



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
“Luis Felipe Moncada”
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO

Monografía para optar al Título de:
Licenciatura en Microbiología

TEMA

Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018.

AUTORES

Br. Abraham Enoc Molina Morales
Br. Francisco Antonio García Herrera
Br. Braulio Renato Centeno Rizo

TUTOR

MSc. Oscar Heriberto Arbizú Medina
MSc. Microbiología Médica

Managua, marzo de 2019

GLOSARIO

A:

ABC: (ATP Binding Cassette)
ADN: ácido desoxiribonucleico
ADN bicatenario: ADN de doble cadena
AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulánico
AMK: Amikacina
APB: ácido fenil borónico

B:

β -lactámicos: beta-lactámicos
BGNF: bacilos Gram negativos no fermentadores
BLEE: beta-lactamasa de espectro extendido

C:

CAZ: Ceftazidima
CI: concentración inhibitoria
CIP: Ciprofloxacina
CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical & Laboratory Standards Institute)
CMI/CIM: concentración mínima inhibitoria
COL: Colistín
CRO: Ceftriazona

E:

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

F:

Fenotípico: rasgos visibles

G:

Genotípico: rasgos genéticos
GEN: Gentamicina

H

HAN: Hospital Alemán Nicaragüense

I:

IMP: Imipenem
In vivo: dentro de un organismo
Integrón: elemento genético móvil

K:

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

L:

Leucocitosis: aumento de leucocitos
Leucopenia: disminución de leucocitos
LVX: Levofloxacina

M:

MBL: metalo β -lactamasa
MEM: Meropenem
MNO: Minociclina

Morbilidad: cantidad de enfermos con respecto a la población total

Mortalidad: cantidad de muertos con respecto a la población total

MOX: Moxifloxacina

Mucinas: proteínas de las mucosas

N:

Neutropenia: disminución de los neutrófilos

NDM: New Delhi metalo β -lactamasa

Nosocomial: relativo a las infecciones intrahospitalarias

O:

Oliguria: disminución de producción de orina

OMP: Proteína de membrana externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

Operón: unidad genética compleja formada por un grupo de genes

Oportunista: patógeno que actúa solo ante deficiencia de defensas normales

Osteomielitis: inflamación de médula ósea y hueso

OXA: oxacilinas

P:

PBP: Proteína fijadora de penicilina (peniciline binding protein)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Periplásmico: espacio que envuelve al citoplasma

PIP: Piperacilina-Tazobactam

Plásmido: moléculas de ADN extracromosómico

Porina: proteína de membrana que forma canales

PRL: Piperacilina

R:

RPM: Revoluciones por minuto

S:

Saprófito: que obtiene alimento de materia orgánica

SAM: Ampicilina-Sulbactam

STX: Trimetoprim-Sulfametoxazol

T:

TBE: Tris borato EDTA/ disolución tampón para electroforesis

TG: Tigeciclina

Transpeptidasa: enzima necesaria para formación de membrana

Transposón: elemento genético móvil dentro de un genoma

TET: Tetraciclinas

TZP: Piperacilina-Tazobactam

U:

UCI: unidad de cuidados intensivos

UFC: unidades formadoras de colonias

V:

VITEK: Sistema de identificación bacteriana automatizado

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por habernos permitido culminar con éxito y habernos brindado en todo el camino la inteligencia y sabiduría necesaria para poder salir adelante.

A LA UNAN MANAGUA

Por haber facilitado los equipos y materiales para la realización de este estudio a través de la financiación del FPI de la UNAN Managua.

A NUESTROS DOCENTES

Por toda la enseñanza brindada a lo largo de los años. A nuestro tutor MSc. Oscar Arbizú Medina por su apoyo en la realización de esta investigación, así mismo a la Lic. Kenia García por su valioso apoyo en el Laboratorio de Biología Molecular. A todo el personal del Laboratorio y Departamento de Bioanálisis Clínico por su gran apoyo en la realización de la investigación.

AL HOSPITAL ALEMÁN NICARAGUENSE

Al Lic. Yader Lanzas del Laboratorio de Bacteriología del H. Alemán Nicaragüense, por su colaboración en la obtención y recogida de información de las cepas del estudio.

A NUESTROS FAMILIARES

Por su valioso apoyo y motivación a lo largo de todos estos años, así como para la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios por haberme permitido llegar hasta acá a pesar de las dificultades de la vida, por haberme dado la salud, tiempo, sabiduría, inteligencia y paciencia necesaria para poder culminar con éxito esta carrera.

A mi familia: mis padres Freddy Molina C. y Adriana Morales G., mi abuela Ángela Gallegos H. y a todos mis hermanos, por ese apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera, por sus valiosos consejos, palabras de aliento, felicitaciones y correcciones.

A todos los maestros que siempre me apoyaron de una u otra manera a lo largo de esta carrera, por sus regaños y felicitaciones en cada logro en el transcurso de mi carrera.

A mis compañeros de clase que me apoyaron de manera directa o indirectamente en todos estos años, por sus palabras de ánimo, consejos y sobre todo momentos compartidos, de igual manera a los que no pudieron graduarse con nosotros.

Abraham Molina M.

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 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018, 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.

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos constituye una problemática debido a la creciente diseminación de mecanismos de resistencia que pone en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, comprometiendo la salud de los pacientes afectados.

Los genes que codifican enzimas capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos incluyendo los carbapenémicos, las «carbapenemasas», han venido a reducir aún más las opciones terapéuticas que quedan disponibles en el mercado. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, son bacilos Gram negativos no fermentadores que han obtenido gran notoriedad debido a la adquisición de estos genes, y que comúnmente se relacionan con “infecciones asociadas a la atención en salud” (IAAS), con altos índices de morbilidad y mortalidad.

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal en el Hospital Alemán Nicaragüense, la muestra estuvo comprendida por 32 cepas, de las cuales 16 corresponden a *Pseudomonas aeruginosa* y 16 a *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados durante enero de 2017 a febrero de 2018; en el estudio se caracterizaron fenotípicamente 14 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y 7 cepas de *Acinetobacter baumannii*; y genotípicamente por PCR convencional a las 16 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* respectivamente.

En los resultados obtenidos para la parte fenotípica, se encontró un 71.4% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo para metalo- β -lactamasas, mientras que en *A. baumannii*, solo un 14.3 %; sin embargo, mediante la técnica de PCR convencional, se encontró la presencia de genes VIM y GIM en el 93.8% de las cepas de *P. aeruginosa*, aisladas con mayor frecuencia en secreciones bronquiales y hemocultivos, correspondiente al 26.7% en ambos casos; la sala mayormente afectada fue UCI-Pediátrica con un 40% de los aislamientos. En el caso de *A. baumannii* se encontró la presencia del gen New Delhi (NDM) en el 12.5% de las cepas, y los genes VIM y GIM en un 6.3%, de los cuales el 100% fueron aislados de hemocultivos; las salas de origen fueron UCI-Neonato, UCI-Adultos y Cirugía con un 33.3% respectivamente.

Este es el primer estudio en reportar la presencia de estos géneros bacterianos productores de metalo β -lactamasas que incluye todas las salas del Hospital Alemán Nicaragüense; es importante la realización de más trabajos que permitan un seguimiento de la epidemiología

de los genes de resistencia a los carbapenémicos, para contribuir con datos que den lugar al mejoramiento de la política para el control de resistencia antimicrobiana, reforzando las buenas prácticas de atención en salud y concientizando sobre el uso racional de los medicamentos.

Índice de contenido

GLOSARIO	0
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	5
4. Planteamiento del problema	7
5. Objetivos de la investigación	9
6. Marco teórico	10
6.1. Resistencia antimicrobiana.....	10
6.1.1. Resistencia a los carbapenémicos.....	10
6.1.2. Transferencia genética.....	11
6.1.3. Genes de resistencia enzimática ante carbapenémicos.....	12
6.2. Fármacos antibióticos.....	15
6.2.1. Antibióticos β -lactámicos.....	16
6.3. Bacilos Gram negativos no fermentadores.....	16
6.3.1. Generalidades del género <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
6.3.2. Factores de virulencia del género <i>Pseudomonas</i>	17
6.3.3. Patogenia del género <i>Pseudomonas</i>	18
6.3.4. Manifestaciones clínicas del género <i>Pseudomonas</i>	19
6.3.5. Mecanismos de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
6.3.6. Generalidades del género <i>Acinetobacter</i>	23
6.3.7. Factores de virulencia del género <i>Acinetobacter</i>	23
6.3.8. Patogenia del género <i>Acinetobacter</i>	24
6.3.9. Manifestaciones clínicas del género <i>Acinetobacter</i>	24
6.3.10. Mecanismos de resistencia de <i>Acinetobacter baumannii</i>	25
6.4. Métodos de detección de resistencia antimicrobiana	27
6.4.1. Métodos de difusión	27
6.4.2. Difusión en disco.....	28
6.4.3. Método de tiras Épsilon (E-Test)	28
6.4.4. Métodos de dilución	29
6.4.6. Métodos moleculares.....	31
7. Diseño metodológico	33
7.1. Tipo de estudio	33
7.2. Área de estudio.....	33
7.3. Universo	33

7.3.1. Muestra.....	33
7.4. Tipo de muestreo.....	33
7.5. Criterios de inclusión:	34
7.6. Criterios de exclusión:.....	34
7.7. Limitaciones del estudio.....	34
7.8. Métodos e instrumentos de recolección de datos	35
7.9. Procedimientos	35
8. Operacionalización de las variables.	41
9. Análisis y discusión de resultados.....	43
10. Conclusiones	57
11. Recomendaciones	58
12. Bibliografía	59
ANEXOS	65

1. Introducción

La resistencia bacteriana conlleva a la limitación de las opciones terapéuticas disponibles, siendo además un problema emergente puesto que antes se encontraban casos esporádicos, pero en los últimos años, en gran cantidad de trabajos investigativos se reporta cada vez más su presencia.

Uno de los grupos más relevantes en este contexto son los bacilos Gram negativos no fermentadores, cuyos principales representantes son los géneros *Acinetobacter spp* y *Pseudomonas spp*; estos se caracterizan principalmente por no fermentar carbohidratos, son aerobios, siendo *Pseudomonas* oxidasa positiva, y *Acinetobacter* oxidasa negativa (Carroll et al., 2016). Estos microorganismos se consideran oportunistas, ya que, en una persona con sus defensas normales, tienen limitada capacidad infectiva.

Dada su resistencia para permanecer en el ambiente hospitalario suelen infectar a pacientes internados, y sumado a la capacidad de desarrollar resistencia, complican el manejo de las infecciones ocasionadas por dichos patógenos (Vanegas et al., 2014). La gran relevancia de este grupo radica en que, en la actualidad se reportan con más frecuencia cepas resistentes a aminoglucósidos, quinolonas, polimixinas y carbapenémicos, algo verdaderamente alarmante debido al escaso desarrollo de nuevas alternativas de antibióticos en los últimos años, misma razón por la cual son asociados a infecciones graves y a mortalidad.

Para esta investigación se analizaron cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos, aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo comprendido por el estudio (enero 2017 – febrero 2018), con el objetivo de caracterizarlas fenotípicamente y genotípicamente para determinar la presencia de genes productores de metalo β -lactamasas, así como la frecuencia y distribución de estas.

2. Antecedentes

En el 2013, Ophelie & Molin Queste (2016), realizaron un trabajo sobre detección fenotípica de carbapenemasas en *P. aeruginosa* en el Hospital de Clínicas San Lorenzo, en Paraguay, encontrando un perfil de sensibilidad para cepas de *P. aeruginosa* portadoras de probable MBLs con 100% de resistencia a meropenem y 94% a imipenem. Así también se observó sensibilidad del 100% para colistina. Las muestras de las que se aislaron mayor porcentaje de microorganismos fueron orina (33%) y secreción traqueal (28%), los cuales provenían de UCIA (38%), Clínica Médica (28%), Urgencias Adultos (18%), Urología (5%), Traumatología (5%) y Consultorio (5%); datos alarmantes en la morbi-mortalidad de cada hospital ya que demuestran diseminación de este fenómeno que estaba limitado a unidades de cuidados intensivos.

Hernán Rodríguez, Nastro & Famiglietti (2018), en su estudio de: Carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii*. Revisión de su difusión en América Latina, revisan la epidemiología y la prevalencia de carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemes en aislamientos procedentes de países latinoamericanos, donde menciona que la aparición de OXA 72 y NDM-1 representa un hallazgo novedoso que se observa simultáneamente y sin relación clonal en diferentes países, algunos de los cuales son distantes entre sí.

Estudios acerca de la resistencia antimicrobiana que se encuentra en los hospitales de Nicaragua, ponen en manifiesto que esta situación en el país es alarmante, ya que hay aumento de la prevalencia de la resistencia en los aislamientos de los pacientes atendidos en las unidades de salud. Entre dichos estudios tenemos los siguientes:

Rojas, Silva & Zambrana (2004) en un estudio de expedientes realizado entre 2002 y 2003 de un hospital de Estelí sobre multirresistencia en bacterias Gram negativas, encontraron que *P. aeruginosa*, fue la bacteria Gram negativa más aislada, seguida de *A. baumannii* y otras bacterias Gram negativas, con una creciente resistencia en relación a otros estudios hacia cloranfenicol, cefalosporinas, trimetoprim sulfametoxazol y aminoglucósidos.

Cruz Blanco (2015) realizó un estudio de casos de infecciones por *A. baumannii* en el hospital La Mascota, Managua, utilizando datos de expedientes de un periodo comprendido entre el

año 2010 al 2014, donde se encontró un patrón de resistencia hacia carbapenémicos correspondiente a un 33.3% de los aislamientos en niños inmunocomprometidos. En otra población correspondiente a niños de áreas rurales donde el tracto respiratorio fue el más afectado y que además presentaban otras patologías, la proporción de probable carbapenemasa fue del 88.2%. El estudio encontró que la resistencia aumenta cada año, ya que en el 2010 la resistencia era del 12.8% y para el año 2014, esta había aumentado a 43.3%.

Arbizú Medina, et al. (2016) realizaron un estudio: Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en especies de *Enterobacteriaceae* aisladas de pacientes hospitalizados, en Managua, en el cual analizaron 249 cepas, entre las cuales se identificó a 45 cepas resistentes a los carbapenémicos, de estas cepas, 43 dieron positivo para el test de sinergia con EDTA; 21 portaban el gen de NDM. El 66% de metalo- β -lactamasa NDM 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%.

Jalinas Gavarrete (2016) realizó un estudio en el Hospital Humberto Alvarado de Masaya, donde aisló 15 tipos de microorganismos, predominando los Gram negativos, siendo *A. baumannii* y *P. aeruginosa* la tercera y cuarta bacteria más aislada respectivamente; el 12.5% de las cepas de *Pseudomonas* resultaron resistentes a carbapenémicos; en el caso de *Acinetobacter* la resistencia es de 50%. El autor compara esta situación con los casos a nivel internacional, indicando que los resultados son similares con respecto a la resistencia que aumento cada año, de un 0% en el 2004 a 20% en el 2005 y 40% en el 2006.

Pérez Mendoza (2016) realizó una tesis sobre los patrones de resistencia antimicrobiana en el Hospital Alemán Nicaragüense, centrada en el área de neonatología, comprendido de enero a diciembre del 2014, utilizando muestras para hemocultivo aisló un total de 138 cepas de distintos tipos de microorganismos, encontrando 25 cepas (18%) de Gram negativos no fermentadores, de las cuales el 17% presentaron resistencia a imipenem y meropenem.

Caldera & Robles (2017), en su trabajo de caracterización fenotípica de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes, obtuvieron 130 cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores, de las cuales *A. baumannii* fue el agente más frecuente con 68 aislamientos (62%), seguido de *P. aeruginosa* con 62 aislamientos (47,7%). Además, encontraron en *P.*

aeruginosa un 92% de MBL, y un 8% de posible OXA; para *A. baumannii* fue un 40% MBL y un 60% posible OXA.

3. Justificación

Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii*, están implicados principalmente en infecciones nosocomiales, gracias a que se encuentra en casi cualquier lugar dentro de un hospital, lo que hace fácil su diseminación y que sea adquirido por algún paciente. Para combatir las infecciones por estos microorganismos y por cualquier otro que cause una enfermedad, en pacientes hospitalizados son utilizados generalmente fármacos de amplio espectro, siendo el uso irracional de estos antibióticos una muy importante causa de la creciente aparición de bacterias multirresistentes, que implican mayor dificultad para combatirlos. Por lo antes mencionado, el tratamiento contra estas bacterias constituye un reto de salud a nivel mundial, con el constante riesgo de que se conviertan en microorganismos panresistentes (Fariñas & Martínez, 2013).

Según registros del HAN (2018), en el periodo de investigación comprendido por este estudio, del total de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas, se encontró con un 15% resistente a los carbapenémicos, y en *Acinetobacter baumannii* un 11.7%. Cabe destacar que en los últimos años los genes de carbapenemasas tipo metalo- β -lactamasas (MBL) han adquirido notoria importancia por su fácil y rápida diseminación y la forma en como comprometen la salud del paciente dejándolo con pocas o nulas opciones terapéuticas, por lo tanto, es de gran importancia detectar la presencia de estos genes en estos géneros bacterianos.

La utilización de técnicas moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la caracterización genotípica de la resistencia farmacológica, ha sido de gran ayuda para estudiar estos genes y poder clasificarlos. La implementación de esta técnica tiene un gran impacto en el control epidemiológico por los datos obtenidos en las investigaciones sobre farmacoresistencia gracias a las ventajas que provee dicho sistema, las cuales son su gran especificidad y la selectividad, además de la rapidez del análisis. Detectar la resistencia antimicrobiana lo más pronto posible podría disminuir las tasas de mortalidad por tratamientos ineficaces. De igual forma, conocer los genes implicados podría ser un indicativo para proveer un tratamiento, puesto que no todos los genes presentan mismo perfil de resistencia.

