.1. Etiología
- 1.1.2. Taxonomía
- 1.1.3. Características Generales
- 1.1.4. Factores de virulencia
- 1.1.5. Patogenicidad
- 1.1.6. Manifestaciones clínicas
- 1.1.7. Métodos Diagnósticos

1.2. No fermentadores

1.2.1. *Acinetobacter baumannii*

- 1.2.1.1. Etiología
- 1.2.1.2. Taxonomía
- 1.2.1.3. Características Generales
- 1.2.1.4. Factores de Virulencia
- 1.2.1.5. Patogenicidad
- 1.2.1.6. Manifestaciones Clínicas
- 1.2.1.7. Métodos Diagnósticos

2. Antimicrobianos

3. Resistencia Antimicrobiana

3.1. Resistencia a los Carbapenémicos

3.2. Transferencia Genética

- 3.2.1. Transformación
- 3.2.2. Conjugación
- 3.2.3. Transducción

3.3. Genes de Resistencia Enzimática a Carbapenémicos

4. Métodos de Detección de Susceptibilidad Antimicrobiana

4.1. Difusión en Disco

4.2. Concentración Mínima Inhibitoria

4.3. Métodos Moleculares

4. Genotipificación para la detección de Carbapenemasa de tipo OXA

6.1.Oxacilinasas

6.1.1. OXA-23

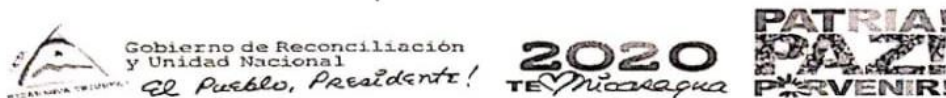
6.1.2. OXA- 48

6.1.3. OXA-58

12.2. Anexo N°2: Tabla N°1

| Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos | |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| N° | HOSPITALES Y CENTROS DE SALUD |
| 1 | <i>Hospital Roberto Calderón (HRC)</i> |
| 2 | <i>Hospital Manuel de Jesús Rivera, La Mascota (HMJR)</i> |
| 3 | <i>Hospital Alemán Nicaragüense (HAN)</i> |
| 4 | <i>Hospital Antonio Lenín Fonseca (HALF)</i> |
| 5 | <i>Hospital Bertha Calderón (HBC)</i> |
| 6 | <i>Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales (HEODRA)</i> |
| 7 | <i>Hospital Solidaridad (HSOL)</i> |
| 8 | <i>Hospital Luis Felipe Moncada, San Carlos Río San Juan (HLFM)</i> |
| 9 | <i>Hospital Aldo Chavarría (HACH)</i> |
| 10 | <i>MID Boaco (MIDBOAC)</i> |
| 11 | <i>Hospital Masaya (HMAS)</i> |
| 12 | <i>Hospital San Juan de Dios (HSJDD)</i> |
| 13 | <i>Hospital Humberto Alvarado (HUA)</i> |
| 14 | <i>Hospital de Granada (HGRA)</i> |
| 15 | <i>Hospital España, Chinandega (HECH)</i> |
| 16 | <i>Centro de Salud Sócrates Flores (CSSF)</i> |
| 17 | <i>Centro de Salud Villa Venezuela (CSVV)</i> |
| 18 | <i>Centro de Salud Ticuantepe (CST)</i> |

12.3. Anexo N° 3: Imagen N° 1



Managua, 02 de diciembre del 2020
DGD-NVSQ-1595-12-2020

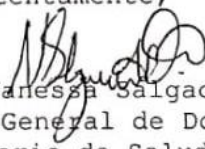
Lic. Justo Reyes Cierro
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
Su Despacho. -

Estimado Licenciado Reyes:

Tengo a bien informarle que las Bachilleres Lisseth Argentina Boniche Sánchez, Adriana Dolores Garay Hernández y Estrella Caridad Miranda Gómez tienen autorización para realizar en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia la siguiente investigación:
"Determinación Fenotípica y Genotípica de Carbapenemasas de tipo OXA en cepas de Enterobacterias (OXA-48) y Acinetobacter baumannii (OXA23 y OXA 58) aisladas en los hospitales pertenecientes a la Red Nicaragüense para la vigilancia de la Resistencia a los antimicrobianos y remitidas al Centro Nacional de Diagnóstico y referencia "Concepción Palacios" durante el período de Enero 2016-Diciembre 2020.

Sin más que agregar, me despido no sin antes saludarle y expresarle mis muestras de consideración y estima.

Atentamente,


Dra. Natalia Vanessa Salgado Quintana
Directora General de Docencia
Ministerio de Salud



Cc Archivo/Cronológico
Nvsq/esrh

2021, SIEMPRE VICTORIOSOS...!
EN INSURRECCIÓN DE LA ESPERANZA...!
PATRIA LIBRE, PURO CORAZÓN ...!
DANIEL, UNIDA NICARAGUA TRIUNFA...!



¡CRISTIANA, SOCIALISTA, SOLIDARIA!
MINISTERIO DE SALUD
Contiguo a la colonia lro de mayo - 2264-
7630 - www.minsa.gob.ni

12.4. Anexo N° 4: Tabla N° 2

| Primers de Carbapenemasa de tipo Oxacilinasas (OXA-23 Acinetobacter baumannii) | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|-----------------------------|---------------------|
| N° | Primer | Secuencia | | Peso molecular (pb) |
| 1 | OXA-23 | <i>forward</i> | 5'-GTATAGATGCCGGCATTCTGA-3' | 513 pb |
| | | <i>reverse</i> | 5'-TCGGATTGGAGAACCAGAAAA-3' | |

12.5. Anexo N° 5: Tabla N° 3

| Primers de Carbapenemasa de tipo Oxacilinasas (OXA- 48 Enterobacterias) | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|------------------------------|---------------------|
| N° | Primer | Secuencia | | Peso molecular (pb) |
| 2 | OXA-48 | <i>forward</i> | 5'-ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG-3' | 775 pb |
| | | <i>reverse</i> | TGAGCACTTCTTTTGTGATG-3' | |

12.6. Anexo N° 6: Tabla N° 4

| Primers de Carbapenemasa de tipo Oxacilinasas (OXA-58 Acinetobacter baumannii) | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|----------------------------|---------------------|
| N° | Primer | Secuencia | | Peso molecular (pb) |
| 3 | OXA-58 | <i>forward</i> | 5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3' | 383 pb |
| | | <i>reverse</i> | 5'-TACGACGTGCCAATTCTTGA-3' | |

12.7. Anexo N° 7: Tabla N° 5

| Mezcla de Reacción para PCR OXA-23 (<i>Acinetobacter baumannii</i>) | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| N° | Reactivo/ Producto | Volumen Producto |
| 1 | Buffer 10X | 2,5 µl |
| 2 | MgCl ₂ (50mM) | 0,75 µl |
| 3 | dNTPs (10mM) | 0,5 µl |
| 4 | Taq Pol (5U/µl) | 0,15 µl |
| 5 | OXA-23 forward (10µM) | 0,5 µl |
| 6 | OXA- 23 reverse (10µM) | 0,5 µl |
| 7 | H ₂ O (Calidad Molecular) | 17,6 µl |
| 8 | ADN | 2,5 µl |
| Volumen Final | 25µl | |

12.8. Anexo N° 8: Tabla N° 6

| Mezcla de Reacción para PCR OXA-48 (<i>Enterobacterias</i>) | | |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| N° | Reactivo/ Producto | Volumen Producto |
| 1 | Buffer 10X | 2,5 µl |
| 2 | MgCl ₂ (50mM) | 0,75 µl |
| 3 | dNTPs (10mM) | 0,5 µl |
| 4 | Taq Pol (5U/µl) | 0,15 µl |
| 5 | OXA-48 forward (10µM) | 0,5 µl |
| 6 | OXA-48 reverse (10µM) | 0,5 µl |
| 7 | H ₂ O (Calidad Molecular) | 17,6 µl |
| 8 | ADN | 2,5 µl |
| Volumen Final | 25µl | |

