



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA

UNAN - MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

“Luis Felipe Moncada”

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

Licenciatura en Microbiología

Tema:

Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasas en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el período enero a diciembre 2017.

Autores:

Br. Gillien Lisbeth Acevedo Aguilar

Br. Yixria Dominik Dávila Zeledón

Br. Reyna María Montenegro Somarriba

Tutor.

MsC. Oscar Heriberto Arbizú Medina

09 abril de 2019
Managua, Nicaragua



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE NICARAGUA

UNAN-Managua

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

“Luis Felipe Moncada”

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO
DE:

Licenciatura en Microbiología



Tema:

Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasas en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el período enero a diciembre 2017.

Autores:

Br. Gillien Lisbeth Acevedo Aguilar

Br. Yixria Dominik Dávila Zeledón

Br. Reyna María Montenegro Somarriba

Tutor.

MsC. Oscar Heriberto Arbizú Medina

09 abril de 2019
Managua, Nicaragua

Agradecimientos

A **Dios Todopoderoso** por su infinita misericordia, por permitirnos estar a donde ahora estamos, por ser nuestro proveedor y protector a lo largo de este camino y por llenarnos de su Sabiduría para poder culminar este trabajo.

A la **UNAN-Managua** por ser nuestra Alma Máter, por brindarnos todo el apoyo necesario en equipos, local y materiales a utilizar en nuestro estudio, por el apoyo brindado por el Fondo para Proyectos de Investigación de la UNAN-Managua.

A **Nuestras Familias**, por su apoyo incondicional, por enseñarnos a perseverar y conseguir nuestras metas propuestas y por estar siempre para nosotros.

A **Nuestros Docentes**, por brindarnos todo su conocimiento a lo largo de nuestro proceso de aprendizaje, por su paciencia y sus consejos.

Al **Hospital Alemán Nicaragüense**, por abrir sus puertas para la realización de esta investigación, a los licenciados del Laboratorio de Bacteriología por su grata disposición y por apoyarnos en todo lo necesario.

A **Nuestro Tutor**, por confiar en nosotras y por brindarnos todo su apoyo para realizar este trabajo, por estar desde los procesos de iniciación, así como la culminación de esta investigación.

Agradecemos de manera especial a la **Lic. Kenia García Rosales** por todo el apoyo brindado durante el proceso de esta investigación, de igual manera, los responsables del Laboratorio de Bioanálisis Clínico por su ayuda incondicional al momento del traslado y muestreo de la investigación.

Dedicatoria

Dedico esta tesis que con mucho esfuerzo hemos realizado, primeramente, a Dios quien ha sido mi fortaleza en mi debilidad, mi guía, cuando mis pies no sabían dónde ir; por permitirme estar donde ahora estoy, además de ser quien me ha llenado de su gran amor e infinita misericordia, porque sé que puedo confiar en Él cada día de mi vida.

A mi madre por ser la persona en la que puedo confiar y contar en todo momento, además de motivarme a seguir adelante. A mi Padre por estar pendiente de mí y de mis necesidades, y de igual manera, a cada miembro de mi familia que me ha brindado su apoyo a lo largo de este camino.

También a mis compañeras por su comprensión y dedicación a lo largo de este trabajo, porque no solo logramos ser un gran equipo, sino porque además pudimos llegar a forjar una gran amistad.

Gillien Lisbeth Acevedo Aguilar

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mi familia, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible, principalmente a mis padres, por enseñarme que las mejores cosas en la vida toman tiempo, a mis hermanos, por su apoyo incondicional durante todo este trayecto.

Yixria Dominik Dávila Zeledón

Dedicatoria

Primeramente, a Dios Todopoderoso por ser mi fortaleza, refugio y permitirnos culminar con éxito esta etapa en nuestras vidas.

A mi madre Juana Somarriba por su apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso de aprendizaje, por ser el pilar fundamental en mi vida y por aconsejarme en todo lo que necesitaba.

A mis familiares que de una u otra forma estuvieron presentes dándome ánimos y fortaleza para culminar con éxito esta etapa.

A demás personas que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este trabajo y a todos aquellos quienes por su apoyo ha sido posible la culminación del mismo.

Reyna María Montenegro Somarriba

RESUMEN

El surgimiento de la resistencia bacteriana se ha originado a causa del consumo excesivo o insuficiente de antibióticos, dejando como consecuencia, el desarrollo de mecanismos de resistencia; tal como, la producción de enzimas inhibidoras de antibióticos, creando así un problema de salud pública a nivel mundial que amenaza con agotar las opciones terapéuticas efectivas para la erradicación de bacterias patógenas.

La familia de los carbapenémicos son a la fecha los Betalactámicos con el espectro de actividad más amplio, por esta razón, estas moléculas son de principal importancia en el tratamiento de infecciones intrahospitalarias, principalmente de aquellas causadas por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

La emergencia por la rápida diseminación de las enterobacterias resistentes a carbapenémicos constituye un problema más grave aún, puesto que, genera mayor dificultad para su tratamiento por lo que pueden presentarse como resistentes a varios antibióticos.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, de corte transversal y de carácter retrospectivo; fue realizado en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN). Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia. De las 529 cepas de enterobacterias aisladas que conformaron el universo de la investigación, únicamente 27 cepas, presentaron resistencia a los carbapenémicos, lo que representa un 5.10% del total de las muestras. Estas cepas fueron seleccionadas y analizadas mediante el método de difusión por disco en agar para confirmar la presencia de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa, en donde todas resultaron positivas.

Se utilizó la PCR convencional para detectar los genes de resistencia de las 27 cepas seleccionadas, obteniendo como resultado, la determinación de la presencia de genes tipo: NDM-1, encontrándose con una prevalencia de 61.77%, IMP con 17.65%, SPM con 11.76%, GIM, SIM y VIM con 2.94% respectivamente. Cabe destacar que, se encontraron 5 cepas pertenecientes a los géneros *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* que eran portadoras de dos genes a la vez, mientras que 1 cepa perteneciente al género *Citrobacter freundii* presentaba tres genes diferentes a la vez; todos los genes eran codificadores para carbapenemasas tipo Metallo.

De los microorganismos analizados en el estudio, *Klebsiella pneumoniae*, presentó mayor porcentaje de aislamiento, con un total de 17 aislamientos que representaron el 63% del total de la muestra, seguido de *Serratia marcescens* con un 14.81%, *Escherichia coli* con un 11.11%, *Citrobacter freundii* con un 3.70%, *Escherichia fergusonii* con un 3.70% y finalmente *Enterobacter cloacae* con un 3.70%. La sala más afectada fue la Unidad de Cuidados Intensivos que atiende a neonatos, con un total de 20 aislamientos, lo que equivale al 74.07% del total de la población muestreada.

VALORACIÓN DEL TUTOR

La resistencia bacteriana ha evolucionado en gran medida durante los últimos años debido al uso indiscriminado de los antibióticos, la capacidad que tienen los microorganismos de desarrollar múltiples mecanismos de resistencia, debe preocupar a la comunidad científica, por la reducción drástica de las opciones terapéuticas que tenemos a nuestro alcance para combatir los distintos tipos de procesos infecciosos. La producción de enzimas que hidrolizan a los carbapenémicos, es la más nueva, pero quizás la más importante debido que estas han agotado la última línea de antibiótico como son los carbapenémicos, aumentando las problemáticas intrahospitalarias, ya que estas cepas son muy difíciles de tratar.

Considero que este trabajo de monografía con la temática *Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense en el período enero a diciembre 2017*, es de gran importancia por la situación actual en los hospitales del país, agravando la calidad de vida de los pacientes, se estima que en un futuro cercano sea imposible poder usar los antibióticos para contrarrestar las infecciones bacterianas, algunos autores citan que se debe hablar de panresistencia, porque existen microorganismos sin alternativa antibiótica, por lo tanto intratable.

Tutor.

MSc. Oscar Arbizú Medina
Docente Dpto. Bioanálisis Clínico.
UNAN-Managua. I.P.S.

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMC: Amoxicilina-Ácido clavulánico

AMK: Amikacina

AMP: Ampicilina

AMP-C: Cefalosporinas de clase C.

APB: Ácido fenil-borónico

BLEE: β -lactamasas de espectro extendido.

CAR: Carbenicilina

CAZ: Ceftazidime

CEC: Cefaclor

CHL: Cloranfenicol

CIM: Concentración Mínima Inhibidora

CIP: Ciprofloxacino

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical & Laboratory Standards Institute)

CNDR: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia

COL: Colistín

CRO: Ceftriazona

CTX –M: Cefotaximasa

CXM: Cefuroxime

DIM: Imipenemasa holandesa (Dutch imipenemase)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos libres

EAE: *E. coli* enteroagregativa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EPEC: *E. coli* enteropatógena

ERT: Ertapenem

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

FEP: Cefepime

FOX: Cefoxitin

FPI: Proyectos de Investigación

GEN: Gentamicina

GIM: German imipenemasa

HAN: Hospital Alemán Nicaragüense

I: Intermedio

IAAS: Infecciones asociadas a la asistencia sanitaria

IMP: Imipenem

IMP: Imipenemasa

INCIENSA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

ITU: Infecciones del tracto Urinario.

KHM: Hospital de la Universidad de Kyorin imipenemasa (Kyorin University Hospital imipenemase)

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa.

LPS: Lipopolisacárido

LVX: Levofloxacino

MBL: Metalobetalactamasas

MER: Meropenem

NAL: Ácido Nalídixico

NCCLS: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

NDM: New Delhi metalo-beta- lactamasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OXA: Oxacilinas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

R: Resistente

RPM: Revoluciones por minuto

S: Sensible

SDS: Dodecilsulfato sódico

SHU: Síndrome hemolítico urémico

SHV: Beta-lactamasas de la familia sulfidril

SIM: Seoul imipenemasa

SNC: Sistema Nervioso Central

SPM: Sao Paulo metalo-beta-lactamasa

STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga

SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol

TAE O TBE: Tris- borato-EDTA

TEM: Beta-lactamasa de la familia Temoniera

TGC: Tigeciclina

TIC: Ticarcilina

TZP: Piperacilina- Tazobactam

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UFC: Unidad formadora de colonias

UV: Ultra violeta

VIM: Verona imipenemasa

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES	2
III.	JUSTIFICACIÓN	5
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
V.	OBJETIVOS.....	8
5.1.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	9
VI.	MARCO TEÓRICO	10
6.1.	Infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS).....	10
6.2.	Generalidades de las enterobacterias	10
6.3.	Patología de las enterobacterias.....	12
6.4.	Carbapenémicos	17
6.5.	Resistencia.....	17
6.5.1.	Genética de la resistencia.....	17
6.5.2.	Mecanismos de resistencia.....	19
6.5.3.	Carbapenemasas.....	22
6.6.	Métodos de detección fenotípica para la clasificación de carbapenemasas	22
6.6.1.	Método de difusión en disco	23
6.7.	Método de detección de genes productores de carbapenemasas.....	23
6.7.1.	Extracción de ácido nucleico	24
6.7.2.	Técnica de la PCR.....	26
VII.	DISEÑO METODOLÓGICO	28
VIII.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	38
IX.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	42
X.	CONCLUSIONES.....	55
XI.	RECOMENDACIONES.....	56
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
XIII.	ANEXOS.....	58

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos constituye un problema de salud cada vez mayor a nivel mundial debido a su uso irracional, lo que ha conllevado a la aparición de cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos. Estas bacterias poseen la capacidad de diseminarse y pueden adquirir resistencia muy fácilmente mediante mutación o por medio de transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes, esto conlleva a fracasos terapéuticos cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo frente al microorganismo que produce la infección.

En nuestro país, según estudios anteriormente realizados en hospitales de Referencia Nacional, se han encontrado altas tasas de incidencia, en cuanto al hallazgo de bacterias que presentan resistencia a carbapenémicos por distintos mecanismos, por lo cual este estudio se realizó con la finalidad de caracterizar fenotípica y genotípicamente genes de resistencia productores de enzimas Metallo- β -lactamasa en enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas de alto riesgo en el HAN en el período comprendido entre enero a diciembre 2017.

Este estudio es de carácter descriptivo, de corte transversal y retrospectivo en donde se estudiaron cepas que presentaron resistencia a los carbapenémicos con una CIM de 2–4 $\mu\text{g/mL}$ en Imipenem y Meropenem respectivamente, y/o un punto de corte ≤ 19 mm mediante la técnica de difusión por disco en agar, según los estándares utilizados en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana brindados por la CLSI 2017.

Los datos con los cuales se seleccionaron las muestras a trabajar, fueron recolectados del Libro de Registros de aislamientos bacteriológicos del HAN, estas muestras fueron identificadas y analizadas mediante el método VITEK®2 Compact, y la técnica de difusión por disco en agar, siguiendo el protocolo de diagnóstico empleado por el laboratorio de bacteriología del HAN. Una vez recogidos los datos se procedió a determinar fenotípica y genotípicamente los genes productores de enzimas tipo carbapenemasa de cada bacteria.

II. ANTECEDENTES

La resistencia a los fármacos en enterobacterias es un serio problema al que la humanidad se enfrenta en la actualidad, ya que periódicamente aparecen nuevos mecanismos de resistencia; debido a esto, distintos países han realizado estudios con el fin de evaluar la prevalencia fenotípica y genotípica de genes de resistencia presentes en estas bacterias.

Chinchilla, durante el año 2012; en la ciudad de Guatemala, realizó un estudio denominado *Detección de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC-2 en enterobacterias BLEE+: Evaluación fenotípica con confirmación genotípica* en cepas aisladas de enterobacterias de pacientes que acudían al centro de asistencia que presentaron Betalactamasa de Espectro Extendido positivo (BLEE+). Se analizaron 118 muestras de las cuales, el 58% eran especies de *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella pneumoniae* con un 42; finalmente el 39% de las muestras analizadas poseían carbapenemasas tipo Metallo- β -lactamasas (Chinchilla, 2013).

(INCIENSA) en el año 2014, llevó a cabo un estudio en Costa Rica que lleva por nombre *Primer hallazgo de carbapenemasas tipo Metallobetalactamasas New Delhi (MBL-tipo Metallobetalactamasas New Delhi (MBL-NDM) en Costa Rica NDM) en Costa Rica*, donde se confirmó el primer caso positivo por MBL-NDM en *Escherichia coli* aislada del urocultivo de una niña de dos años que presentó un cuadro de infección urinaria recurrente. El aislamiento fue referido por el Laboratorio Clínico de Hospital de Niños. La niña, procedente de Nicaragua, había recibido tratamiento antimicrobiano con gentamicina en este país. La *Escherichia coli* aislada mostró resistencia a betalactámicos, Ciprofloxacina, Trimetoprim-Sulfametoxazole y sensibilidad a Nitrofurantoina (INCIENSA, 2014).

Duarte durante el periodo comprendido entre 2011 al 2015 llevó a cabo un estudio llamado *Infecciones por Escherichia coli y su Perfil de Resistencia en niños atendidos en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”*. En el que estudió infecciones por *Escherichia coli* y su perfil de resistencia fenotípico; resultando así, 322 muestras de las cuales, 11 de las muestras eran productoras de carbapenemasa lo que corresponde al 3.4 %. Por otro lado, el tipo de infección más frecuente fue diagnosticado en el servicio de nefrología con 30.7% del cual un 10.2% corresponden a infecciones adquiridas en la misma unidad de

salud en pacientes de urología y en el servicio de cirugía pediátrica, los atendidos fueron un 35.1% por infección de herida quirúrgica superficial. Las muestras examinadas para identificar estas infecciones fueron 38.2% secreción de la herida y 30.7% en orina (Duarte, 2016).

Sequeira a partir de enero de 2010 a diciembre del 2014, realizó un estudio por nombre *Infecciones por Klebsiella Pneumoniae y su perfil de resistencia en egresados del Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”*, el microorganismo en cuestión pertenecía al género *Klebsiella pneumoniae*, de dicho estudio se analizaron 252 muestras de las cuales 56 resultaron positivas para carbapenemasa lo que corresponde al 22.2 % del total de muestras (Sequeira, 2015).

Ortiz, *et al.*, en julio de 2014, llevaron a cabo un estudio denominado *Infecciones por Klebsiella Pneumoniae y su perfil de resistencia en egresados del Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”*, ésta investigación tenía como objetivo la identificación fenotípica de enterobacterias productoras de carbapenemasa aisladas de procesos infecciosos de pacientes internos del Hospital en el cual se analizaron 13 cepas, de estas; 12 pertenecían al género de *Klebsiella pneumoniae*, es decir, el 92.30% y 1 cepa identificada como *Escherichia coli*, es decir, el 7.70% de frecuencia. No hubo presencia de carbapenemasa tipo KPC, por lo tanto, las 13 cepas resultaron con MBL (Ortiz, *et al.*, 2014).

Caldera y Robles, en el año 2014 realizaron un estudio llamado *Caracterización Fenotípica de bacilos Gram Negativos resistentes a Carbapenems procedentes de la Red Nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos*, este estudio consistía en caracterizar fenotípicamente bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenems, que procedían de la Red Nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, en el laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia “Conchita Palacios” (CNDR). Los resultados fueron 165 cepas de las cuales la mayor prevalencia fue por parte de *Klebsiella pneumoniae* con un 69%. En tanto a carbapenemasas, 140 de las cepas (72%) presentaron sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) por tanto eran Metallo- β -lactamasa, mientras que 9 de las cepas presentaron sinergia con ácido fenilborónico (APB), lo que indica la posible presencia de enzimas de tipo KPC y las 46 cepas restantes (23%) no presentaron sinergia con ninguno

de los inhibidores por lo tanto se clasifican como carbapenemasas tipo OXA (Caldera & Robles, 2017).

Cerda Aragón, *et al.*, en el año 2015 llevaron a cabo un estudio llamado *Genes productores de enzimas carbapenemasa 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 este se estudiaron los genes productores de enzimas carbapenemasas tipo MBL, KPC y OXA mediante la técnica de PCR. Se analizaron 249 cepas de enterobacterias aisladas de muestras de pacientes internados en el Hospital de las cuales solo 45 fueron resistentes fenotípicamente y genotípicamente, se encontró que el 91.11% de las cepas presentaban resistencia a los carbapenémicos a través de las enzimas productoras de carbapenemasas tipo Metallo. En el estudio la especie con mayor prevalencia fue *Klebsiella pneumoniae* (Cerda-Aragón, *et al.*, 2017).

Arbizú Medina, *et al.*, en el año 2018, llevaron a cabo un estudio denominado *Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en especies de Enterobacteriaceae aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua*, en el cual se analizaron 45 cepas. De estas cepas, 43 dieron positivo para el test de sinergia con EDTA; 21 portaban el gen de Nueva Delhi. El 66% de Metallo- β -lactamasa Nueva Delhi se encontró en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, seguida de *Escherichia vulneris*, en un 14%, *Escherichia coli* en un 5%, *Providencia rettgeri* en un 5%, *Pantoea agglomerans* en un 5% y *Kluyvera cryocrescens* en un 5% (Arbizú-Medina, *et al.*, 2018).

III. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos constituye un problema de salud cada vez mayor a nivel mundial. Hasta hace unos años atrás, los mecanismos de resistencia que se presentaban con mayor frecuencia, eran las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), éstas se encontraban en enterobacterias aisladas de pacientes con infecciones intrahospitalarias; quedando como últimas opciones terapéuticas los carbapenémicos. El uso irracional de los antibióticos ha conllevado a la aparición de cepas de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos.