Con este estudio se pretende aportar datos que permitan que el Hospital Alemán Nicaragüense tenga mayor conocimiento de la epidemiología sobre los genes de resistencia a carbapenémicos, siendo la unidad de salud el beneficiario directo por el motivo antes mencionado, y de manera indirecta, los pacientes se verán beneficiados por las medidas que las autoridades del centro dispongan para mejorar la situación planteada. Además, permitirá continuar la línea investigativa en este centro con el grupo de microorganismos utilizados para este trabajo, y conocer de forma actualizada la prevalencia de las infecciones por microorganismos resistentes a carbapenémicos para fines de estudio.

4. Planteamiento del problema

Caracterización del problema

Los genes de resistencia productores de carbapenemasa constituyen una gran problemática debido a la habilidad de conferirles resistencia a las bacterias frente antibióticos de tipo carbapenem. Cabe destacar que no solo brindan resistencia a estos fármacos, sino que también a otras familias de antibióticos β -lactámicos como penicilinas y cefalosporinas. Esto es producto de que las bacterias han venido evolucionando y adaptándose a la presencia de diferentes antibióticos; puesto que antes de poseer resistencia a carbapenémicos, ya eran resistentes a penicilinas, es de esa manera por que los genes que dan resistencia a estas drogas también poseen resistencias a otras familias de antibióticos β -lactámicos.

Estos genes pueden ser cromosómicos o extracromosómicos (plásmidos, transposones, integrones), siendo el caso de los extracromosómicos más preocupante, debido a que están altamente implicados en la transmisión horizontal de genes de resistencia a otras bacterias que no pertenecen al mismo género.

En febrero del año 2017, la Organización mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, dividiéndolos en 3 niveles de prioridad: crítica, elevada y media. *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos, y *Enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenémicos y productoras de BLEE, son las que encabezan la lista, siendo consideradas como prioridad crítica.

Delimitación del problema

En el Hospital Alemán Nicaragüense se han venido aislando con mayor frecuencia cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores, entre ellos *P. aeruginosa*, seguido de *A. baumannii* con un perfil de resistencia alarmante. Para la caracterización de dicho perfil, en este hospital se ha venido realizando mediante Vitek 2 Compact® y Kirby Bauer, sin embargo, a través de esos métodos no es posible conocer los genes de resistencia implicados en estos brotes.

Esto constituye un inconveniente, ya que los genes de resistencia se transmiten a una gran cantidad de géneros y especies bacterianas, dando como resultado el incremento de las

probabilidades de adquirir una infección por una bacteria multirresistente, donde quienes tienen más riesgo son los pacientes que se encuentran en las áreas críticas dentro del medio hospitalario.

El controlar dicho proceso infeccioso para una bacteria multirresistente constituiría todo un desafío para el personal médico, puesto que las opciones terapéuticas se han reducido al mínimo.

Formulación del problema:

Por la temática antes planteada surge la siguiente interrogante:

¿Cuáles son las características fenotípicas y genotípicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018?

Sistematización del problema:

¿Cuáles son los mecanismos de resistencia fenotípicos a los carbapenémicos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* a través del método de Kirby-Bauer con triple disco modificado?

¿Cuáles son los genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasas tipo metalo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* a través de la técnica de PCR convencional?

¿Cuál es el perfil de resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productoras de metalo β -lactamasas?

¿Cuál es la frecuencia y distribución de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productoras de metalo β -lactamasas según microorganismo aislado, tipo de muestra y sala clínica del Hospital Alemán Nicaragüense?

5. Objetivos de la investigación

Objetivo General

- Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018.

Objetivos específicos

1. Identificar fenotípicamente mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* a través del método de Kirby-Bauer con triple disco modificado.
2. Detectar genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasas tipo metalo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* a través de la técnica de PCR convencional.
3. Evaluar el perfil de resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productoras de metalo β -lactamasas.
4. Describir la frecuencia y distribución de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productoras de metalo β -lactamasas según microorganismo aislado, por tipo de muestra y sala clínica del Hospital Alemán Nicaragüense.

6. Marco teórico

6.1. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana generalmente es infrecuente en una población bacteriana antes de ser expuesta a un compuesto, ante la exposición, estas bacterias mantienen su capacidad replicativa y de esta manera reemplaza a la población original con una resistente. Estos individuos resistentes son más virulentos que la población susceptible y en algunos casos su capacidad replicativa es más lenta. Es por ello que, si se suspende la presión selectiva, la población nativa sin resistencia puede recolonizar al paciente; por esa misma razón la resistencia antimicrobiana es menor en la comunidad que en los hospitales, ya que en los centros hospitalarios la presión selectiva nunca cesa. Los factores implicados tanto en la adquisición de resistencia como en la diseminación horizontal son: bajo nivel de higiene de las manos, contaminación de equipos, materiales y mobiliario, condiciones higiénico-sanitarias del centro hospitalario y el incumplimiento de las normativas de bioseguridad (Fica, 2014).

Además, el Dr. Fica (2014) comenta que la resistencia antimicrobiana puede ser explicada por numerosos mecanismos. Los más caracterizados y además prevalentes en bacterias Gram positivas y negativas, corresponden a sistemas enzimáticos de degradación o a modificaciones estructurales de la pared celular o de los sitios blancos en el citoplasma o ADN. Para los antibióticos más utilizados (β -lactámicos), la resistencia en bacilos Gram negativos es predominantemente enzimática.

6.1.1. Resistencia a los carbapenémicos

Los carbapenémicos han sido los antibióticos β -lactámicos de mayor actividad evadiendo la mayoría de los mecanismos de resistencia bacteriana y, generalmente, se reservan para el tratamiento de infecciones graves o para aquellas causadas por organismos resistentes a otros antibióticos.

La resistencia a esta familia de antibióticos por parte de las bacterias Gram negativas está mediada, generalmente, por combinaciones de mecanismos ya sean inherentes al microorganismo o conferidos mediante plásmidos y transposones. Rara vez participa un mecanismo único. Los principales mecanismos que intervienen en esta resistencia son:

modificación y desactivación enzimática, disminución en la expresión de porinas, bombas de eflujo y modificación del sitio blanco.

6.1.2. Transferencia genética

La transferencia genética juega un papel muy importante en el esparcimiento de genes de resistencia alrededor del mundo, principalmente la transferencia horizontal, ya que permite la transferencia de genes de resistencia a una especie bacteriana totalmente diferente, lo que termina incrementando la multiresistencia bacteriana.

Esta consiste en que el ADN puede transferirse de un organismo a otro, modificando de manera permanente la composición genética del organismo receptor, dándole la capacidad de llevar a cabo alguna nueva función. Este proceso se denomina transferencia genética lateral u horizontal para diferenciarla de la herencia (transferencia vertical). La transferencia genética horizontal se da mediante 3 mecanismos: conjugación, transducción y transformación (Carroll et al., 2016).

Murray, Rosenthal, & Pfaller (2016), los explican de la siguiente manera:

- **Conjugación**

Suele darse entre bacterias pertenecientes a una misma especie o de especies relacionadas, aunque también tiene lugar entre procariontas y células vegetales, animales y micóticas. Los plásmidos de resistencia antimicrobiana suelen transferirse mediante este mecanismo. El ADN pasa unidireccionalmente, de forma directa por contacto intercelular, a través del llamado pilus sexual. Las bacterias grampositivas que llevan a cabo una conjugación R (resistencia antibiótica), como los estreptococos, los estreptomicetos y los clostridios, se acercan por medio de una molécula de adhesina presente en la superficie de la célula donante en lugar de a través de un pilus. El tipo de acoplamiento depende de la presencia o ausencia de un plásmido conjugativo, como el plásmido F (factor de fertilidad). El plásmido F se transfiere a sí mismo, convirtiendo a las células receptoras en células macho (F+). El ADN transferido por conjugación es una molécula monocatenaria.

- **Transducción**

Está mediada por virus bacterianos (bacteriófagos) que captan fragmentos de ADN y los almacenan. El ADN suministrado a las células infectadas es luego incorporado al genoma bacteriano. La transducción puede clasificarse como especializada si los fagos en cuestión transfieren genes específicos (habitualmente los adyacentes a sus lugares de integración en el genoma) o generalizada si la selección de las secuencias es aleatoria debido al almacenamiento accidental del ADN. Las partículas de la transducción generalizada deben contener sobre todo ADN bacteriano y una cantidad pequeña o nula de ADN del fago. Cuanto más próximos se dispongan dos genes en el cromosoma bacteriano, mayor será la probabilidad de un proceso de cotransducción en el mismo fragmento de ADN.

- **Transformación**

Es el proceso mediante el cual las bacterias captan fragmentos de ADN desnudo en el medio y los incorporan a sus genomas. Este fue el primer mecanismo de transferencia genética descubierto en bacterias. Las bacterias Gram positivas y negativas son capaces de captar y conservar de forma estable ADN exógeno. Ciertas especies presentan una capacidad natural de captación de ADN exógena (por lo que se definen como «competentes»), como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Neisseria*. La competencia aparece al final de la fase logarítmica de crecimiento, un cierto tiempo antes de que la población bacteriana entre en la fase estacionaria. La mayor parte de las bacterias no muestra una capacidad natural de captación del ADN.

6.1.3. Genes de resistencia enzimática ante carbapenémicos

Según explican Suárez et al. (2006), los genes que median la resistencia son los siguientes:

- β -lactamasas tipo AmpC:

Confiere resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, Aztreonam, Cefamicinas (Cefoxitín y Cefotetán) e inhibidores de β -lactamasas. Presenta poca afinidad con los carbapenémicos, sin embargo, cuando la bacteria sintetiza grandes cantidades de la enzima, en conjunto con el cierre de porinas, permite que la bacteria hidrolice los carbapenémicos, presentando resistencia al antibiótico.

En algunas bacterias Gram negativas como en el caso de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* este gen se encuentra en los cromosomas, los cuales poseen un complejo sistema de regulación que permite sintetizar la enzima solo en situaciones necesarias.

- β -lactamasas tipo carbapenemasas:

Se han descrito dos tipos con base en estudios moleculares. Las primeras son enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, estas son las llamadas carbapenemasas tipo serina o serin-carbapenemasas. El segundo grupo son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática; estas son las denominadas metalo β -lactamasas.

La serin-carbapenemasa tipo GES-2 resulta de una sustitución de aminoácidos en el gen GES-1 (BLEE no derivado de SHV o TEM), lo que le confiere resistencia a carbapenémicos. Otra serin-carbapenemasa es la de clase D tipo OXA; se ha caracterizado principalmente en *A. baumannii*, y son predominantemente penicilinasas con gran poder hidrolítico ante oxacilina, e hidrolizan débilmente Imipenem y Meropenem. Algunas de ellas con particular importancia son OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58.

Entre las familias más importantes de las metalo β -lactamasas de clase B son VIM e IMP, los cuales son transferibles por encontrarse localizados en integrones. Estos confieren resistencia a oximino-cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos, aminoglucósidos y quinolonas, y presentan sensibilidad variable al Aztreonam, teniendo un mayor rango de resistencia antimicrobiana.

Según lo presenta Rueda (2014), la clasificación en general de las β -lactamasas es la siguiente:

- Grupo 1: Cefalosporinasas que no son inhibidas por ácido clavulánico. Tipo serina, clase C.
- Grupo 2: β -lactamasas generalmente inhibidas por ácido clavulánico. Tipo serina, clase A y D.
- Grupo 3: β -lactamasas pobremente inhibidas por ácido clavulánico, pero inhibidas por agentes quelantes. Clase B.
- Grupo 4: Penicilinasas no inhibidas por ácido clavulánico.

En sí, las carbapenemasas pueden englobarse de la siguiente manera (Rueda, 2014):

- Clase molecular B (Ambler), grupo funcional 3 (Bush & Jacoby):

Son metalo β -lactamasas que abarcan los genes VIM, NDM, IMP, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, DIM, FIM. Entre los microorganismos más representativos en este grupo de carbapenemasas se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, y los no fermentadores *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Las metalo β -lactamasas confieren resistencia a cefalosporinas de 3ra generación. Son inhibidas por EDTA.

El gen IMP fue la primera metalo β -lactamasa aislada, en 1991 en Japón, en cultivos de *Serratia marcescens* y *P. aeruginosa*. El gen VIM se identificó en el año 1997 en Italia (Verona) en un aislado de *P. aeruginosa*. La identificación de SPM se realizó en 1999 en Brasil (Sao Paulo) en un aislado clínico de *P. aeruginosa*. El gen GIM se detectó en Alemania (German), en diferentes aislados clínicos de *P. aeruginosa*. SIM se detectó en Corea (Seúl) en *A. baumannii* (Salvador Luján, 2017).

La metalo β -lactamasa NDM (New Delhi) es la más reciente, descrita por primera vez en el 2008, en un paciente sueco, el cual al retornar de la India presentó infección del tracto urinario por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos. En América Latina, el primer reporte se dio en el 2011 en cepas de *K. pneumoniae*, aislados de pacientes pediátricos en Guatemala, sin historial de viajes (Resurrección et al., 2017).

- Clase molecular A (Ambler), grupo funcional 2f (Bush & Jacoby):

Son enzimas tipo serina que abarcan los genes KPC, GES, SME, IMI, NMC. Son predominantes en enterobacterias, entre las cuales encontramos: *Enterobacter sp.*, *S. marcescens* (SME, IMI, NMC); *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter sp.*, *C. freundii*, *P. aeruginosa* (KPC); *P. aeruginosa* (GES). KPC y GES confieren resistencia a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación, además de resistencia a Aztreonam. Son inhibidas por APB.

- Clase molecular D (Ambler), grupo funcional 2d (Bush & Jacoby):

Son Oxacilinasas (del tipo serino) cuyos genes más representativos son OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143 y OXA-48. Más prevalente en *Acinetobacter spp* que en otras

bacterias. Presenta una hidrólisis a los antibióticos variable y posee la particularidad de no tener inhibidor.

6.2. Fármacos antibióticos

Los antibióticos se definen como sustancias provenientes de organismos vivos u obtenidos mediante síntesis química, que son capaces de matar bacterias o detener su desarrollo, y que además poseen una importante característica: toxicidad selectiva; esto significa que la toxicidad sobre el patógeno es mayor que la causada sobre el huésped (Morán, 2014).

Los antibióticos utilizados en terapia son bacteriostáticos o bactericidas, y en función de su sitio de acción, su estructura química y su naturaleza se pueden dividir en grupos. El manejo de la clasificación también ayuda a comprender el mecanismo adoptado por los microbios para volverse resistentes (Singh, 2016).

Los fármacos antibióticos tienen diversas clasificaciones. Molina (2015), de acuerdo al mecanismo de acción que presentan los antibióticos, los clasifica de la siguiente manera:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular
- Daño a la membrana plasmática
- Inhibición de la síntesis de proteína
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- Antimetabolitos
- Inhibidores de betalactamasas
- Antifúngicos

Otra clasificación muy utilizada agrupa a los antibióticos sobre la base de su estructura química y las denomina como familias o clases de antibióticos:

- Aminoglucósidos
- β -lactámicos
- Lincosamidas
- Macrólidos
- Quinolonas
- Rifamicinas
- Tetraciclinas

En cuanto a la clasificación de los β -lactámicos, estas se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos (Díaz, 2018).

6.2.1. Antibióticos β -lactámicos

Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que poseen en su estructura un anillo β -lactámico. Son los antibióticos más utilizados en todos los ámbitos, debido a su eficacia, baja toxicidad y amplio espectro terapéutico. Su mecanismo consiste en la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, actuando sobre el peptidoglicano, lo que produce la destrucción de la bacteria. Para ejercer su acción, deben llegar a su diana, las PBPs (proteínas de unión a penicilinas), que se sitúan en la parte externa de la membrana citoplasmática. Una vez alcanzadas, se unen a ellas de manera covalente, inactivándolas. Esto es debido a que poseen un anillo betalactámico en su estructura, lo que les hace similar al sustrato natural de estas proteínas (Lacueva, 2017)

6.3. Bacilos Gram negativos no fermentadores

Con el término de bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNF), se designa un grupo heterogéneo de microorganismos incapaces de fermentar diversos hidratos de carbono. Muchos de ellos se comportan como oportunistas y pueden causar infecciones graves. Actualmente, han cobrado notoria importancia por su incidencia en infecciones hospitalarias; se destaca en estos el hallazgo de especies como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*; de este último, *A. baumannii* es la especie que con mayor frecuencia se asocia a infecciones nosocomiales graves y a la muerte.

Los pacientes afectados por estos patógenos son capaces de producir un amplio abanico de presentaciones clínicas. El mayor problema en el manejo de estos pacientes viene dado por el hecho de que son microorganismos con una gran capacidad de adquirir múltiples mecanismos de resistencia que hacen que las opciones terapéuticas sean cada vez más limitadas (Hernández et al., 2014).

- **Factores de virulencia**

Los factores de virulencia se refieren a las propiedades (es decir, productos genéticos) que permiten que un microorganismo se establezca en o dentro de un hospedador y aumente su potencial para causar enfermedades. Los factores de virulencia incluyen toxinas, proteínas

que median la unión bacteriana, carbohidratos de la superficie celular y proteínas que protegen una bacteria, y enzimas hidrolíticas que pueden contribuir a la patogenicidad de la bacteria (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria, 2019).

Los bacilos Gram negativos no fermentadores están compuestos por una gran cantidad de géneros bacterianos, sin embargo, a continuación, solo se abordarán de los factores de virulencia en común de los 2 más importantes del género *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Murray et al. (2016), mencionan algunos de estos:

- Cápsula: Exopolisacárido mucoide; adhesina; inhibe la acción bactericida de los antibióticos; aumenta invasividad evitando fagocitosis.
- Lipopolisacárido (LPS): Actividad endotoxina.
- Fimbrias: Adherencia a las células epiteliales humanas.
- Exoenzimas: Rompimiento de moléculas de gran tamaño; aumenta invasividad.
- Fosfolipasa C: Hemolisina termolábil; media en el daño tisular; estimula la respuesta inflamatoria.

6.3.1. Generalidades del género *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonaceae*. Se trata de un bacilo Gram negativo no fermentador, con una longitud aproximada de 1 a 3 μm de largo y de 0,5 a 1 μm de ancho. Además, posee un flagelo polar constituido por una estructura proteica compleja que le proporciona movilidad en medios líquidos y respuesta a estímulos químicos. Se caracteriza por ser uno de los principales patógenos oportunista en los seres humanos. Posee un metabolismo aeróbico estricto, produce pigmentos cuando crece en cultivo, como por ejemplo la piocianina (color azul), la pioverdina (color verde-amarillo fluorescente), la piorrubina (color rojo) y la piomelanina (color negro) (MacQuhae, 2018).