12.9. Anexo N° 9: Tabla N° 7

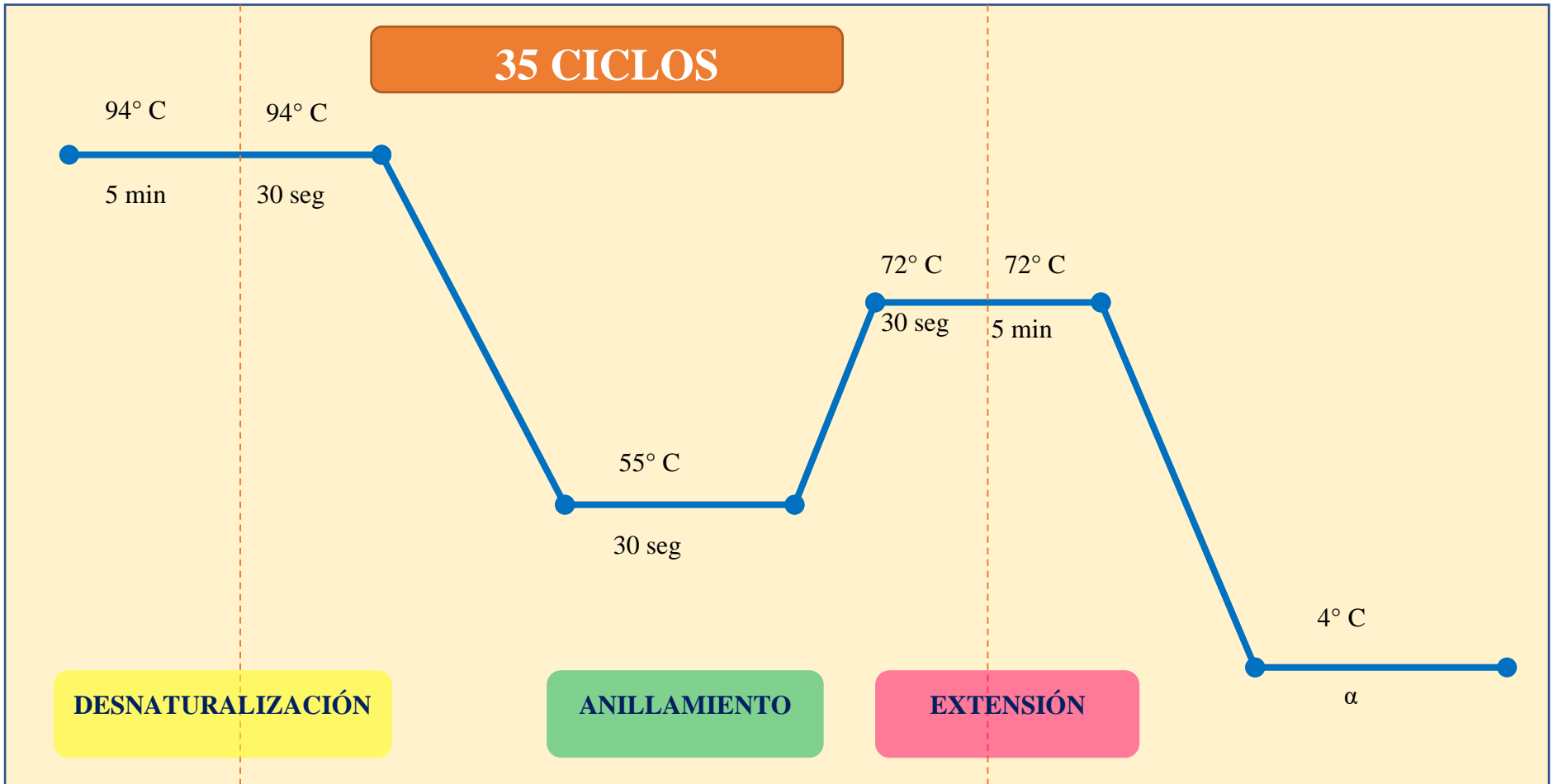
| Mezcla de Reacción para PCR OXA-58 <i>Acinetobacter baumannii</i> | | |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| N° | Reactivo/ Producto | Volumen Producto |
| 1 | Buffer 10X | 2,5 µl |
| 2 | MgCl ₂ (50mM) | 0,75 µl |
| 3 | dNTPs (10mM) | 0,5 µl |
| 4 | Taq Pol (5U/µl) | 0,15 µl |
| 5 | OXA-58 <i>forward</i> (10µM) | 0,5 µl |
| 6 | OXA-58 <i>reverse</i> (10µM) | 0,5 µl |
| 7 | H ₂ O (Calidad Molecular) | 17,6 µl |
| 8 | ADN | 2,5 µl |
| Volumen Final | 25µl | |

12.10. Anexo N° 10: Tabla N° 8

| Detalles para Corrida de Electroforesis | | | | | | |
|------------------------------------------------|-----------------------------|----------------|---------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Tipo de Peine | Producto Amplificado | Voltaje | Tiempo | Buffer de Carga | ADN amplificado | Cantidad de ADN con Buffer de Carga ubicado en Cada Pozo |
| 10 pozos | OXA | 140 | 50 min | 5 µl | 25 µl | 8 µl |
| 12 pozos | | 140 | 60 min | 5 µl | 25 µl | 8 µl |
| 14 pozos | | 140 | 90 min | 5 µl | 25 µl | 8 µl |
| 16 pozos | | 140 | 70 min | 5 µl | 25 µl | 8 µl |
| 20 pozos | | 140 | 90 min | 5 µl | 25 µl | 8 µl |