De igual forma, es importante destacar la capacidad que tienen las enterobacterias para desarrollar mecanismos de resistencia y la facilidad que poseen de diseminarse. Un criterio que debe tomarse en cuenta, es el tipo de cepa y su localización (sea sistémica o no), esto conlleva a mayores costos médicos, estadías prolongadas en el Hospital y, asimismo; mayor índice de mortalidad, puesto que las opciones terapéuticas son limitadas o casi nulas, siendo así, uno de los mayores desafíos a los que se enfrentan hoy día los médicos y personal de salud.

Con este estudio se pretende contribuir con información y datos aproximados sobre el comportamiento y la distribución de enterobacterias con genes productores de enzimas capaces de generar resistencia a carbapenémicos y la diseminación de estos microorganismos en áreas hospitalarias.

Por tanto, se realizó el estudio en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en donde se seleccionaron cepas de enterobacterias con resistencia a carbapenémicos. Estas cepas fueron aisladas e identificadas a partir de muestras clínicas de pacientes internos en el Hospital por el personal del Laboratorio de Bacteriología del HAN. Dichas cepas fueron trasladadas al Laboratorio de Bioanálisis Clínico y al Laboratorio de Biología Molecular “*MA Elmer Cisneros Moreira*” para confirmar y caracterizar los genes codificadores de enzimas carbapenemasa, presentes tanto, fenotípica como genotípicamente; con el fin de conocer el comportamiento y distribución en el área hospitalaria.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enterobacterias provocan diversos tipos de infecciones, tales como, infecciones del tracto respiratorio, urinario, diseminadas, entéricas, extraintestinales, entre otras. Estas bacterias pueden actuar como oportunistas, principalmente en salas hospitalarias que requieren cuidados intensivos, donde la mayoría de los pacientes se encuentran inmunodeprimidos, lo cual facilita la diseminación bacteriana. Estas han aumentado su nivel de supervivencia hacia los fármacos a causa de la resistencia, ocasionando un fallo terapéutico al tratar de erradicar la infección, lo que podría conducir al paciente a complicaciones y/o la muerte.

Con el fin de conocer la naturaleza de la cepa que está causando la infección, se realiza la detección del tipo de mecanismo de resistencia que posee una bacteria se obtiene su información, tanto fenotípica como genotípicamente, para evaluar el perfil de resistencia y valorar los antibióticos que tendrían que ser utilizados de tratamiento al paciente. Considerando también la capacidad de diseminación de bacterias con resistencia, es importante llevar a cabo estudios que permitan conocer la distribución de bacterias con resistencia en salas de alto riesgo de distintos hospitales.

Por tanto, se pretende caracterizar fenotípica y genotípicamente, genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa de tipo Metallo- β -lactamasa en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el HAN.

De lo anterior mencionado nos planteamos, ¿cuál es la caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense en el período enero a diciembre 2017?

De lo cual, se generan las siguientes preguntas de la investigación:

¿Qué mecanismos de resistencia a carbapenémicos pueden detectarse de manera fenotípica en enterobacterias aisladas de muestras clínicas, mediante técnicas de difusión por disco?

¿Qué genes productores de enzimas carbapenemasa se identificarán en las cepas aisladas mediante la técnica de PCR convencional?

¿Cuál es el perfil de resistencia de las cepas de las enterobacterias en estudio?

¿Cuál es la distribución de cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasa que son aisladas por sala y por tipo de muestra en el hospital?

V. OBJETIVOS

General:

Caracterizar fenotípica y genotípicamente genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa, en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense en el período enero a diciembre 2017.

Específicos

1. Detectar fenotípicamente mecanismos de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas de Cuidados Intensivos y Oncología, mediante técnicas de difusión por disco.
2. Identificar genotípicamente los genes de resistencia a carbapenémicos en las cepas de enterobacterias aisladas mediante la técnica de PCR convencional.
3. Evaluar el perfil de resistencia a carbapenémicos que poseen las cepas de enterobacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes del estudio.
4. Determinar la distribución de cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasa que son aisladas por sala y por tipo de muestra en el Hospital.

5.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este estudio fue realizado gracias al apoyo que brinda el Fondo para Proyectos de Investigación (FPI), mismo que promociona investigaciones brindando todo el apoyo necesario. Cabe destacar que se logró completar el período de investigación equivalente a un año de estudio.

El estudio estaba planificado abarcar el equivalente a dos años de muestreo, es decir; comprender el periodo enero 2017 a diciembre 2018, pero debido a la denegación de acceso a más información y la no disposición de materiales y locaciones para poder realizar el estudio, por lo tanto, se llegó al censo de situar el periodo de tiempo del estudio limitado para poder finalizar la investigación debido a la combustión social y política vivida en el país a inicios del año 2018.

A partir del reinicio de las actividades académicas, se pretendía darle seguimiento a la investigación, pero en el laboratorio del Hospital Alemán Nicaragüense lamentablemente ya no se disponía de materiales para archivar las cepas que durante el transcurso del año resultaron ser resistentes a los carbapenémicos. Por lo que no se logró recuperar las cepas del periodo enero a diciembre 2018.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1. Infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS)

Las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS), antes conocidas como infecciones nosocomiales o infecciones intrahospitalarias, constituyen un problema de salud pública en los pacientes hospitalizados debido al incremento de costos de hospitalización por conceptos de estadía prolongada y por tratamiento con antibióticos costosos (Arango-Díaz, *et al.*, 2018).

Las IAAS se definen como infecciones asociadas a la atención en salud, cualquiera sea su contexto (por ejemplo, en hospitales, centros para hospitalizaciones prolongadas, instalaciones comunitarias / ambulatorias o instancias de cuidado en el hogar o centros comunitarios).

Una IAAS es una infección localizada o sistémica que se desencadena a partir de una reacción adversa a la presencia de uno o varios agentes infecciosos o sus toxinas, sin que haya evidencia de su presencia previa a la admisión en el centro de atención en salud respectivo. Usualmente, se considera que una infección corresponde a una IAAS si se manifiesta al menos 48 horas después de la admisión (Unahalekhaka, 2014).

Entre los factores que favorecen estas infecciones, se destacan la edad, la gravedad de la enfermedad de base, el estado inmunológico, el estado nutricional, la duración de la hospitalización, el no cumplimiento de las normas en los procedimientos invasivos (catéter venoso y urinario, intubación endotraqueal, endoscopia y cirugía, entre otros) y el hacinamiento en los servicios, así como el déficit de agua, ropa, utensilios de limpieza y material gastable en áreas de riesgo (Arango-Díaz, *et al.*, 2018).

Los principales agentes causantes de las IAAS corresponden a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, de estos últimos, se destacan las enterobacterias.

6.2. Generalidades de las enterobacterias

Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo. Son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la

vegetación y también en la flora intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano (Murray, *et al.*, 2007).

Escherichia coli, es el microorganismo más prevalente de esta familia; es una de las bacterias prototípicas sometidas a estudio. Miden 2 a 4 μm de longitud con bordes paralelos y extremos redondeados; su forma varía desde cocobacilos grandes hasta de bacilos elongados, filamentosos. Los microorganismos no forman esporas ni presentan tinción acidorresistente (García & Rodríguez, 2010).

La pared celular, membrana celular y estructuras internas son similares desde el punto de vista morfológico en todas las enterobacterias. Los componentes de la pared y superficie celular son antigénicos (Ryan, *et al.*, 2010).

6.2.1. Características generales

Las enterobacterias se caracterizan por no formar esporas, crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, fermentan glucosa, no producen oxidasa, y tener una movilidad variable.

Son Gram-negativos que poseen una membrana citoplasmática, una cubierta de peptidoglicano y una compleja pared celular que comprende la cápsula, la cual contiene lipopolisacáridos (LPS) y canales para la penetración de antibióticos y nutrientes (Medina, 2010).

6.2.2. Factores de virulencia

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* comparten un antígeno común (antígeno común enterobacteriano), pueden ser móviles o inmóviles con flagelos peritricos y no forman esporas (Murray, *et al.*, 2007).

Poseen una estructura antigénica compleja. Los antígenos “O” son la parte más externa del lipopolisacárido de la pared celular y constan de unidades repetidas de polisacáridos. Si bien cada género de las *Enterobacteriaceae* se relaciona con grupos O específicos, un solo microorganismo puede portar varios antígenos O. La mayor parte de las shigelas comparten uno o más antígenos O con *E. coli* (Jawetz, *et al.*, 2011).

Los antígenos “K” son externos a los antígenos “O” en algunas enterobacterias. Se encuentran en la cápsula de aquellas bacterias que pueden formar macrocápsula, microcápsula o capa mucilaginosa. Las klebsielas forman grandes cápsulas que constan de polisacáridos (antígenos K) que recubren los antígenos somáticos (O ó H) y se pueden identificar mediante las pruebas de hinchazón capsular con antisueros específicos.

Los antígenos "H" están situados en los flagelos y son de naturaleza proteica y en algunas ocasiones se pueden distinguir antígenos en fase uno y en fase dos (Romero, 2007).

Las endotoxinas, como el lípido A; son constituyentes de la pared bacteriana y sólo se liberan cuando la célula muere y se lisa. Su toxicidad reside en la fracción del lípido A del lipopolisacárido (LPS). Casi todas las enterobacterias producen exotoxinas que funcionan como enterotoxinas y pueden ser termolábiles o termoestables. Las fimbrias, como factores de adherencia de la bacteria, colaboran de manera importante en la adhesión a la superficie mucosa del huésped.

Las bacteriocinas son sustancias bactericidas contra cepas de la misma especie, pero no contra sí mismas y pueden colaborar para mantener el equilibrio ecológico de diversas bacterias en el intestino. Su producción es controlada por plásmidos (Tortora, *et al.*, 2007).

6.3. Patología de las enterobacterias

Muchas enterobacterias habitan en el intestino humano (Ej.: *Escherichia coli*, *Proteus*, etc. otras son patógenos primarios (es decir que no colonizan el intestino del humano por ej.: *Salmonella*, *Shigella*, etc.). Las enterobacterias tienen gran importancia en el ámbito hospitalario donde pueden causar infecciones respiratorias, urinarias, de heridas y del Sistema Nervioso Central (SNC) (Sordelli, 2016).

6.3.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

6.3.1.1. Infecciones urinarias

E. coli es la causa más frecuente de infección de las vías urinarias y contribuye a casi 90% de las primeras infecciones urinarias en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos consisten en polaquiuria, disuria, hematuria y piuria. El dolor en la fosa renal se relaciona con infección urinaria alta. Ninguno de estos síntomas o signos es específico de la infección

por *E. coli*. La infección del sistema urinario puede ocasionar bacteriemia con signos clínicos de septicemia (Jawetz, *et al.*, 2011).

Las bacterias patógenas extraintestinales de *Escherichia coli*, tienen la capacidad de causar enfermedades diversas y graves, como infecciones del tracto urinario (ITU) y bacteriemia. La incidencia de bacteriemia está aumentando a nivel mundial. (Alhashash, *et al.*, 2013).

6.3.1.2. Septicemia

De forma característica, la septicemia producida por los bacilos Gram-negativos como *E. coli* proviene de infecciones del aparato urinario o digestivo (p. ej., perforación gastrointestinal que provoca una infección intra abdominal). La mortalidad que se asocia a la septicemia por *E. coli* es elevada en pacientes cuya inmunidad está alterada, o en los que la infección primaria se localiza en el abdomen o en el SNC (Murray, *et al.*, 2007).

6.3.1.3. Infecciones del sistema nervioso central

Los neonatos, durante su primer mes de vida están particularmente predispuestos a la meningitis bacteriana. *E. coli* y los estreptococos del grupo B son responsables de la mayoría de los casos (García & Rodríguez, 2010).

6.3.1.4. Infecciones intestinales provocadas por *E. coli*

6.3.1.5. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado. Son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero.

La enfermedad tiene un período de incubación de 14 a 50 horas. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito.

La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada, pero también puede ser grave. La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 108 unidades formadoras de colonias (UFC) (Rodríguez, 2002).

6.3.1.6. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Es una causa importante de diarrea en neonatos en los países subdesarrollados, causando enfermedad muy raramente en adultos en el mundo desarrollado. Producen una lesión típica en la mucosa, con la formación de microcolonias y la pérdida de las microvellosidades adyacentes. Clínicamente se caracteriza por producir diarrea acuosa con más o menos fiebre o vómitos (García & Rodríguez, 2010).

6.3.1.7. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas de EIEC afectan la mucosa del colon y producen un cuadro disentérico similar, aunque menos severo, al que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1. Las manifestaciones clínicas asociadas a esta infección son evacuaciones escasas acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre (Molina & Eslava, 2015).

6.3.1.8. *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC)

Se ha relacionado con colitis hemorrágica, una forma grave de diarrea, y con el síndrome hemolítico urémico (SHU); enfermedad que desencadena insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. De los serotipos de *E. coli* que producen toxina Shiga, O157:H7 es el más frecuente (Jawetz, *et al.*, 2011).

6.3.1.9. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Las características clínicas de la infección intestinal por EAEC, es una diarrea secretora acuosa con moco y sangre, y febrícula. Un gran porcentaje de pacientes presentan lactoferrina fecal detectable (un indicador sensitivo de leucocitos fecales) y niveles elevados de IL-8 en las heces. La infección por EAEC puede estar acompañada de una forma sutil de inflamación de la mucosa (Molina & Eslava, 2015).

6.3.2. *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*), está presente en el sistema respiratorio y en las heces de casi 5% de las personas sanas. Produce una pequeña proporción (alrededor de 1%) de las neumonías bacterianas. *K. pneumoniae* puede producir una consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa.

Produce infecciones urinarias y bacteriemia con lesiones focales en pacientes débiles. Otros microorganismos entéricos también producen neumonía. Las bacterias del género *Klebsiella* figuran entre las 10 principales bacterias patógenas que ocasionan infecciones hospitalarias.

Se han aislado otras dos klebsiellas relacionadas con trastornos inflamatorios de las vías respiratorias altas: *K. pneumoniae* subespecie *ozaenae* de la mucosa nasal en ozena, una atrofia fétida y progresiva de las mucosas; y *K. pneumoniae* subespecie *rhinoscleromatis* del rinoscleroma, un granuloma destructor de la nariz y la faringe.

Klebsiella granulomatis (antes *Calymmatobacterium granulomatis*) produce una enfermedad ulcerosa genital crónica (Jawetz, *et al.*, 2011).

6.3.3. *Enterobacter, Citrobacter, Morganella, Serratia*

Las infecciones primarias producidas por *Enterobacter, Citrobacter, Morganella* o *Serratia* son infrecuentes en sujetos inmunocompetentes. Con mayor frecuencia son responsables de infecciones nosocomiales en neonatos y en pacientes inmunodeprimidos. Por ejemplo, se ha observado que *Citrobacter koseri* tiende a producir meningitis y abscesos cerebrales en neonatos.

La antibioterapia frente a la infección por estos géneros puede carecer de eficacia como consecuencia de la frecuente resistencia a múltiples antibióticos por parte de los microorganismos. La resistencia es un problema especialmente grave en las especies de *Enterobacter* (Murray, *et al.*, 2007).

6.3.4. *Salmonella*

6.3.4.1. Salmonelosis gastroentéricas

También denominadas salmonelosis no tifoideas, son cualquier infección producida por salmonellas distintas a la *Salmonella typhi*. El cuadro clínico más frecuente relacionado con estas salmonellas es la gastroenteritis aguda, siendo también responsables de casos de bacteriemias y de infecciones focales extradigestivas en algunas ocasiones (Jurado, *et al.*, 2010).

6.3.5. *Yersinia*

Yersinia enterocolitica es una causa relativamente infrecuente de diarrea, siendo algo más frecuente en los países escandinavos. La infección por *Yersinia pseudotuberculosis* es la más rara de las yersiniosis. La manifestación más frecuente es la adenitis mesentérica. También se han descrito casos de eritema nodoso, que en ocasiones se han presentado de forma epidémica (García & Rodríguez, 2010).

6.3.6. *Shigella*

La shigelosis es una enteritis aguda que presenta un período de incubación de 1 – 5 días. Las manifestaciones clínicas oscilan desde una infección asintomática o una diarrea leve hasta cuadros de diarrea acuosa con fiebre, dolor abdominal tipo cólico, tenesmo y evacuaciones con sangre, moco y pus (disentería bacilar), náuseas con o sin vómito (Molina & Eslava, 2015).

Cabe destacar el síndrome urémico hemolítico (SHU). También se han reportado desequilibrio hidroelectrolítico, convulsiones en niños pequeños, megacolon tóxico, prolapso rectal, bacteriemia, sepsis. Cerca del 3% de las personas con infección por *Shigella flexneri* y con una predisposición genética pueden desarrollar el síndrome de Reiter (Molina, *op. cit.*, 2015).

La bacteriemia es raramente documentada en shigelosis. En adultos está usualmente asociada con alguna enfermedad de fondo, destacando la malnutrición como una de las más asociadas. En niños menores de un año, el riesgo de muerte por bacteriemia es mayor (Cabrera, *et al.*, 2005)

6.3.7. *Proteus*

La infección del aparato urinario por *Proteus mirabilis* es la enfermedad más frecuente causada por este género. Se eleva el pH urinario y facilita la formación de cálculos renales. El aumento de la alcalinidad de la orina también resulta tóxico para el uroepitelio (Murray, *et al.*, 2007).

6.3.8. *Providencia*

Las bacterias del género *Providencia* (*Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens* y *Providencia stuartii*) son miembros de la microflora intestinal normal. Todos producen infecciones urinarias y a menudo son resistentes al tratamiento antimicrobiano (Jawetz, *et al.*, 2011).

6.4. Carbapenémicos

Los carbapenémicos, entre los betalactámicos, son los más efectivos y presentan un amplio espectro de actividad antibacteriana. Son activos frente a muchas especies bacterianas y menos vulnerables a la mayoría de los determinantes de la resistencia a betalactámicos. Además, son considerados como el último y más confiable recurso para tratar las infecciones bacterianas y son más seguros que otras drogas de última línea como las polimixinas; pues presentan pocos efectos adversos (Sacaquispe-Contreras *et al.*, 2018).

6.5. Resistencia

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antimicrobiano, constituye un problema creciente de la salud pública en todo el mundo. La resistencia puede ser producida por selección natural, como producto de mutaciones ocurridas al azar, o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población (Calderón & Aguilar, 2016).

6.5.1. Genética de la resistencia

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética. Nuevos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o

diferentes. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos) (Vignoli & Seija, 2008).

6.5.1.1. Resistencia natural

La resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico.

Algunos ejemplos de esto podemos mencionar a la resistencia que presenta *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas por un proceso natural de expulsión del antibiótico y a la Colistín, debido a la presencia de un lipopolisacárido que disminuye la afinidad de los antibióticos polipeptídicos a su sitio blanco; *K. pneumoniae* que por su producción natural de betalactamasas es resistente a las penicilinas, tales como, Ampicilina y Amoxicilina (Pérez & Robles, 2013).

6.5.1.2. Resistencia adquirida

Los mecanismos de resistencia, adquiridos y transmisibles son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana.

Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas (Pérez, 1998).

6.5.1.2.1. Resistencia a betalactámicos

La familia de los betalactámicos es una de las familias de antimicrobianos más numerosa y más utilizada en la práctica clínica. A lo largo de los años, se han ido incorporando nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram-negativos, capaces de superar las resistencias adquiridas frente a sus predecesores (Navarro, *et al.*, 2002).

La hidrólisis de betalactámicos por medio de enzimas betalactamasas, es el mecanismo de resistencia más común para esta clase de antibióticos en bacterias Gram-negativas. Estos antibióticos, entre ellos Penicilina, Cefalosporinas y Carbapenemes, son utilizados como tratamiento de primera elección en gran cantidad de infecciones, por lo que la detección de estas enzimas tiene un gran impacto clínico en la selección de la terapia a utilizar (Jiménez, 2011).

6.5.2. Mecanismos de resistencia

6.5.2.1. Alteración de la diana

La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico, consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras (Pérez, *et al.*, 2013).

Los antibióticos deben atravesar la cubierta bacteriana para poder alcanzar su sitio de acción, excepto cuando la diana es la propia envoltura externa de los gramnegativos. Las bacterias gramnegativas disponen mayor resistencia que las grampositivas a la entrada de los antibióticos, debido a que estas poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglucano (Calvo & Martínez, 2009).

6.5.2.2. Disminución de la permeabilidad

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas.

Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplasmático (Tafur, *et al.*, 2008).

El antibiótico debe penetrar la membrana externa y/o citoplasmática para ejercer su efecto antimicrobiano. Las bacterias han desarrollado mecanismos para disminuir la absorción de la molécula antimicrobiana y así evitar que el antibiótico alcance su objetivo intracelular o periplásmico. Este mecanismo es particularmente importante en las bacterias

gramnegativas ya que limita la entrada de sustancias desde el medio externo. De hecho, la membrana externa actúa como la primera línea de defensa contra la penetración de múltiples compuestos tóxicos, incluidos varios agentes antimicrobianos (Munita & Arias, 2016).

6.5.2.3. Mecanismos de E flujo o expulsión del antibiótico

Las bombas de flujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos. La expresión de estas bombas puede ser permanente o expresión constitutiva e intermitente o expresión que puede inducirse (Suárez, *et al.*, 2005).

Estas proteínas se encuentran presentes en microorganismos grampositivos, gramnegativos y eucariotas. Las células bacterianas y las eucariotas tienen variados sistemas transportadores de membrana con múltiples funciones vitales como ingreso de nutrientes, excreción de sustancias tóxicas y mantenimiento de la homeostasis (Machetti, *et al.*, 2011).

6.5.2.4. Betalactamasas

Son enzimas, producidas por bacterias con peptidoglucano y por algunos hongos, utilizadas para defenderse de antibióticos betalactámicos, o bien son utilizadas por la bacteria para sintetizar su pared bacteriana. Se han descrito más de 190 enzimas de tipo betalactamasa, y constituyen la mayor causa de resistencia bacteriana hacia antibióticos con anillos betalactámicos.

Las betalactamasas son proteínas especializadas con estructura cuaternaria de β -hoja. Están divididas en clases de acuerdo a su peso molecular, punto isoeléctrico y sitio activo entre otros (Abarca & Herrera, 2001).

6.5.2.5. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE han sido reportadas en múltiples especies de bacterias Gram-negativas. *Klebsiella* spp. y *Escherichia coli*, son los géneros más frecuentemente implicados. Estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefalosporinas (como las Cefalosporinas de tercera generación), el Aztreonam, las Penicilinas y las Cefalosporinas de espectro reducido.

Por otro lado, son incapaces de hidrolizar Cefamicinas (Cefoxitina y Cefotetán) y Carbapenems. Las BLEE son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas tipo AmpC. Se han descrito varias familias de BLEE, siendo TEM, SHV y CTX-M las más prevalentes. La mayoría de BLEE se han originado por medio de mutaciones espontáneas de betalactamasas de espectro reducido por cambios en los aminoácidos en su sitio activo, lo que permite ampliar su capacidad hidrolítica.

En la práctica, la presencia de cualquier tipo de infección moderada a seria, por una bacteria productora de BLEE, debe llevar al clínico a considerarla como resisntente a las cefalosporinas de amplio espectro y a los Monobactámicos (Tafur, *et al.*, 2008).

6.5.2.6. Betalactamasas tipo AmpC

Las AmpC son serin-betalactamasas pertenecientes al grupo 1 según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Son también llamadas cefalosporinasas, aunque su espectro de acción hidrolítica no sólo incluya cefalosporinas.

Ciertas enterobacterias poseen de manera natural betalactamasas tipo AmpC, tal es el caso de *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei*; al igual que bacilos Gram-negativos no fermentadores de importancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa*.

Las AmpC producidas por los microorganismos antes mencionados, son de naturaleza cromosómica inducible y explican la resistencia natural a las Aminopenicilinas, Cefalosporinas de 1ra generación, Cefamicinas (Cefoxitina, Cefotetán) y Aminopenicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasas (Amoxicilina-Ácido clavulánico, Ampicilina-sulbactam), expresada por estos agentes bacterianos. *E. coli*, *Shigella spp.* y *Acinetobacter baumannii*, también poseen betalactamasas AmpC cromosómicas pero constitutivas (no inducibles).

Por otra parte, existen AmpC de codificación plasmídica que pueden ser inducibles o no. Una característica de las enzimas AmpC es que no tienen efecto, por si solas, sobre cefalosporinas de 4ta generación, ni sobre carbapenémicos, siendo estos últimos los betalactámicos de elección en cepas productoras de AmpC.

Además, las AmpC no son inhibidas por los clásicos inhibidores de betalactamasas (Ácido clavulánico, Sulbactam, Tazobactam), aunque algunas pueden ser inhibidas por Sulbactam o Tazobactam (Martínez, 2009).

6.5.3. Carbapenemasas

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las betalactamasas. Tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros betalactámicos. Además, presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles. Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles.

Se ha propuesto una clasificación en dos grupos: serincarbapenemasas o carbapenemasa tipo KPC, que pertenecen a la clase molecular A o D de Ambler y Metallo- β -lactamasa (MBL) que corresponden a la clase B de Ambler, denominadas así por la dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento. Estos grupos difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores (Moreno, 2013).

6.5.3.1. Metallo clase B

Las MBL pertenecen a la clase B de Ambler, y al grupo 3 de la clasificación de Bush, constituyen las carbapenemasas adquiridas de mayor relevancia clínica ya que tienen capacidad de hidrolizar a todos los antibióticos betalactámicos, excepto el aztreonam y no ser inhibidas por los inhibidores de betalactamasas (Morejón, 2012).

Dentro de las MBL se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM, y KHM. Las más importantes incluyen las familias de VIM, IMP y SPM-1 (Moreno, 2013).

6.6. Métodos de detección fenotípica para la clasificación de carbapenemasas

El control de la propagación de estas bacterias resistentes a carbapenémicos se basa en la correcta identificación y clasificación de las MBL y demás carbapenemasas por parte de laboratorios microbiológicos clínicos (Notake, *et al.*, 2013)

6.6.1. Método de difusión en disco

Este método es utilizado de rutina en muchos laboratorios de microbiología, para microorganismos de rápido crecimiento y microorganismos que necesitan condiciones más especiales para crecer que el resto. Dicho método, consiste en la presencia o ausencia de una zona de inhibición de crecimiento, la cual se mide en milímetros. La interpretación de esta prueba se realiza en relación del diámetro de la zona de inhibición (mm) con la concentración inhibitoria mínima (CIM, $\mu\text{g/mL}$).

Esta prueba se puede ver afectada por distintos factores, los cuales deben ser controlados para asegurar la veracidad de los resultados (Hadzicki, 2009).

6.6.1.1. Inhibición por EDTA

El disco de EDTA, es empleado en la detección fenotípica de Metallo- β -lactamasa (MBLs), por el método de triple disco, el cual consiste en colocar, sobre una placa de agar Mueller – Hinton inoculado con la cepa problema, un disco que contiene un agente quelante (EDTA, SMA, ácido dipicolínico o ácido 2-mercaptopropiónico) rodeado por un disco de Imipenem (10 μg) y otro de Meropenem (10 μg). Esta prueba es positiva si se observa un aumento del halo de inhibición o la presencia de una zona de inhibición entre el IMP y/o el MER y el agente quelante (Ortiz, *et al.*, 2014).

6.7. Método de detección de genes productores de carbapenemasas

Los genes que codifican carbapenemasas, usualmente se encuentran en plásmidos o en otros elementos genéticos móviles (Sacsquispe-Contreras *et al.*, 2018).

La confirmación molecular de bacterias con carbapenemasas se recomienda para las sospechas de cepas productoras de estas enzimas. Sin embargo, aunque los métodos de detección molecular como la PCR y la secuenciación de los genes de la carbapenemasa son confiables para la confirmación de las carbapenemasas, es difícil realizar tales pruebas en los laboratorios de rutina de microbiología clínica, debido al nivel de habilidad requerido, el alto costo y el equipo especial requerido. Por lo tanto, se necesita un método alternativo simple y rápido para confirmar la presencia de carbapenemasa en bacterias (Notake, *et al.*, 2013).

6.7.1. Extracción de ácido nucleico

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

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

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

6.7.1.1. Etapas en la extracción de ADN

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

- Lisis de las células o virus. Las sales caotrópicas ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos consiguiendo su desnaturalización. La adición de un detergente como el SDS es necesaria a menudo para eliminar las membranas.
- Degradación de la fracción proteica asociada al ADN. se consigue mediante la adición de una proteasa. La fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico.
- Purificación. Consta de 3 fases
- ❖ Precipitación de ADN: El ADN es insoluble en el alcohol, por lo que se puede precipitar el etanol frío o isopropanol y recuperar mediante una centrifuga. El alcohol del sobrenadante se llevará las sales añadidas previamente.

- ❖ Lavado de pellet. Se realizará con alcohol frío volviendo a centrifugarse.
- ❖ Recuperación. El sedimento se puede resuspender en agua o tampón Tris tras ser secado completamente

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

6.7.1.2. Cuantificación de ADN

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

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

Para estimar la pureza de ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260nm y 280nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas, una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminante como carbohidrato o fenol (Alejos, *et al.*, 2014).

6.7.2. Técnica de la PCR

La PCR es una técnica para la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de ADN. Es una forma simple y muy rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas. La reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Mas, *et al.*, 2001).

6.7.2.1. Etapas de la PCR

Desnaturalización: Las cadenas de ADN serán calentadas a 95°C durante un tiempo aproximado de 20 a 30 segundos, con el objetivo de separar ambas cadenas. Al final de esta etapa se obtendrán las cadenas separadas, las cuales servirán como molde.

Hibridación: Los primers se alinean al extremo 3' de la cadena molde, para lo cual se necesitan dos secuencias diferentes, una denominada forward, o sentido, y otra reverse, o antisentido. Para ello, se necesita que el termociclador alcance una temperatura entre 50 – 60°C, generalmente se necesitan 30 segundos en este ciclo.

Extensión: En esta etapa se utiliza una enzima con la función de ADN polimerasa, la cual, sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de una cadena molde. En la etapa de extensión la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers a una temperatura óptima de 72°C, y a una velocidad muy rápida agrega los desoxirribonucleótidos libres (dNTPs) complementarios, creando así las cadenas completas de ADN (Becerril, *et al.*, 2015).

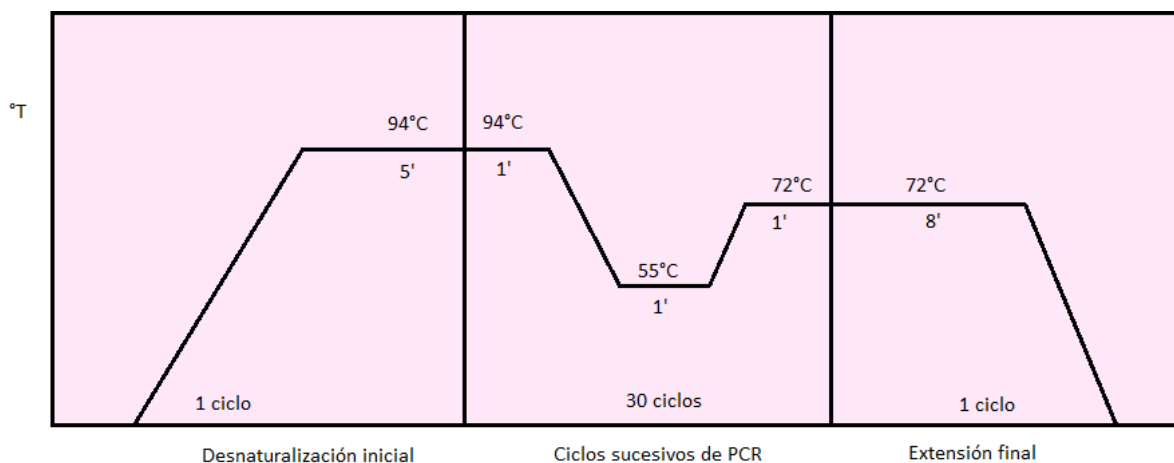


Figura No. 1: Amplificación de ADN

Análisis del producto de amplificación

Al finalizar la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente; los amplicones se visualizan a través de una electroforesis en geles de agarosa. Esta separación se realiza bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo.

Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV; adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas. La combinación adecuada de todos los elementos químicos mencionados, hacen posible la síntesis in vitro del ADN utilizando la PCR (Tamay de Dios, *et al.*, 2013).

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Tipo de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal de carácter retrospectivo en el cual se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa, en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense de enero a diciembre 2017.

7.2. Áreas de estudio

Se realizó en el Hospital Alemán Nicaragüense, ubicado de las SIEMENS 300 varas al sur.

7.3. Universo

El universo fue comprendido por 529 enterobacterias aisladas e identificadas a partir de muestras clínicas de pacientes ingresados en Salas del HAN. Dichas cepas fueron analizadas e identificadas por el personal del Laboratorio de Bacteriología del HAN, durante el período comprendido entre enero a diciembre 2017.

7.4. Muestra

La muestra fue conformada por 27 cepas de enterobacterias aisladas en el período de enero a diciembre 2017, que presentaron resistencia a los carbapenémicos con una CIM de 2–4 $\mu\text{g/mL}$ en Imipenem y Meropenem respectivamente, y/o un punto de corte ≤ 19 mm mediante la técnica de difusión por disco en agar, según los estándares utilizados en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana brindados por la CLSI 2017.

7.5. Criterios de inclusión

- ✓ Aislamiento de cepas pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae de muestras clínicas de pacientes internos.
- ✓ Enterobacterias que presentaron resistencia a los carbapenémicos con una CIM de 2–4 $\mu\text{g/mL}$ en Imipenem y Meropenem respectivamente, y/o un punto de corte ≤ 19 mm mediante la técnica de difusión por disco en agar.

7.6. Criterios de exclusión

- ✓ Cepas de enterobacterias que presentaron un perfil de resistencia sensible.
- ✓ Cepas no correspondientes al grupo de enterobacterias.
- ✓ Cepas de pacientes que no se encuentren ingresados en el hospital (consulta externa).

7.7. Tipo de muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

7.8. Recopilación de información

Cada cepa seleccionada e incluida en el estudio era proveniente del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense (HAN), en donde se realizó a dichas cepas su identificación mediante pruebas bioquímicas y el perfil de resistencia se determinó empleando el equipo VITEK®2 Compact y el método de difusión por disco en agar, según el Protocolo de diagnóstico del Laboratorio de Bacteriología del HAN. Los resultados e información de cada una de las cepas se hallaban anotados en el Libro de Registros de dicho Laboratorio. El control de calidad de estos resultados es establecido y vigilado por el CNDR, por lo que en nuestra investigación no se realizó.

La selección de cada cepa fue establecida por los criterios de inclusión descritos anteriormente. Para obtener la información sobre el perfil de resistencia e identificación bacteriana, se realizó una ficha de recolección en donde se llenaron acápite importantes en cuanto a su género, especie y perfil de resistencia (Ver ficha en Anexos).

Obtenidos estos datos se procedió a realizar la confirmación del fenotipo de resistencia de cada una de las cepas y seleccionar la PCR convencional de acuerdo al tipo de carbapenemasa encontrado.

Se realizó una base de datos en el Software Microsoft Office Excel 2013/2016, en donde se registró la información recabada tanto de la detección de los genes como de la proveniencia de las muestras y otros datos incluidos en el estudio.

7.9. Recolección de las cepas

Se seleccionaron las cepas que cumplían con los criterios de inclusión y que fueron almacenadas en caldo leche.

7.10. Procesamiento de las cepas

Recuperación del microorganismo:

En el Hospital Alemán Nicaragüense

- Se realizó un pase de Agar MacConkey de las cepas de enterobacterias almacenadas en caldo leche a -20°C , provenientes de muestras aisladas e identificadas por el personal del laboratorio de bacteriología del HAN.
- Se introdujo un hisopo estéril en los viales, conteniendo las cepas de interés, se inoculó en una placa de Agar MacConkey previamente rotulada, y se dejó que el inóculo fuera absorbido por el agar.
- Se sembraron las bacterias por agotamiento en estría en Agar MacConkey y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C .
- Pasado el tiempo de incubación, con un asa recta se tomaron 2 UFC características del Agar MacConkey y se inocularon en viales conteniendo 1 mL de caldo leche, se incubaron por 4 horas a 37°C .

Transporte al Laboratorio de Bioanálisis clínico en la UNAN-Managua.

- Se trasladaron los viales conteniendo las cepas en caldo leche, al laboratorio de bacteriología de la UNAN-Managua, utilizando un termo con refrigerantes para mantener la temperatura en los viales.
- Se recuperaron las cepas introduciendo un hisopo estéril en caldo leche, se inoculó en Agar MacConkey y se dejó que el inóculo fuera absorbido por el agar.
- Se realizó un rayado por agotamiento de estrías y se incubó de 18-24 horas a 37°C .
- Una vez recuperado el microorganismo, se procedió a realizar la siembra en un agar nutritivo o Mueller Hinton, con el fin de reducir y verificar la pureza del sub-cultivo y se procedió a realizar la técnica para la detección fenotípica de carbapenemasa por triple disco.

Preparación de inóculo

- Con un asa recta se tomó una UFC del Agar Mueller Hinton.

- Se realizó una suspensión homogénea en un tubo de ensayo conteniendo 3 mL de solución salina estéril al 0.85%.
- Se ajustó la turbidez del inóculo a la del estándar 0.5 de McFarland comparándolo visualmente. Para ello, se debió colocar la cepa problema en una gradilla y a la par el estándar de McFarland. Esta gradilla debe tener en la parte posterior una tira de papel blanco con una o dos líneas negras de 0.5 a 1 cm de ancho, la cual actúa como contraste para comparar la turbidez de los tubos. Si la turbidez del inóculo es menor, se agrega más inóculo. Si la turbidez es mayor, se debe diluir con solución salina.