6.3.2. Factores de virulencia del género *Pseudomonas*.

Incluyendo los factores de virulencia anteriormente descritos en el **Inciso 6.3.**, el género *Pseudomonas* posee ciertos factores específicos que no poseen otros géneros de bacilos Gram negativos no fermentadores. De acuerdo con Murray et al., entre los factores de virulencia que influyen en el proceso patogénico de *Pseudomonas* se encuentran:

- Piocianina: Altera la función ciliar; incrementa la liberación de IL-8, la cual estimula la respuesta inflamatoria; además media el daño tisular mediante producción de radicales de oxígeno tóxicos.
- Pili: funciona como adhesina.
- Exotoxina A: Inhibe síntesis de proteínas y además produce daño tisular (p. ej., piel, córnea); inmunosupresor.
- Exotoxina S: Inhibe la síntesis de proteínas; también es inmunosupresor.
- Citotoxina (leucocidina): Citotóxica para las membranas de células eucariotas (p. ej., altera la función leucocitaria y produce lesiones en el lecho microvascular del pulmón).
- Elastasa: Enzima que produce destrucción de los tejidos que contienen elastina (p. ej., vasos sanguíneos, tejido pulmonar, piel), colágeno, inmunoglobulinas y factores del complemento.
- Proteasa alcalina: Causa destrucción tisular, inactivación del interferón y del factor de necrosis tumoral α .
- Ramnolípido: Es una hemolisina termoestable que altera los tejidos que contienen lecitina, además inhibe la actividad ciliar del pulmón.
- Resistencia antibióticos: Dificulta el tratamiento antimicrobiano.

6.3.3. Patogenia del género *Pseudomonas*.

P. aeruginosa es patógena sólo cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales, por ejemplo, por lesión directa del tejido; cuando se utilizan catéteres intravenosos o sondas urinarias; o cuando hay neutropenia, como en el caso de quimioterapia antineoplásica. La bacteria se adhiere a las mucosas o la piel y las coloniza, produce invasión local y enfermedad sistémica. Estos procesos son favorecidos por las fimbrias, las enzimas y las toxinas antes descritas. El lipopolisacárido desempeña un papel directo en la producción de fiebre, choque, oliguria, leucocitosis y leucopenia, coagulación intravascular diseminada y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (Carroll et al.).

6.3.4. Manifestaciones clínicas del género *Pseudomonas*.

La sintomatología de las infecciones por *Pseudomonas* varía dependiendo del tipo de infección y el lugar de la misma.

Si se trata de una infección en el tracto respiratorio, dentro de las manifestaciones puede notarse una tos crónica, pérdida del apetito, sibilancias en el pecho cuando se respira, pérdida de peso, confusión, escalofríos y dificultad para respirar, lo que hace que el color de la piel se vea más azulado (Melaine, 2017).

Entre los síntomas de una infección en las válvulas cardíacas se incluyen: fiebre, soplo, fatiga, líquido en los pulmones, retención de líquidos, mareos, debilidad, y el ritmo cardíaco acelerado e irregular. Entre los síntomas de una infección en el oído se encuentran el dolor, la picazón, la supuración, la inflamación, la fiebre, la sensibilidad extrema y la parálisis de los nervios del rostro. Los síntomas de una infección ocular incluyen el dolor, el enrojecimiento, la inflamación y los problemas en la vista. Las uñas verdes, el olor frutado, el pus verde azulado, la picazón y las lesiones, son síntomas de una infección en la piel (Caldwell, 2017).

En el caso que el trastorno se encuentre en el sistema nervioso central, se percibe el desarrollo de fiebre alta, rigidez en la espalda y en el cuello, fuertes dolores de cabeza y confusión. En cambio, si la alteración está presente en los huesos y articulaciones puede sentirse inflamación y malestar en el lugar afectado, además de la fiebre y el dolor, principalmente en el cuello y la espalda. Si la alteración por *Pseudomonas* es gastrointestinal, los síntomas que se hacen presentes destacan la irritabilidad, vómitos, diarrea, migraña, deshidratación, fiebre, molestias abdominales y distensión estomacal (Melaine, 2017).

6.3.5. Mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Las infecciones por *P. aeruginosa*, acarrea una limitada existencia de agentes antimicrobianos efectivos debido a la elevada resistencia intrínseca que presenta a diferentes familias de antimicrobianos como: Aminopenicilinas, Aminopenicilinas combinadas con inhibidores, cefalosporinas de 1º y 2º generación, Cefamicinas, Ertapenem, Trimetoprim Sulfametoxazol, Tetraciclinas, Cloranfenicol, Macrólidos, Glucopéptidos, antiguas Quinolonas, Novobiocina y Nitrofurantoína. Esta resistencia natural, es debida a que *P. aeruginosa* posee una β -lactamasa cromosómica inducible de tipo AmpC, a la presencia de

una membrana poco permeable y a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos. Además, este microorganismo tiene una elevada capacidad de adquirir resistencia mediante diversos mecanismos a los antibióticos (Gonzales, 2018).

Según Guevara (2015), los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos encontrados en *P. aeruginosa* pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Resistencia intrínseca:

Mecanismos de resistencia naturales en los miembros de una especie bacteriana determinada, los cuales se expresan independientes a la exposición a los antibióticos. Estos mecanismos en *P. aeruginosa* son: impermeabilidad de la membrana externa, bombas de eflujo y producción de enzimas degradadoras o modificadoras de antibióticos.

- Resistencia adquirida:

Implica la adquisición de información genética nueva, bien sea a través de mutaciones en el genoma bacteriano o por inserción de elementos extracromosomales como plásmidos, transposones o integrones, que contienen genes que codifican diversos mecanismos de resistencia: desrepresión de β -lactamasas tipo AmpC, pérdidas de porinas, sobreexpresión de bombas de eflujo, modificación de las proteínas de unión a las penicilinas (PBP), producción de enzimas degradadoras y modificadoras de antibióticos, modificación del sitio de acción del antimicrobiano.

- Resistencia a los β -lactámicos

Para ejercer su acción antimicrobiana los β -lactámicos requieren penetrar la pared celular y atacar las PBP, en el caso de *P. aeruginosa* este proceso se torna más difícil, ya que presenta lipopolisacáridos en su membrana externa, que dificulta la penetración del fármaco, además de esto, *P. aeruginosa* carece de porinas de alta permeabilidad que permitan el ingreso del fármaco dentro de la célula. Por esto sólo algunos β -lactámicos presentan actividad frente al microorganismo (Gonzales, 2018).

- Impermeabilidad de membrana y pérdida de porinas

La membrana de *P. aeruginosa* contiene aproximadamente 64 porinas las cuales conforman canales. Estas porinas se han agrupado en tres familias principales: las porinas OprD específicas. OprM de eflujo/secreción y las TonB dependientes. Las porinas más estudiadas

en *P. aeruginosa* son: OprB, OprC, OprD, OprE, OprF, OprJ, OprM, OprN, las cuales limitan el paso de sustratos a través de la membrana externa. Dentro de este grupo de porinas, la OprF es la que se encuentra en mayor proporción y la principal responsable de conferirle a la membrana características de impermeabilidad. La porina OprD, se considera la más importante desde el punto de vista clínico, ya que permite el paso de los carbapenémicos hacia el citoplasma, pero no permite el paso de otros β -lactámicos. Las porinas OprJ, OprM y OprN son de tipo inducible y generalmente están unidas a proteínas transportadoras formando bombas de eflujo (Guevara, 2015).

Igualmente, Guevara (2015) continúa explicando que la disminución de las porinas puede elevar la concentración inhibitoria mínima de diferentes antibióticos. La pérdida de la porina OprF, ocasiona una ligera elevación de la CIM de los β -lactámicos y las Fluoroquinolonas, mientras que la ausencia de la porina OprD eleva la CIM de Imipenem.

- Bombas de eflujo

Son sistemas utilizados para remover del espacio intracelular, productos tóxicos para el microorganismo. Las bombas de eflujo conocidas hasta ahora pertenecen a 6 familias llamadas por sus siglas en inglés como: MFS (Major Facilitator, Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance Modulation Cell Division), MATE (Multidrug and Toxic Compounds Extrusion), ABC (ATP Binding Cassette) y DMT (Drug/Metabolite Transporter). *P. aeruginosa* posee genes que codifican 5 de las 6 familias de bombas conocidas, pero con predominio de las pertenecientes a las RND. Las bombas de eflujo de la familia RND están conformadas por tres elementos, una proteína transportadora ubicada en la membrana interna o citoplasmática (MexB, MexD, MexF, MexY etc), una porina ubicada en la membrana externa (OprM, OprJ, OprN, OprD) y una proteína periplásmica accesoria (Mex A, Mex C, Mex E, Mex X etc), cuya función es unir en una estructura a los componentes de la bomba. Las bombas de eflujo están ubicadas entre la membrana interna y la externa y el espacio periplásmico. Actualmente en *P. aeruginosa*, se han identificado once sistemas de eflujo pertenecientes a la familia RND: Mex AB-OprM, Mex CD-OprJ, Mex EF-OprN, Mex XY, Mex JK etc. Los genes que codifican los sistemas de eflujo pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o en elementos transmisibles como plásmidos, estos genes están organizados como un operón (Guevara, 2015).

- β -lactamasas

Son enzimas con capacidad de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico, lo cual confiere resistencia a la bacteria, siendo capaz de inactivar a diversos antibióticos como: cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Estas enzimas se encuentran codificadas en plásmidos, lo que les otorga la capacidad de diseminación entre distintas cepas lo que ha provocado que se hayan difundido a nivel mundial en pocos años (Bolaños & Iannacone, 2017).

P. aeruginosa posee β -lactamasas tipo AmpC de origen cromosómico, la misma que al sobre expresarse gracias a un mecanismo complejo de interacción y mutación de varios genes, otorga a esta bacteria resistencia frente a la mayoría de antibióticos β -lactámicos. Las β -lactamasas tipo BLEE, codificadas por plásmidos se adquieren mediante transporte de ADN extracromosomal, se manifiestan también por resistencia a penicilinas y a cefalosporinas, y por último carbapenémicos. El AmpC cromosómico inducible de *P. aeruginosa* se produce a bajos niveles de manera natural y aumentan su síntesis en presencia de inductores β -lactámicos. Cuando la producción de AmpC está aumentada de forma significativa, se expresa resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos con la excepción de los carbapenémicos (Bolaños & Iannacone, 2017).

- Carbapenemasas

Hidrolizan carbapenémicos y en su gran mayoría hidrolizan casi todos los β -lactámicos. Se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo al mecanismo hidrolítico de su sitio activo, el primer grupo son las carbapenemasas que poseen serina, en este grupo encontramos las carbapenemasas clase A y clase D (Oxacilinasas). El segundo grupo son las carbapenemasas metalo β -lactamasas (MBL) las cuales necesitan átomos de zinc; que es utilizado como metal cofactor para su actividad enzimática, también son conocidas como carbapenemasas clase B (Bolaños & Iannacone, 2017).

- Oxacilinasas

La producción de oxacilinasas estaba restringida a muestras de *Acinetobacter spp.* Sin embargo, la producción de OXA-40 también ha sido aislada de *P. aeruginosa* últimamente (Gonzales, 2018).

- Serino-carbapenemasas

Han sido identificadas principalmente en *E. cloacae*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*, aunque también se han detectado en no fermentadores como *P. aeruginosa*. Las primeras enzimas tipo KPC fueron encontradas en plásmidos, son predominantes en *K. pneumoniae*, y rara vez en *A. baumannii* y *P. aeruginosa*; en este último microorganismo la enzima KPC ha sido detectada tanto en plásmido como en cromosoma (Bolaños & Iannacone, 2017).

- Metallo- β -lactamasas

Son producidas constitutivamente por algunas especies bacterianas como: *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas spp* y *Crhyseobacterium meningosepticum*. A partir de la década de los 90', genes que codifican MBL, conocidas como MBL móviles o adquiridas, han sido descritos en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y algunas enterobacterias y están en general localizados o asociadas a estructuras genéticas móviles. Entre las clases MBLs adquiridas, IMP, VIM, SPM, GIM y AIM, han sido identificadas en *P. aeruginosa* (Gonzales, 2018).

6.3.6. Generalidades del género *Acinetobacter*

Las acinetobacterias son cocobacilos anchos Gram negativos, inmóviles y oxidasa negativos, que se desarrollan como aerobios estrictos. Crecen como saprófitos ubicuos en la naturaleza y en el entorno hospitalario. Sobreviven en las superficies húmedas, como los equipos de terapia respiratoria, y en las superficies secas como la piel del ser humano. Estas bacterias forman también parte de la microbiota bucofaríngea normal de un pequeño número de individuos sanos, y pueden crecer hasta alcanzar un número elevado durante la hospitalización (Murray et al.,).

6.3.7. Factores de virulencia del género *Acinetobacter*

En el **Inciso 6.3.** se mencionaron algunos de los factores de virulencia que poseen en común las bacterias Gram negativas no fermentadoras, a continuación, se explican los factores que poseen en específico el género *Acinetobacter*.

- Butirato esterasa, Caprilato esterasa y Leucin arylamidasa: Permite hidrolizar ácidos grasos de cadena cortas causando daño tisular a nivel de lípidos.
- Secreción de sideroforos: Captación de hierro.

- Producción de slime/limo: Litotoxicidad e inhibición y migración de neutrófilos, aumentando la virulencia de otras bacterias en infecciones mixtas.
- OMPs: Traducción de señales, adhesión y patogénesis.
- Superficie hidrofóbica: Provee protección frente a la fagocitosis y adhesión a células hospederas.

6.3.8. Patogenia del género *Acinetobacter*

Pilatasig & Cecibel (2016) citan a Quintero (2014) al hablar sobre la patogenia de *Acinetobacter*, aludiendo que la infección por cepas de *A. baumannii* depende de factores inherentes al huésped, como: inmunodeficiencias y quemaduras; entre otros factores externos tenemos: el ingreso prolongado en el hospital (sobre todo UCI), contacto con los instrumentos contaminados: ventilación mecánica, dispositivos intravasculares y tratamientos previos con antibióticos de amplio espectro.

La poca cantidad de factores de virulencia que poseen estas bacterias, determina que sean patógenos oportunistas. El desarrollo de *Acinetobacter* en medios con pH ácido y baja temperatura favorece la invasión de tejidos desvitalizados. Hasta el momento, no se ha detectado ninguna citotoxina producida por estos microorganismos. La adherencia a las células epiteliales y las mucinas, mediadas o no por fimbrias o polisacáridos capsulares, son factores de virulencia que pueden jugar un papel importante en la colonización de los tejidos de los pacientes susceptibles. Los factores que favorecen la supervivencia de *Acinetobacter* son: la producción de bacteriocina, la presencia de cápsula, y la viabilidad prolongada de las bacterias en un medio seco. La resistencia a los antimicrobianos contribuye a la supervivencia y diseminación de estas cepas en los hospitales. En personas con mecanismos de defensa normales, *Acinetobacter* desempeñan un papel muy limitado en el desarrollo de infección (Acosta, 2017).

6.3.9. Manifestaciones clínicas del género *Acinetobacter*

De acuerdo con Álvarez (2018), *A. baumannii* puede presentar las siguientes manifestaciones clínicas:

- La manifestación clínica más común de la infección por *A. baumannii* es la neumonía adquirida en el hospital y está asociada a pacientes con ventilación mecánica ingresados en la UCI.
- La neumonía adquirida en la comunidad debido a *A. baumannii*, suele estar relacionada con problemas previos del paciente como el alcoholismo, tabaquismo, enfermedad pulmonar crónica y diabetes mellitus.
- La bacteriemia es otra de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la infección nosocomial por *A. baumannii*. El origen suele ser infecciones del tracto respiratorio inferior o de dispositivos intravasculares, aunque también pueden ser heridas e infecciones del tracto urinario.
- La infección de tejidos blandos y de piel por *A. baumannii* ha producido casos de celulitis o fascitis necrotizante. Dentro también se han descrito casos en aislamientos de osteomielitis. Se ha descrito un incremento en los casos de meningitis producidas por *A. baumannii* principalmente en pacientes que se recuperan de neurocirugías.

6.3.10. Mecanismos de resistencia de *Acinetobacter baumannii*

La multirresistencia de *A. baumannii* normalmente se asocia a la adquisición de genes que confieren resistencia. Si bien diversas β -lactamasas tanto de amplio espectro como de espectro extendido han sido descritas en este microorganismo, la principal resistencia a β -lactámicos se relaciona con la hiperproducción de la cefalosporinasa cromosómica (AmpC) asociada a la presencia de ISAbal en el promotor del gen bla_{ampC}.

Los mecanismos documentados de resistencia antibiótica consisten en la producción de enzimas que tienen facultad de alterar los aminoglucósidos y β -lactamasas de amplio espectro, alteraciones cualitativas y cuantitativas de las porinas de membrana externa y alteración de las proteínas fijadoras de penicilinas. La resistencia se ha atribuido a plásmidos, transposones y cromosomas. La inducción de β -lactamasas de amplio espectro durante el tratamiento con cefalosporinas ha determinado que algunos autores recomendasen evitar por completo esta clase de antimicrobianos (Acosta, 2017).

- **Mecanismos de resistencia natural**

A. baumannii posee una cefalosporinasa tipo AmpC no inducible denominada ADC (del inglés: Acinetobacter-derived cephalosporinase), siendo éste el mecanismo de resistencia

más frecuente de esta bacteria a los β -lactámicos. La sobreexpresión de ADC está mediada por la presencia de secuencias de inserción que contienen promotores que favorecen la transcripción del gen, como la ISAbal e ISAbal25. Se estima que aproximadamente 50% de las cepas de *A. baumannii* tienen hiperproducción de ADC. Cuando esta enzima se expresa en bajo nivel confiere resistencia a ampicilina; sin embargo, cuando está sobre expresado produce resistencia a cefalotina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, sin afectar carbapenémicos, ni Cefepime. Algunas de estas enzimas (ADC-33 y ADC-56) han sido consideradas como AmpC de espectro extendido o ESAC (del inglés: extended-spectrum AmpC), por lo que pueden hidrolizar también Cefepime (Vanegas et al., 2014).