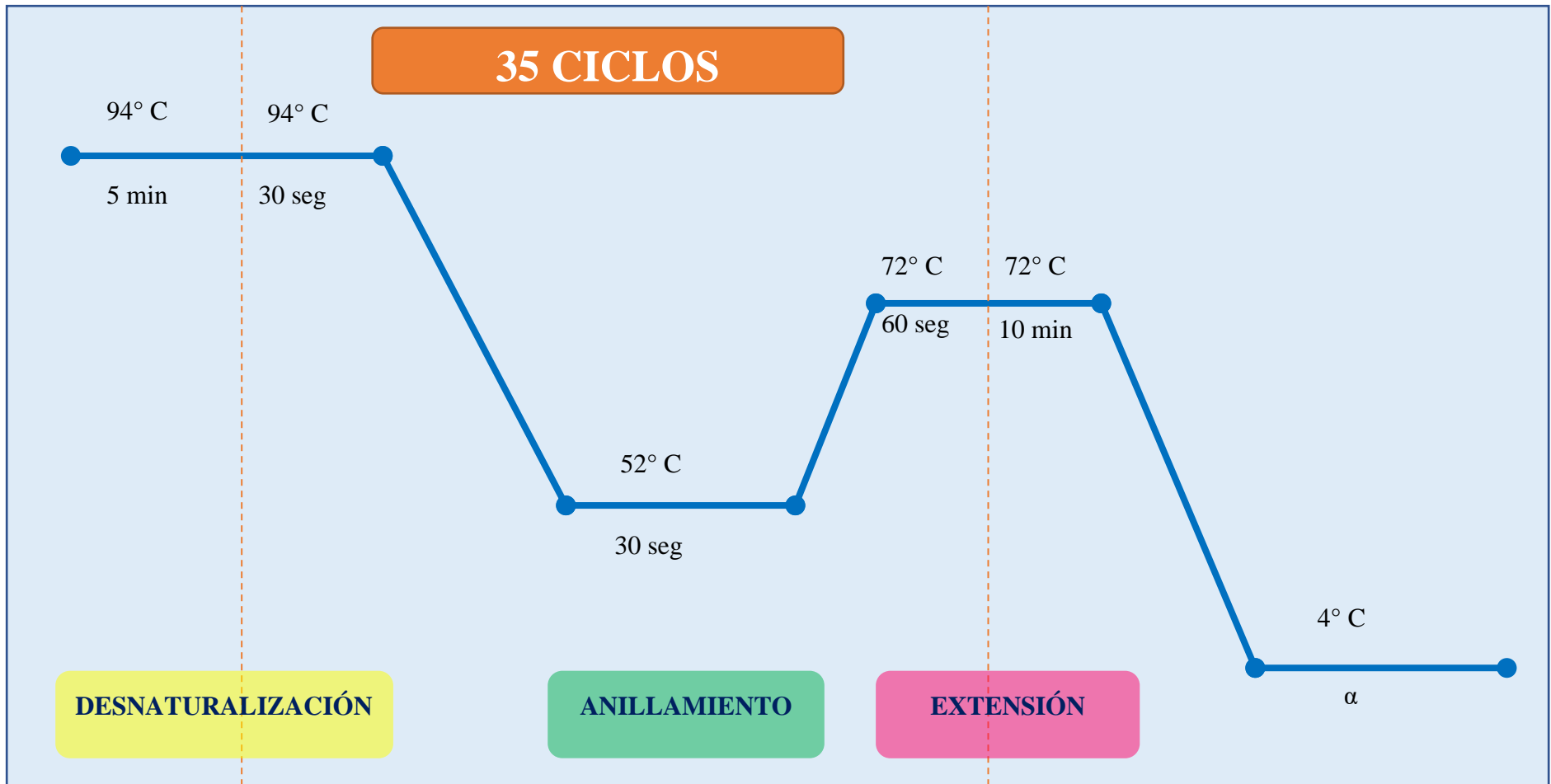
12.11. Anexo N° 11: Imagen N° 2

Ciclado OXA-23 *Acinetobacter baumannii*



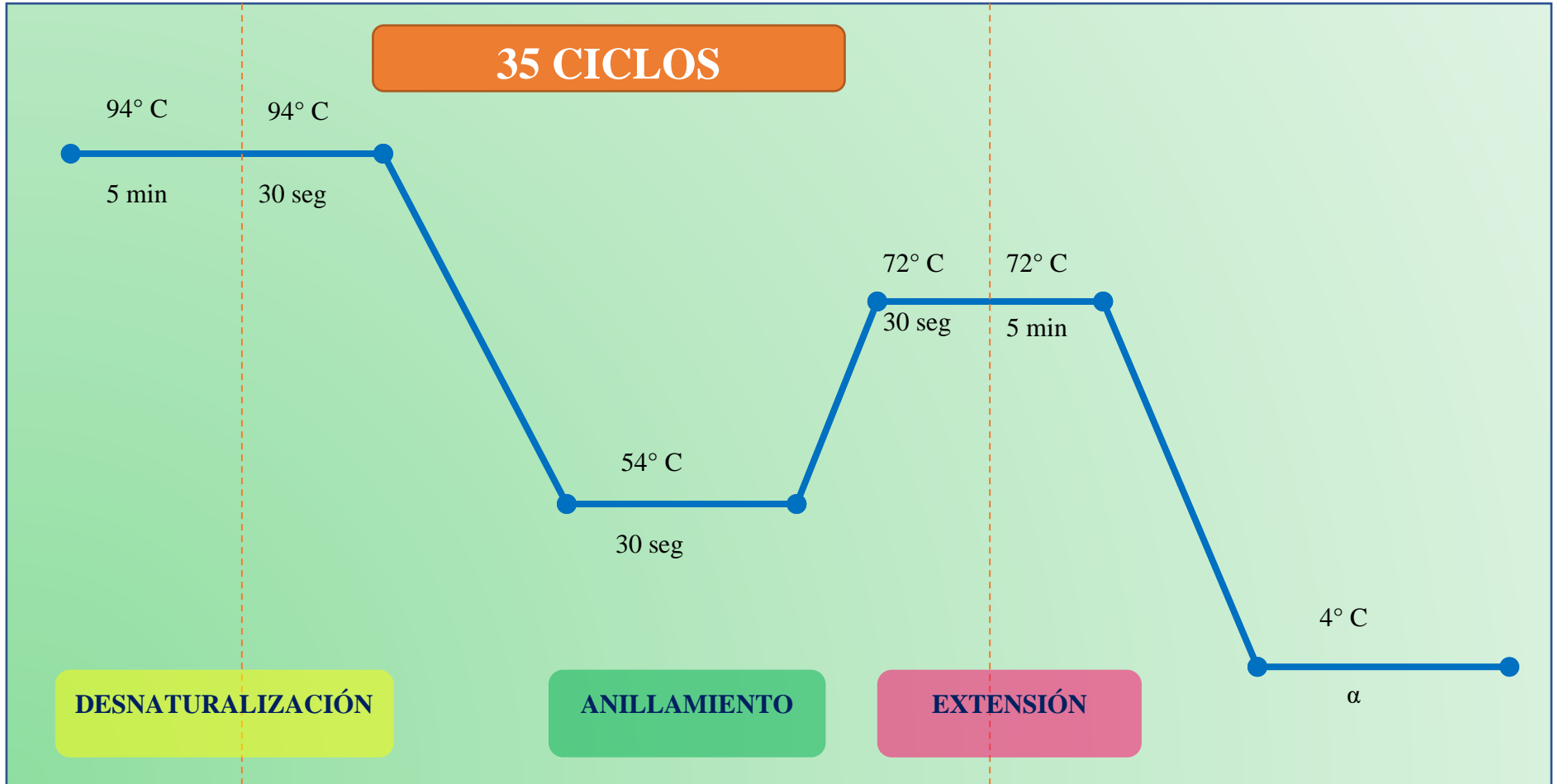
12.12. Anexo N° 12: Imagen N° 3

Ciclado OXA- 48 *Enterobacterias*



12.13. Anexo N° 13: Imagen N°4

Ciclado OXA-58 *Acinetobacter baumannii*



12.14. Anexo N°14: Protocolo OXA-23 (*Acinetobacter baumannii*)

Protocolo para la Detección del gen OXA-23 en *Acinetobacter baumannii*

| Mezcla de Reacción PCR | | |
|--------------------------|------------|-----------------------|
| Reactivo | Volumen µl | Volumen Producto(n)µl |
| | | 20 |
| Buffer 10X | 2.5 | 50 |
| MgCl ₂ (50mM) | 0.75 | 15 |
| dNTP's (10mM) | 0.5 | 10 |
| Taq pol (5U/µl) | 0.15 | 3 |
| Primer Forward | 0.5 | 10 |
| Primer Reverse | 0.5 | 10 |
| H ₂ O | 17.6 | 352 |
| ADN | 2.5 | |
| Total | 25 | 500 |

| CICLADO | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclado (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-55°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-GTATAGATGCCGGCATTICTGA-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-TCGGATTGGAGAACCAGAAAA-3' |
| GEN | |
| <i>blaOXA-23</i> | 513 pb |

PCR

FECHA:

| Posición | Muestra |
|----------|---------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Analista:

INVITROGEN

ELECTROFORESIS

FECHA:

| Especificaciones | |
|------------------|-----------|
| Voltaje | 120 Volts |
| Tiempo | 80 min |
| Agarosa | 0.9 gr |
| TBE 1X | 90 mL |

| Carril | Muestra | Resultados |
|--------|---------|------------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | | |
| 10 | | |
| 11 | | |
| 12 | | |

Analista:

| |
|------------|
| AÑO |
| |

12.16. Anexo N° 16: Protocolo OXA-58 (*Acinetobacter baumannii*)

Protocolo para la Detección del gen OXA-58 en *Acinetobacter baumannii*

| Mezcla de Reacción PCR | | |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|
| Reactivo | Volumen μ l | Volumen Producto(s) μ l |
| | | 30 |
| Buffer 10X | 2.5 | 75 |
| MgCl ₂ (50mM) | 0.75 | 22.5 |
| dNTP's (10mM) | 0.5 | 15 |
| Taq pol (5U/ μ l) | 0.15 | 4.5 |
| Primer Forward | 0.5 | 15 |
| Primer Reverse | 0.5 | 15 |
| H ₂ O | 17.6 | 528 |
| ADN | 2.5 | |
| Total | 25 | 675 |

| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclado (30-35 Ciclos) 94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| forward | 5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3' |
| Reverse | 5'-TACGACGTGCCAATTCITGA-3' |
| GEN | |
| blaOXA-58 | 383 pb |

ELECTROFORESIS

FECHA:

| Especificaciones | |
|------------------|-----------|
| Voltaje | 120 Volts |
| Tiempo | 120 min |
| Agarosa | 1.0 gr |
| TBE 1X | 90 mL |

PCR

FECHA:

| Posición | Muestra |
|----------|---------|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

| Carril | Muestra | Resultados |
|--------|---------|------------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | | |
| 10 | | |
| 11 | | |
| 12 | | |
| 13 | | |
| 14 | | |
| 15 | | |
| 16 | | |
| 17 | | |
| 18 | | |
| 19 | | |
| 20 | | |

Analista:

INVITROGEN

Analista:

AÑO

12.17. Anexo N° 17: Tabla N° 9

Tabla N° 9: Identificación de género y especie de *Enterobacterias* y *Acinetobacter baumannii* en aislados de la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos en el periodo de enero 2016 – diciembre 2018.

| Identificación de género y Especie de <i>Enterobacterias</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> “2016-2018” | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Microorganismo Aislado | n=190 | |
| | Frecuencia | Porcentaje |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 62 | 33% |
| <i>Escherichia coli</i> | 31 | 16% |
| <i>Serratia marcescens</i> | 6 | 3% |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 13 | 7% |
| <i>Enterobacter gergoviae</i> | 1 | 1% |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 77 | 41% |
| TOTAL | 190 | 100% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA)

12.18. Anexo N° 18: Tabla N° 10

Tabla N° 11: *Identificación de género y especie de Enterobacterias y Acinetobacter baumannii en aislados de la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos en el periodo de enero 2016 – diciembre 2018.*

| Identificación género y especie de enterobacterias y acinetobacter baumannii año 2016 - 2018 | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| AÑOS | MICROORGANISMO AISLADO | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
| 2016 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 14 | 39% |
| 2016 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 15 | 42% |
| | <i>Escherichia coli</i> | 5 | 14% |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | 2 | 5% |
| 2017 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 24 | 36% |
| 2017 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 25 | 38% |
| | <i>Escherichia coli</i> | 10 | 15% |
| | <i>Serratia marcescens</i> | 2 | 3% |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | 5 | 8% |
| 2018 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 39 | 44% |
| 2018 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 22 | 25% |
| | <i>Escherichia coli</i> | 16 | 18% |
| | <i>Serratia marcescens</i> | 4 | 5% |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | 6 | 7% |
| | <i>Enterobacter gergoviae</i> | 1 | 1% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA)