Para el inóculo se tomó en cuenta lo siguiente:

- Los tubos para preparar el inóculo fueron del mismo diámetro que el que contiene el patrón de McFarland.
- El patrón de turbidez se mantuvo sellado a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Inoculación en el Mueller Hinton y colocación de discos de antimicrobianos:

- Se introdujo un hisopo estéril en la suspensión, luego presionarlo contra las paredes del tubo, con el fin de escurrir el exceso de inóculo.
- Se estrió en tres direcciones, de tal manera que se cubra de manera uniforme toda la superficie del medio.
- Se dejó secar la placa por un período de 3 a 5 minutos. Nunca se debe dejar secar la placa por más de 15 minutos antes de aplicar los discos de sensibilidad.

Test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

- Se inoculó sobre la superficie del agar Mueller Hinton en tres direcciones; se dejó secar la placa por 5 minutos, seguidamente se colocó un disco de EDTA de (10µg) entre un disco de Imipenem y un disco de Meropenem (10µg) a una distancia de 15mm entre cada disco.
- El resultado positivo se evidenció por la sinergia o deformación de los halos (efecto huevo), en cualquiera de los dos antibióticos hacia el EDTA, indicando la presencia de Metallo-β-lactamasas; un resultado negativo no presenta sinergia o deformación de los halos.

Para el método de triple disco se tomó en cuenta lo siguiente:

- Los discos que contenían drogas de la familia de los betalactámicos se mantuvieron en freezer a temperaturas menores a -20°C .
- Los de uso diario se mantuvieron a temperaturas entre $4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$.
- Se mantuvieron envueltos en paquetes herméticos, con desecante, para protegerlos de la humedad.
- Se verificó la fecha de vencimiento antes de utilizarlos.
- Se debieron sacar del refrigerador una 1 a 2 horas antes de su empleo, para que estuvieran a temperatura ambiente al momento de usarlos.

Condiciones de incubación:

- Se incubaron las placas en forma invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.
- La incubación fue a temperaturas de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 – 24 horas.
- Las condiciones y tiempos de incubación fueron en dependencia del microorganismo evaluado.

Control de calidad de la técnica de difusión por triple disco para la confirmación fenotípica de carbapenemasa:

- ✓ Cepa utilizada como Control Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ Cepa utilizada como Control Positivo: *Klebsiella pneumoniae* cód. 17010 (control interno del Laboratorio de Biología Molecular de la UNAN-Managua).

Lectura de la sinergia entre discos:

- Se realizó la lectura de la sinergia entre los discos de IMP y MER frente al disco de EDTA, según las normas Clinical & Laboratory Estándar Institute (CLSI) 2017.

Una vez finalizados los ensayos fenotípicos en el Laboratorio de Bioanálisis Clínico de la UNAN-Managua, las cepas fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Molecular “*MA Elmer Cisneros Moreira*” para proceder a la detección mediante la técnica de PCR convencional, de genes de resistencia productores enzimas carbapenemasa.

En el Laboratorio de Biología Molecular “MA Elmer Cisneros Moreira” de la UNAN-Managua

Extracción de ADN

Las cepas analizadas en el estudio y los controles fueron cultivadas en agar MacConkey, el cual fue incubado por 24 horas a 37°C. Se tomaron 3 UFC, las que fueron inoculadas en viales Eppendorf con 100 µL de agua libre de nucleasas. Estos viales fueron colocados en baño maría durante 10 minutos en ebullición, seguido de 5 minutos colocadas en hielo para luego ser centrifugadas por 5 minutos a 12,000 RPM. Se extrajeron 80 µL del sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf.

Cuantificación de ADN

Se determinó la pureza de ADN según la proporción de la absorbancia a 260nm y 280nm por lo que una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, esta cuantificación se realizó utilizando el equipo Nanodrop Lite 2763 que hace uso de tecnología que permite pipetear una muestra directamente en una superficie de medición óptica. El sistema utiliza la tensión superficial inherente para mantener una muestra de micro-volumen en su lugar durante el ciclo de medición. Una vez que finalizado, la superficie se limpió con un paño de laboratorio libre de pelusa.

Tipos de primers empleados para el estudio de NDM-1 (Arbizú-Medina, et. al, 2018)

<i>Primers</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño del producto amplificado (pb)</i>
<i>NDMF</i>	5' AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC 3'	512pb
<i>NDMR</i>	5' GGC GTA GTG CTC AGT GTC 3'	

Protocolo de trabajo para mezcla de corrida NDM (Arbizú-Medina, et. al, 2018)

<i>Reactivo/producto</i>	<i>Volumen Reactivo/producto</i>	<i>Total p< de la mezcla en base a 10 muestras</i>
<i>Reaction Buffer thermo</i>	2.5 µl	25 µl
<i>dNTP-Mix (10mM)</i>	0.5 µl	5 µl
<i>NDMF (10nM)</i>	0.5 µl	5 µl
<i>NDMR (10nM)</i>	0.5 µl	5 µl
<i>ADN molde</i>	2.5 µl	25 µl
<i>Agua libre de nucleasas</i>	18 µl	180 µl
<i>Taq-Polimerasa</i>	0.5 µl	5 µl

Se utilizó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización 94°C, por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, 94°C por 30 segundos, hibridación 50°C por 30 segundos, amplificación 72°C por 60 segundos, extensión final 72°C por 10 minutos y temperatura final de 4°C; las muestras se analizaron en un Máster Cyler, marca Eppendorf, modelo número 5341.

Protocolo de Primers de los genes Metalo-β-lactamasa (González-Escalante, 2013)

<i>Primers</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño del producto amplificado (pb)</i>
<i>IMPF</i>	5'GGAATAGAGTGGCTTAATCTC 3'	188pb
<i>IMPR</i>	5'CCAAACACTASGTTATCT 3'	
<i>VIMF</i>	5'GATGGTGTTTGGTCGCATA 3'	390pb
<i>VIMR</i>	5'CGAATGCGCAGCACCAG 3'	
<i>GIMF</i>	5'TCGACACACCTTGGTCTGAA 3'	477pb
<i>GIMR</i>	5'AACTTCCAACCTTGCCATGC 3'	
<i>SIMF</i>	5'TACAAGGGATTCGGCATCG 3'	570pb
<i>SIMR</i>	5'TAATGGCCTGTTCCCATGTG 3'	
<i>SPMF</i>	5'AAAATCTGGGTACGCAAACG 3'	271pb
<i>SPMR</i>	5'ACATTATCCGCTGAAACAGG 3'	

Protocolo de trabajo para mezcla de corrida Metallo- β -lactamasa (González-Escalante, 2013)

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

Se utilizó el siguiente programa de amplificación, desnaturalización 94°C, por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, 94°C por 30 segundos, hibridación 50°C por 30 segundos, amplificación 72°C por 60 segundos, extensión final 72°C por 10 min, final 4°C.

Preparación del Gel Agarosa para la corrida (1.5%)

Se pesaron, en balanza analítica 1.5gr de agarosa liofilizada, se colocaron en un beaker y se diluyeron en 100ml de TBE con concentración de 1X se colocó en el microondas hasta que se disuelva completamente presentando aspecto transparente, se le colocaron 1.5 μ l de bromuro de ethidium y se mezcló, luego se vertió el gel en la cámara con peine para su

gelificación. Una vez gelificado se retiró el peine y se le colocó TBE 1X en los lados de la cámara.

Electroforesis en Gel de Agarosa

Una vez concluidos los ciclos de amplificación, se tomó el producto amplificado más buffer de carga (Loading).

Se procedió a mezclar bien sobre papel parafilm y se colocó cada muestra en su posición en el gel de agarosa según el protocolo de corrida incluyendo el marcador molecular y los controles positivos que corresponden a controles internos utilizados en el Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros Moreira” de la UNAN-Managua, cepas internas que funcionan como controles internos y controles negativos para lo cual, se utilizó agua libre de ADNasa que validó cada corrida:

El producto de la PCR fue evaluado en un gel de Agarosa al 1.5% de con 0.5 µg/mL de bromuro de ethidium, la electroforesis se corrió a 120 voltios por 50 minutos las bandas; de ADN fueron visualizadas en una cámara con luz ultravioleta y fotografiada. Ambos productos amplificados luego fueron analizados en la corrida.

<i>Tipo de peine</i>	<i>Voltaje(V)</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Buffer de carga loading</i>	<i>Producto</i>
<i>Peine de 5 pozos</i>	120v	45 minutos	2 µl	8-10 µl
<i>Peine de 8 pozos</i>	120v	45 minutos	2 µl	6 µl
<i>Peine de 12 pozos</i>	120v	1 hora y 40 minutos	2 µl	8 µl
<i>Peine de 20 pozos</i>	120v	1 hora	2 µl	6 µl

Una vez colocadas las mezclas se cerró la cámara y se procedió a conectar a una fuente de poder primero con un tiempo y potencia de acuerdo al número de muestras en proceso. Corridas las muestras se colocó el gel de agarosa sobre la cámara de fluorescencia y se

analizaron los pesos moleculares obtenidos, se tomaron fotos de los productos amplificados para su debido registro (Fotografía en Anexos).

Control de calidad para la técnica de PCR convencional:

- ✓ Control Negativo: Agua grado PCR
- ✓ Control positivo: 17010: *Klebsiella pneumoniae* (VIM/GIM)
- ✓ Control positivo: 17011 *Klebsiella pneumoniae* (IMP/SPM/VIM/SIM)
- ✓ Control positivo: 1-1-45 *Klebsiella pneumoniae* (New Delhi y OXA)

Controles Internos del Laboratorio de Biología Molecular de la UNAN-Managua. Cepas brindadas por la UNAN-LEÓN, secuenciada en Karolinska Institutet Suecia.

Una vez finalizados los ensayos moleculares en el Laboratorio de Biología Molecular “*Elmer Cisneros Moreira*” de la UNAN-Managua, las cepas fueron almacenadas en viales conteniendo 1 mL de caldo leche previamente hecho en el Laboratorio de Bioanálisis Clínico en donde serán utilizadas para investigaciones futuras.

VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable	Subvariable	Indicadores	Valores			Criterios
Mecanismos de resistencia fenotípicos a carbapenémicos.	MBL	Sinergia con EDTA				Positivo Negativo
	KPC	Sinergia con APB				Positivo Negativo
	OXA	No hay sinergia				Positivo Negativo
Genotipo	MBL	IMP	188pb			Positivo Negativo
		VIM	390 pb			
GIM	477pb					
SIM	570 pb					
SPM	271pb					
		NDM-1	512pb			
Perfil de Resistencia antimicrobiana	Resistencia a carbapenémicos	Medición de la concentración inhibitoria mínima (µg/mL)	Carbapenémicos			Sensible Intermedio Resistente
			IMP	MER	ERTA	
			≤ 1µg/mL	≤ 1µg/mL	≤ 0.5µg/mL	
			2µg/mL	2µg/mL	1µg/mL	
		≥4µg/mL	≥4µg/mL	≥2µg/mL		
		Medición del halo de inhibición (mm)	Carbapenémicos			Sensible Intermedio Resistente
			IMP	MER	ERTA	
			≥23mm	≥23mm	≥22mm	
			20-22mm	20-22mm	19-21mm	
		≤ 19mm	≤ 19mm	≤ 18mm		

Otros antibióticos testados	Medición de la concentración inhibitoria mínima (µg/mL)	Antibióticos			
		AMC	CAZ	CRO	
		≤8/4	≤4	≤1	Sensible
		16/8	8	2	Intermedio
		≥32/16	≥16	≥4	Resistente
		AMP	CEP	CEC	
		≤8	≤16	≤8	Sensible
		16	-	16	Intermedio
		≥32	≥32	≥32	Resistente
		CXM	FOX	TZP	
		≤8	≤8	≤16/4	Sensible
		16	16	32/4-64/4	Intermedio
		≥32	≥32	≥128/4	Resistente
		FEP	NAL	CIP	
		≤2	≤16	≤1	Sensible
		-	-	2	Intermedio
		≥16	≥32	≥4	Resistente
		SXT	GEN	AMK	
		≤2/38	≤4	≤16	Sensible
		-	8	32	Intermedio
		≥4/76	≥16	≥64	Resistente
		CHL	COL		
		≤8	-		Sensible
		16	-		Intermedio
	≥32	-		Resistente	
	Medición del halo de inhibición (mm)	Antibióticos			
		AMC	CAZ	CRO	
		≥18	≥21	≥23	Sensible
	14-17	18-20	20-22	Intermedio	
	≤13	≤17	≤19	Resistente	

			AMP	CEP	CEC	
			≥17	≥15	≥18	Sensible
			14-16	-	15-17	Intermedio
			≤13	≤14	≤14	Resistente
			CXM	FOX	TZP	
			≥18	≥18	≥21	Sensible
			15-17	15-17	18-20	Intermedio
			≤14	≤14	≤17	Resistente
			FEP	NAL	CIP	
			≥25	≥19	≥31	Sensible
			19-24	14-18	21-30	Intermedio
			≤18	≤13	≤20	Resistente
			SXT	GEN	AMK	
			≥21	≥15	≥17	Sensible
			16-20	13-14	15-16	Intermedio
			≤15	≤12	≤14	Resistente
			CHL	COL		
≥18	-		Sensible			
13-17	-		Intermedio			
≤12	-		Resistente			
Distribución en el Hospital	Unidad de Cuidados Intensivos	Neonato	Cantidad de cepas positivas por salas			Carbapenemasa positiva
		Pediátrico				
		Adulto				
	Medicina	Carbapenemasa negativo				
Cirugía						
Otras salas						
Tipo de muestra	Secreciones	Tipo de enterobacteria aislada	Crecimiento de:			Crecimiento positivo Crecimiento negativo
			<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia spp</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> 			

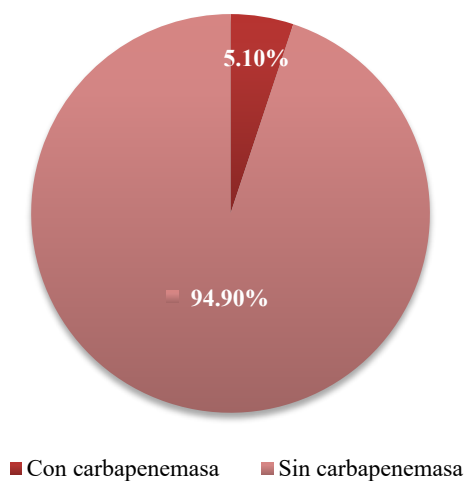
	Urocultivo		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella spp</i> • <i>Shigella spp</i> • <i>Proteus spp</i> • <i>Enterobacter spp</i> • <i>Providencia spp</i> • <i>Morganella morganii</i> • <i>Citrobacter spp</i> • <i>Serratia spp</i> • <i>Yersinia spp</i> 	
	Hemocultivo			

IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

La diseminación global de enzimas productoras de carbapenemasas en enterobacterias, es de importancia en la salud pública, debido al uso frecuente de antibióticos pertenecientes a la familia de los carbapenémicos, para tratar infecciones, por tanto, la falta de recursos farmacéuticos dificulta las opciones terapéuticas para combatir estos microorganismos.

Gráfico No. 1

Aislamiento de enterobacterias con resistencia a carbapenémicos



Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

La detección de carbapenemasas tiene implicaciones clínicas relevantes, porque en los pacientes infectados por cepas productoras de carbapenemasas, se observan fallos clínicos y microbiológicos frecuentes, observándose un aumento de letalidad y estadía en el centro hospitalario y posibilidad de causar brotes (INCIENSA, 2014).

De las 529 cepas que conformaron el universo de la investigación únicamente 27 cepas presentaron resistencia a los carbapenémicos, lo que representa un 5.10% de frecuencia de aislamientos, en comparación con el estudio realizado por Cerda Aragón *et al.*, en el año 2016, llevado a cabo en la misma área de estudio de nuestra investigación, encontró una prevalencia de hallazgos equivalente al 18.07% de cepas que presentaron resistencia a carbapenémicos, lo que resulta en una disminución porcentual equivalente a un 12.97%. Lo

anterior sugiere que la reducción de hallazgos de bacterias con resistencia a carbapenémicos puede ser posible implementando protocolos y sistemas de vigilancia para contrarrestar la diseminación de estas bacterias.

Por otro lado, en el estudio realizado por Ortiz Machado, *et al.*, en el año 2014 en el Hospital Antonio Lenin Fonseca de la capital, se refleja que, el universo total del estudio fue de 730 cepas del cual, el 1.8% de ellas presentaban resistencia a los carbapenémicos, por lo que se comprueba que, la resistencia es un problema en aumento drástico por parte de las bacterias; de igual forma, en la investigación realizada por Echieverri-Toro, *et al.*, en el año 2012 en Colombia, se analizaron 243 muestras de las cuales solo un 5% presentó resistencia a los carbapenémicos.

Luego de seleccionar las 27 cepas como la muestra del estudio, se aplicó un screening para confirmar la presencia del mecanismo de resistencia a carbapenémicos y clasificar el tipo de carbapenemasa para seleccionar la PCR para la fase posterior correspondiente al perfil genotípico. En dicho screening se confirmó la positividad de dichas cepas, resultando positivas fenotípicamente 27 cepas para carbapenemasa tipo Metallo.

Las Metallo- β -lactamasa son sin duda el grupo más relevante de carbapenemasas debido a su diversificación, así como también a su diseminación prácticamente mundial (Moreno, 2013).

A pesar de que, en estudios, como el realizado por Cerda Aragón, *et al.*, en el año 2016 y el estudio realizado por Caldera y Robles en el año 2016, en el que ambos investigadores encontraron la presencia de Carbapenemasa distintas a la Metallo- β -lactamasa, como son las carbapenemasas tipo OXA y las serincarbapenemasas o KPC; sin embargo, la presencia de las Metallo- β -lactamasas en Enterobacterias en ambos estudios fue la que obtuvo la mayor prevalencia en las cepas analizadas.

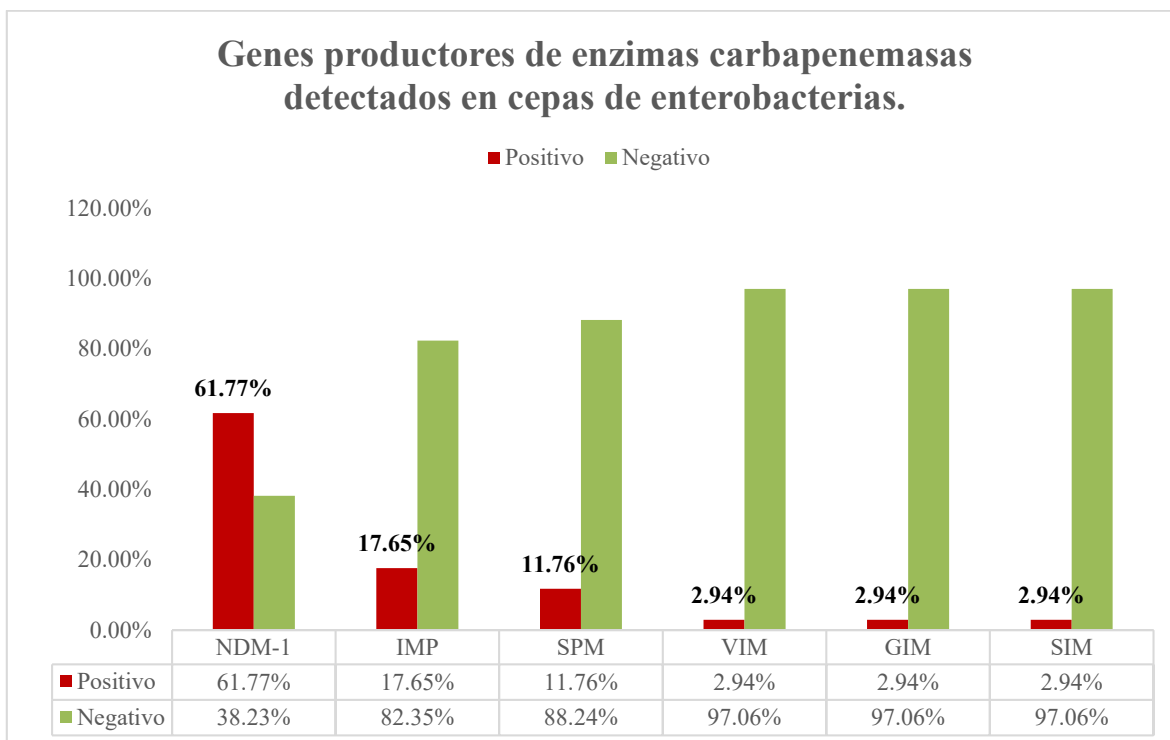
Nuestro estudio concuerda con el realizado en el Hospital Antonio Lenin Fonseca por Ortiz Machado, *et al.*, en el 2014, en el cual el screening realizado para detectar la presencia fenotípica del mecanismo de resistencia a carbapenémicos, la Metallo- β -lactamasa, resultó positiva para toda la muestra sospechosa.