Además de los mecanismos mencionados anteriormente Vanegas et al. (2014), explican lo siguiente: “otro mecanismo de resistencia intrínseco en *A. baumannii* es la presencia de la oxacilinas OXA-51, cuya expresión basal hidroliza débilmente penicilinas y carbapenémicos; (...) mediada por la secuencia de inserción ISAbal en un mecanismo similar a la AmpC cromosómica” (p. 236).

- **Mecanismos de resistencia adquiridos**
 - **Resistencia a antibióticos β -lactámicos**

Al igual que en el caso de *Pseudomonas*, cinco de los 6 mecanismos enzimáticos adquiridos han sido identificados en *A. baumannii* (IMP, VIM, SIM, SPM y NDM). Las β -lactamasas de clase D u oxacilinasas son las que se describen con mayor frecuencia en cepas de *A. baumannii*, siendo las principales OXA-24, OXA-23, OXA-51 y OXA-58. Estas enzimas pueden estar codificadas en plásmidos, excepto OXA-51, codificada en el cromosoma bacteriano y con frecuencia usada como marcador de especie (Vanegas et al.,).

En resistencia a β -lactámicos se han encontrado mecanismos no enzimáticos, entre los cuales se encuentran cambios en las proteínas de membrana externa OMPs, bombas de eflujo multifármaco y alteraciones en la afinidad o expresión de las proteínas de unión a penicilina PBP. Poco se sabe acerca de las porinas de la membrana externa de *A. baumannii*, recientemente se estableció que la proteína CarO, se asocia con resistencia a Imipenem y Meropenem. Diversos estudios señalan que el genoma de cepas *A. baumannii* multirresistentes codifica una amplia gama de sistemas de bomba eflujo multifármaco. La bomba de tipo familiar AdeABC es la mejor estudiada hasta el momento y favorece

resistencia a β -lactámicos, carbapenémicos, aminoglucósidos, Eritromicina, Cloramfenicol, tetraciclinas, fluoroquinolonas y Trimetoprim. AdeABC es cromosómicamente codificada y, normalmente, está regulado por un sistema de dos componentes, un sensor quinasa (AdeS) y su regulador de respuesta asociado (Rodríguez et al., 2016).

- **Resistencia a colistina**

La resistencia a colistina ha sido asociada con los genes pmrA y pmrB que originan cambios en genes relacionados con la modificación del lípido A, con la pérdida o deficiencia de la producción de lipopolisacárido y con la modificación de la porina OmpW

6.4. Métodos de detección de resistencia antimicrobiana

Las pruebas de detección de resistencia antimicrobiana son una de las tantas armas con las que se cuenta en un laboratorio para ayudar a los profesionales en medicina controlar los procesos infecciosos que se desarrolla en los pacientes y mejorar la calidad de vida de este último. No hay un método estandarizado que se use de manera internacional y que sea único, por lo tanto, hay una gran variedad de pruebas para la detección de la resistencia antimicrobiana.

Para efectuar los diferentes ensayos de sensibilidad, García (2014) menciona las siguientes técnicas: Métodos de difusión (difusión en disco, E-Test); Métodos de dilución (macro dilución en caldo, micro dilución en caldo, dilución en medio sólido con agar); Otros métodos (Métodos moleculares, Métodos automatizados).

6.4.1. Métodos de difusión

Las técnicas fenotípicas son las más utilizadas en los laboratorios clínicos para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, en las que prueba directamente la interacción entre microorganismo y antimicrobiano. Uno de estos métodos es el de difusión, en los que el antimicrobiano se encuentra en un disco, tableta o tira con una concentración determinada, el cual se coloca en un plato de cultivo previamente inoculado, difundiéndose en el medio y formando un gradiente de concentración luego del periodo de incubación (Martínez L. , 2016).

6.4.2. Difusión en disco

Los ensayos de difusión en disco implican colocar múltiples discos impregnados con antibióticos en una superficie de agar inoculada con bacterias y medir el diámetro de las zonas de inhibición para determinar cualitativamente la susceptibilidad a los antibióticos (Syal et al., 2017).

Fundamento: Las pruebas de difusión en disco consisten en depositar, en la superficie del agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel impregnados con diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición si la cepa bacteriana es sensible. (López, 2016)

6.4.3. Método de tiras Épsilon (E-Test)

La prueba de Epsilometer (E-Test) es un método de "gradiente exponencial" de determinación de resistencia antimicrobiana. La E-Test se ha desarrollado para proporcionar una cuantificación directa de la susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos. Este es un método cuantitativo que aplica tanto la dilución del antibiótico como la difusión del antibiótico en el medio (Acharya, 2015).

Fundamento: Acharya (2015), explica el fundamento de esta prueba de la siguiente manera: el dispositivo consiste en un gradiente predefinido, continuo y exponencial de concentraciones de antibióticos inmovilizados a lo largo de una tira de prueba de plástico rectangular. Después de 48 horas de incubación, una zona de inhibición en forma de gota cruza la tira reactiva graduada en la concentración inhibitoria (CI) del antibiótico.

Un gradiente antimicrobiano estable predefinido está presente en una delgada tira de plástico inerte no porosa de 5 mm de ancho, 60 mm de largo conocida como tira E-test. Cuando la E-Test se aplica sobre una placa de agar inoculada, se produce una liberación inmediata del fármaco y el establecimiento de un gradiente de concentración antimicrobiana en un medio de agar. Después de la incubación durante la noche, las pruebas se leen viendo las tiras desde la parte superior de la placa, se produce una elipse de inhibición simétrica. La intersección

de la parte inferior del área de inhibición del crecimiento en forma de elipse con la tira de prueba indica el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

6.4.4. Métodos de dilución

Están basadas en valorar la inhibición del crecimiento bacteriano en una batería de tubos o placas con medio de cultivo que representan un rango de concentraciones del antimicrobiano a estudiar. A tal efecto, se preparan en el medio de cultivo adecuado (caldo o agar) diluciones del antimicrobiano, habitualmente en una escala discontinua de progresión geométrica en base 2; con posterioridad se inoculan los tubos o placas para permitir el crecimiento, y tras ello se realiza la lectura observando en qué concentración sobreviene la inhibición del microorganismo, lo que permite definir la CMI del antimicrobiano en cuestión. Cuando se emplea un medio líquido, además, se puede determinar la actividad bactericida realizando un subcultivo de los medios sembrados previamente en un medio de cultivo nuevo que no tenga antimicrobiano (Martínez, 2016).

- **Macro dilución en caldo**

Para el ensayo de macrodilución en caldo, se realiza una serie de diluciones del fármaco en caldo en tubos de ensayo y se agrega el mismo número de células de una cepa bacteriana de prueba a cada tubo. La CIM se determina al examinar los tubos para encontrar la concentración más baja de fármaco que inhibe el crecimiento visible (Lumen microbiology, 2016).

Fundamento: Es un método que determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antibióticos en los cuales los medios de crecimiento se pipetean en un tubo de ensayo. Cada tubo contiene una concentración conocida de fármaco y se inocula con una cantidad conocida de bacterias. Los tubos se incuban durante un período de tiempo específico y cada uno se evalúa para determinar el crecimiento de células bacterianas. La concentración de fármaco en el primer tubo que no muestra crecimiento se conoce como CMI para ese antibiótico (Semantic scholar, 2018).

- **Micro dilución en caldo**

En cuanto al concepto de esta técnica, García J. (2014) lo explica como una técnica donde se utiliza un medio líquido, en el cual se realizan diluciones en placas de micropocillos en lugar de tubos, en los cuales hay concentraciones crecientes de un antibiótico.

Fundamento: La micro dilución en caldo utiliza pozos de microtitulación rellenos con concentraciones de antibióticos en series de doble dilución para determinar la CMI. Esto es generalmente realizado en un formato de 96 pocillos que permite probar hasta 12-15 antibióticos simultáneamente. Las pruebas se pueden leer manualmente o de forma automatizada utilizando máquinas especializadas (Luc, 2015).

- **Dilución en medio solido con agar**

El método de dilución en agar se utiliza para la determinación de la CMI de compuestos antimicrobianos. Siguiendo las pautas estandarizadas, las bacterias anaeróbicas o aeróbicas se siembran en un medio de agar nutritivo, que se complementa con diferentes concentraciones de agentes antimicrobianos. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se cuentan luego de 48 h de incubación. Este método tiene una función simple y rentable (Schumacher et al., 2017).

Fundamento: Se basa en la preparación de una serie de placas de agar a las cuales se agrega el antimicrobiano a probar, en distintas concentraciones incluidas en el medio. Luego cada una de dichas placas se inocula con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio (Mc Farland 0.5). Las placas se examinan después de incubar por 18 a 24 horas a 35° C: se observa si hubo crecimiento bacteriano o ausencia de él y se determina la CMI del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor CMI para una determinada combinación bacteria/antimicrobiano en una prueba concreta (Rios & Hernandez, 2016).

6.4.5. Métodos automatizados

Son sistemas fáciles y rápidos, generalmente automatizados o semi automatizados. Son métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que solo ofrecen garantía para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales.

Fundamento: la mayoría de estos métodos utilizan sistemas de micro dilución en medio líquido sobre microplaca con pocillos en “U” e interpretan el crecimiento bacteriano en los diferentes pocillos por medio de un auto analizador (mediciones por turbidez o fluorescencia) (Campus, 2017).

6.4.6. Métodos moleculares

La PCR es la técnica más comúnmente empleada en biología molecular para la amplificación del ADN en la cual se lleva a cabo una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual de manera natural sintetiza el ADN en las células (Becerril et al., 2015).

Fundamento: La PCR utiliza la enzima ADN polimerasa que dirige la síntesis de ADN a partir de sustratos de desoxinucleótidos en un ADN molde de una sola hebra. La ADN polimerasa agrega nucleótidos al extremo 3' de un oligonucleótido de diseño personalizado cuando se hibrida a un ADN molde más largo. Por lo tanto, si un oligonucleótido sintético se hibrida a un molde de cadena simple que contiene una región complementaria al oligonucleótido, la ADN polimerasa puede usar el oligonucleótido como cebador y alargar su extremo 3' para generar una región extendida de ADN bicatenario (Microbiology info, 2015).

De acuerdo con Becerril et al. (2015), cada ciclo de PCR consta de tres pasos:

- **Desnaturalización:** en esta etapa las cadenas de ADN son calentadas a 95° C durante un tiempo promedio de 20 a 30 segundos, con el objetivo de separar ambas cadenas. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas, las cuales servirán como molde.
- **Hibridación:** En la etapa de 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 anti sentido. Para que esto suceda es necesario que el termociclador alcance una temperatura entre 50-60° C, generalmente se necesitan 30 segundos en este ciclo.
- **Extensión:** en esta etapa se necesita una enzima con la función de ADN polimerasa, la cual se encargará de la catálisis de la reacción, sintetizando nuevas cadenas de ADN a partir de una cadena molde. La enzima más usada es la Taq ADN polimerasa, con

capacidad de soportar temperaturas muy altas. 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 (dntp's) complementarios, creando así las cadenas completas de ADN.

Importancia del PCR en la epidemiología y control de la resistencia antimicrobiana

La PCR ha contribuido de gran manera al desarrollo de la epidemiología, abriendo paso a la “epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas”, que ha venido evolucionando y tomando elementos de la epidemiología clásica, para proveer datos más específicos en lo que a patógenos respecta (Arpajón, Sosa, & Doval, 2014).

Las pruebas de tamizaje para la búsqueda de enzimas productoras de carbapenemasa, como es la prueba de triple disco, no son efectivas en la totalidad de los casos. Como indican Calvo et al. (2011), puede haber falsos negativos cuando la enzima es expresada en bajas cantidades, sobre todo las carbapenemasas tipo metalo. Esto puede evitarse agregando sulfato de zinc al medio para incrementar la producción de la enzima (en el caso de metalo β -lactamasas). En cambio, puede haber falsos positivos cuando hay presencia de BLEE tipo CTX-M o hiperproducción de Amp-C más reducción de porinas. En estos casos es donde la técnica de PCR toma vital importancia, puesto que mediante esta se puede decir con certeza que la resistencia es producto de enzimas tipo carbapenemasa.

En otro contexto, los diferentes tipos de gen VIM, por ejemplo, presentan distinta susceptibilidad hacia algunos antibióticos (López, Torres, & Prada, 2016), por tanto, podría utilizarse la identificación y diferenciación de los genes como pauta para suministrar la mejor opción terapéutica.

7. Diseño metodológico

7.1. Tipo de estudio

Según la ocurrencia de hechos es un estudio *prospectivo*, de corte *transversal* según el periodo y secuencia del estudio. Según el análisis y el alcance de los resultados es de tipo *descriptivo* (Vásquez Hidalgo, 2016).

7.2. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN), ubicado de la Siemens, Carretera Norte, 2 cuabras al sur, Managua, Nicaragua.

Este hospital cuenta con diferentes áreas de atención, incluyendo servicio de medicina general y diversas áreas de atención especializada.

7.3. Universo

El universo estuvo comprendido por 40 cepas resistentes a los carbapenémicos, de las cuales 21 pertenecían a *Pseudomonas aeruginosa* y 19 a *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán nicaragüense en el periodo comprendido por el estudio, esta información fue obtenida de los libros de registros del Laboratorio de bacteriología del HAN.

7.3.1. Muestra

De las 21 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos que comprendían el universo, se tomó una muestra de 16 cepas, de igual manera, de las 19 cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos que comprendían el universo, también se tomó una muestra de 16 cepas; estas cumplían con todos nuestros criterios de inclusión.

7.4. Tipo de muestreo

No probabilístico, por conveniencia.

7.5. Criterios de inclusión:

- 7.5.1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense durante el tiempo de estudio.
- 7.5.2. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con una CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ a Imipenem y Meropenem por VITEK.
- 7.5.3. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con un halo de inhibición ≤ 21 mm para Imipenem y Meropenem por el método de Kirby-Bauer.

7.6. Criterios de exclusión:

- 7.6.1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con sensibilidad reducida a los carbapenémicos por mecanismos de resistencia diferentes a carbapenemasas (BLEE, Disminución de permeabilidad, eflujo, etc.)
- 7.6.2. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos provenientes de otras unidades de salud.
- 7.6.3. Cultivos contaminados.

7.7. Limitaciones del estudio

El estudio no abarca más cepas del año 2018, debido a la dificultad para poder recolectar y analizar muestras en los meses que ocurrieron problemas sociopolíticos en Nicaragua (abril-julio, 2018).

Solo se realizó la búsqueda de mecanismos de resistencia fenotípicos a los carbapenémicos a 14 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y a 7 cepas de *Acinetobacter baumannii* debido a falta de recursos económicos.

Solo se realizó la genotipificación de las cepas para genes de metalo β -lactamasas.

7.8. Métodos e instrumentos de recolección de datos

Se usó la ficha de recolección de datos (ver *Anexos*) y la investigación documental para la búsqueda de información de diferentes fuentes.

7.9. Procedimientos

- **Autorización para realizar el estudio**

Para la autorización del estudio fue necesario la aprobación del protocolo por parte de la subdirección docente y el Departamento de Bioanálisis Clínico del POLISAL, UNAN-Managua, posteriormente se remitió el permiso al SILAIS Managua, el cual una vez autorizado, brindó una carta concediendo el permiso para realizar la investigación (Ver *anexos*).

- **Identificación de las cepas (Laboratorio de bacteriología del HAN)**

Se procedió a buscar los datos de las cepas de interés en los libros de registros del Laboratorio del Hospital Alemán Nicaragüense, así como en la base de datos del Software “Whonet”. Una vez identificadas las cepas que se incluirían en el estudio, se procedió a llenar la información completa de estas cepas en “fichas de recolección de datos” previamente elaboradas (ver en *Anexos*). Esta información posteriormente fue ingresada en otra base de datos en programas informáticos de Microsoft Word & Excel 2016. Las cepas estaban preservadas en viales con caldo de leche, refrigerados a una temperatura de -20° C.

- **Transporte y almacenamiento de las cepas**

Se seleccionaron las cepas de interés y se transportaron en los viales con caldo de leche al laboratorio de Biología Molecular del POLISAL, UNAN-Managua en termo plástico, conservando la cadena de frío (5 -10° C) mediante el uso de Hiel Packs para ser almacenadas a una temperatura de -70° C hasta su posterior procesamiento.

- **Reactivación de las cepas en Agar MacConkey (Laboratorios de Bioanálisis Clínico, POLISAL, UNAN-Managua):**

Las cepas preservadas en caldo de leche en refrigeración (- 70° C) en el Laboratorio de Biología Molecular, fueron transportadas a los Laboratorio de Bioanálisis Clínico para proceder de la siguiente manera:

- Se dejó que los caldos alcanzaran temperatura ambiente de forma gradual, pasándolo a refrigeradores con diferentes temperaturas (-70, -20, 4° C, temperatura ambiente).
- Se tomó con un hisopo la muestra a partir del caldo de leche que contienen las cepas para el estudio correspondiente, asimismo los controles positivos.
- Se inoculó en placas con Agar MacConkey y se dejó que el inóculo fuese absorbido por el agar.
- Se hizo una siembra de la cepa por estriado convencional y agotamiento.
- Se incubaron las placas invertidas de 18-24 horas a una temperatura de $37 \pm 1^\circ \text{C}$.

Caracterización fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenémicos por método de Kirby-Bauer (Laboratorios de Bioanálisis Clínico, POLISAL, UNAN-Managua).

- Se realizó una suspensión al 0.5% en la escala de McFarland con la cepa aislada y reactivada previamente en Agar MacConkey.
- Se tomó un hisopo estéril y se sumergió en la solución preparada, escurriéndolo en las paredes internas para extraer el exceso de humedad.
- Se realizó la siembra de la suspensión en Agar Mueller Hinton, distribuyéndose de manera uniforme en toda la placa haciendo el estriado en 3 direcciones.
- Se colocaron sensidiscos impregnados con EDTA (10 μg) en medio de sensidiscos de Imipenem y Meropenem (30 μg) a una distancia de 10 mm entre el centro de cada disco.
- Se incubaron las placas invertidas por 18-24 horas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$.
- Se revisaron las placas en busca de sinergia entre los carbapenémicos y el inhibidor (EDTA).
- La sinergia entre los carbapenémicos y EDTA es positivo a cepas con enzimas carbapenemasas tipo Metallo.
- La ausencia de sinergia entre los carbapenémicos y los inhibidores son tomadas como posibles productores de enzimas carbapenemasas tipo OXA.