12.19. Anexo N° 19: Tabla N° 11

TABLA N° 12: *Perfil de susceptibilidad antimicrobiana en Enterobacterias en el año (2016)*

| Perfil de susceptibilidad antimicrobiano "Enterobacterias 2016" | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------|----------|-------------------|----------|----------|
| ANTIMICROBIANOS | n= | | | 22 | | |
| | FRECUENCIA | | | PORCENTAJE | | |
| | S | I | R | S | I | R |
| IMP | 0 | 3 | 19 | 0% | 14% | 86% |
| MEM | 0 | 0 | 22 | 0% | 0% | 100% |
| CRO | 0 | 0 | 22 | 0% | 0% | 100% |
| CAZ | 0 | 0 | 22 | 0% | 0% | 100% |
| FEP | 0 | 0 | 22 | 0% | 0% | 100% |
| ATM | 1 | 1 | 20 | 5% | 5% | 90% |
| GEN | 0 | 0 | 22 | 0% | 0% | 100% |
| SXT | 2 | 0 | 20 | 9% | 0% | 91% |
| COL | 22 | 0 | 0 | 100% | 0% | 0% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA)

12.20. Anexo N° 20: Tabla N° 12

TABLA N° 13: Perfil de susceptibilidad antimicrobiana: "Enterobacterias 2017"

| Perfil de susceptibilidad antimicrobiano "Enterobacterias 2017" | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------|------------|---|----|------------|----|-----|
| ANTIMICROBIANOS | n= | | | 42 | | |
| | FRECUENCIA | | | PORCENTAJE | | |
| | S | I | R | S | I | R |
| IMP | 3 | 0 | 39 | 7% | 0% | 93% |
| MEM | 3 | 0 | 39 | 7% | 0% | 93% |
| CRO | 0 | 1 | 41 | 0% | 2% | 98% |
| CAZ | 0 | 1 | 41 | 0% | 2% | 98% |
| FEP | 1 | 0 | 41 | 2% | 0% | 98% |
| ATM | 14 | 0 | 28 | 33% | 0% | 67% |
| GEN | 4 | 2 | 36 | 10% | 4% | 86% |
| SXT | 1 | 0 | 41 | 2% | 0% | 98% |
| COL | 40 | 0 | 2 | 95% | 0% | 5% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNRD-MINSA)

12.21. Anexo N° 21: Tabla N° 13

TABLA N° 14: Perfil de susceptibilidad antimicrobiana: "Enterobacterias 2018"

| Perfil de susceptibilidad antimicrobiano "Enterobacterias 2018" | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------|------------|---|----|------------|----|------|
| ANTIMICROBIANOS | n= | | | 49 | | |
| | FRECUENCIA | | | PORCENTAJE | | |
| | S | I | R | S | I | R |
| IMP | 0 | 0 | 49 | 0% | 0% | 100% |
| MEM | 0 | 0 | 49 | 0% | 0% | 100% |
| CRO | 8 | 0 | 41 | 16% | 0% | 84% |
| CAZ | 8 | 0 | 41 | 16% | 0% | 84% |
| FEP | 8 | 4 | 37 | 16% | 8% | 76% |
| ATM | 8 | 0 | 41 | 16% | 0% | 84% |
| GEN | 10 | 0 | 39 | 20% | 0% | 80% |
| SXT | 8 | 0 | 41 | 16% | 0% | 84% |
| COL | 45 | | 4 | 92% | 0% | 8% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA)

12.22. Anexo N° 22: Tabla N° 14

TABLA N° 15: Perfil de susceptibilidad antimicrobiana: "Acinetobacter baumannii 2016"

| Perfil de susceptibilidad antimicrobiano "Acinetobacter baumannii 2016" | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|---|----|------------|----|------|
| ANTIMICROBIANOS | n= | | | 14 | | |
| | FRECUENCIA | | | PORCENTAJE | | |
| | S | I | R | S | I | R |
| IMP | 0 | 0 | 14 | 0% | 0% | 100% |
| MEM | 0 | 0 | 14 | 0% | 0% | 100% |
| CAZ | 0 | 0 | 14 | 0% | 0% | 100% |
| FEP | 0 | 0 | 14 | 0% | 0% | 100% |
| PIP | 0 | 0 | 14 | 0% | 0% | 100% |
| TZP | 0 | 0 | 14 | 0% | 0% | 100% |
| SAM | 1 | 1 | 12 | 7% | 7% | 86% |
| GEN | 1 | 0 | 13 | 7% | 0% | 93% |
| SXT | 0 | 0 | 14 | 0% | 0% | 100% |
| MINO | 14 | | | 100% | 0% | 0% |
| COL | 14 | 0 | 0 | 100% | 0% | 0% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA)

12.23. Anexo N° 23: Tabla N° 15

TABLA N° 16: Perfil de susceptibilidad antimicrobiana: “*Acinetobacter baumannii* 2017”

| Perfil de susceptibilidad antimicrobiano " <i>Acinetobacter baumannii</i> 2017" | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------|---|----|------------|----|------|
| ANTIMICROBIANOS | n= | | | 24 | | |
| | FRECUENCIA | | | PORCENTAJE | | |
| | S | I | R | S | I | R |
| IMP | 1 | 0 | 23 | 4% | 0% | 96% |
| MEM | 1 | 0 | 23 | 4% | 0% | 96% |
| CAZ | 0 | 0 | 24 | 0% | 0% | 100% |
| FEP | 0 | 0 | 24 | 0% | 0% | 100% |
| PIP | 1 | 0 | 23 | 4% | 0% | 96% |
| TZP | 0 | 0 | 24 | 0% | 0% | 100% |
| SAM | 1 | 0 | 23 | 4% | 0% | 96% |
| GEN | 0 | 0 | 24 | 0% | 0% | 100% |
| SXT | 0 | 0 | 24 | 0% | 0% | 100% |
| MINO | 24 | 0 | | 100% | 0% | 0% |
| COL | 24 | 0 | 0 | 100% | 0% | 0% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA)

12.24. Anexo N° 24: Tabla N° 16

TABLA N° 17: Perfil de susceptibilidad antimicrobiana: "Acinetobacter baumannii 2018"

| Perfil de susceptibilidad antimicrobiano "Acinetobacter baumannii 2018" | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|---|----|------------|----|------|
| ANTIMICROBIANOS | n= | | | 39 | | |
| | FRECUENCIA | | | PORCENTAJE | | |
| | S | I | R | S | I | R |
| IMP | 0 | 0 | 39 | 0% | 0% | 100% |
| MEM | 0 | 0 | 39 | 0% | 0% | 100% |
| CAZ | 0 | 0 | 39 | 0% | 0% | 100% |
| FEP | 0 | 0 | 39 | 0% | 0% | 100% |
| PIP | 0 | 0 | 39 | 0% | 0% | 100% |
| TZP | 0 | 1 | 38 | 0% | 3% | 97% |
| SAM | 0 | 0 | 39 | 0% | 0% | 100% |
| GEN | 1 | 2 | 36 | 3% | 5% | 92% |
| SXT | 0 | 0 | 39 | 0% | 0% | 100% |
| MINO | 39 | 0 | 0 | 100% | 0% | 0% |
| COL | 39 | 0 | 0 | 100% | 0% | 0% |

Fuente: Libros de Registro – Departamento de Bacteriología (CNDR-MINSA)

12.25. Anexo N° 25: Tabla N° 17

Tabla N° 17: Frecuencia del Gen OXA-48: *Enterobacterias* 2016,2017 y2018 (n=113)

| FRECUENCIA DEL GEN OXA-48: <i>Enterobacterias</i> 2016-2018 | | |
|--------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|
| | OXA-48 | NO AMPLIFICÓ |
| FRECUENCIA | 1 | 112 |
| PORCENTAJE | 1% | 99% |

Fuente: Resultados de Electroforesis, Protocolos de Trabajo *Enterobacterias* 2016,2017 y 2018.