El gen NDM-1, fue inicialmente reportado en Suecia, en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, el primer aislamiento fue de un paciente transferido de la India, se han reportado aislamientos de cepas productoras de NDM, principalmente en el Reino Unido, India y Pakistán, pero actualmente se ha propagado en todo el mundo (Bogaerts, *et al.*, 2011).

En América Latina, el primer reporte data del año 2011, en dos cepas de *K. pneumoniae*, que se aislaron de pacientes pediátricos en Guatemala. Dos años después, en Colombia, se presentó un nuevo brote por el mismo agente en seis neonatos, representando los primeros reportes de NDM en Sudamérica. (Resurrección, *et al.*, 2017).

En 2014, se reporta el primer aislamiento positivo para carbapenemasas tipo Metallo- β -lactamasa New Delhi (MBL-NDM) en Costa Rica, correspondiente a una cepa de *Escherichia coli* aislada de un urocultivo de una paciente pediátrica procedente de Nicaragua (INCIENSA, 2014).

Gráfico No. 2



Fuente: Datos obtenidos de la realización de la PCR convencional para detectar genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo.

Técnica realizada en el Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros Moreira” de la UNAN-Managua.

Las bacterias NDM-1, suelen cursar con otros mecanismos de resistencia frente a antibióticos de diversas familias, como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y al trimetoprim-sulfametoxazol; inclusive, algunos se han reportado como panresistentes (Resurrección, *et al.*, 2017).

De las 27 cepas aisladas se detectó el gen NDM-1 en 21 cepas lo que es equivalente a 61.77%, esto concuerda con la investigación llevada a cabo por Arbizú Medina, *et al.*, en el año 2016 para detectar por primera vez la presencia del gen NDM-1 en enterobacterias aisladas del Hospital Alemán Nicaragüense, en donde 22 cepas de 45 de la muestra total eran portadoras del gen NDM-1, equivalente al 48.89%; lo que pone en evidencia la prevalencia de diseminación de bacterias portadoras de este gen al cabo de un año de diferencia de estudios.

El gen IMP se detectó en 6 cepas lo que representa una prevalencia del 17.65%. Con relación a la investigación realizada por Cerda Aragón, *et al.*, en 2016, en donde el hallazgo de IMP se encontró con una prevalencia del 12.2%, lo que indica el aumento de diseminación de estos genes.

Así también, en el mismo estudio realizado por Cerda Aragón, *et al.*, se detectó la presencia del gen SPM en 6 cepas, lo que equivale a un 14.63%, en comparación con los hallazgos encontrados en nuestra investigación, se observó un porcentaje disminuido con relación a la detección del gen SPM.

Según Ruiz Garbajosa en el año 2016, indica que; un microorganismo multirresistente es aquel que no es sensible a tres o más familias de antibióticos (Ruiz Garbajosa, *et al.*, 2016).

De las 27 cepas analizadas mediante la técnica de la PCR convencional, se detectó que 2 cepas pertenecientes a los géneros *Klebsiella pneumoniae*, poseían el gen IMP y SPM; mientras que 1 cepa de la misma especie, presentaba los genes IMP y GIM.

Se detectaron los genes IMP y NDM-1 en una cepa perteneciente al género *Escherichia coli*, mientras que VIM y SPM fueron detectados en una cepa de *Enterobacter cloacae*.

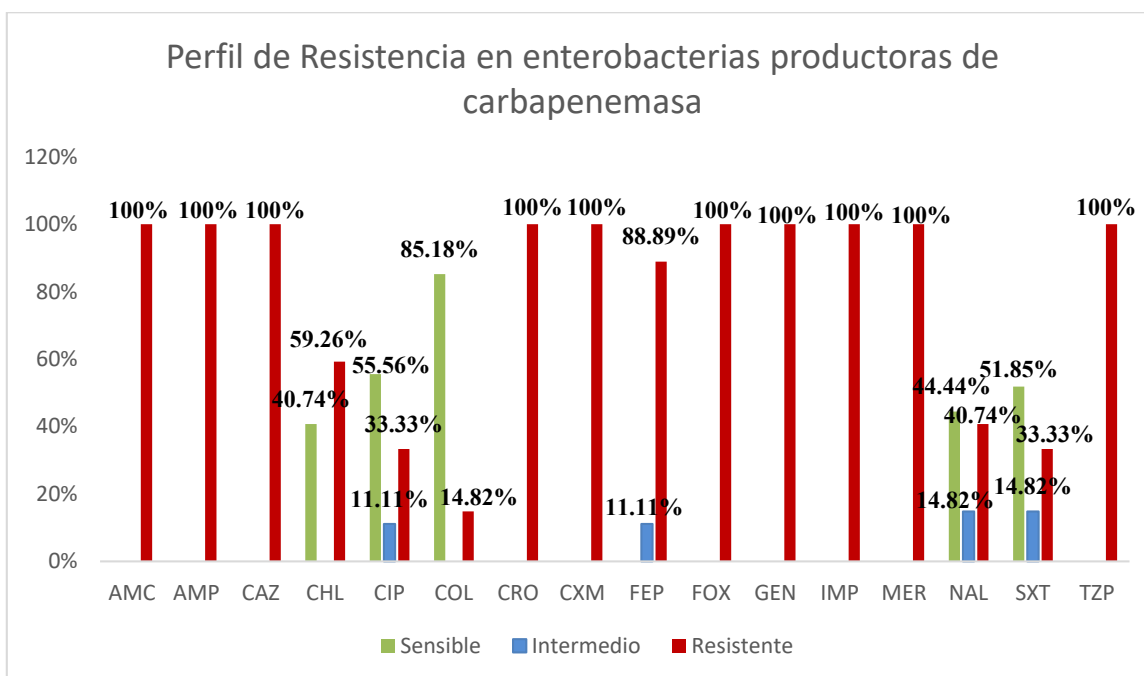
Los genes NDM-1, IMP y SIM fueron detectados en una sola cepa de *Citrobacter freundii*, que los poseía simultáneamente.

La importancia de la detección de los genes VIM, GIM y SIM yace en su capacidad de diseminación, estas son carbapenemasas distribuidas internacionalmente, y se han difundido entre múltiples especies de enterobacterias. La expresión de los genes VIM confiere resistencia a todos los β -lactámicos, excepto Aztreonam (Sonnevend, *et al.*, 2012).

Con la aparición de nuevos fármacos, aunque estos se utilicen de manera racional o no, se va a producir la manifestación de algún mecanismo de resistencia antimicrobiano y, por lo tanto, la aparición de cepas resistentes. Ante esta realidad junto con la falta de nuevas drogas disponibles, resulta urgente tener conocimiento de las cepas que circulan tanto en los Centros Hospitalarios como en la comunidad, y establecer junto con otros profesionales de la salud protocolos orientados al uso adecuado de los antibióticos (Moreno, 2013).

La vigilancia de la resistencia a antimicrobianos es una herramienta que permite entender mejor cómo contribuyen las dinámicas de generación de resistencia en poblaciones microbianas a este fenómeno y el papel que estas juegan en las infecciones asociadas a la atención en salud. Un conocimiento más profundo del problema de la resistencia generará las bases para su contención (Maldonado, *et al.*, 2014).

Gráfico No. 3



Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Los antibióticos han revolucionado la práctica de la Medicina Clínica, lo que permite avances al momento de dar respuesta frente a una infección por una bacteria. Sin embargo, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) amenaza con obstaculizar e incluso revertir

algunos de estos avances. El efecto de la RAM en muchos países puede ser calculado; pero su efecto global es difícil de cuantificar, ya que los datos epidemiológicos son escasos en muchas áreas del mundo (Serra-Valdés, 2017).

El perfil de resistencia mostrado en la gráfica engloba a enterobacterias tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*. Por lo que no todos los antibióticos testados aparecen en la gráfica y su perfil de susceptibilidad varía entre especies, en Anexos se graficó el perfil de resistencia a antibióticos por las enterobacterias encontradas en el estudio.

Los fármacos que presentaron sensibilidad en la mayoría de las cepas del estudio fueron: Trimetropin-Sulfametoxazol (SXT), Ciprofloxacina (CIP), Ácido nalidíxico (NAL), Cloranfenicol (CHL) y Colistín (COL), este último presentó eficacia en 23 cepas de las enterobacterias en estudio lo que equivale a un 85.18%. La investigación presenta similitud con los resultados obtenidos del estudio realizado por Cerda Aragón, *et al.*, en el año 2016, en el HAN; en donde los antibióticos antes descritos se presentaron sensibles frente a las cepas del estudio.

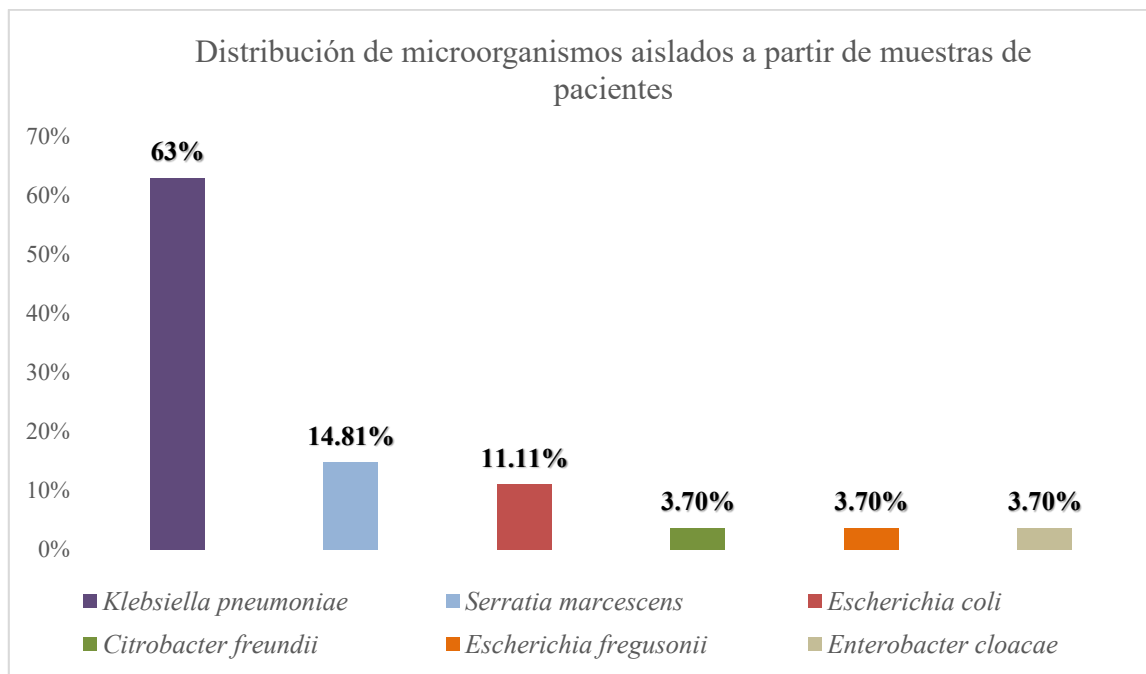
El uso de COL puede llegar a ser restringido debido a su nefrotoxicidad y neurotoxicidad. Sin embargo, se debe considerar como opción terapéutica, evaluando la resistencia a demás antibióticos y los riesgos al momento de utilizarlo como terapia antimicrobiana en el paciente.

Cabe recalcar que las cepas que se presentaron resistentes a COL, eran 4 cepas de *Serratia marcescens*, ya que poseen una resistencia natural característica, por lo que antibióticos como: Aminopenicilinas, Cefalosporinas de 1er, 2da, y 3era generación, Polimixina E o Colistín, Tetraciclinas y Nitrofurantoinas, no poseen actividad frente a las diferentes especies de *Serratia*.

Respecto a la sensibilidad registrada hacia SXT, según la farmacocinética de dicho antibiótico, alcanza concentraciones en tejidos y fluidos, debe ser considerado como principal opción terapéutica dependiendo de la zona en donde se aisló la bacteria.

Las llamadas superbacterias, se han convertido en una preocupación a nivel mundial debido a su resistencia a los antibióticos. La más reciente es *Klebsiella pneumoniae*, definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una bacteria intestinal capaz de producir neumonía, septicemias e infectar a pacientes de cuidados intensivos. La OMS asegura que es una amenaza que debe ser atendida de manera urgente (OMS, 2018).

Gráfico No. 4



Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

De las 27 muestras que conformaron el estudio de acuerdo a los criterios de inclusión de la investigación, se obtuvo que; el microorganismo que presentó mayor frecuencia de aislamiento fue *Klebsiella pneumoniae* con un total de 17 aislamientos lo que representa un 63%; en comparación al estudio realizado por Chinchilla en el año 2012, quien encontró que el 58% de los aislamientos investigados en el estudio fueron cepas pertenecientes al género *Escherichia*, especie *coli* y seguido de *Klebsiella pneumoniae*.

Por lo que se puede destacar la gran diferencia de frecuencias de hallazgos de cepas aisladas en Hospitales de la región Centroamericana. En el estudio realizado por Sacsquispe

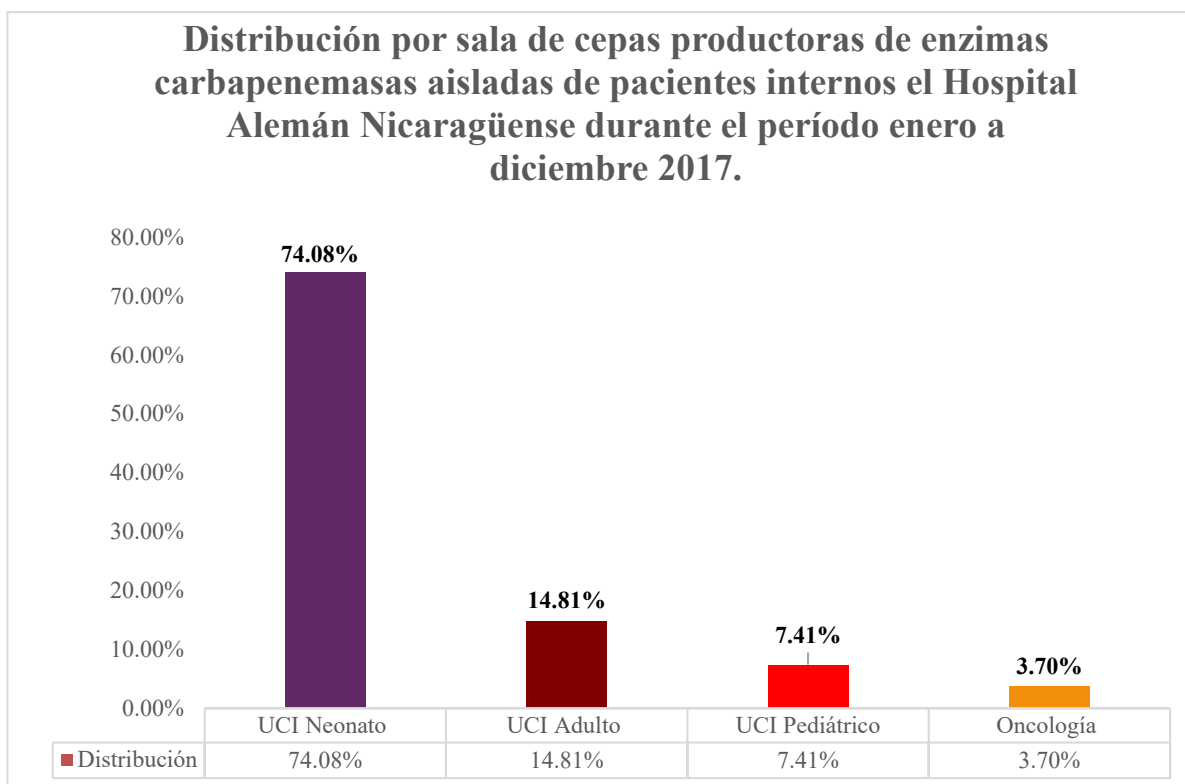
Contreras en el año 2017 en Lima, Perú; también el hallazgo relevante fue la alta prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* con un 66.26%, comprobando así que la frecuencia de hallazgos no difiere tanto a pesar de tratarse de hallazgos en el Sur de América.

Serratia marcescens, presentó un total de 4 aislamientos equivalente a un 14.81%. En la investigación relacionada al estudio que fue llevada a cabo por Cerda Aragón y *et al.*, en el año 2016 en donde se encontró que *Serratia marcescens*, solo obtuvo un total de 1 aislamiento equivalente al 2.22%; indicando así, en un año de diferencia, el porcentaje de hallazgos incrementó un 12.60% de presencia de especies de *Serratia marcescens* con resistencia a carbapenémicos.

Escherichia coli, con un total de 3 aislamientos, en comparación con la investigación realizada por Ortiz y *et al.*, en el año 2014, en donde se obtuvo solo 1 aislamiento, siendo esta la bacteria que pertenece a la microbiota normal del cuerpo humano es importante destacar el incremento en la frecuencia de hallazgos de estas bacterias que poseen enzimas que le confieren resistencia a los carbapenémicos.

Las salas de unidades de cuidados intensivos son áreas que están predispuestas a la adquisición de microorganismos portadores de genes de resistencia a carbapenémicos, debido a los procedimientos invasivos que son realizados como aplicación de catéter venoso y urinario, intubación endotraqueal, endoscopia y cirugía, entre otros, y debido a que, en esta se encuentran pacientes en estado delicado, inmunosuprimidos y permanecen por largos períodos (Arango-Díaz, *et al.*, 2018).

Gráfico No. 5



Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

De las 27 cepas seleccionadas, 20 se aislaron en el área de UCI-neonato, representando el 74.08%, esto concuerda con el estudio llevado a cabo por Cerda Aragón, *et al.*, en el año 2016; en el cual, la mayor frecuencia de aislamientos se dio en la sala de UCI-neonato con un 51.14%, siendo la sala con mayor afectación por la diseminación de estas bacterias que presentan resistencia a los carbapenémicos.