Extracción de ADN (Laboratorio de Biología Molecular POLISAL, UNAN-Managua)

A partir del cultivo fresco de los reisolamientos en Agar MacConkey se procedió a hacer la extracción de ADN por el método de calor a todas las cepas a través de los siguientes procedimientos:

- En tubo eppendorf se midió 100 μ l de agua grado PCR.
- Del cultivo fresco se realizó un pool de célula/UFC en el tubo eppendorf.
- Se dio vórtex para mezclar bien.
- Se colocó el tubo en baño maría en ebullición por 10 minutos.
- Se retiró el tubo y se dejó enfriar en hielo por 5 minutos.
- Se centrifugó a 12,000 RPM por 5 minutos.
- Se extrajo 80 μ l del sobrenadante en nuevo tubo eppendorf

Caracterización genotípica por la técnica de PCR convencional (metalo β -lactamasas)

Para la realización de la parte genotípica de las cepas en búsqueda de genes productores de metalo β -lactamasas por PCR-multiplex, se utilizaron los siguientes primers:

Tabla N° 1:

Primers de Metalo β -lactamasas utilizados

Primer	Secuencia	Peso molecular (pb)
IMP forward	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3'	188 pb
IMP reverse	5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATCT-3'	
SPM forward	5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3'	271 pb
SPM reverse	5'-ACATTATCCGCTGAAACAGG-3'	
VIM forward	5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3'	390 pb
VIM reverse	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	
GIM forward	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3'	477 pb
GIM reverse	5'-AACTTCCAACCTTGGCCATGC-3'	
SIM forward	5'-TACAAGGGATTCGGCATCG-3'	570 pb
SIM reverse	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	

Tabla N° 2*Preparación de la mezcla de reacción para metalo β -lactamasas.*

Reactivo/producto	Volumen reactivo/producto	Volumen total para n=11
Agua libre de nucleasas	31 μ l	341 μ l
Reaction Buffer 10x	5 μ l	55 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1 μ l	11 μ l
IMP_{forward} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
IMP_{reverse} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
SPM_{forward} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
SPM_{reverse} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
VIM_{forward} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
VIM_{reverse} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
GIM_{forward} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
GIM_{reverse} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
SIM_{forward} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
SIM_{reverse} (10 μm)	1 μ l	11 μ l
Taq polimerasa	1 μ l	11 μ l
ADN molde	2 μ l	11 μ l

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Realizada la master mix se tomó una cantidad de 48 μ l y se colocaron en tubos Eppendorf previamente rotulados con el código de la respectiva cepa en estudio, luego se agregó 2 μ l del ADN muestra y los controles positivos previamente extraídos y se llevó al termociclador para la amplificación.

Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: Desnaturalización a 94° por 5 min., seguido de 36 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 seg.; hibridación a 52° C por 40 seg.; amplificación 72° C por 50 seg.; y una extensión final de elongación a 72° C por 5 min.

Caracterización genotípica por la técnica de PCR convencional (NDM)

Para la realización de la parte genotípica de las cepas en búsqueda de genes productores de metalo β -lactamasas (NDM) por PCR, se utilizaron los siguientes primers:

Tabla N° 3

Primers de blaNDM utilizados.

Primer	Secuencia	Peso molecular (pb)
NDM _{forward}	5-3 AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC'	512 pb
NDM _{reverse}	5-3 GGC GTA GTG CTC AGT GTC'	

Tabla N° 4

Preparación de la mezcla de reacción para blaNDM.

Reactivo/producto	Volumen reactivo/producto	Volumen total N= 10
Agua libre de nucleasas	18.5 μ l	185 μ l
Reaction Buffer 10x	2.5 μ l	25 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	0.5 μ l	5 μ l
NDM _{forward} (10 μ m)	0.5 μ l	5 μ l
NDM _{reverse} (10 μ m)	0.5 μ l	5 μ l
Taq polimerasa	0.5 μ l	5 μ l
ADN molde	2 μ l	5 μ l

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Realizada la master mix se tomó una cantidad de 23 μ l y se colocaron en tubos Eppendorf previamente rotulados con el código de la respectiva cepa en estudio, luego se agregó 2 μ l del ADN muestra y los controles positivos previamente extraídos y se llevó al termociclador para la amplificación.

Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: Desnaturalización a 94° por 5 min., seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 seg.; hibridación a 52° C por 30

seg.; amplificación 72° C por 60 seg.; y una extensión final de elongación a 72° C por 10 min.

- **Preparación del gel de agarosa (1.5%) para la corrida de electroforesis**

Se pesó en balanza analítica 1.5 gr de agarosa a granel, se colocó en un beaker y se diluyó en 100 ml de TBE con concentración de 1x; se colocó en un calentador hasta que se disolvió totalmente. Se agregó 2 µl de Bromuro de etidio y se mezcló para luego verter en la cámara con peine para su gelificación. Una vez gelificado se llenó la cámara de electroforesis con TBE 1x y posterior se retiró el peine.

- **Electroforesis en gel de agarosa**

Al concluir los ciclos de amplificación, se tomó el producto de amplificación + buffer de carga (Loading Buffer); se procedió a mezclar bien sobre papel parafilm y se colocó cada muestra en su posición correspondiente en el gel de agarosa según el protocolo de corrida incluyendo el marcador molecular y los controles negativos y positivos para validar la técnica. Se cerró la cámara para proceder a conectar a una fuente de poder con un tiempo y potencia de acuerdo al número de muestra en el proceso, tal como se presenta en la siguiente tabla.

Tabla N° 5

Especificaciones para corrida de electroforesis

Tipo de peine	Tipo de Producto amplificado	Voltaje (v)	Tiempo	Buffer de carga (Loading)	ADN amplificado
De 12 pozos	Metalo β-	120 v	80 min.	2 µl	8 µl
De 20 pozos	lactamasas	120 v	80 min.	2 µl	8 µl
De 12 pozos	NDM	120 v	90 min.	2 µl	8 µl
De 20 pozos		120 v	90 min.	2 µl	8 µl

Después de transcurrido el tiempo de electroforesis, se colocó el gel de Agarosa sobre un transluminador UV y se analizaron los pesos moleculares obtenidos.

Ver Imagen N° 1 y 2 en Anexos.

8. Operacionalización de las variables.

Objetivo específico	Variables	Subvariables	Indicador	Valor	Criterio
Identificar fenotípicamente mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> a través del método de Kirby-Bauer con triple disco modificado.	Metalo β -lactamasas	EDTA + carbapenémicos	Sinergia Positiva/Negativa	Positivo/Negativo	-
Detectar genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasas tipo metalo en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> a través de la técnica de PCR convencional.	Genes de Metalo β -lactamasas	IMP	188 pb	Presencia/Ausencia de banda en electroforesis	-
		VIM	390 pb		
		GIM	477 pb		
		SIM	570 pb		
		SPM	271 pb		
		NDM	412 pb		
Evaluar el perfil de resistencia de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> productoras de metalo β -lactamasas.	Perfil de resistencia	CAZ, AMC, FEP, ATM, PRL, IMP, MEM, TZP, SAM, GEN, CIP, LEV, AMK, MOX, COL, TG, TET, CRO, MOX, STX, MNO	Halo de inhibición/CIM	Punto de corte según CLSI (2017)	Resistente, Intermedio, Sensible

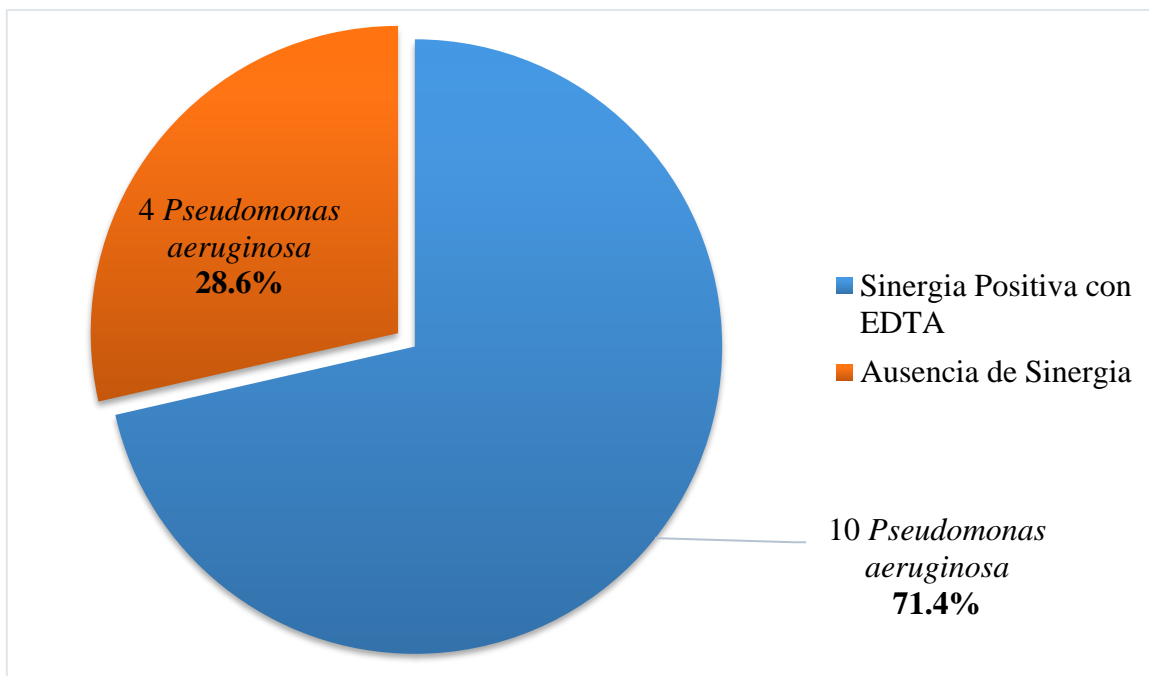
<p>Describir la frecuencia y distribución de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> productoras de metalo β-lactamasas según microorganismo aislado, tipo de muestra y sala clínica del Hospital Alemán Nicaragüense.</p>	metalo β -lactamasa	-	Imipenem/Meropenem	CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ Halo inhibición ≤ 21 mm	Positivo / Negativo
	Microorganismo aislado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-VITEK [®] 2 Compact -Identificación bioquímica	-	Positivo / Negativo
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	VITEK [®] 2 Compact -Identificación bioquímica	-	Positivo / Negativo
	Sala clínica	Unidad de cuidados intensivos (UCI)	- Aislado/No aislado	-	-
		Medicina interna			
		Ginecología			
		Cirugía			
		Pediatría			
Neonatología					
Tipo de Muestra	Secreción	- Aislado/No aislado	-	-	
	Líquido				
	Sangre				
	Orina				

9. Análisis y discusión de resultados

Se analizó un total de 16 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, estas fueron aisladas de enero de 2017 - febrero de 2018 en distintas salas del Hospital Alemán Nicaragüense, todas cumplían con nuestros criterios de inclusión para el objeto de estudio de la investigación, de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

Gráfico N° 1:

Caracterización fenotípica de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos según test de triple disco modificado por el método de Kirby-Bauer.



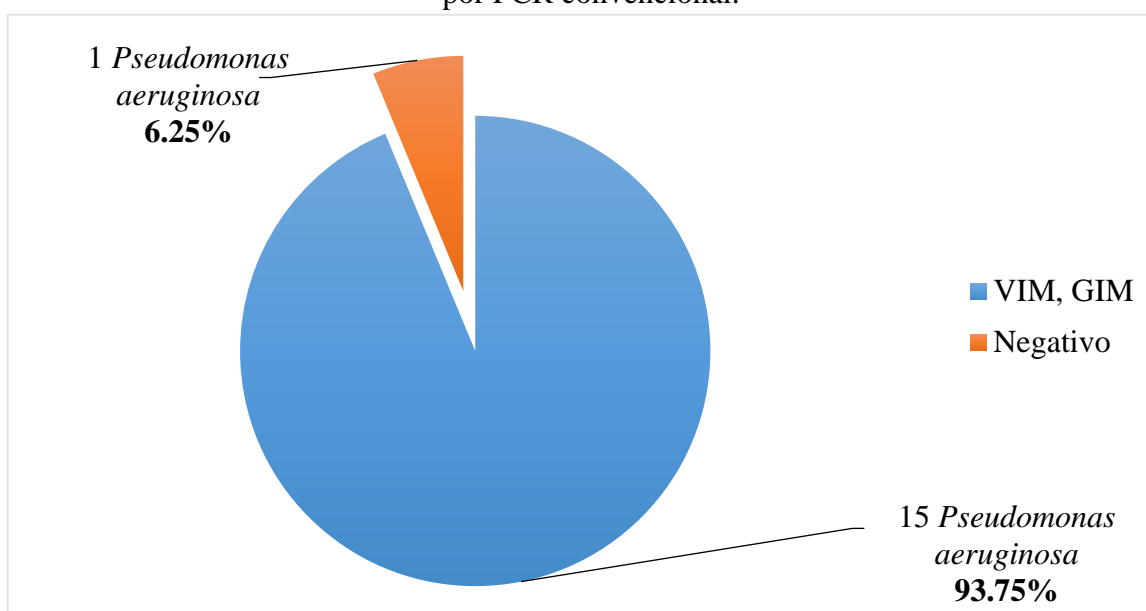
Fuente: Datos Laboratorio de Bioanálisis Clínico, POLISAL, UNAN-Managua (2017-2018).

Para poder encontrar los mecanismos de resistencia fenotípicos a carbapenémicos se hizo uso del test de sinergismo de triple disco modificado, el cual consiste en enfrentar un disco impregnado con EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) en medio de sensidiscos de Imipenem y Meropenem (30 µg) a una distancia de 10 mm entre el centro de cada disco. De las 14 cepas a las que se le hizo la prueba de triple disco, el 71.4% (10/14) presentó sinergia positiva, clasificándose en el grupo de metalo-β-lactamasas. El 28.6% (4/14) restante no presentó sinergia.

Gastelo, Diaz, & Maguiña (2016), realizaron una investigación en el hospital regional Lambayeque de Perú, donde analizaron 29 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras de secreciones y líquidos de pacientes con diagnóstico presuntivo de infección, en el cual solo el 10.3% (3/29) de estos aislamientos eran productores de enzimas carbapanemasas tipo metalo, realizado por 3 métodos fenotípicos, incluyendo Kirby Bauer. Estos resultados difieren significativamente con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que encontramos una mayor frecuencia de cepas con fenotipo para metalo β -lactamasas.

Gráfico N° 2:

Caracterización genotípica de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos por PCR convencional.



Fuente: Datos de Laboratorio de Biología Molecular, POLISAL, UNAN-Managua (2017-2019).

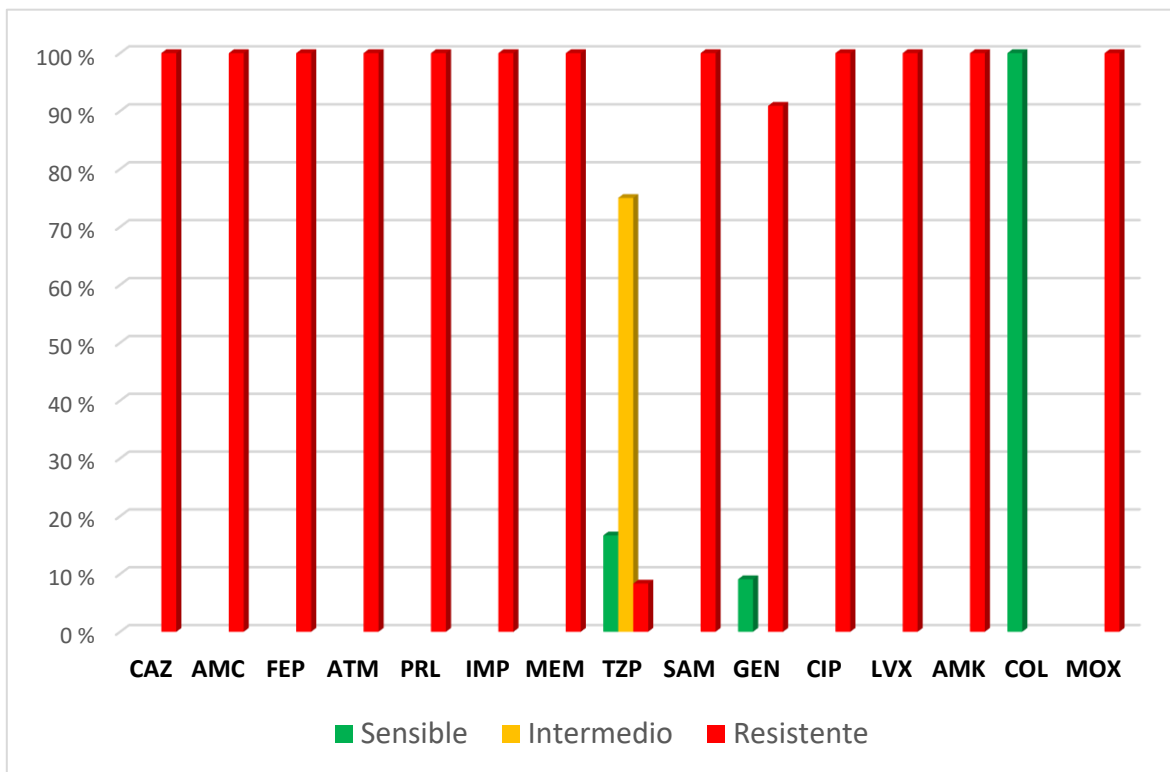
De las 16 muestras de *Pseudomonas aeruginosa*, analizadas a través de la prueba de PCR convencional, 15 cepas correspondientes al 93.75% presentaron genes codificadores de carbapanemasas de tipo metalo- β -lactamasas (MBL), específicamente los genes VIM y GIM. Solo 1 cepa de *Pseudomonas aeruginosa* correspondiente al 6.25% no presentó genes de tipo metalo; por lo tanto, se puede sospechar de una carbapenemasa de tipo OXA, debido a que tampoco presentó sinergia fenotípicamente, sin embargo, este estudio no tiene el propósito de tal alcance. Cabe destacar que del 28.6% (4/14) que dio sinergia negativa a EDTA con carbapenémicos (Ver Gráfico N° 1), genotípicamente sí presentaron genes VIM y GIM, lo

que significa que, a pesar de portar los genes, no lo expresan fenotípicamente. Esto se puede explicar debido a que, si la bacteria produce la enzima en poca cantidad, no podrá expresar fenotípicamente el efecto de sinergia, por lo cual algunos procedimientos en microbiología clínica sugieren agregar sulfato de zinc al medio para incrementar la expresión de la enzima (Calvo et al., 2011).