12.26. Anexo N° 26: Tabla N° 18

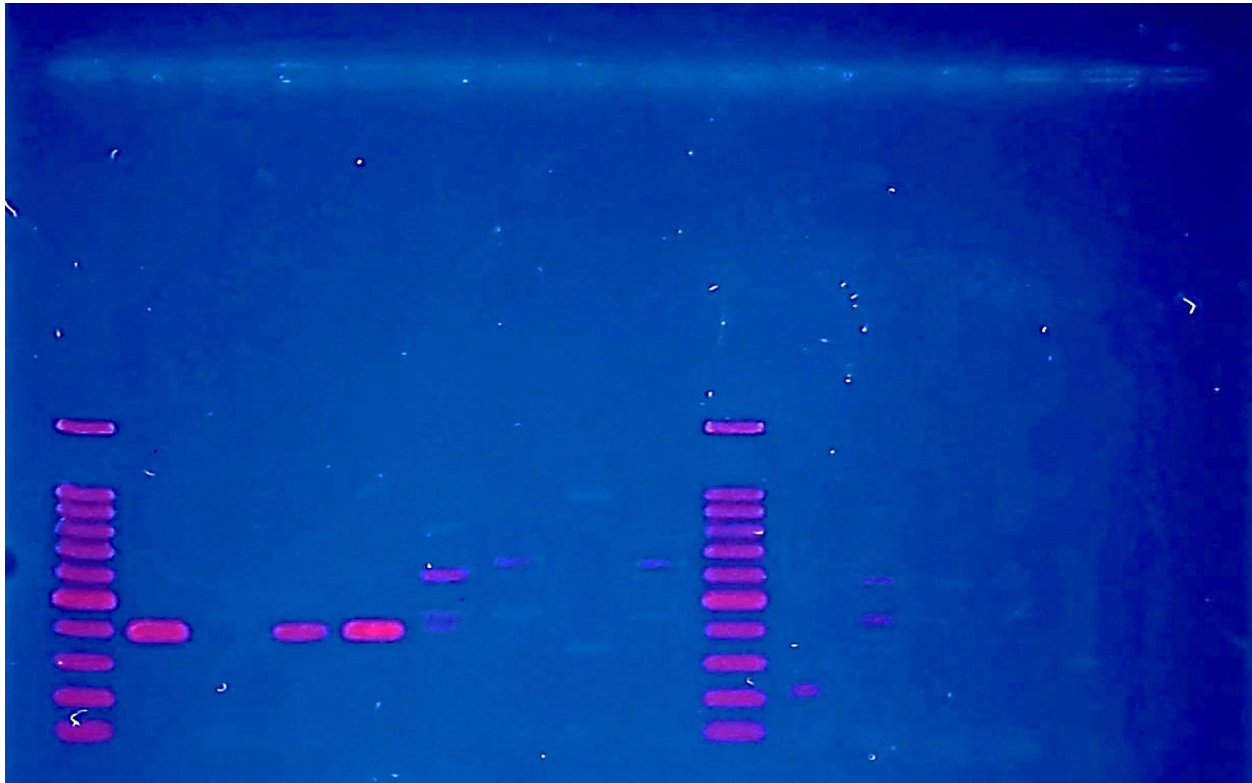
Tabla N° 18: Frecuencia del Gen OXA-23 & OXA-58: *Acinetobacter baumannii* 2016,2017 y2018 (n=77)

| FRECUENCIA DE OXA-23 Y OXA-58: <i>Acinetobacter baumannii</i> 2016,2017 y 2018 | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 2016 | 2017 | 2018 | 2016 | 2017 | 2018 |
| OXA-23 | 0 | 2 | 4 | 0% | 3% | 5% |
| OXA-58 | 0 | 4 | 1 | 0% | 5% | 1% |
| NO AMPLIFICÓ | 77 | 74 | 72 | 100% | 96% | 94% |

Fuente: Resultados de Electroforesis, Protocolos de Trabajo *Acinetobacter baumannii* 2016,2017 y 2018.

RESULTADOS: ELECTROFORESIS

Acinetobacter baumannii: Gen OXA- 58 “Año 2016”

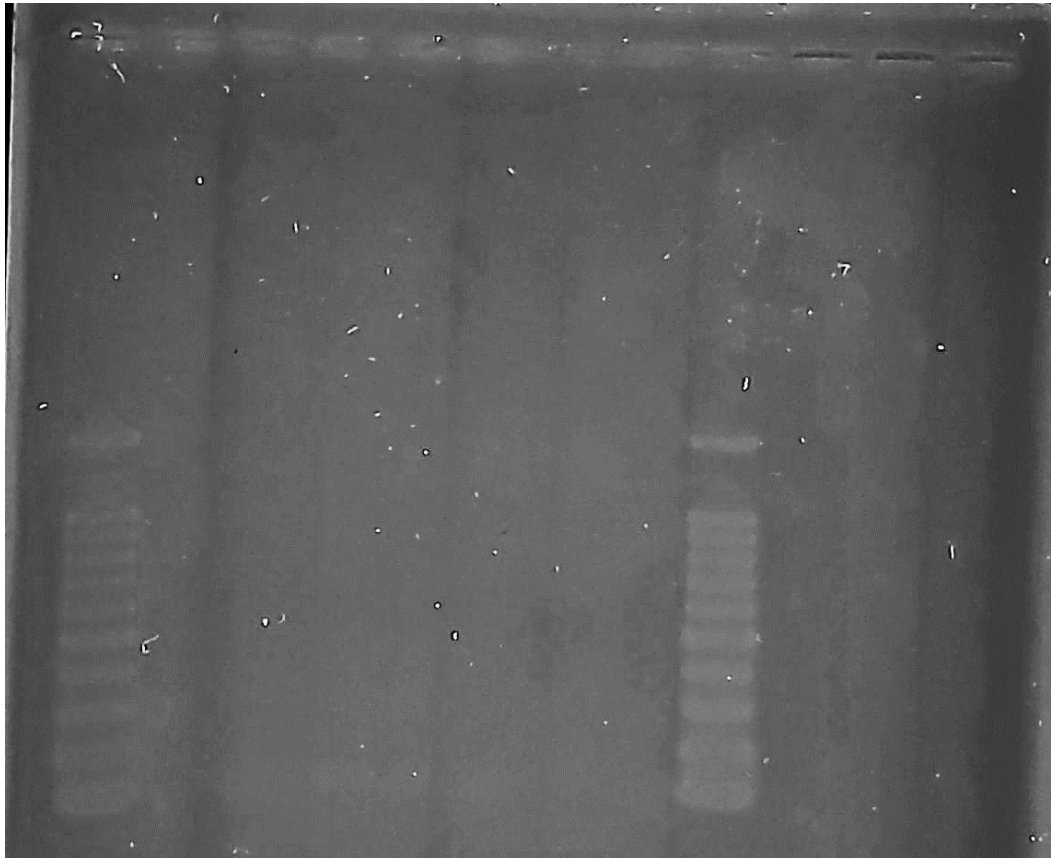


| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-TACGACGTGCCAATTCTTGA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-58</i> | 383 pb |

15 de diciembre de 2020

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|--------------|----------|-----------|----------------------|----------------|------------|------------|-----------|------------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Cepas | Marcador | OPS 222 A | <i>E. coli</i> 25922 | OPS 222 A 1/10 | 59 CC 2020 | 61 CC 2020 | 3 CC 2016 | 10 CC 2016 | 22 CC 2016 | Marcador | 24 CC 2016 | 25 CC 2016 | 29 CC 2016 | 31 CC 2016 | 32 CC 2016 | 33 CC 2016 |

Acinetobacter baumannii: Gen OXA- 58 “Año 2016”

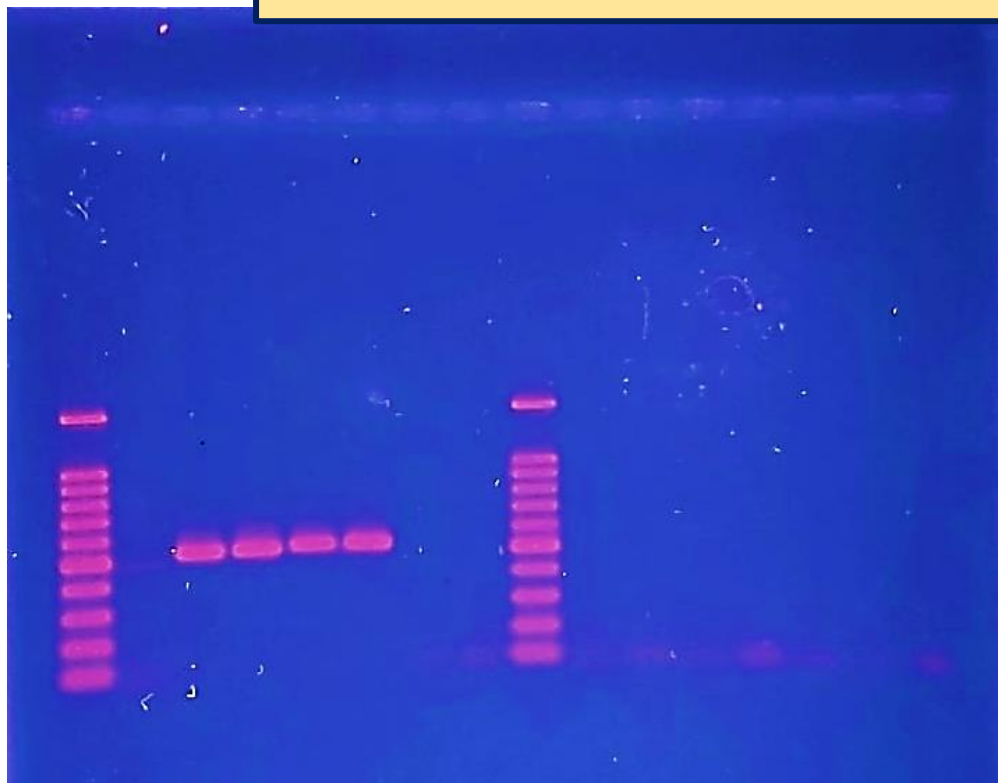


| CICLADO | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos) 94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-TACGACGTGCCAATTCTTGA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-58</i> | 383 pb |