Los procesos traumáticos a los que están sometidos los pacientes que son ingresados a una UCI se asocian a los diversos factores que originan puertas de entrada a

microorganismos, que pueden ser causantes de infecciones sistémicas; por lo que siendo una sala de UCI que atiende a Neonatos, estos pacientes no poseen un sistema inmunológico totalmente funcional.

La UCI Neonatal es una unidad pediátrica que acoge a todos aquellos recién nacidos antes de término desde cualquier edad gestacional, por lo que estando frente a procesos en los que se les aplican tubos que suministran líquidos, alimentos, medicamentos u oxígeno extra; esto predispone aún más la infección de organismos resistentes.

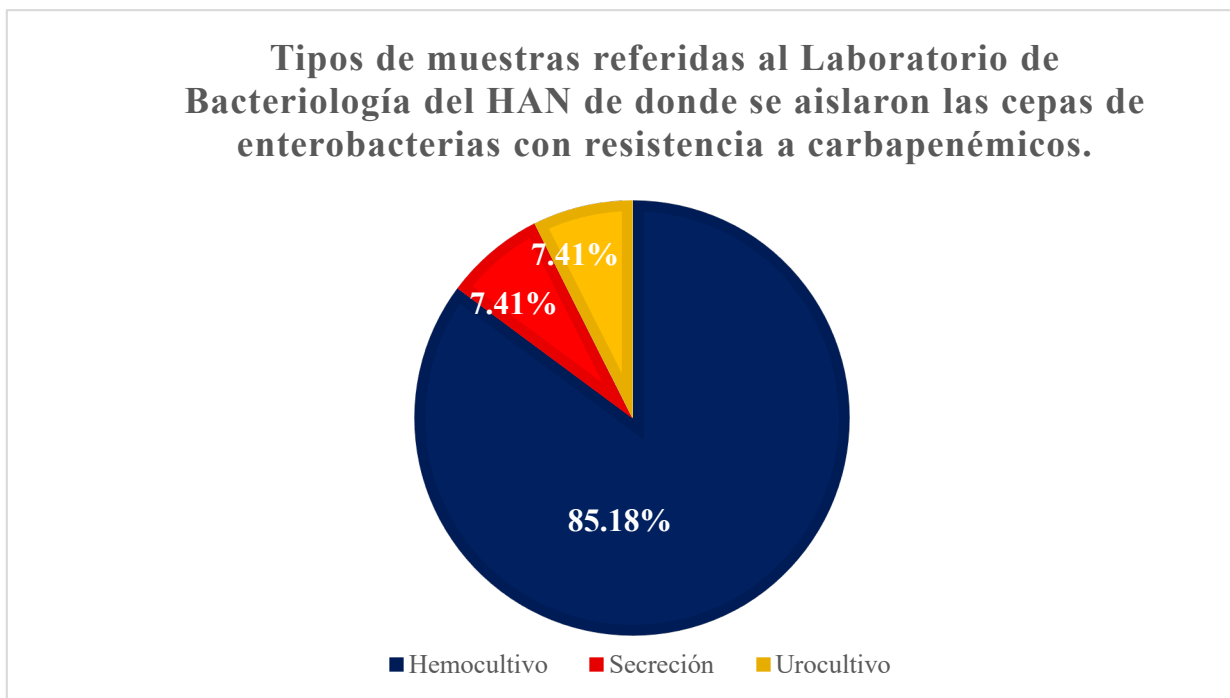
Tradicionalmente las infecciones neonatales se han dividido en infecciones neonatales contraídas al inicio temprano, si ocurrían dentro de las 72 horas de vida (adquiridas por la madre) y de inicio tardío, si se presentan después de las 72 horas de vida (hogar u hospitalización). (Amaya, *et al.*, 2010).

De igual forma el estudio realizado por Sequeira en el año 2015, en el Hospital Manuel de Jesús Rivera “La Mascota”, refleja que; la resistencia bacteriana de las infecciones estaba asociada a la localización de la atención sanitaria de cuidados intensivos, por lo que la sala con mayor afectación fue la Unidad de Terapia Intensiva, lo que representa avenencia frente a los hallazgos de nuestro estudio.

En el grupo de patógenos nosocomiales, en los que resaltan *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Proteus*, incluyen patógenos y oportunistas responsables de una amplia gama de infecciones. Muchas especies son miembros de la microbiota normal. Los sitios de infecciones asociadas a la atención sanitaria, son el tracto urinario, los sitios quirúrgicos, el torrente sanguíneo y las neumonías.

Este grupo de patógenos nosocomiales es responsable del 46% de infecciones del tracto urinario y del 24% de infecciones de sitios quirúrgicos, del 17% de bacteriemia y el 30% de las neumonías (Guentzel, 1996).

Gráfico No. 6



Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

El tipo de muestra más frecuentemente analizado fue el hemocultivo, en total fueron 23 hemocultivos referidos al laboratorio de 27 muestras en total. Nuestro estudio difiere del realizado por Duarte en el año 2015, en el Hospital Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” en el que la muestra que más fue analizada, fue la proveniente de Urocultivo, seguido de Hemocultivo en 51 muestras de 322 muestras en total.

Según el estudio realizado por Sacsquispe, *et al.*, en 2017, en Perú; encontró que las enterobacterias con resistencia a carbapenémicos, son causas comunes de infecciones asociadas a la atención hospitalaria y asegura que se aíslan mayormente en infecciones del tracto sanguíneo en pacientes con catéteres, neumonía (frecuentemente asociadas a la ventilación utilizada en salas) e infecciones en vías urinarias. En relación a nuestra investigación, concuerda la información antes mencionada puesto que los hallazgos de estas bacterias se presentaron en Hemocultivos.

X. CONCLUSIONES

1. La caracterización fenotípica se realizó mediante la técnica de difusión por disco, colocando discos de carbapenémicos de IMP y MER frente a un disco o inhibidor ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Con esto se confirmó el fenotipo de resistencia perteneciente al tipo MBL en las 27 cepas.
2. El gen con mayor frecuencia encontrado a través de la técnica de la PCR convencional fue el gen NDM-1, con un 61.77% seguido del gen IMP con un 17.65%, el gen SPM con un 11.76% y finalmente el gen VIM, GIM y SIM con un 2.94% respectivamente. De las cepas estudiadas, se encontraron 5 cepas que eran portadoras de más de 2 genes diferentes, asimismo, se aisló 1 cepa con la presencia de más de dos genes.
3. Todas las especies bacterianas aisladas presentaron resistencia a aminopenicilinas, cefalosporinas de 1er, 2da, 3era y 4ta generación y carbapenémicos. Los demás antibióticos testados tuvieron diferentes resultados según los Registros del Laboratorio de Bacteriología del HAN.
4. Se encontró que 74.08% de las cepas productoras de carbapenemasas que fueron aisladas provenían de pacientes internos en Salas de UCI neonato, seguido de un 14.81% en la sala de UCI Adulto, un 7.41% de cepas pertenecientes a UCI Pediátrico y finalmente 3.70% en el área de Oncología. La muestra de donde mayormente se aislaron estas cepas fue el Hemocultivo.

XI. RECOMENDACIONES

Al Ministerio de Salud: Fortalecer los sistemas de vigilancia a nivel nacional para contrarrestar la diseminación de estos microorganismos resistentes e implementar protocolos para el manejo efectivo de la terapia antibiótica en pacientes que presenten infecciones por estas bacterias.

Al HAN: Realizar un registro de pacientes colonizados o infectados con cepa resistente, durante su estadía en el hospital, para evitar la diseminación de la bacteria.

Crear un archivo de todas las cepas aisladas de pacientes que presentan resistencia a antibióticos como control epidemiológico y como base para crear un sistema de vigilancia interno con el fin de disminuir la diseminación de estos microorganismos.

Limitar la cantidad de visitas en las Salas donde se encuentran ingresados los pacientes así como también, controlar la limpieza dentro del hospital para disminuir el riesgo de contaminación cruzada con las manos del personal de salud.

A la UNAN-Managua: Específicamente al Instituto Politécnico de la Salud, para seguir instando a los estudiantes en Ciencias de la Salud sobre la importancia de investigar sobre el comportamiento y diseminación de bacterias con resistencia a carbapenémicos en distintos hospitales del país.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, G., & Herrera, M. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. San José, San José, Costa Rica.
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y Purificación de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y práctico* (pág. 274). México.
- Alhashash, F., Weston, V., & McNally, A. (2013). Multidrug-Resistant Escherichia coli Bacteremia. *Emerging Infectious Diseases*, 1699-1701.
- Alhashem, F., Leonie, N., Verbeet, T., Alp, E., & Doganay, M. (2017). Treatment of sepsis: What is the antibiotic choice in bacteremia due to carbapenem resistant Enterobacteriaceae? *World Journal of Clinical Cases*, 324-332.
- Amaya, E., Cáceres, M., Fang, H., Torres, A., Palmgren, A., Nord, C., & Weintraub, A. (2010). Antibiotic Resistance Patterns in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Causing Septicemia in Newborns in León, Nicaragua: Correlation with Environmental Samples. *Journal of Chemotherapy*, 25-29.
- Arango-Díaz, A., López Berrío, S., Vera Nuñez, D., & Castellanos, E. (2018). Epidemiología de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. *Acta Médica del Centro*, 262-272.
- Arbizú-Medina, O., García-Rosales, K., Cerda-Aragón, H., Martínez-García, W., Pérez-Martínez, A., & Lanzas-Baca, Y. (2018). Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en especies de Enterobacteriaceae aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua. *Acta Médica Costarricense*, 15-18.
- Ariza, B., & León, A. (2013). Carbapenemasa Nueva Delhi tipo 1 (NDM): descripción fenotípica, epidemiológica y tratamiento. *Laboratorio Actual*, 24-31.
- Becerril, D., Torres, E., Moreno, G., Aguilar, A., Arenas, R., & Hernández, R. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa (pcr) y sus aplicaciones en dermatología. *Dermatología Cosmética Médica y Quirúrgica (DCMQ)*, 214-219.

- Cabrera, C., Puricaza, R., León, A., & Celis, J. (2005). Sepsis por shigella flexneri. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 145-147.
- Caldera, F., & Robles, D. (Marzo de 2017). Caracterización Fenotípica de bacilos Gram Negativos resistentes a Carbapenems procedentes de la Red Nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos de enero 2014 a diciembre 2016. *Trabajo monográfico para optar al título de Licenciatura en Microbiología* . Managua , Nicaragua .
- Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*, 757-763.
- Calvo, J., & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *ELSEVIER*, 1-66.
- Cerda-Aragón, H., Martínez, W., & Pérez, A. (2017). Genes productores de enzimas carbapenemasa 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 agosto 2015 a enero 2016. *Trabajo monográfico para optar al título de Licenciatura en Microbiología*. Managua, Nicaragua.
- Chinchilla, A. (Mayo - Agosto de 2013). Detección de Carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC-2 en Enterobacterias BLEE+:Evaluación Fenotípica con Confirmación Genotípica . *Tesis para optar al título de Médico Cirujano*. Ciudad de Guatemala, Guatemala.
- Duarte, A. (Mayo de 2016). Infecciones por Escherichia coli y su Perfil de Resistencia en niños atendidos en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” 1ero Enero 2011 – 31 Diciembre 2015. *Informe Final de Investigación para optar al Título de Médico Especialista en Pediatría*. Managua, Nicaragua.
- Echeverri-Toro, L., Penagos, S., Castañeda, L., & Villa, P. (2012). Klebsiella pneumoniae multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista chilena de infectología*, 175-182.

- García, A., & Rodríguez, F. (2010). Unidad de Enfermedades Infecciosas. *Medicine*, 3426-31.
- González-Escalante, E. (2013). Metallo- β -lactamasas en aislamientos clínicos de pseudomonas aeruginosa en Lima, Perú. *Rev Perú Méd Exp Salud Pública*, XXX(2), 214-245. Recuperado el 10 de Julio de 2017, de http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000200013&lng=en&nrm=iso>
- Guentzel, N. (1996). Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus. En Galveston, *Medical Microbiology. 4th edition* (pág. Chapter 26). Texas.
- Hadzicki. (08 de Diciembre de 2009). KIRBY-BAUER DISK DIFFUSION SUSCEPTIBILITY TEST PROTOCOL. American Society For Microbiology.
- Herrera, M., Moya, T., Vargas, A., M., H., Herrera, J., & Marín, J. (2011). Aislamiento de cepas de Escherichia spp. diferentes de Escherichia coli en el . *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 1-2.
- Hrabak, J., Chudackova, E., & Papagiannitsis, C. (2014). Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection "2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 839–853.
- INCIENSA. (19 de Febrero de 2014). Alerta: Primer hallazgo de carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas New Delhi (MBL - tipo Metalobetalactamasas New Delhi (MBL-NDM) en Costa Rica . *Informe*. Tres Ríos , Cartago , Costa Rica .
- Jawetz, Melick, & Adelberg. (2011). *Microbiología médica*. México DF: Mc Graw Hill.
- Jiménez, A. (2011). *Mecanismos de resistencia a los antibióticos de importancia clínica en enterobacterias*. San José, Costa Rica: INCIENSA Centro Nacional de Referencia en Bacteriología Laboratorio de Antimicrobianos.
- Jurado, R., Arenas, C., Doblas, A., Rivero, A., & Torre, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas . *Medicine*, 3497-3501.

- Kumar, P., Ghosh, S., Rath, D., & Gadpayle, K. (2013). Multidrug resistant citrobacter: an unusual cause of liver abscess. *Unusual association of diseases/symptoms*, 1-4. doi:doi:10.1136/bcr-2013-008714
- Machetti, M., Errecalde, J., & Mestorino, N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por Bombas de Eflujo. Impacto en la Multirresistencia. *Analecta Veterinaria* , 40-53.
- Maldonado, N., Robledo, C., Munera, I., Capataz-Tafuer, C., & Roncancio, G. (2014). Caracterización de los procedimientos para la realización de hemocultivos en pacientes adultos, en instituciones hospitalarias del Área Metropolitana del Valle de Aburrá. *Asociación Colombiana de Infectología*, 19-25.
- Martínez, D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica . *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:78-83.
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC*, 15.
- Medina, A. (Abril de 2010). Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. Madrid, España.
- Mendoza, L., & Arias, M. (2010). Susceptibilidad antimicrobiana en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales: experiencia de 43 meses. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 13-24.
- Miranda, S., Rodríguez, P., Hormazábal, J., Ramirez, V., Pidal, P., & Silva, F. (04 de 04 de 2018). Documentos Técnicos para el Laboratorio Clínico, Recomendaciones para Detección Carbapenemasas en Enterobacterias y Pseudomonas Aeruginosa . Chile.
- Molina, J., & Eslava, C. (03 de Agosto de 2015). *Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM*. Obtenido de Departamento de Microbiología y Parasitología - Recursos en Bacteriología:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>

- Molina, J., & Uribarren, T. (07 de Agosto de 2015). *Universidad Nacional Autónoma de México* . Obtenido de Infecciones por Shigella : <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/shigella.html>
- Morejón, M. (28 de Octubre de 2012). *Biblioteca virtual en salud de Cuba*. Obtenido de Biblioteca virtual en salud de Cuba: http://bvs.sld.cu/revistas/mie/vol11_4_12/mie05412.html
- Moreno, K. (2013). Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos . *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica* , 599-605.
- Munita, J., & Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr. Author manuscript*, 1-37.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaüer, M. (2007). *Microbiología Médica* . Madrid : ELSEVIER.
- Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2002). *Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias*. Barcelona, España: Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Nordmann, P. (2010). [Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems]. *Med Sci (Paris)*, 950-959. doi:10.1051/medsci/20102611950
- Notake, S., Matsuda, M., Tamai, K., Yanagisawa, H., Hiramatsu, K., & Kikuchi, K. (2013). Detection of IMP Metallo- β -Lactamase in Carbapenem-Nonsusceptible Enterobacteriaceae and Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Rods by Immunochromatography Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 1762-1768.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (29 de 01 de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Comunicados de Prensa: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>
- Ortiz, D., Rodríguez, M., & Urbina, J. (Julio de 2014). Identificación fenotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasa y genes que portan β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE), en cepas aislada de procesos infecciosos en los pacientes

- internos del Hospital Antonio Lenin Fonseca. *Tesis para optar al título de licenciatura en Bioanálisis Clínico*. Managua, Nicaragua.
- Pasteran F., A. E. (2012). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *Journal of Antimicrobial*, 67:1795-1797.
- Pena, I. (2016). Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid .
- Pérez, D. (1988). Resistencia bacteriana antimicrobianos: Su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria . *Información terapéutica del sistema nacional de Salud* , 57-67.
- Pérez, H., & Robles, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 186-191.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México*, 464-475.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (Tercera ed.). México: Médica Panamericana. Recuperado el 10 de Julio de 2017
- Ruiz Garbajosa, P., & Cantón, R. (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Sociedad Española de Quimioterapia*, 21-25.
- Ryan, K., Sherris, J., Ahmad, N., Lawrence, W., G., R., & Plorde, J. (2011). *Microbiología Médica*. México D. F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.
- Sacsquispe-Contreras, R., & Bailón-Calderón, H. (2018). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3829>. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3829>

- Salud, I. C. (19 de Febrero de 2014). Alerta: Primer hallazgo de carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas New Delhi (MBL- tipo Metalobetalactamasas New Delhi (MBL-NDM) en Costa Rica NDM) en Costa Rica. Tres Ríos, Cartago, Costa Rica.
- Sequeira, M. (20 de Abril de 2015). Infecciones por *Klebsiella Pneumoniae* y su perfil de resistencia en egresados del Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” del 1 de Enero del 2010 al 31 de Diciembre. *Tesis Monográfica para optar al título de Médico Especialista en Pediatría*. Managua, Nicaragua.
- Serra-Valdés, M. Á. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 402-419. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v16n3/rhcm11317.pdf>
- Sonnevend, A., Ghazawi, A., Yahfoufi, N., Al-Baloushi, A., Hashmey, R., Mathew, M., . . . Pál, T. (2012). VIM-4 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in the United Arab Emirates. *Clinical Microbiology And Infection*, E494–E496.
- Sordelli, D. (2016). *Universidad de Buenos Aires: Facultad de Ciencias Médicas*. Recuperado el 13 de 07 de 2017 , de ENTEROBACTERIAS (EB) Y SU PATOGENIA: <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/t5.pdf>
- Suárez, C., Kattán, J., Guzmán, A., & Villegas, M. (21 de Diciembre de 2005). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Cali, Cali, Colombia .
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (03 de Julio de 2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Cali, Colombia.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (Mayo-Agosto de 2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR tiempo real. *Investigacion de Discapacidad*, II(2), pp 70-78. Recuperado el 10 de Julio de 2017, de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Unahalekhaka, A. (2014). Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud. *Conceptos básicos de control de infecciones*, 29-44.

Vignoli, R., & Seija, V. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA*, 649 - 692.

ANEXOS

Tabla No. 1

Aislamiento de enterobacterias con resistencia a carbapenémicos en muestras de pacientes internos en salas de Cuidados Intensivos del HAN durante el periodo enero a diciembre 2017.