Actualmente se han descrito diversos grupos de genes de MBL siendo IMP, VIM los de mayor frecuencia en el mundo, en el Hospital Alemán Nicaragüense se pudo encontrar una distribución igualitaria de los genes VIM y GIM, ya que las 15 cepas con metalo- β -lactamasas poseían tanto VIM como GIM. Cabe destacar que el grupo GIM está reportado en menos países que IMP y VIM. Este análisis genotípico demuestra que los genes de tipo metalo- β -lactamasas fueron los más comunes; este resultado concuerda con la investigación realizada por Salvador (2016) en los hospitales de Lima, en el cual la detección de genes codificantes de MBL en 76 aislamientos de *P. aeruginosa* por el método confirmativo de PCR Multiplex, reveló que 24/76 (31.58%) aislamientos portaban genes codificantes para MBL. De ellos 23/24 (95.83%) portaron el gen *blaIMP* codificantes de enzimas tipo IMP y 1/24 (4.17%) el gen *blaVIM* codificante de las enzimas tipo VIM.

Gráfico N° 3:

Perfil de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas.



Fuente: Registro de Datos de Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense, Managua-Nicaragua (2017-2018).

Según el perfil de resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productores de metalo β -lactamasas, obtenido de registros del Laboratorio de Bacteriología del HAN, y realizado a través de la técnica de difusión por disco (Kirby Bauer) y/o CIM (VITEK), estas son resistentes a casi todos los antibióticos testados, a como se esperaba en este tipo de cepas productoras de este tipo de carbapenemasas. Hay resistencia del 100% de las cepas a todos los β -lactámicos como CAZ, AMC, FET, ATM, IMP, MEM y SAM, al igual que otras familias de antibióticos como PRL, CIP, LVX, AMK y MOX, siendo únicamente sensible a TZP, 2 de las 12 cepas a las que se les testó este antibiótico, lo cual corresponde al 17% del total de cepas, así mismo, 9 de 12 cepas resultaron tener una sensibilidad intermedia al antibiótico, correspondiente al 75%, siendo únicamente resistente a este fármaco una cepa de *P. aeruginosa*, correspondiente al 8%; Por otra parte, se aprecia que 1 de 11 cepas tiene sensibilidad a GEN (9%), mientras que las 10 cepas restantes se mantienen resistentes (91%). Colistin presentó una sensibilidad del 100% en todas las cepas, por lo que se considera como

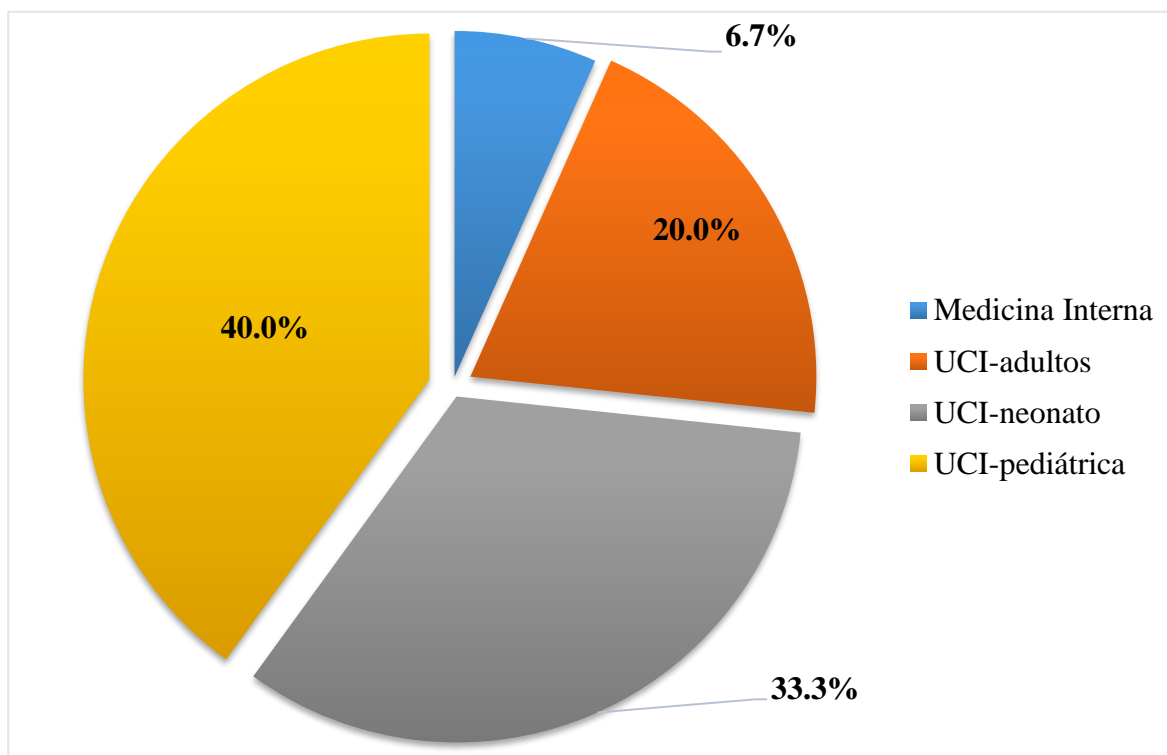
opción terapéutica, sin embargo, es necesario considerar muchos factores al momento de administrarlo, por ejemplo, la edad del paciente, estado renal, localización de la infección, etc., ya que este fármaco posee alto riesgo de nefrotoxicidad (Medina et al., 2017).

Resultados similares fueron publicados por Ophelie y Molin (2013), quienes obtuvieron en el perfil de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras de probables MBLs un 100% de resistencia a MEM, GEN y CIP, 94% a IMP y PIP, 61% a CAZ, 44% a AMK y 33% a FEP. Así también se observó sensibilidad del 100% para COL, 56% para AMK, y 6% para IMP, FEP y PIP.

Cabe destacar que, a la fecha, aún no se han reportado cepas resistentes a Colistín en Nicaragua en lo que respecta a *P. aeruginosa*.

Gráfico N° 4:

Distribución de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas por sala de aislamiento.



Fuente: Registro de Datos de Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense, Managua-Nicaragua (2017-2018).

De las 15 cepas en estudio que presentaron genes de metalo β -lactamasas, 6 fueron aisladas del área de UCI-pediátrica lo que represento un 40%, seguido por 5 cepas de la sala de UCI-neonato representado un 33.3%, 3 cepas aisladas de UCI-adultos que representaron un 20%, y finalmente 1 cepa en el área de medicina interna con un único aislamiento el cual representó un 6.7%.

Las 3 salas que presentaron mayor distribución de *P. aeruginosa* son las salas de cuidados intensivos, esto es debido a que son áreas con factores que predisponen a la adquisición de infecciones nosocomiales por bacterias multirresistentes. En estas áreas los pacientes se encuentran en estados críticos, inmunosuprimidos, por lo general con ventilación mecánica, catéteres venosos y sondas. Como se explicó anteriormente en la patogenia de esta bacteria, *P. aeruginosa* es patógena sólo cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales, por ejemplo, cuando hay solución de la continuidad de mucosas y de la piel por lesión directa del tejido; cuando se utilizan catéteres intravenosos o sondas urinarias; o cuando hay neutropenia, como en el caso de quimioterapia antineoplásica.

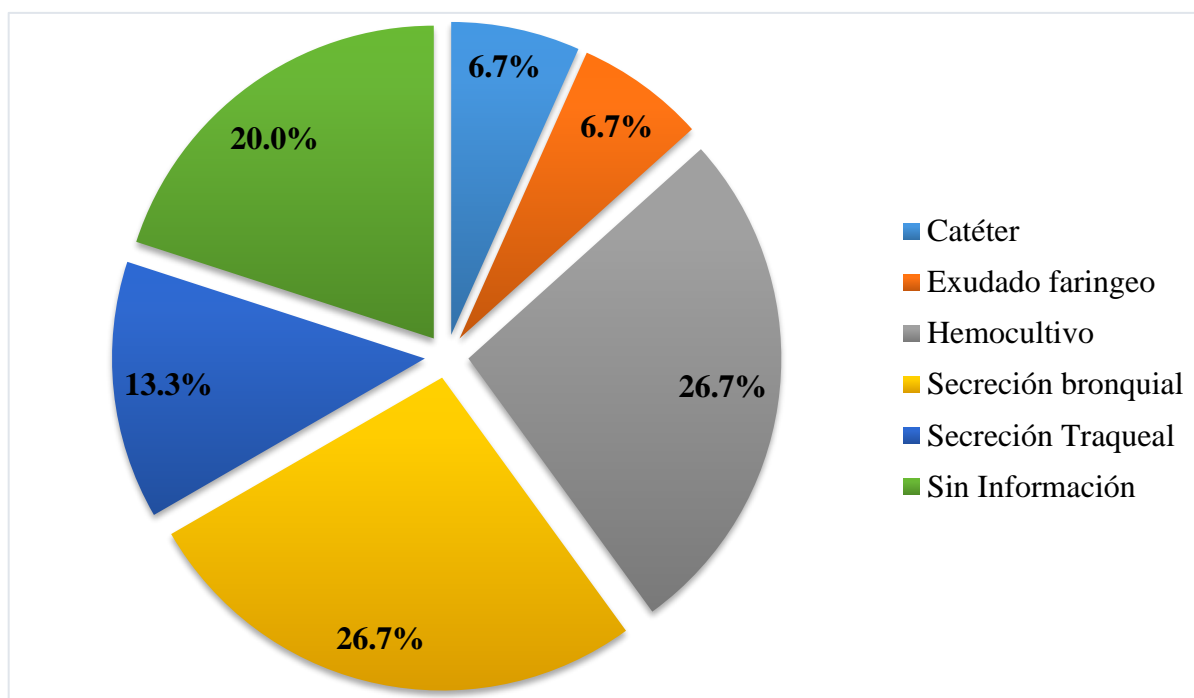
Hay que destacar que las dos primeras salas que presentan mayor distribución de *P. aeruginosa*, fueron unidades de cuidados intensivos para neonatos y pacientes pediátricos, esto es por que los niños poseen un sistema inmunológico poco desarrollado, además, hay que añadir los procesos traumáticos a los que son sometidos: ventilación mecánica, catéteres intravenosos, sondas etc. Sumando todos esos factores más la estancia prolongada en el hospital se termina traduciendo como la oportunidad que tienen estas bacterias oportunistas para infectar al paciente y causarle un problema grave que puede terminar en muerte si no se le brinda el cuidado adecuado.

En este trabajo la mayoría de cepas aisladas provienen de pediatría, sin embargo, en la investigación de Gastelo, Diaz, & Maguiña (2016), en las 53 cepas aisladas, la mayoría provenían de los servicios de UCI, 43 cepas; además se observó que la mayoría de cepas aisladas correspondían al grupo etario de 60 años a más. Similar a nuestra investigación, las salas con mayor aislamiento fueron las de cuidados intensivos, pero difieren en grupos etarios. En otro estudio realizado por Ophelie y Molin (2013), en un Hospital de Clínicas en Paraguay, obtuvieron un 38% de aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo β -lactamasas en UCI-Adultos, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

En medicina interna solo se encontró una cepa en un paciente de 66 años de edad, siendo la sala menos afectada. El aislamiento de esta cepa puede estar relacionada con la edad del paciente debido a enfermedades de base que favorecen al mal funcionamiento sistémico, siendo aprovechado por *P. aeruginosa*.

Gráfico N° 5:

Distribución de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas aisladas según tipo de muestra.



Fuente: Registro de Datos de Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense, Managua-Nicaragua (2017-2018).

Según registros internos del Laboratorio de Bacteriología del HAN, de todas las *P. aeruginosa* productores de metalo β -lactamasas, 4 de las 15 cepas fueron aisladas de secreciones bronquiales, correspondientes al 26.7%, de igual manera para hemocultivos, 4 aislamientos que corresponden al 26.7%, seguido de 2 aislamientos en secreciones de tráquea equivalente al 13.3%, finalmente con menor frecuencia en catéter, y exudado faríngeo con tan solo un aislamiento correspondiente al 6.7%. El 20% no declara información respecto al lugar de toma de muestra (secreciones).

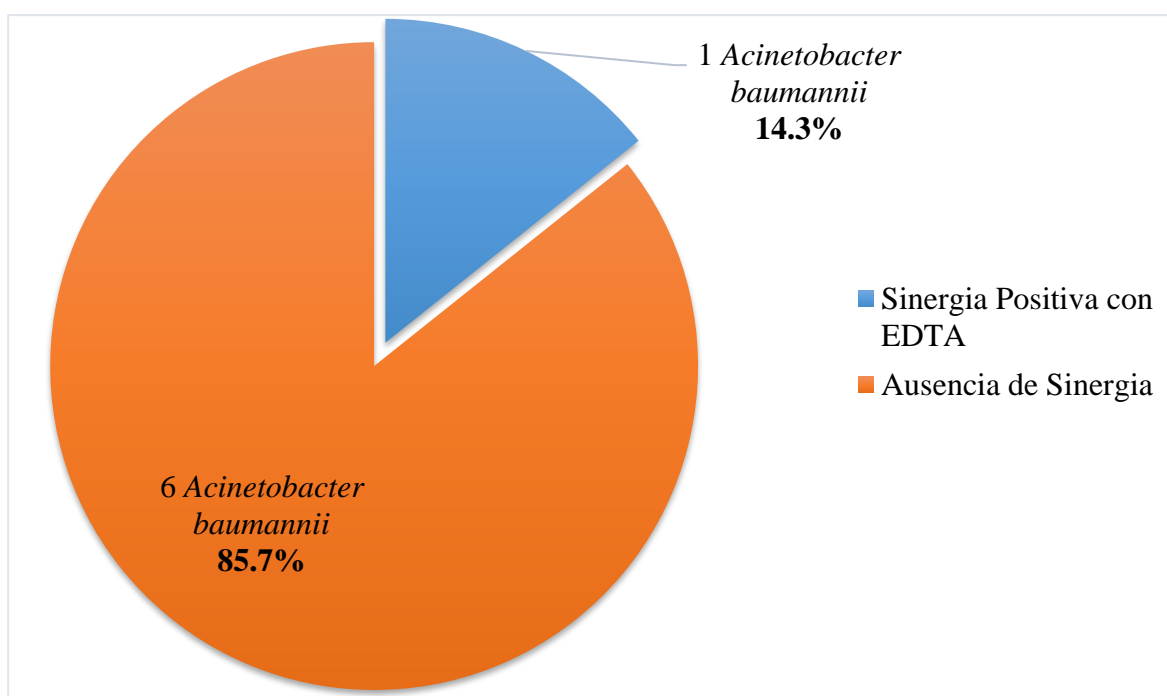
Haciendo una comparación de los datos obtenidos en este estudio respecto al lugar de toma de muestra y las salas de donde fueron aisladas las cepas, lo que más prevalece son hemocultivos y secreciones bronquiales, y las salas donde hay más porcentajes de aislamientos de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas, son UCI-pediátrica, UCI-Neonato y UCI-Adultos con aislamientos del 40, 33.3 y 20% respectivamente. Esto es debido a que en las salas de UCI se presentan muchas complicaciones donde es necesario entubar al paciente para que pueda respirar a través de medios mecánicos, siendo este el proceso donde ocurre la colonización de la bacteria en las vías aéreas, por lo tanto, es aislada con mayor frecuencia en secreciones bronquiales y de tráquea. Además, no se sabe con exactitud como se realiza el proceso de lavado o esterilización de los materiales utilizados en esas salas, o si el material es compartido entre las diferentes salas de cuidados intensivos. Por consiguiente, cuando la infección avanza y se complica, esta se disemina en sangre, dando también altos porcentajes de aislamientos en hemocultivos.

Estos resultados también coinciden con el estudio de Ophelie y Molin (2013), realizado en un hospital de Clínicas en San Lorenzo, Paraguay, donde encontraron entre otras, un 28% de aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* con probable MBLs en secreciones traqueales, correspondiente a 5/18 aislamientos.

Respecto a *Acinetobacter baumannii*, se analizaron 16 cepas de este género que tenían resistencia a carbapenémicos, estas fueron aisladas de igual manera en el periodo comprendido por el estudio en distintas salas del Hospital Alemán Nicaragüense, todas cumplían con nuestros criterios de inclusión para el objeto de estudio de la investigación, para las cuales, se obtuvieron los siguientes resultados.