15 de diciembre de 2020

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|----------|----|----|----|
| Cepas | Marcador | 38 CC 2016 | 44 CC 2016 | 48 CC 2016 | 49 CC 2016 | 52 CC 2016 | 54 CC 2016 | Mezcla de Reacción | Marcador | / | / | / |

Acinetobacter baumannii: Gen OXA-23 “Año 2016”

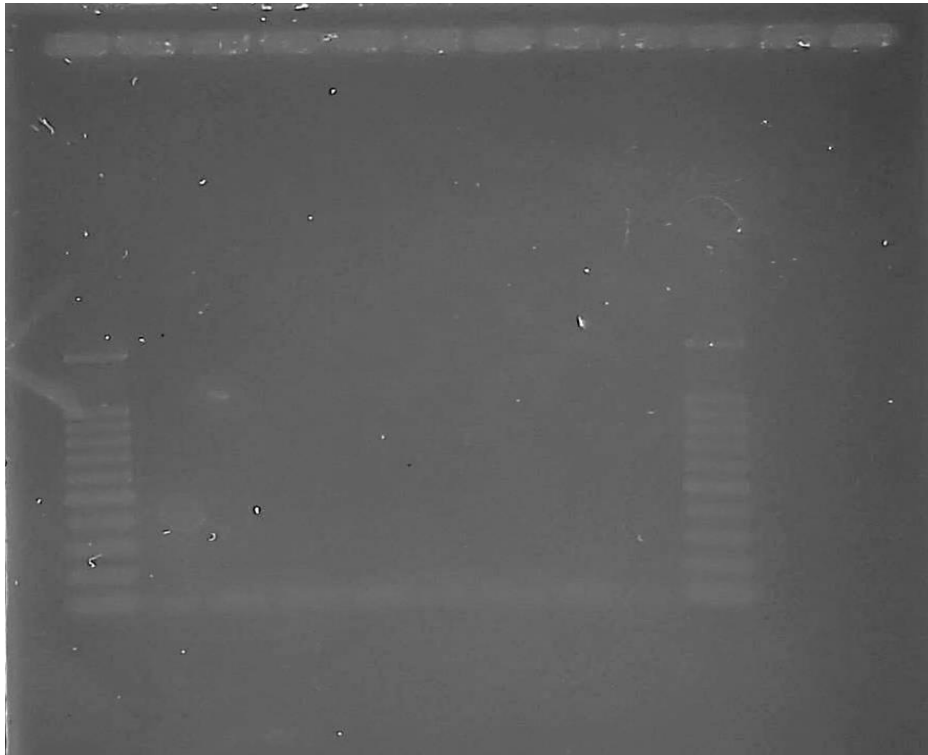


| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-55°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-GTATAGATGCCGGCATTCTGA-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-TCGGATTGGAGAACCAGAAAA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-23</i> | 513 pb |

16 de Diciembre de 2020

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|--------------|----------|-------------------------|---------------|--------------------------|------------------|------------------|--------------|------------------|----------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Cepas | Marcador | <i>E. coli</i> 25922 | 57 CC 2020 | 57 CC 2020 1/10 | 58 CC 2020 | 60 CC 2020 | 3 CC 2016 | 10 CC 2016 | Marcador | 22 CC 2016 | 24 CC 2016 | 25 CC 2016 | 29 CC 2016 | 30 CC 2016 | 31 CC 2016 | 32 CC 2016 |

Acinetobacter baumannii: Gen OXA- 23 “Año



| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-55°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-GTATAGATGCCGGCATTCTGA-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-TCGGATTGGAGAACCAGAAAA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-23</i> | 513 pb |

16 de Diciembre de 2020

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|----------|----|----|
| Cepas | Marcador | 33 CC 2016 | 38 CC 2016 | 44 CC 2016 | 48 CC 2016 | 49 CC 2016 | 52 CC 2016 | 54 CC 2016 | Mezcla de Reacción | Marcador | / | / |

Acinetobacter baumannii: Gen OXA- 58 “Año 2017”

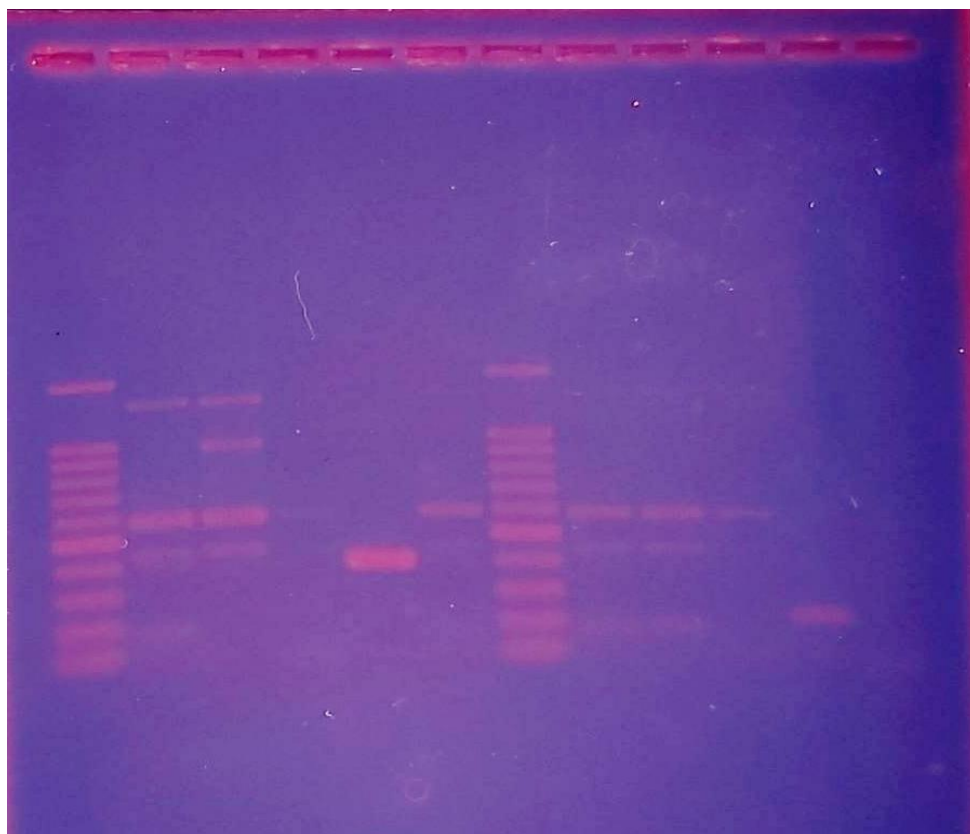


| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclado* (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGT AT T GGGGCT T GT GCT G-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-T ACGACGT GCCAAT T CT T GA-3' |
| GEN | |
| <i>bla</i> OXA-58 | 383 pb |

17 de diciembre de 2020

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|--------------|----------|----------------------|-----------|----------------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|---------------|------------|------------|------------|------------|
| Cepas | Marcador | <i>E. coli</i> 25922 | OPS 222 A | OPS 222 A 1/10 | 59 CC 2020 | 61 CC 2020 | 11 CC 2017 | 12 CC 2017 | Marcador | 14 CC 2017 | 15 CC 2017 | 16 CC 2017 | 18 CC 2017 | 21 CC 2017 | 22 CC 2017 | 33 CC 2017 |
| | | | | | | | | | | | | OXA-58 | | | | |

Acinetobacter baumannii: Gen OXA- 58 “Año 2017”