	Frecuencia	Porcentaje
Con carbapenemasa	27	5.10 %
Sin carbapenemasa	502	94.90 %
Total	529	100

Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Tabla No. 2

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en enterobacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes internos del Hospital Alemán Nicaragüense durante el período enero a diciembre 2017.

	Frecuencia	Porcentaje %
Screening positivo MBL	27	100
Screening negativo MBL	0	0
Total	27	100

Fuente: Datos obtenidos de la realización del screening para confirmación de Metallo- β -lactamasas a cepas seleccionadas con resistencia a carbapenémicos.

Screening realizado en el Laboratorio de Bioanálisis Clínico de la UNAN-Managua

Tabla No. 3

Genes codificadores de carbapenemasas detectados en cepas aisladas de pacientes hospitalizados en el área de UCI y Oncología del HAN mediante la técnica de PCR convencional durante el periodo enero a diciembre 2017.

	Frecuencia	Porcentaje %
NDM-1	21	61.77
IMP	6	17.65
SPM	4	11.76
GIM	1	2.94
SIM	1	2.94
VIM	1	2.94
Total	34	100%

Fuente: Datos obtenidos de la realización de la PCR convencional con el fin de detectar genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo.

Técnica realizada en el Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros Moreira” de la UNAN-Managua.

Tabla No. 4

Cepas de Enterobacterias detectadas mediante la técnica de PCR Convencional con presencia de dos o más genes codificadores para carbapenemasas tipo Metalo.

Detección de genes en cepas del Estudio		
Cepas detectadas	Frecuencia	Porcentaje
Presencia de un solo gen	21	77.78%
Presencia de dos genes concomitantes	5	18.52%
Presencia de más de dos genes concomitante	1	3.70%
Total	27	100%

Fuente: Datos obtenidos de la realización de la PCR convencional para detectar genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metalo.

Técnica realizada en el Laboratorio de Biología Molecular “*MA. Elmer Cisneros Moreira*” de la UNAN-Managua.

Tabla No. 5

Perfil de resistencia a antibióticos encontrado en cepas productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes internos en las salas de UCI y Oncología del Hospital Alemán Nicaragüense en el período enero a diciembre 2017.

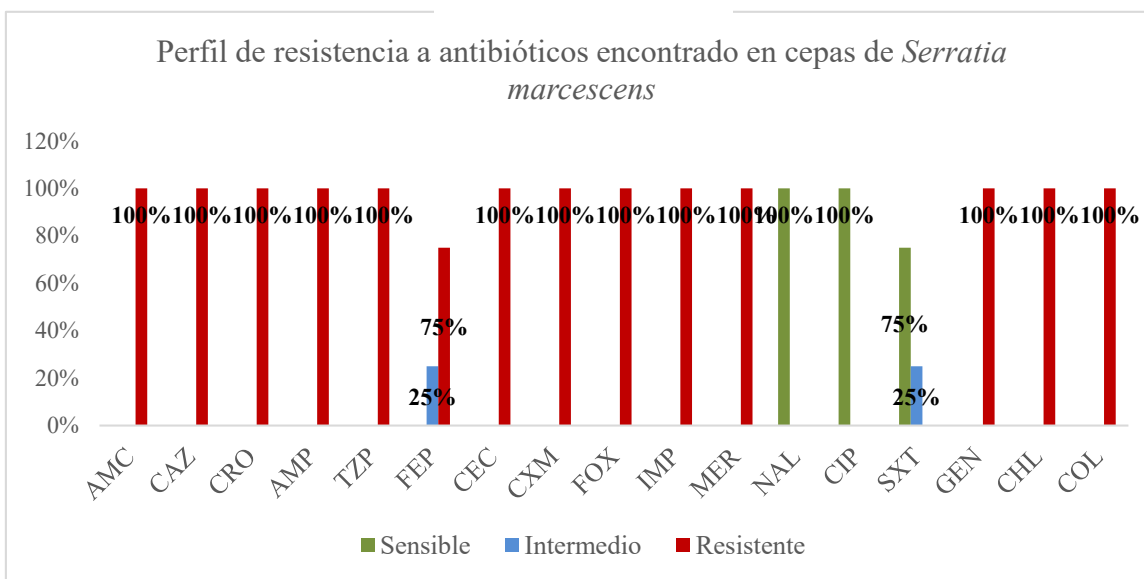
GENERO Y ESPECIE																		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Serratia marcescens</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Citrobacter freundii</i>			<i>Escherichia fergusonii</i>			<i>Enterobacter cloacae</i>		
Antibióticos testados																		
	Frecuencia de hallazgos según criterios y puntos de corte de la CLSI 2017																	
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMC	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
AMK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	-	-	-	-	-	-
AMP	0	0	17	0	0	4	0	0	3	-	-	-	0	0	1	0	0	1
CAZ	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
CEC	0	0	17	0	0	4	0	0	3	-	-	-	0	0	1	0	0	1
CEP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CHL	6	0	11	0	0	4	2	0	1	1	0	0	-	-	-	1	0	0
CIP	7	3	7	4	0	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0
COL	17	0	0	0	0	4	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
CRO	0	0	17	0	0	4	0	0	3	-	-	-	0	0	1	0	0	1
CXM	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
FEP	0	2	15	0	1	3	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
FOX	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
GEN	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
IMP	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
MER	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
NAL	4	4	9	4	0	0	1	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0
SXT	7	2	8	3	1	0	3	0	0	0	0	1	-	-	-	1	0	0
TZP	0	0	17	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1

CTX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	-	-	-
LVX	-	-	-	-	-	-	1	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TGC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-
TOTAL	17			4			3			1			1			1		

Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

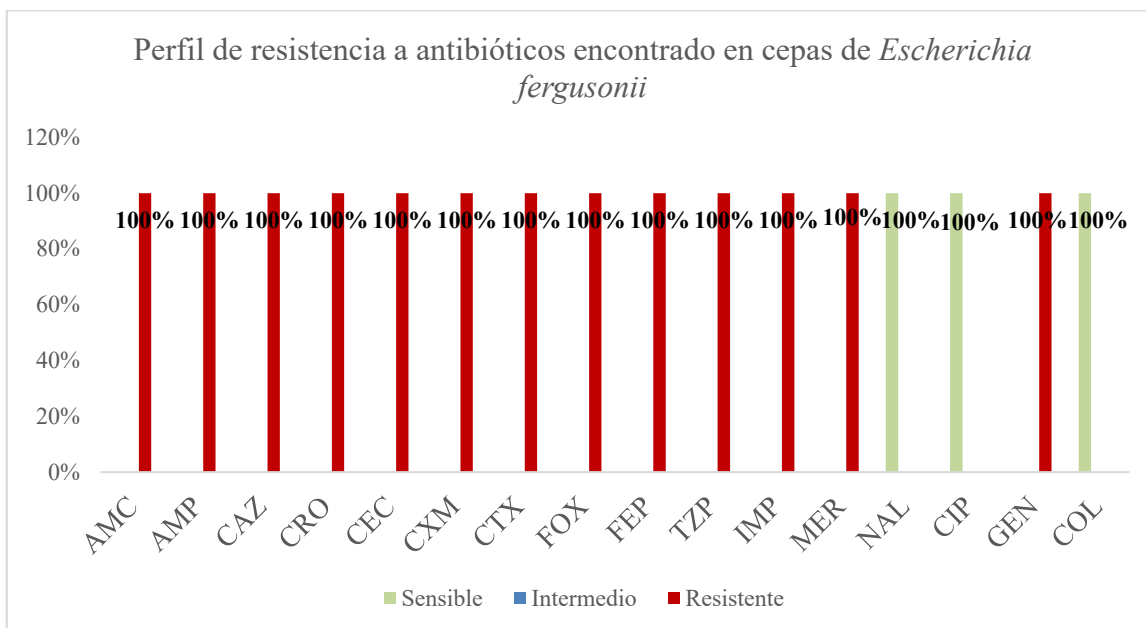
Perfil de resistencia a antibióticos encontrado en cada una de las especies bacterianas del estudio

Gráfico No. 7



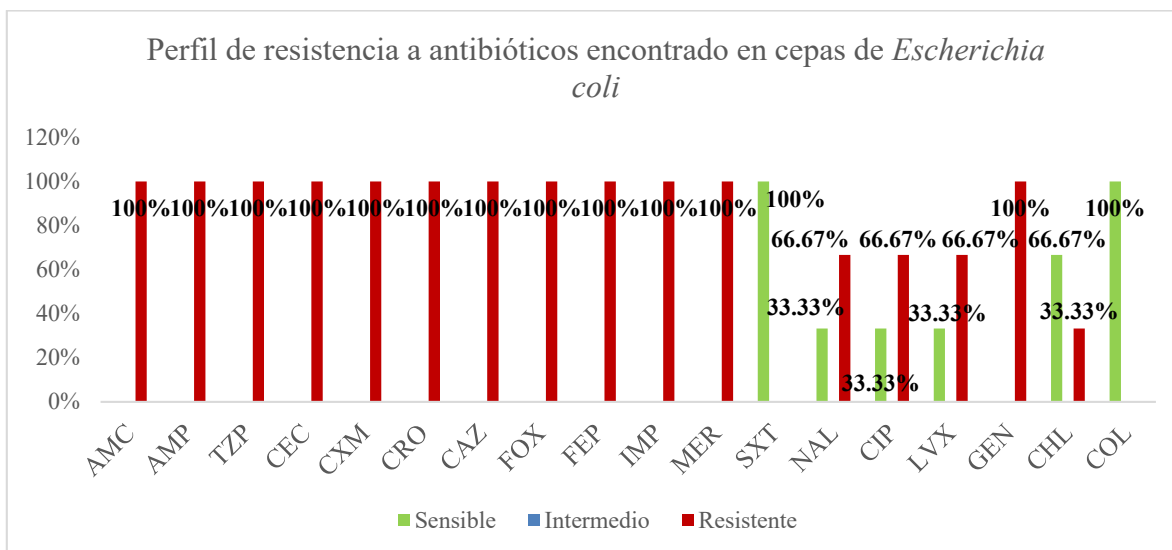
Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Gráfico No. 8



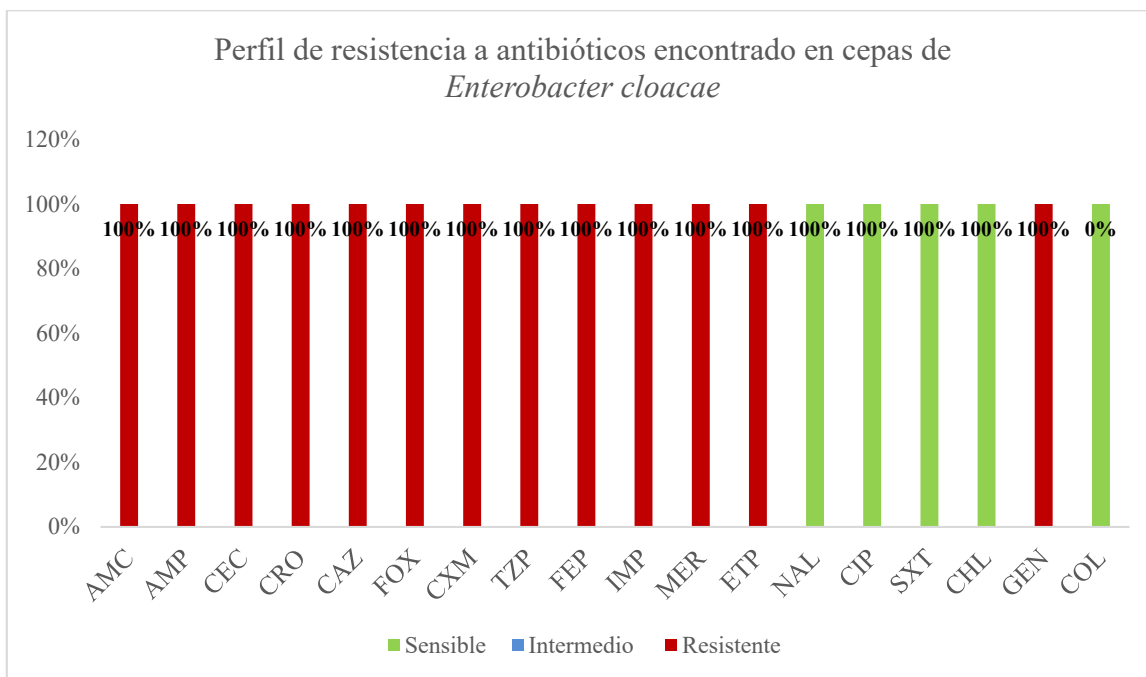
Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Gráfico No. 9



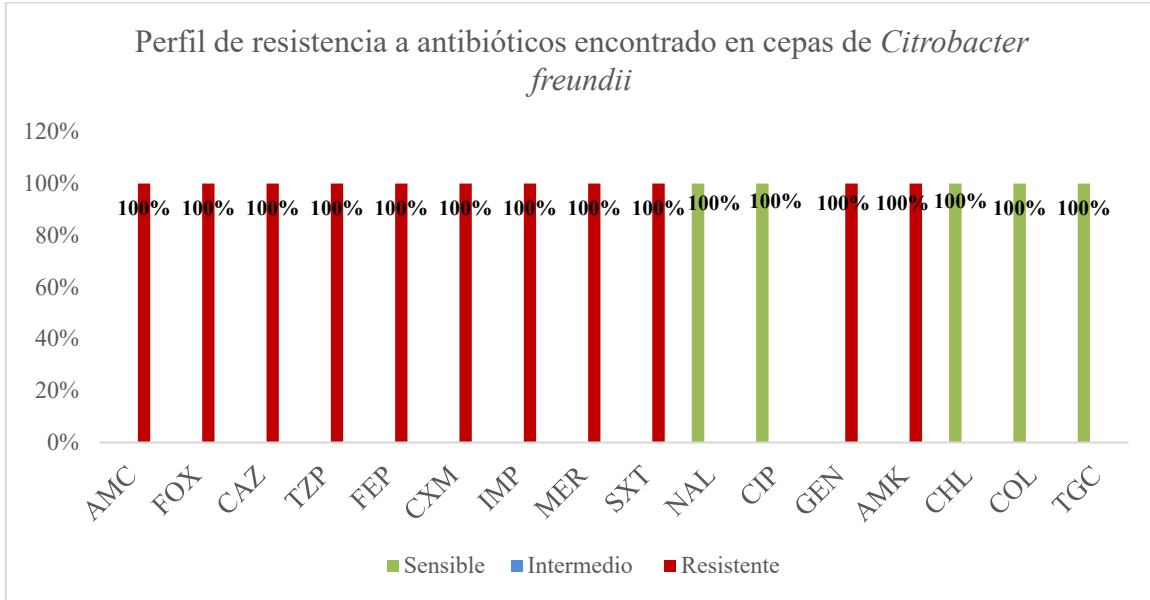
Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Gráfico No. 10



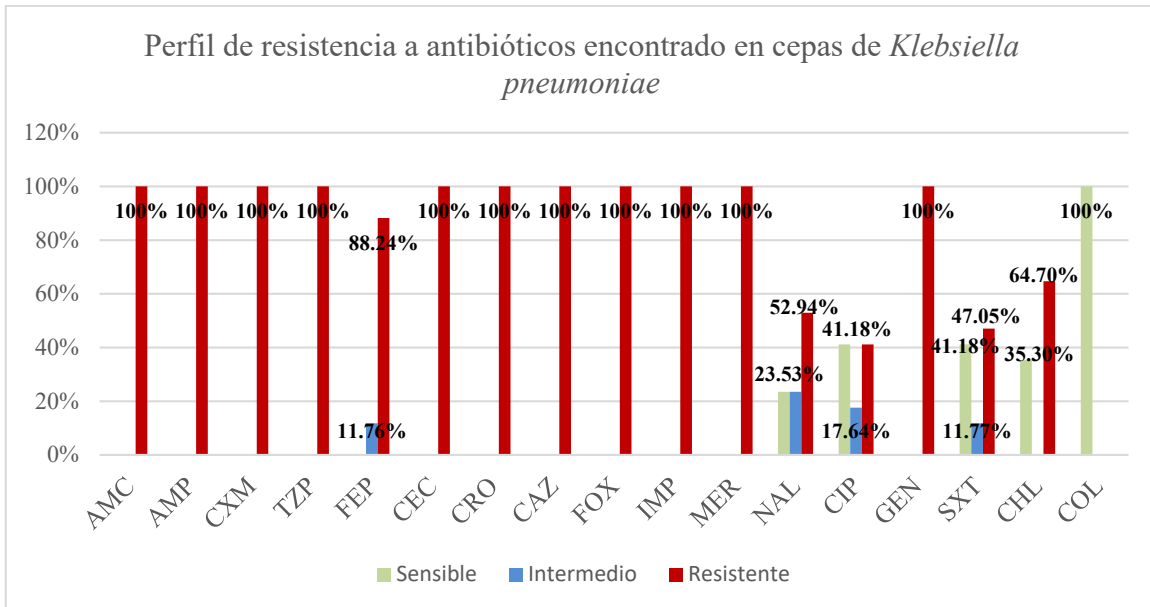
Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Gráfico No. 11



Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Gráfico No. 12



Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Tabla No. 6

Distribución de microorganismos aislados de muestras de pacientes internos del Hospital Alemán Nicaragüense en el período enero a diciembre 2017.

Género y Especie	Frecuencia de hallazgos	Porcentajes
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	63 %
<i>Serratia marcescens</i>	4	14.81 %
<i>Escherichia coli</i>	3	11.11 %
<i>Citrobacter freundii</i>	1	3.70 %
<i>Escherichia fergusonii</i>	1	3.70 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3.70 %
Total	27	100 %

Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Tabla No. 7

Distribución por sala de cepas productoras de enzimas carbapenemasas aisladas de pacientes internos el Hospital Alemán Nicaragüense durante el período enero a diciembre 2017.

Distribución por Salas		
	Frecuencia	Porcentaje
UCI Neonato	20	74.08%
UCI Adulto	4	14.81%
UCI Pediátrico	2	7.41%
Oncología	1	3.70%
Total	27	100%

Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.

Tabla No. 8

Tipos de muestras referidas al Laboratorio de Bacteriología del HAN de donde se aislaron las cepas de enterobacterias con resistencia a carbapenémicos.