Gráfico N° 6:

Caracterización fenotípica de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos según test de triple disco modificado por el método de Kirby-Bauer

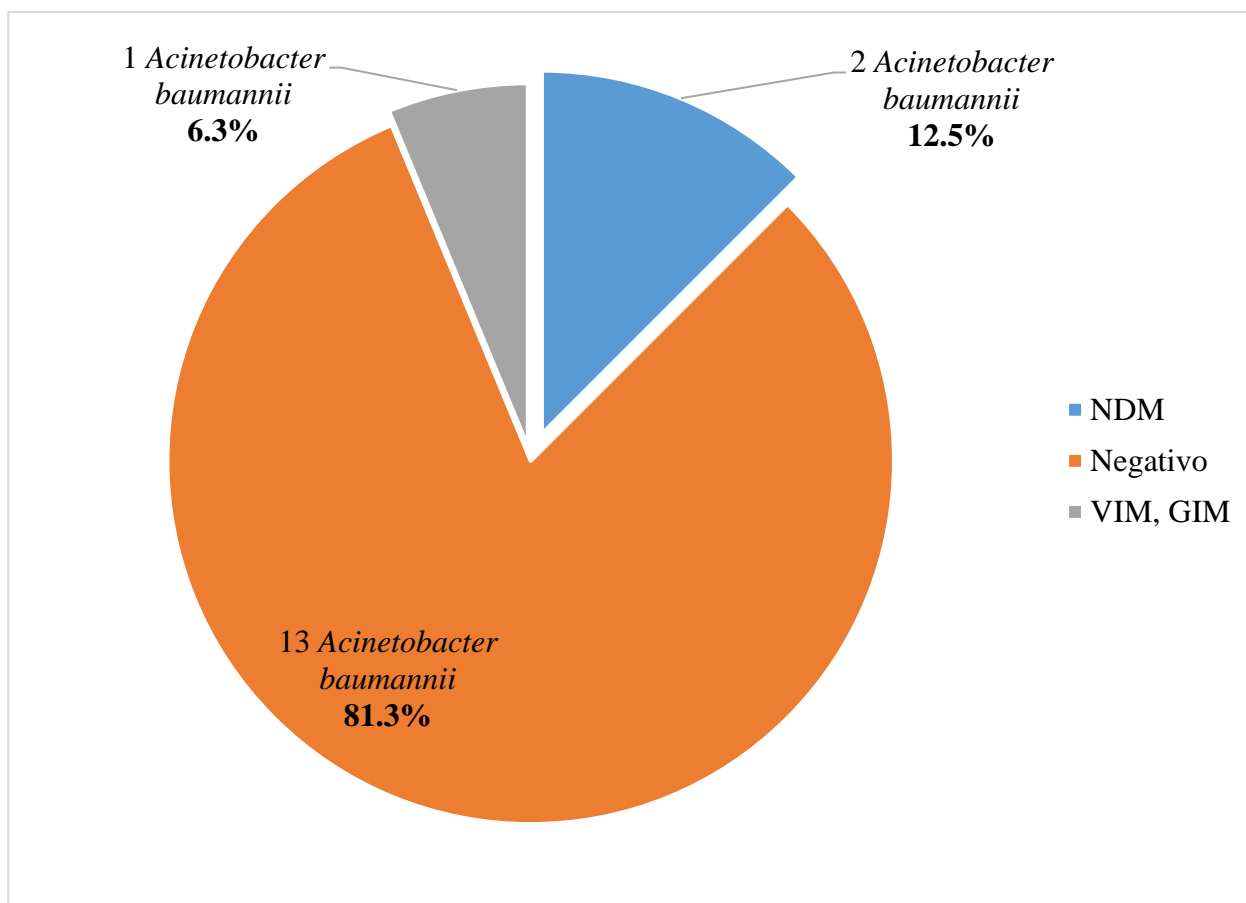


Fuente: Datos Laboratorio de Bioanálisis Clínico, POLISAL, UNAN-Managua (2017-2018).

Los resultados de la caracterización fenotípica de *Acinetobacter baumannii* según test de sinergia entre carbapenémicos y EDTA, muestran que tan solo el 14,3% (1/7 muestras) presentó sinergia positiva siendo clasificadas en el grupo de metalo- β -lactamasas y el 85,7% restante (6/7) no presentaron sinergia, por lo tanto podrían tratarse de oxacilinasas basándonos en el estudio realizado por Gastelo, Diaz, & Maguiña (2016), donde encontraron que ninguna de las cepas de *Acinetobacter baumannii* estudiadas poseían metalo- β -lactamasas, pero en cambio presentaron carbapenemasas tipo OXA.

Gráfico N° 7:

Caracterización genotípica de *Acinetobacter baumannii* resistentes a los carbapenémicos por PCR convencional.



Fuente: Registro de Datos de Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense, Managua-Nicaragua (2017-2018).

Se analizaron las 16 cepas de *Acinetobacter baumannii* con la técnica de PCR convencional, de las cuales el 12,5%, conformado por 2 cepas presentaron el gen NDM, y en una única cepa, que representa el 6,3%, se encontró los genes VIM y GIM; 13 de las cepas, correspondientes al 81,3%, no presentaron genes codificadores para metalo- β -lactamasas, sin embargo, posteriormente se analizaron (resultados fuera del alcance de este estudio) y se encontró la presencia de genes OXA en las cepas negativas para metalo- β -lactamasas (Libros de registro de Laboratorio de Biología Molecular, POLISAL, UNAN-Managua).

En cuanto a los genes codificadores para MBL se pudieron encontrar NDM, VIM y GIM; el gen VIM es uno de los genes que suele aparecer con gran frecuencia en las bacterias con

MBL; GIM y NDM aparecen con menor frecuencia. Por último, se debe destacar que los reportes de cepas aisladas con el gen NDM en enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores van en aumento. Este gen es proveniente de la India, sin embargo, hoy en día se encuentra diseminado alrededor del mundo.

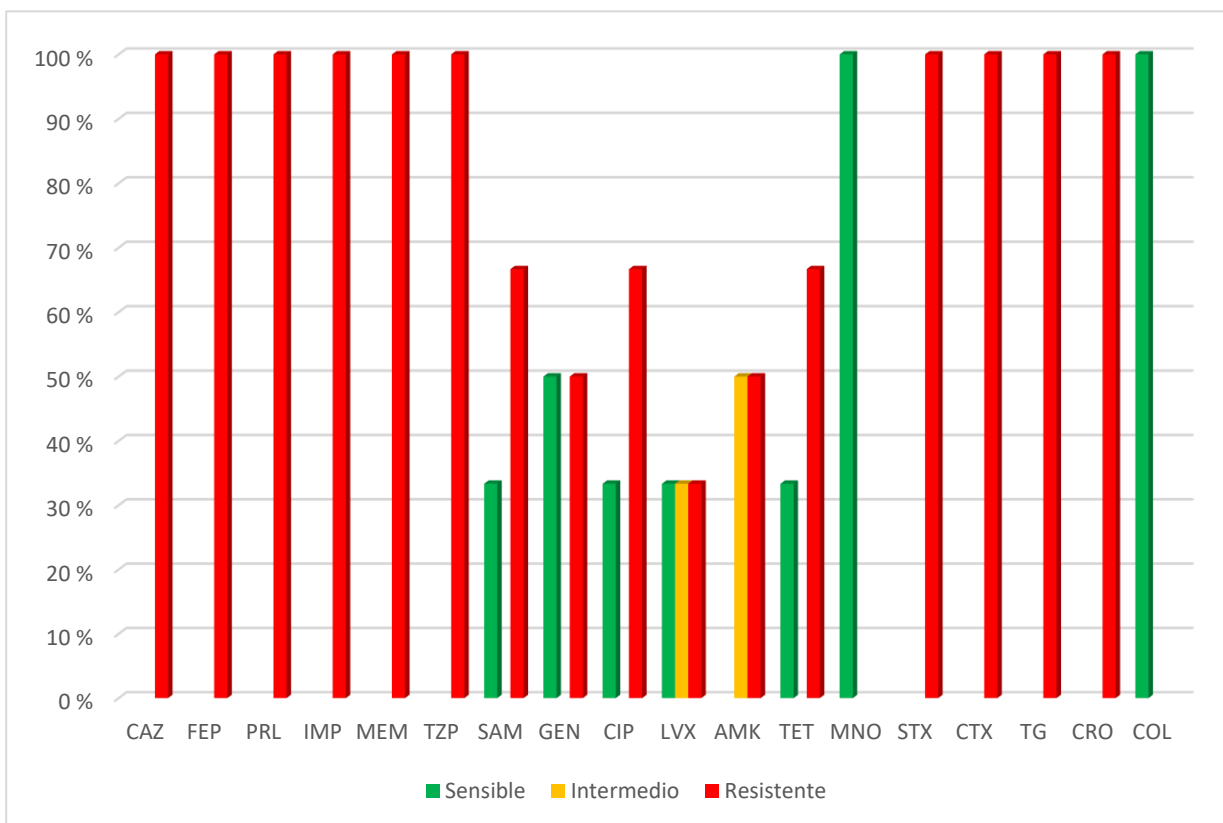
En Latinoamérica, las cifras son cada vez más elevadas, pues se reportan en Guatemala, Colombia, Chile, Argentina, entre otros. En el caso de Nicaragua hasta la fecha no se había descrito este gen, sin embargo, desde hace 2 años se presume su existencia. En el trabajo investigativo de Cerda, Martínez, & Pérez (2018), donde analizaron 249 cepas de *Enterobacteriaceae* en el Hospital Alemán Nicaraguense, el 44,44% resultaron negativos cuando se realizó PCR convencional, sin embargo estas fueron positivas por el método de triple disco con EDTA, sugiriendo la presencia de genes codificadores de enzimas productoras de metalo- β -lactamasas de los cuales no disponían de primers para realizar su identificación, como es el caso del gen NDM. Posteriormente, continuando esta investigación, se publicó un artículo donde se reportó que, de las cepas con resultados negativos, 21 portaban el gen NDM, en su mayoría *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia vulneris* (Arbizú Medina et al., 2018).

A pesar que la investigación de Arbizú Medina et al. (2018) fue realizada en *Enterobacteriaceae* con cepas del año 2015 y 2016 y nuestra investigación fue en cepas de bacilos Gram negativos no fermentadores del año 2017-2018, ambas investigaciones fueron realizadas en las mismas salas del mismo hospital, lo que indica que este gen es compartido entre estos géneros, aunque no comparten muchas características en común. Cabe destacar que es la primera investigación en Nicaragua en la que se reporta la aparición del gen de NDM en cepas de *A. baumannii*.

Hernán Rodríguez et al. (2018), mencionan que la aparición de NDM-1 representa un hallazgo novedoso que se observa simultáneamente y sin relación clonal en diferentes países, algunos de los cuales son distantes entre sí.

Gráfico N° 8:

Perfil de resistencia de *Acinetobacter baumannii* productores de metalo β -lactamasas.



Fuente: Registro de Datos de Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense, Managua-Nicaragua (2017-2018).

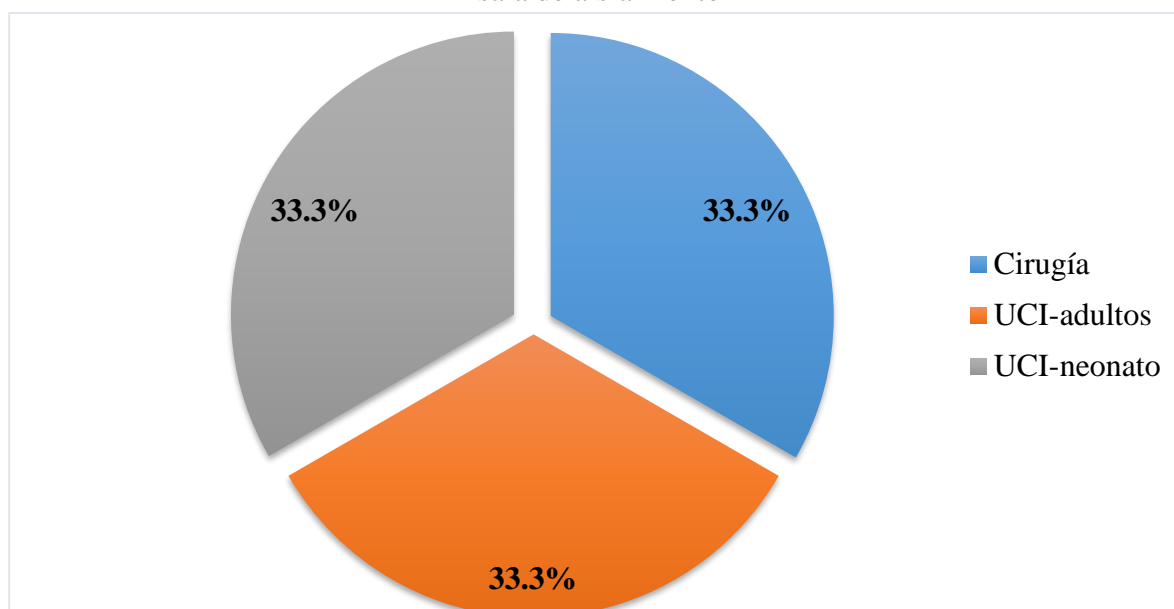
Según el perfil de resistencia de las cepas de *A. baumannii* productores de metalo β -lactamasas, obtenido de registros del Laboratorio de Bacteriología del HAN, y realizado a través de la técnica de difusión por disco (Kirby Bauer) y/o CIM (VITEK), el 100% de estas presentan resistencia a CAZ, FEP, PRL, IMP, MEM, TZP, STX, CTX, TG y CRO, de los cuales la mayoría pertenecen al grupo de los β -lactámicos. El 67% de las cepas (2/3) presentaron resistencia a SAM, CIP y TET; de igual manera para LVX hubo un 33% (1/3) de resistencia y 33% (1/3) sensibilidad intermedia. Para SAM, CIP, LEV y TET, el 33% de las cepas presentaron sensibilidad (1/3). En el caso de GEN y AMK, se aprecia una resistencia en el 50% de las cepas (1/2) respectivamente, el 50% restante para GEN presenta sensibilidad, mientras que en AMK presenta sensibilidad intermedia.

COL y MNO presentaron una sensibilidad del 100% en todas las cepas, por lo que se considera como opción terapéutica ante este tipo de resistencia donde la mayor parte afectada son todos los antibióticos β -lactámicos, sin embargo, a pesar de la efectividad de COL, es necesario considerar muchos factores al momento de administrarlo, por ejemplo la edad del paciente, estado renal, localización de la infección, etc., ya que éste fármaco posee alto riesgo en lo que respecta a nefrotoxicidad (Medina, 2017).

A la fecha, aún no se han reportado cepas de *A. baumannii* resistentes a COL en Nicaragua.

Gráfico N° 9:

Distribución de cepas de *Acinetobacter baumannii* productoras de metalo β -lactamasas por sala de aislamiento



Fuente: Registro de Datos de Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense, Managua-Nicaragua (2017-2018).

Las 3 cepas que dieron positivo para metalo β -lactamasas están distribuidas en salas de cirugía, UCI-Adultos y UCI neonato, con un 33.3% respectivamente. Esto indica que hay similitud en los datos obtenidos con respecto a los aislamientos de *P. aeruginosa*, ya que de igual manera se aisló *A. baumannii* de salas de cuidados intensivos, donde están involucrados varios procesos de ventilación mecánica, o que el paciente está inmunológicamente suprimido, lo que lo hace susceptible a una infección por este tipo de bacteria, ya que al igual que *Pseudomonas spp*, *A. baumannii* se considera oportunista.

Según Cerda Aragón (2016), los genes codificadores de carbapenemasas se pueden diseminar por varias vías, la dispersión entre áreas específicas, como sucede en el paso de pacientes que cursaron con un estado de sepsis grave en UCI y que luego de terminar tratamientos en esta área retornan a su sala de origen como cirugía general, llevando consigo bacterias productoras clones codificadores de enzimas carbapenemasas y principalmente constituyendo transmisión cruzada interhospitalaria.

Hay que tomar en cuenta también que en estas áreas están involucrado una serie de personal que está en constante contacto con diferentes pacientes de diferentes áreas y que probablemente tengan diferentes procesos infecciosos, y de no tener el cuidado y la asepsia en el momento del contacto entre cada paciente podrá transmitir fácilmente cualquier agente infeccioso.

En cuanto a la distribución por muestra, todas las cepas que portan genes para codificar metalo β -lactamasas, el 100% de los aislamientos (3/3) corresponden a hemocultivos. En un estudio realizado por Pérez Farias et al. (2016), encontró una distribución que difiere a la nuestra, la cual es del 43% para Cepas de *A. baumannii* para cepas MBL.

Según Sabatier et al. (2009), los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCI) presentan una desproporcionada alta incidencia de bacteriemias nosocomiales comparado con los pacientes ingresados en otras áreas de hospitalización convencional, y esta se asocia a una importante morbilidad, no obstante, en este estudio no se pudo obtener acceso a los expedientes clínicos para dar una conclusión puntual respecto a la morbilidad.

10. Conclusiones

1. De las 16 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos analizadas, se obtuvo un 71.4% de sinergia positiva con EDTA por el método de triple disco modificado en Kirby-Bauer, mientras que en las 16 cepas de *A. baumannii*, solamente el 14.3% presentó sinergia positiva con EDTA.
2. Los genes de metalo β -lactamasas detectados mediante técnica de PCR convencional, fueron predominantemente VIM y GIM, encontrándose en un 93.8% de las cepas de *P. aeruginosa*, y en un 6.3% de las cepas de *A. baumannii*. Cabe destacar la particularidad que se logró encontrar dos cepas (12.5%) de *A. baumannii* con el gen NDM, el cual es relativamente nuevo en Nicaragua.
3. Respecto al perfil de resistencia, se observó una alta tasa de resistencia a la gran mayoría de antibióticos utilizados. En ambos casos, hay resistencia a los carbapenémicos al igual que para la mayoría de los β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas; en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, solamente el 75% presentó sensibilidad intermedia a piperacilina-tazobactam, y sensibilidad a Piperacilina-Tazobactam (17%), Gentamicina (9%) y Colistina (100%); en *A. baumannii* se observó poca sensibilidad a Ampicilina-Sulbactam, Ciprofloxacino, Levofloxacino y Tetraciclina (33%), Gentamicina (50%), pero manteniendo 100% de sensibilidad para Minociclina, y de igual forma para Colistina.
4. La mayoría de aislamientos corresponden a salas de cuidados intensivos, con un 40% UCI pediátrica para *P. aeruginosa*, además de UCI neonato, con un 33% de aislamientos tanto para *P. aeruginosa* como para *A. baumannii*, seguido de UCI adultos con un 20% y un 33% de aislamientos de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* respectivamente. Con respecto al tipo de muestra, es preocupante el hecho de encontrarse la mayoría en muestras de hemocultivo, teniendo un 26.7% en *P. aeruginosa* y un 100% para *A. baumannii*. Seguido en relevancia, en muestras de secreción bronquial se aisló un 26.7% de *P. aeruginosa*. Todas las cepas antes mencionadas corresponden a cepas productoras de metalo β -lactamasas.