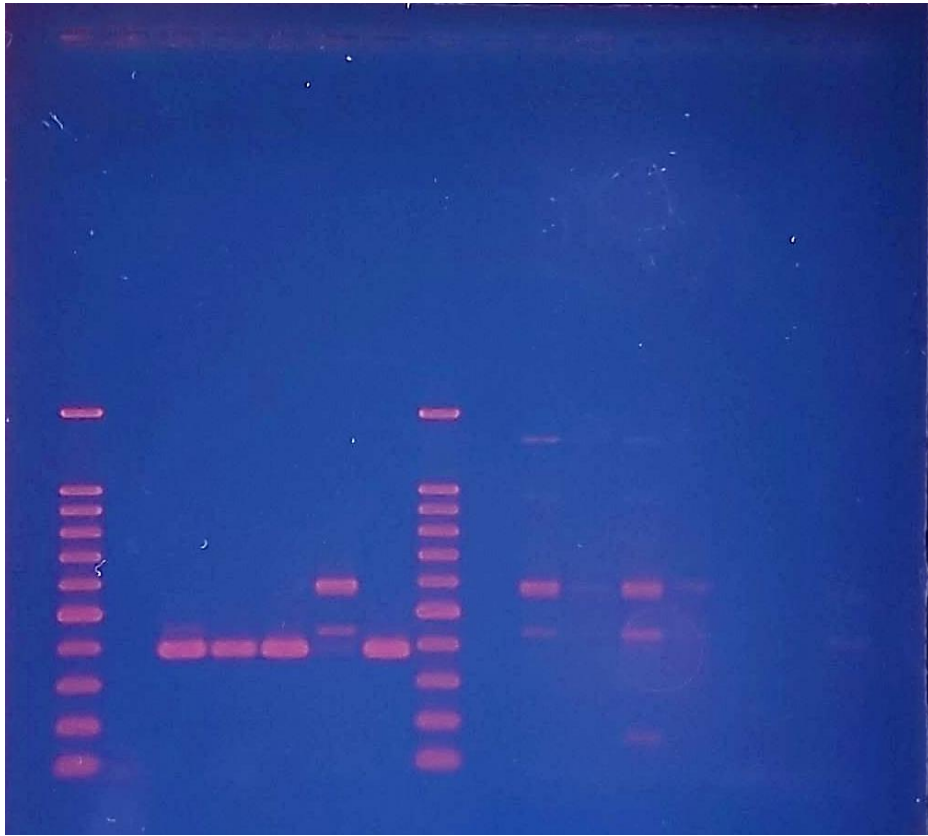


| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGT AT T GGGGCT T GT GCT G-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-T ACGACGT GCCAAT T CT T GA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-58</i> | 383 pb |

17 de diciembre de 2020

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|----------|------------|------------|-----------|---------------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|--------------------|
| Cepas | Marcador | 25 CC 2017 | 27 CC 2017 | 29CC 2017 | 31 CC 2017 | 32 CC 2017 | Marcador | 36 CC 2017 | 37 CC 2017 | 42 CC 2017 | 24 CC 2017 | Mezcla de Reacción |
| | | | | | OXA-58 | | | | | | | |

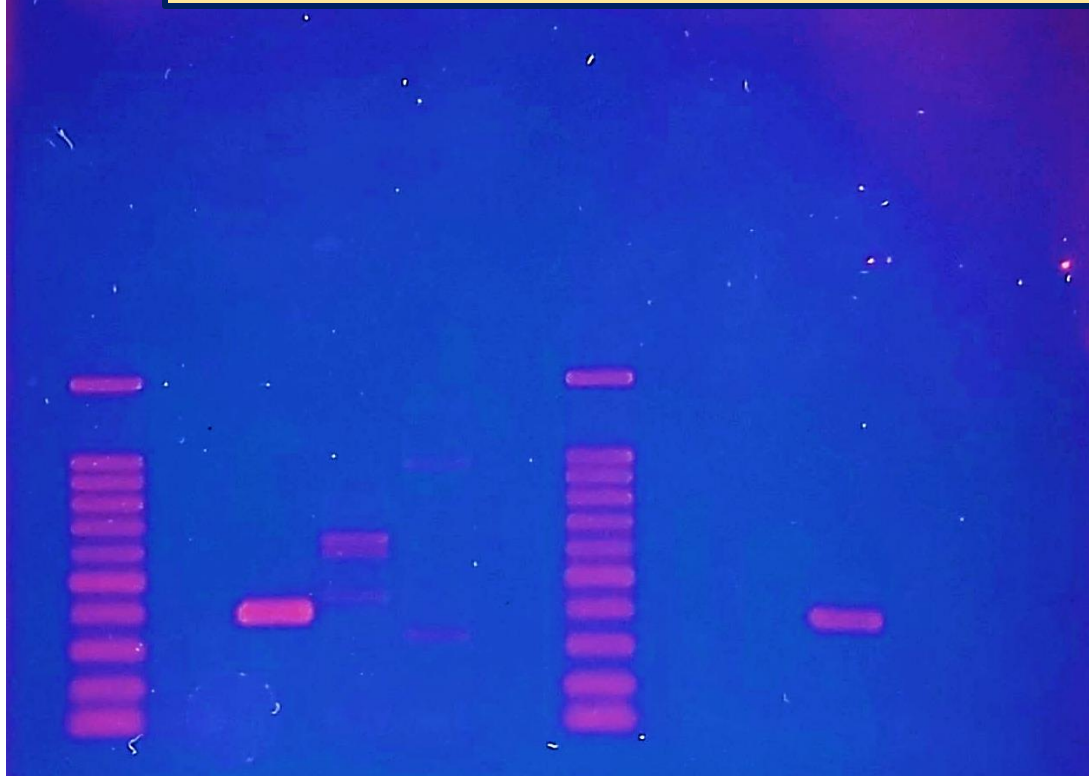
***Acinetobacter baumannii*: Gen OXA- 58 “Año 2017”**



| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGT AT T GGGGCT T GT GCT G-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-T ACGACGT GCCAAT T CTT GA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-58</i> | 383 pb |

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|--------------|----------|----------------------|-----------|----------------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|
| Cepas | Marcador | <i>E. coli</i> 25922 | OPS 222 A | OPS 222 A 1/10 | 59 CC 2020 | 61 CC 2020 | 16 CC 2017 | Marcador | 42 CC 2017 | 46 CC 2017 | 53 CC 2017 | 67 CC 2017 | 76 CC 2017 | 30 CC 2016 | Mezcla de Reacción | 79 CC 2017 |

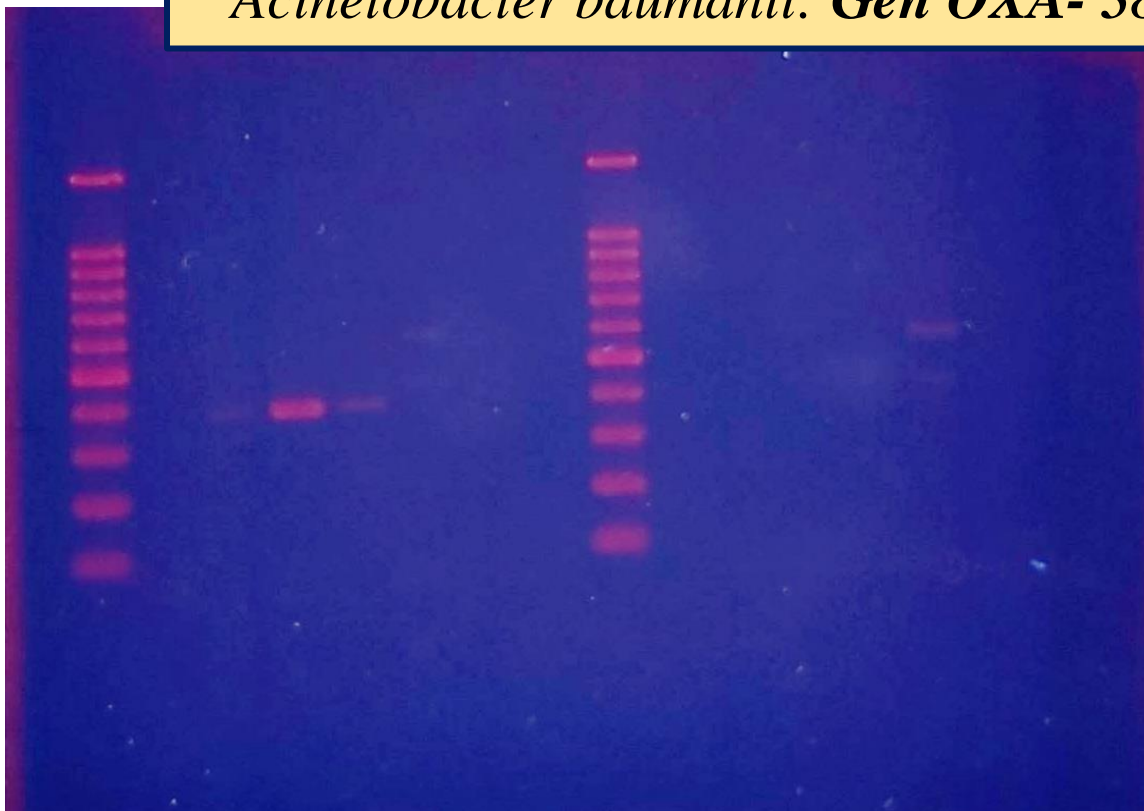
Acinetobacter baumannii: Gen OXA-58 "Año 2018"



| CICLADO | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclor (30-35 Ciclos) 94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGT AT T GGGGCT T GT GCT G-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-T ACGACGT GCCAATT CTT GA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-58</i> | 383 pb |