Distribución por tipo de muestra		
	Frecuencia	Porcentaje
Hemocultivo	23	85.18%
Secreción	2	7.41%
Urocultivo	2	7.41%
Total	27	100%

Fuente: Datos obtenidos del Libro de Registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense HAN durante el período enero a diciembre 2017.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua
UNAN-Managua
Instituto Politécnico de la Salud "Luis Felipe Moncada"
Departamento de Bioanálisis Clínico
Licenciatura en Microbiología



Ficha de recolección de datos

Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa, en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el período enero a diciembre 2017

Datos generales

# De cepa		Código de muestra		Código de ingreso	
Edad		Sexo		Sala	
Tipo de muestra					

Microorganismo aislado

Género		Especie	
Mecanismo de Resistencia detectado			
Metallo- β -lactamasa (sinergia con EDTA)		KPC (sinergia con APB)	Oxacilinas

Sensibilidad por método de CIM por VITEK®2 Compact

Información de Sensibilidad							
Antibiótico	Sensible (μ g/L)	Intermedio (μ g/L)	Resistente (μ g/L)	Antibiótico	Sensible (μ g/L)	Intermedio (μ g/L)	Resistente (μ g/L)

Resultado de la PCR

Positivo:

Negativo:

Gen amplificado:



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua
UNAN-Managua
Instituto Politécnico de la Salud "Luis Felipe Moncada"
Departamento de Bioanálisis Clínico
Licenciatura en Microbiología



Ficha de recolección de datos

Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasa tipo Metallo- β -lactamasa, en enterobacterias aisladas de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense (H.A.N.) en el período enero a diciembre 2017

Datos generales

# De cepa		Código de muestra		Código de ingreso	
Edad		Sexo		Sala	
Tipo de muestra					

Microorganismo aislado

Género		Especie	
Mecanismo de Resistencia detectado			
Metallo- β -lactamasa (sinergia con EDTA)		KPC (sinergia con APB)	Oxacilinas

Sensibilidad por método de difusión por disco (Kirby-Bauer)

Información de Sensibilidad							
Antibiótico	Sensible (mm)	Intermedio (mm)	Resistente (mm)	Antibiótico	Sensible (mm)	Intermedio (mm)	Resistente (mm)

Resultado de la PCR

Positivo:

Negativo:

Gen amplificado:

Detección de carbapenemasas en Enterobacterias

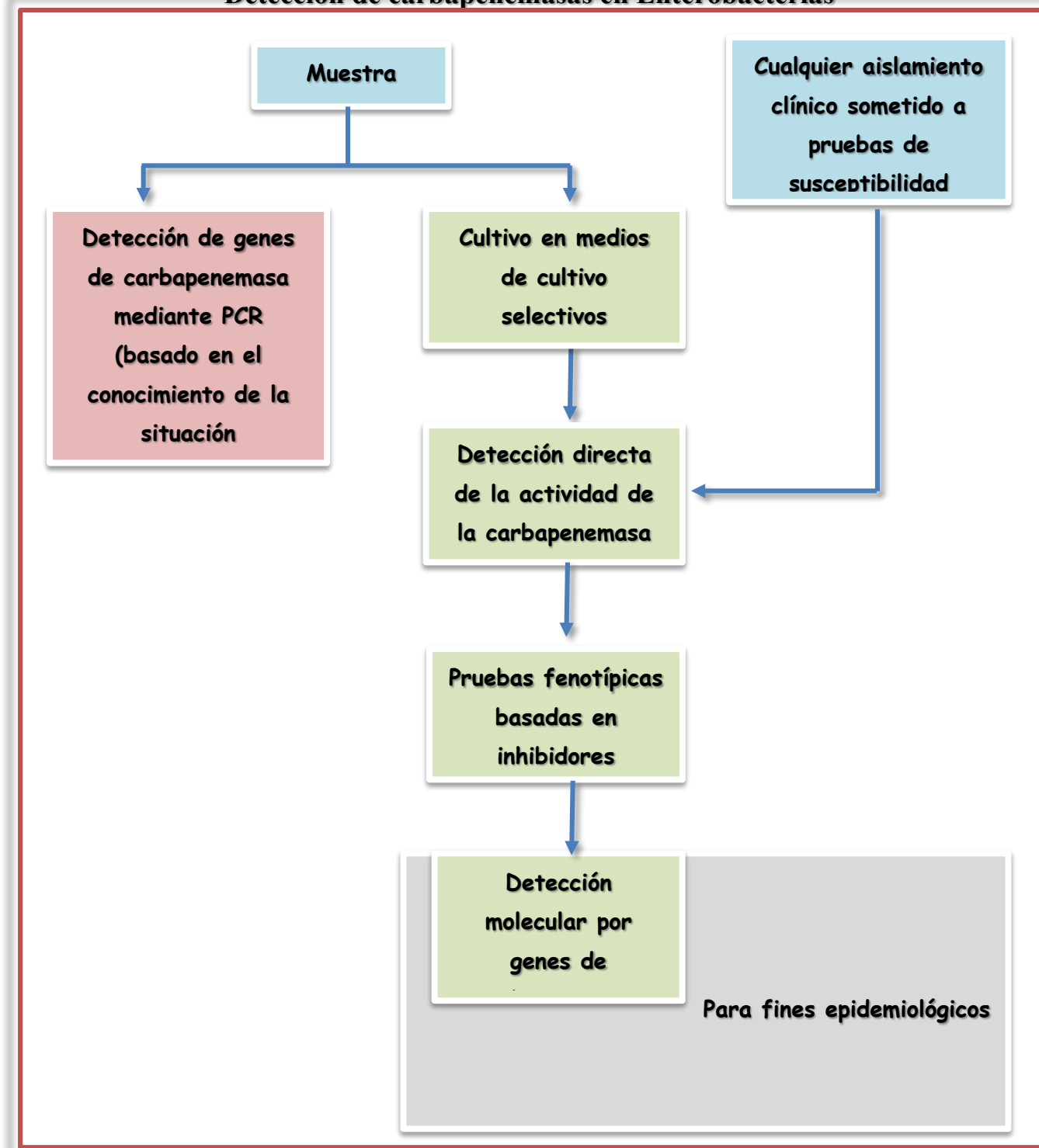


Figura No. 2: Flujograma de trabajo propuesto para la detección de carbapenemasas en laboratorios de diagnóstico (Hrabak, *et al.*, 2014).



Figura No. 3: Cepario de enterobacterias del Hospital Alemán Nicaragüense trasladadas al Laboratorio de Bioanálisis Clínico de la UNAN-Managua.



Figura No. 4: Montaje del método de difusión por disco en Agar utilizando sensidiscos de Imipenem y Meropenem frente al Inhibidor EDTA.



Figura No. 5: Técnica de difusión por disco en Agar Mueller Hinton. **Fenotipo identificado:** Carbapenemasa tipo Metalo- β -lactamasa.

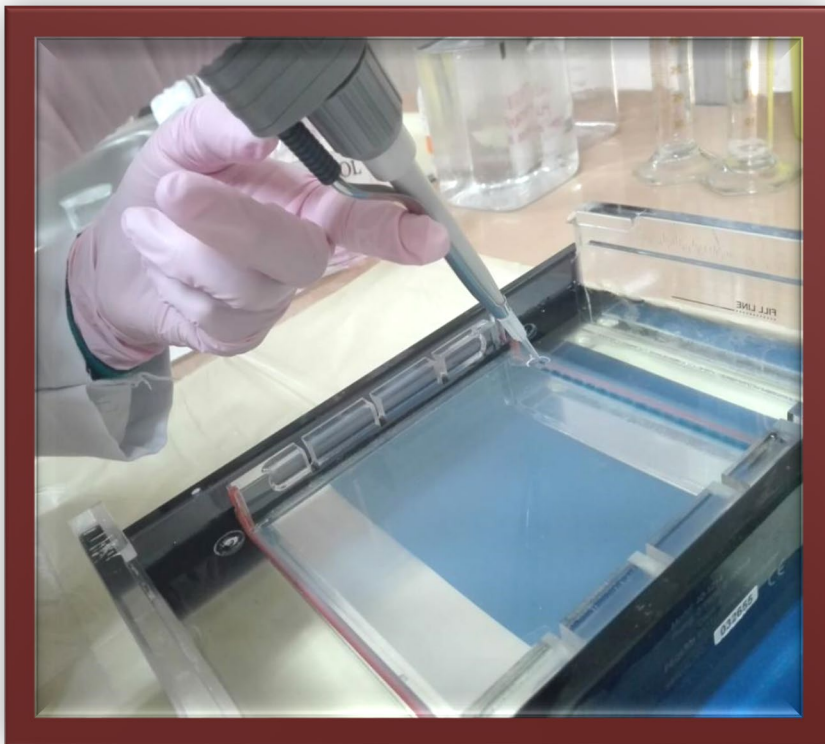


Figura No. 6: Muestras colocadas en pozos del Gel de Agarosa al 1.5% para realizar corrida de PCR Convencional.

Tabla No. 9: Base de datos de cepas seleccionadas en el estudio y resultados de la detección fenotípica y genotípica de enzimas productoras de carbapenemasa.

# De cepa	Código HAN	Código de ingreso	Código UNAN LAB BAC	Código UNAN LAB BM	Género y especie	Sinergia MBL	Gen amplificado
1	1-1-63	158-159	17-A-63	18-022	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	IMP/GIM
2	1-1-66	429-430	17-A-66	18-023	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	IMP/SPM
3	1-1-67	439-440	17-A-67	18-024	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	IMP/SPM
4	1-1-68	134	17-A-68	18-026	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
5	1-1-72	626	17-A-72	18-027	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
6	1-1-74	1151	17-A-74	18-028	<i>Serratia marcescens</i>	Positivo	NDM-1
7	1-1-76	1308-1309	17-A-76	18-029	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
8	1-1-77	1332	17-A-77	18-030	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
9	1-1-78	1445-1446	17-A-78	18-031	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
10	1-1-80	1803	17-A-80	18-032	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
11	1-1-81	857	17-A-81	18-033	<i>Escherichia fergusonii</i>	Positivo	NDM-1
12	1-2-1	19-48	17-B-1	18-034	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
13	1-2-3	2009	17-B-3	18-035	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
14	1-2-4	2026	17-B-4	18-036	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
15	1-2-6	721	17-B-6	18-037	<i>Serratia marcescens</i>	Positivo	NDM-1
16	1-2-7	2201	17-B-7	18-038	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
17	1-2-9	2396	17-B-9	18-039	<i>Serratia marcescens</i>	Positivo	NDM-1
18	1-2-12	3073	17-B-12	18-040	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	SPM
19	1-2-13	1324	17-B-13	18-041	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
20	1-2-15	3693	17-B-15	18-042	<i>Citrobacter freundii</i>	Positivo	NDM-1/SIM/IMP
21	1-2-16	3670	17-B-16	18-043	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
22	1-2-19	4063	17-B-19	18-044	<i>Serratia marcescens</i>	Positivo	NDM-1
23	1-2-24	4719	17-B-24	18-046	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	IMP
24	1-2-25	4735	17-B-25	18-047	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	NDM-1/IMP
25	1-1-73	1155	17-A-73	18-048	<i>Enterobacter cloacae</i>	Positivo	VIM/SPM
26	1-2-26	4599-4600	17-B-26	18-049	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	NDM-1
27	1-2-27	980	17-B-27	18-050	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	NDM-1

CARBAPENEMASAS ADQUIRIDAS

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

**MBL
METALOS**

VIM, IMP, SPM, GIM, SIM,
AIM, NDM, KHM, LIM, DIM

R a C3G y C4G
 S a AZT

Inh. por EDTA

Grupo 3

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

**SERINO
Enzimas**

KPC y GES:
 R a C3G, C4G y ATZ

Sme, IMI/NMC, BIC-1:
 S a C3G, C4G y AZT

Inh. por CLAV +/-
 Inh. por APB

Grupo 2f

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

OXAS

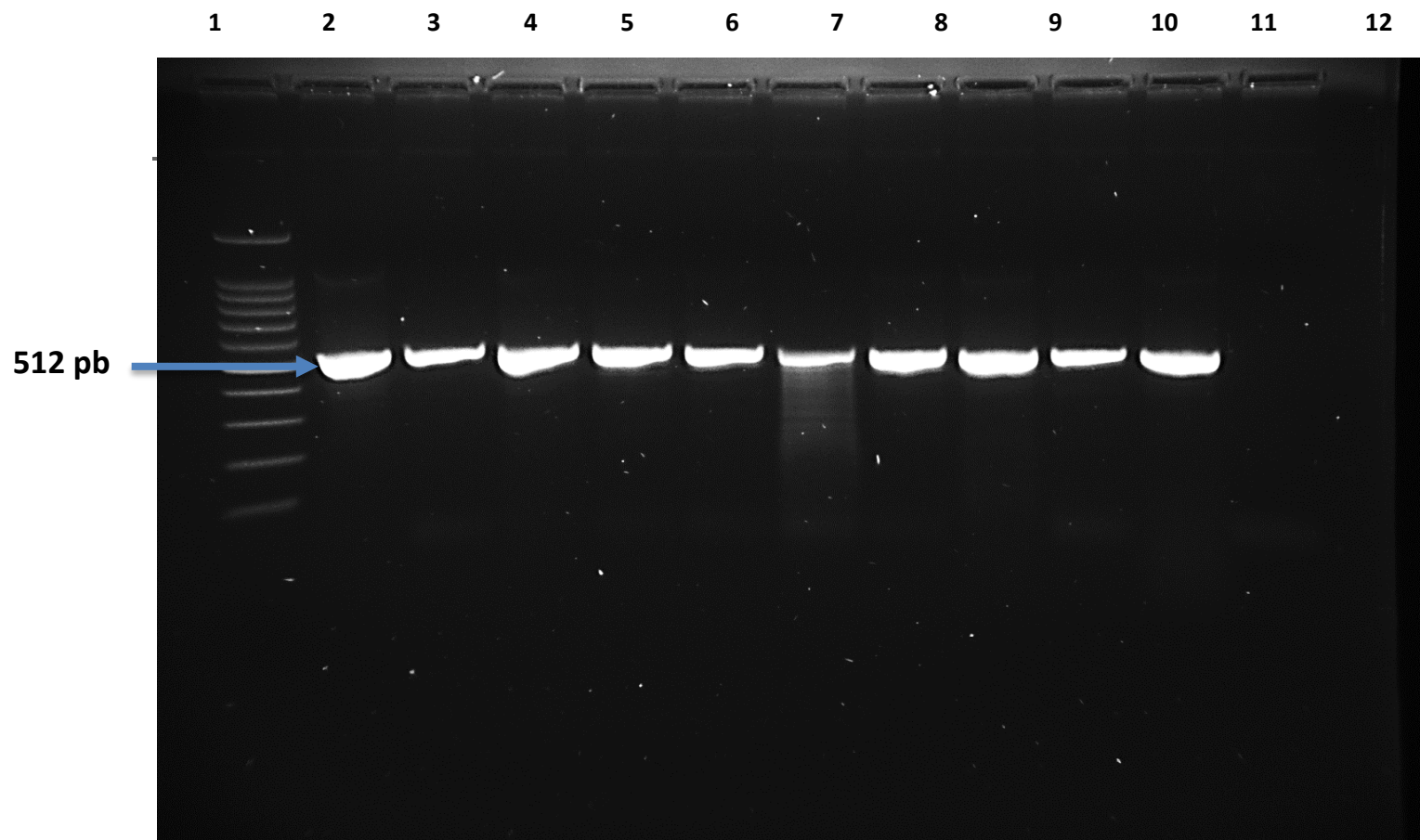
Gr. OXA-23, OXA-24,
 OXA-48, OXA-51, OXA-58,
 OXA-92, OXA-143

S a C3G, C4G y AZT

Sin inhibidores

Grupo 2df

Busk K, AAC 54:969; 2010



Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5%, gen detectado: Metalo- β -lactamasa Delhi.

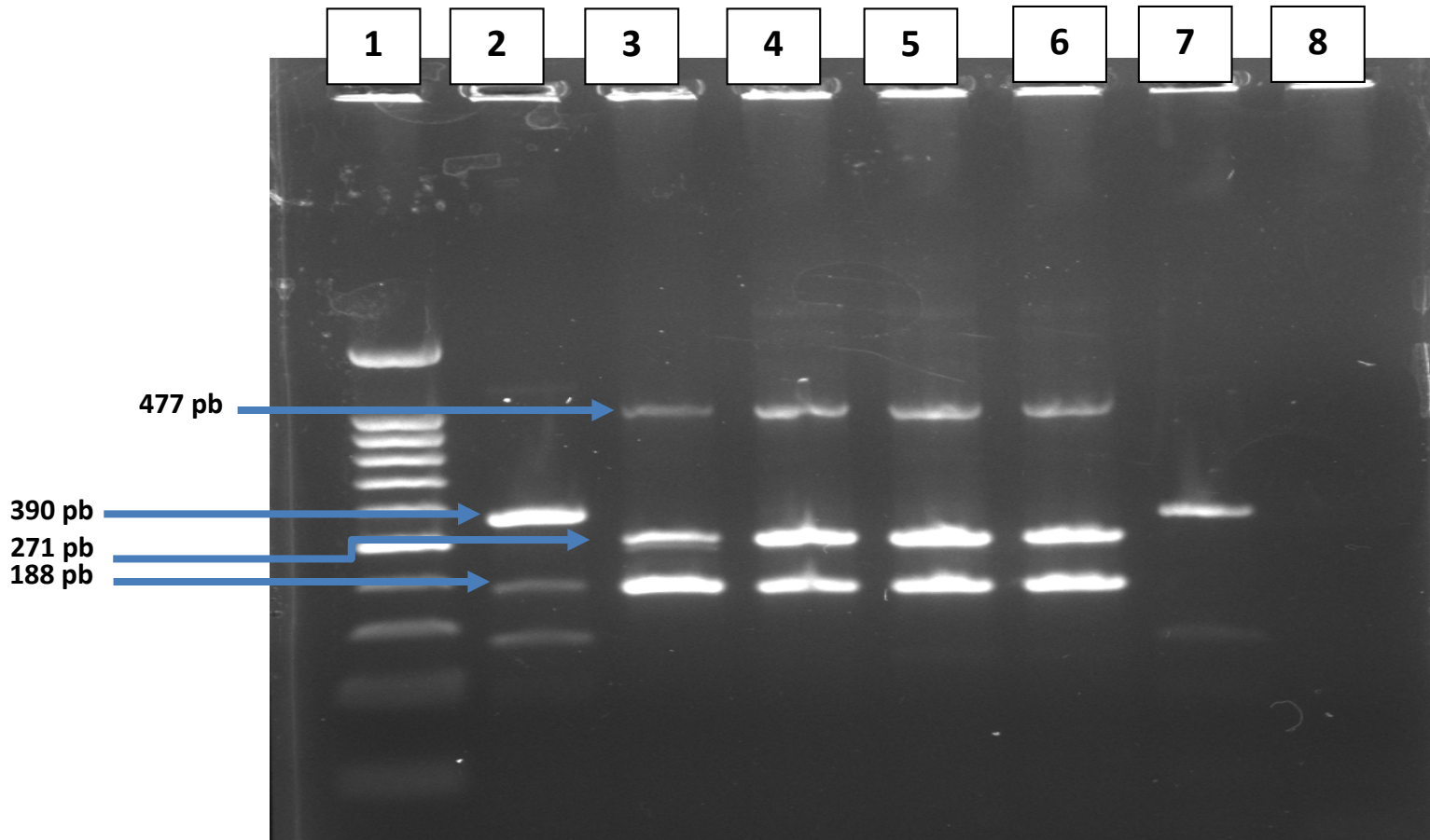
Peso Molecular: 512 pb.

Pozo 1: Marcador Molecular

Pozo 2: Control positivo

Pozos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: Cepas de enterobacterias analizadas.

Pozo 12: Control negativo interno (Agua libre de nucleasas).



Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5%, gen detectado: IMP, SPM, GIM

Peso Molecular: 188pb, 271pb, 390pb 477pb

Pozo 1: Marcador Molecular

Pozo 2: Controles positivos (VIM, IMP)

Pozo 3: Controles positivos (SIM, SPM, IMP)

Pozos 4, 5, 6, 7: Cepas de enterobacterias analizadas.

Pozo 8: Control negativo interno (Agua libre de nucleasas).