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|----------|-------------|---------------|-----------|------------|-----------|----------|------------|------------|---------------|------------|------------|
| Cepas | Marcador | 110 CC 2017 | 31 CC 2017 | 3 CC 2016 | 10 CC 2016 | 3 CC 2016 | Marcador | 10 CC 2016 | 29 CC 2018 | 39 CC 2018 | 46 CC 2018 | 50 CC 2018 |
| | | | OXA-58 | | | | | | | OXA-58 | | |

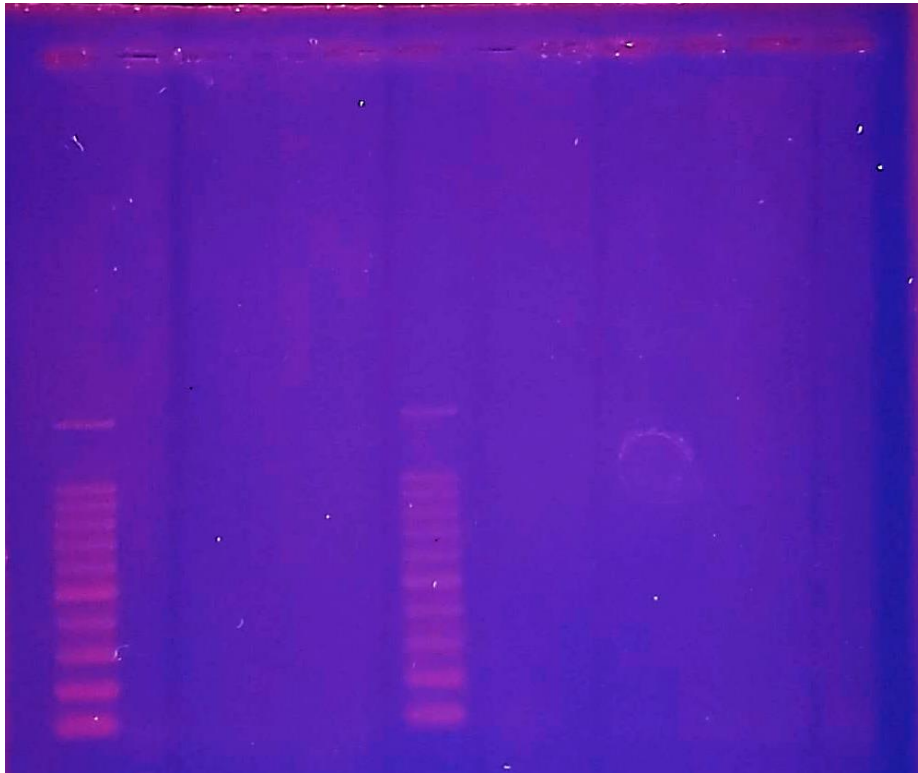
Acinetobacter baumannii: Gen OXA- 58 “Año 2018”



| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGT AT T GGGGCT T GT GCT G-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-T ACGACGT GCCAAT T CT T GA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-58</i> | 383 pb |

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|--------------|----------|-------------------------|--------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|----------|------------------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Cepas | Marcador | <i>E. coli</i> 25922 | OPS 222 A | OPS 222 A 1/10 | 59 CC 2020 | 61 CC 2020 | 51 CC 2018 | Marcador | 52 CC 2018 | 57 CC 2018 | 59 CC 2018 | 88 CC 2018 | 89 CC 2018 | 90 CC 2018 | 91 CC 2018 | 92 CC 2018 |

Acinetobacter baumannii: Gen OXA- 58 “Año 2018”



| CICLADO | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclor (30-35 Ciclos) 94°C por 30seg-54°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-AAGT AT T GGGCT T GT GCT G-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-T ACGACGT GCCAAT T CTT GA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-58</i> | 383 pb |

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|----------|---------------|---------------|----------------|-------------------|----------|----------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Cepas | Marcador | 93 CC 2018 | 94 CC 2018 | 107 CC 2018 | 108 CC 2018 | Marcador | 109 CC 2018 | 110 CC 2018 | 118 CC 2018 | 119 CC 2018 | 120 CC 2018 | 121 CC 2018 |

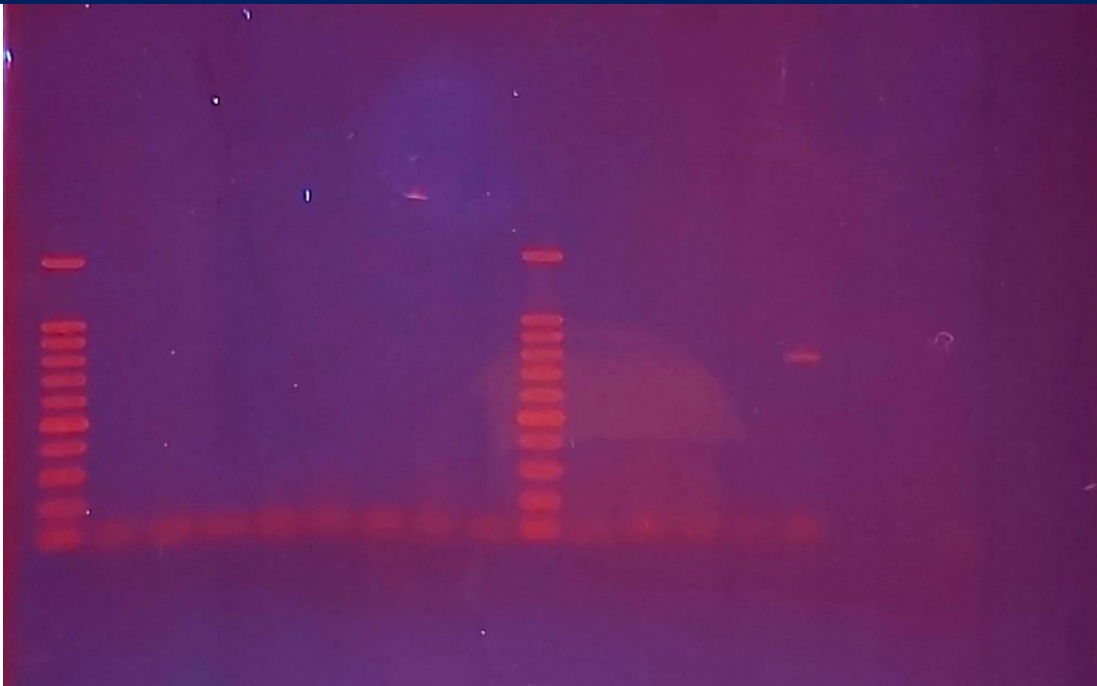
Acinetobacter baumannii: Gen OXA-23 “Año 2018”



| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-55°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-GTATAGATGCCGGCATTCTGA-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-TCGGATTGGAGAACCAGAAAA-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-23</i> | 513 pb |

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|---------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| Cepas | Marcador | 50 CC 2018 | 51 CC 2018 | 52 CC 2018 | 57 CC 2018 | 59 CC 2018 | 88 CC 2018 | 89 CC 2018 | 90 CC 2018 | Marcador | 91 CC 2018 | 92 CC 2018 | 93 CC 2018 | 94 CC 2018 | 107 CC 2018 | 108 CC 2018 | 109 CC 2018 | 110 CC 2018 | 118 CC 2018 | 119 CC 2018 |
| | | | | | | | | | | | OXA-23 | | | | | | | | OXA-23 | |

Enterobacterias: Gen OXA- 48 “Año 2018”



| CICLADO | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Desnaturalización 94°C por 5min; Ciclador (30-35 Ciclos)94°C por 30seg-52°C por 30 Seg-72°C por 60 seg. Extensión Final 72°C por 10 min | |
| <i>forward</i> | 5'-ATGCGTGTATTAGCCTTATCGG-3' |
| <i>Reverse</i> | 5'-TGAGCACTTCTTTTGTGATG-3' |
| GEN | |
| <i>bla OXA-48</i> | 775pb |

| Pozos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|---------------|------------|------------|--------------------|----|----|
| Cepas | Marcador | 54 CC 2018 | 60 CC 2018 | 61 CC 2018 | 62 CC 2018 | 64 CC 2018 | 65 CC 2018 | 66 CC 2018 | 67 CC 2018 | Marcador | 68 CC 2018 | 69 CC 2018 | 70 CC 2018 | 71 CC 2018 | 72 CC 2018 | 73 CC 2018 | 75 CC 2018 | Mezcla de Reacción | / | / |
| | | | | | | | | | | | | | | | OXA-48 | | | | | |