11.Recomendaciones

1. Como principal recomendación según los resultados de este trabajo y otros similares, coincidimos en que es de vital importancia establecer una vigilancia sobre el uso de los fármacos antibióticos, ya que el uso irracional de estos son la principal causa de la aparición de microorganismos multirresistentes, además de las malas prácticas de limpieza tanto personal como de los equipos.
2. Al MINSA, que sea de su utilidad este trabajo ya que presenta un escenario concreto sobre el cual tomar acciones tanto preventivas como correctivas.
3. Que la universidad, como instituto de investigación, pueda divulgar información a profesionales y estudiantes que se dedicarán en un futuro a esta rama de estudio.
4. Dar un seguimiento con futuras investigaciones a esta monografía, para continuar alimentando esta línea de trabajo, ya sea con fines epidemiológicos o educativos.

12. Bibliografía

- Acharya, T. (9 de Enero de 2015). *microbeonline.com*. Obtenido de *microbeonline.com*: <https://microbeonline.com/e-test-epsilometer-test-principle-purpose-procedure-results-and-interpretations/>
- Acosta, S. (1 de Marzo de 2017). *codeinep.org*. Obtenido de *codeinep.org*: <https://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/Acinetobacter.pdf>
- Álvarez, L. (29 de Enero de 2018). *scholar.google.es*. Obtenido de *scholar.google.es*: <https://core.ac.uk/download/pdf/156902295.pdf>
- Arbizú-Medina, Oscar, García-Rosales, Kenia, Cerda-Aragón, Helen, Martínez-García, William, Pérez-Martínez, Asdrúbal, & Lanzas-Baca, Yader. (2018). *Nueva Delhi metalo-β-lactamasa en especies de Enterobacteriaceae aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua*. *Acta Médica Costarricense*, 60(2), 15-18. Retrieved February 11, 2019, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022018000200015&lng=en&tlng=es.
- Arpajón, Y., Sosa, A., & Doval, R. (2014). Contribuciones de la técnica de la Reacción en Cadenas de la Polimerasa a la Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas en Cuba. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 927-939.
- Becerril, D., Torres, E., Moreno, G., Aguilar, A., Arena, R., & Hernandez, R. (24 de Septiembre de 2015). *medigraphic.com*. Obtenido de *medigraphic.com*: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2015/dcm153e.pdf>
- Bolaños, C., & Iannacone, J. (5 de Mayo de 2017). *Researchgate*. Obtenido de *Researchgate*: https://www.researchgate.net/publication/316288932_Patrones_fenotipicos_de_resistencia_en_pseudomonas_aeruginosa_de_muestras_clinicas_a_nivel_de_Sudamerica
- Caldera, F., & Robles, D. (Marzo de 2017). Caracterización fenotípica de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemes procedentes de la red nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, Nicaragua, Enero del 2014 - Diciembre del 2016. Managua, Nicaragua.
- Caldwell, M. (25 de Enero de 2017). *eHow*. Obtenido de *eHow*: http://www.ehowenespanol.com/sintomas-infeccion-bacteria-pseudomonas-aeruginosa-hechos_506435/#page=0
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, C., Beatriz, M., & Navarro, F. (2011). *Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos*. *Seimc.org*. Obtenido de *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>

- Campus. (17 de Julio de 2017). *Campus.usal*. Obtenido de Campus.usal: http://www.campus.usal.es/micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/Labmicro/Antibiograma.html
- Carroll, K., Hobden, J., Miller, S., Morse, S., Mietzner, T., Detrick, B., . . . Sakanari, J. (2016). *Medical Microbiology jawetz, Melnick & Adelberg`s*. New York: Mc Graw Hill.
- Cerda, H., Martinez, W., & Perez, A. (31 de Agosto de 2018). *Genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo-β-lactamasas, kpc y oxa mediante la técnica de PCR convencional en Enterobacterias aisladas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo Agosto 2015-Octubre 2016. Managua, Managua, Nicaragua. repositorio UNAN*. Obtenido de repositorio UNAN : <http://repositorio.unan.edu.ni/8382/1/97633.pdf>
- Ciello, G., & Costa, M. (1 de Septiembre de 2016). *seer.uftm*. Obtenido de seer.uftm: <http://seer.uftm.edu.br/revistaeletronica/index.php/refacs/article/viewFile/1772/1723>
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- Cruz Blanco, C. (2015). Tesis para optar al Título de Especialista en Pediatría. *Infecciones por Acinetobacter baumannii 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 del 2014*. Managua, Nicaragua.
- Diaz, C. (22 de Enero de 2018). *slideshare.net*. Obtenido de slideshare.net: <https://es.slideshare.net/karloz3033/clasificacion-de-los-antibioticos-86494306>
- Fariñas, M., & Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 402-409.
- Fica, A. (2014). Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos, cocáceas gram positivas y anaerobios. Implicancias terapéuticas. Chile.
- Garcia, J. (27 de Abril de 2014). *slideshare*. Obtenido de slideshare: <https://es.slideshare.net/joelsg1/mtodos-de-laboratorio-para-estudio-de-resistencia-a-antibioticos>

- Gastelo, R., Díaz, R., & Maguiña, C. (2016). Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque, diciembre 2014 - julio 2015. *Acta Médica Peruana*, 183-188.
- Gonzales, E. (9 de Julio de 2018). *insn.gob.pe*. Obtenido de *insn.gob.pe*: <http://www.insn.gob.pe/sites/default/files/investigaciones/desarrollo/informes/2018/Informe%20Final%20TO-02-2011.pdf>
- Guevara, A. (21 de Julio de 2015). *researchgate*. Obtenido de *researchgate*: https://www.researchgate.net/publication/280238995_Mecanismos_de_resistencia_antimicrobiana_en_Pseudomonas_aeruginosa_Impermeabilidad_de_membrana_y_bombas_de_eflujo
- Hernán Rodríguez, C., Nastro, M., & Famiglietti, A. (Septiembre, 2018). *Carbapenemasas in Acinetobacter baumannii. Review of their dissemination in Latin America*. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 50. Núm. 3. Julio - Septiembre 2018, páginas 231-334 DOI: 10.1016/j.ram.2017.10.006
- Hernandez, A., Garcia, E., Herrero, J., & Gomez, J. (22 de Mayo de 2014). *sciencedirect*. Obtenido de *sciencedirect*: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541214707759#!>
- Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. (15 de Marzo de 2016). *insht.es*. Obtenido de *insht.es*: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Pseudomonas%20aeruginosa%202017.pdf>
- Jalinas Gavarrete, J. (2016). Tesis monográfica para optar a título de médico y cirujano. *Resistencia bacteriana en cultivos de pacientes ingresados en el Hospital Humberto Alvarado de Masaya en el periodo de Enero de 2014 a Enero de 2015*. Masaya, Nicaragua.
- MacQuhae, C. (2 de Noviembre de 2018). *lifeder.com*. Obtenido de *lifeder.com*: <https://www.lifeder.com/pseudomonas-aeruginosa/>
- Lacueva, M. (28 de Febrero de 2017). *Scholar.google.es*. Obtenido de *Scholar.google.es*: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MANUEL%20LACUEVA%20ARNEDO.pdf>
- López, D., Torres, M., & Prada, C. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Revista Universidad y Salud*, 190-202.
- López, M. (20 de Abril de 2016). <http://repositorio.uta.edu.ec>. Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec>:

<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22436/2/LOPEZ%20ESTRELLA%20C%20MARIA%20TERESA.pdf>

Luc, M. (15 de Marzo de 2015). *digital.lib.washington.edu*. Obtenido de *digital.lib.washington.edu*:

https://digital.lib.washington.edu/researchworks/bitstream/handle/1773/33070/Luc_washington_02500_14147.pdf?sequence=1

Lumen microbiology. (5 de Octubre de 2016). *courses.lumenlearning.com*. Obtenido de *courses.lumenlearning.com*:

<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/testing-the-effectiveness-of-antimicrobials/>

MacQuhae, C. (2 de Noviembre de 2018). *lifeder.com*. Obtenido de *lifeder.com*:
<https://www.lifeder.com/pseudomonas-aeruginosa/>

Martínez, L. (2016). *Detección de microorganismos multirresistentes*. Revista Médica Valdecilla, 17-25.

Medina, J., Paciel, D., Noceti, O. & Rieppi, G. (2017). *Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias*. Rev Méd Urug 2017; 33(3):195-206. Extraído desde <http://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v33n3/1688-0390-rmu-33-03-00079.pdf>

Melaine, R. (10 de Junio de 2017). *ONsalus*. Obtenido de *ONsalus*:
<http://www.onsalus.com/infeccion-por-pseudomonas-sintomas-causas-y-tratamiento-19376.html>

Microbiology info. (23 de Abril de 2015). *microbiologyinfo.com*. Obtenido de *microbiologyinfo.com*:
<https://microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>

Microcsalud. (20 de Junio de 2014). *Microcsalud.us*. Obtenido de *Microcsalud.us*:
<http://www.microcsalud.us.es/grado>temas>

Molina, J. (16 de Mayo de 2015). *facmed.unam*. Obtenido de *facmed.unam*:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html>

Morán, A. (17 de Diciembre de 2014). *Dciencia*. Obtenido de
<http://www.dciencia.es/antibioticos/>

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2016). *Medical Microbiology*. Philadelphia: Elsevier.

National institute of open schooling. (6 de Agosto de 2014). *Nios.ac.in*. Obtenido de *Nios.ac.in*:
<https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/Microbiology/Lesson-12.pdf>

- Ophelie, C., & Molin Queste, M. (2016). *Detección Fenotípica de Carbapenemasas en Pseudomonas aeruginosa en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013*. Obtenido de [https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)25-031](https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)25-031)
- Organización Mundial de la Salud. (27 de Febrero de 2017). WHO. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Pérez Farias, Y., Pérez Quiñones, D. & Carmona Cartaya, Y. (2016). *Complejo Acinetobacter baumannii-calcoaceticus multidrogresistente productor de betalactamasas en hospitales cubanos. IPK, 2016*. Convención Internacional de Salud, Cuba Salud 2018
- Pérez Mendoza, F. (2016). *Patrones de resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas en pacientes de neonatología del Hospital Alemán Nicaragüense, periodo enero-diciembre 2014*. Managua, Managua, Nicaragua.
- Pilatasig, R., & Cecibel, S. (25 de Abril de 2016). *Repositorio Digital UCE*. Obtenido de Repositorio Digital UCE: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7887>
- Resurrección, C., Montenegro, J., Chiappe, A., Vargas, R., Cucho, C., Mamani, D., & Huaroto, L. (2017). Klebsiella pneumoniae nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 261-267.
- Rios, M., & Hernandez, F. (29 de Enero de 2016). <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe>. Obtenido de <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe>: http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3854/Marcos_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rodriguez, R., Bustillo, D., Caicedo, D., Cadena, D., & Castellanos, C. (30 de Marzo de 2016). *Scielo.org*. Obtenido de *Scielo.org*: <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v29n2/v29n2a11.pdf>
- Rojas, J., Silva, E., & Zambrana, L. (2004). Tesis para optar al Título de Especialista en Pediatría. *Multi-resistencia Antimicrobianas de bacterias Gram negativas Hospital San Juan de Dios de Estelí Febrero 2002 - Febrero 2003*. León, Nicaragua.
- Rueda, A. M. (2014). *Resistencia bacteriana en enterobacterias y no fermentadores. Colombia*.
- Sabatier, C., Peredo, R., & Valles, J. (2009). *Bacteriemia en el paciente crítico*. ELSEVIER España, *Med Intensiva*. 2009;33(7):336–345. doi:10.1016/j.medin.2008.08.001

- Salvador Luján, N. (2017). Identificación de genes de Metalo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* de aislados clínicos hospitalarios 2016. Lima, Perú.
- Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J., & Habibovic, P. (4 de Septiembre de 2017). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Obtenido de *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780537/>
- Semantic scholar . (23 de Mayo de 2018). *semanticscholar.org*. Obtenido de *semanticscholar.org*: <https://www.semanticscholar.org/topic/Macro-Broth-Dilution-Method/3734659>
- Singh, B. (19 de Marzo de 2016). *researchgate.net*. Obtenido de *researchgate.net*: https://www.researchgate.net/publication/281405283_Antibiotics_Introduction_to_Classification
- Suárez, C., Kattán, J., Guzmán, A., & Villegas, M. (2006). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. Colombia.
- Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., Tao, N. (10 de Abril de 2017). *Theranostics*. Obtenido de *Theranostics*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479269/>
- Todo sobre odontologia . (26 de Marzo de 2014). *todosobreodontologia.blogspot*. Obtenido de *todosobreodontologia.blogspot*: <http://todosobreodontologia.blogspot.es/1395799616/antibioticos-betalactamicos/>
- Vanegas, J., Higueta, L., Vargas, C., Astrid, C., Rodriguez, E., Roncancio, G., & Jiménez, J. (2015). *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis e infecciones de la piel y los tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia. *Biomédica*, 522-530.
- Vanegas, J., Roncancio, G., & Jimenez, J. (18 de Julio de 2014). *scielo*. Obtenido de *scielo*: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v28n2/v28n2a08.pdf>
- Vásquez Hidalgo, I. (1 de Junio de 2016). Tipos de estudio y métodos de investigación. España.
- Virulance Factors of Pathogenic Bacteria. (7 de Febrero de 2019). *VFDB*. Obtenido de *VFDB*: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>

ANEXOS

Tabla N° 6: *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas enero 2017-febrero 2018 (HAN)

Código interno de laboratorio POLISAL	Tipo de microorganismos aislado	Sexo del paciente	Edad del paciente	Sala de donde fue aislado el microorganismo	Lugar de toma de muestra	Sinergia con carbapenémicos + EDTA	Genes MβL encontrados
18-008	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	39 días	UCI-neonato	Catéter	POSITIVA	VIM, GIM
18-009	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	5 días	UCI-neonato	Hemocultivo	NEGATIVA	VIM, GIM
18-010	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	66 años	Medicina Interna	Secreción	POSITIVA	VIM, GIM
18-011	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	19 años	UCI-adultos	Secreción	POSITIVA	VIM, GIM
18-012	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	15 años	UCI-pediátrica	Exudado faríngeo	POSITIVA	VIM, GIM
18-013	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	15 años	UCI-pediátrica	Secreción Traqueal	POSITIVA	VIM, GIM
18-014	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Masculino	2 meses	UCI-pediátrica	Secreción bronquial	POSITIVA	VIM, GIM
18-015	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	56 años	UCI-adultos	Secreción bronquial	POSITIVA	VIM, GIM
18-016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	16 años	UCI-pediátrica	Secreción Traqueal	NEGATIVA	VIM, GIM
18-017	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Masculino	76 años	UCI-adultos	Secreción	POSITIVA	VIM, GIM
18-018	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Masculino	38 días	UCI-pediátrica	Hemocultivo	NEGATIVA	VIM, GIM
18-019	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	5 meses	UCI-neonato	Hemocultivo	POSITIVA	VIM, GIM
18-020	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Masculino	3 meses	UCI-neonato	Secreción bronquial	POSITIVA	VIM, GIM
18-021	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Masculino	1 mes	UCI-pediátrica	Hemocultivo	NEGATIVA	VIM, GIM
19-004	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Femenino	52 años	-	Secreción de úlcera	-	Negativo
19-010	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		UCI-neonato	Secreción bronquial	-	VIM, GIM

Fuente: Libros de registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense/Datos del Laboratorio de Bioanálisis Clínico y Biología Molecular, POLISAL, UNAN-Managua.

Tabla N° 7: *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas enero 2017-febrero 2018 (HAN)

Código interno de laboratorio POLISAL	Tipo de microorganismos aislado	Sexo del paciente	Edad del paciente	Sala de donde fue aislado el microorganismo	Lugar de toma de muestra	Sinergia con carbapenémicos + EDTA	Genes MβL encontrados
18-001	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	46 años	Cirugía	Hemocultivo	NEGATIVO	VIM, GIM
18-002	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	37 años	UCI-adultos	Hemocultivo	NEGATIVO	Negativo
18-003	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	15 días	UCI-neonato	Hemocultivo	NEGATIVO	Negativo
18-004	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	8 días	UCI-neonato	Hemocultivo	POSITIVO	NDM
18-005	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Femenino	61 años	UCI-adultos	Líquido bronquial	NEGATIVO	Negativo
18-006	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Femenino	-	UCI-adultos	Tubo endotraqueal	NEGATIVO	Negativo
18-007	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Femenino	33 años	Ginecología	Herida Quirúrgica abdomen	NEGATIVO	Negativo
19-001	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	52 años	UCI-adultos	Líquido Pleural	-	Negativo
19-002	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	50 años	Cirugía	Úlcera	-	Negativo
19-003	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Femenino	34 años	UCI-adultos	Punta de catéter	-	Negativo
19-005	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Femenino	48 años	Cirugía	Lavado bronquial	-	Negativo
19-006	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	95 años	UCI-adultos	Bronquial	-	Negativo
19-007	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Femenino	87 años	UCI-adultos	Hemocultivo	-	Negativo
19-008	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	34 días	UCI-neonato	Bronquial	-	Negativo
19-009	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	48 años	UCI-adultos	Hemocultivo	-	NDM
19-012	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Masculino	20 años	UCI-adultos	Hemocultivo	-	Negativo

Fuente: Libros de registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense/Datos del Laboratorio de Bioanálisis Clínico y Biología Molecular, POLISAL, UNAN-Managua.

Tabla N° 8. Perfil de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas

Antibiótico	Frecuencia	Porcentaje Sensibles	Frecuencia	Porcentaje Intermedios	Frecuencia	Porcentaje Resistente	N° total de cepas
CAZ	0	0%	0	0%	13	100%	13
AMC	0	0%	0	0%	1	100%	1
FEP	0	0%	0	0%	12	100%	12
ATM	0	0%	0	0%	9	100%	9
PRL	0	0%	0	0%	11	100%	11
IMP	0	0%	0	0%	15	100%	15
MEM	0	0%	0	0%	14	100%	14
TZP	2	17%	9	75%	1	8%	12
SAM	0	0%	0	0%	1	100%	1
GEN	1	9%	0	0%	10	91%	11
CIP	0	0%	0	0%	11	100%	11
LVX	0	0%	0	0%	13	100%	13
AMK	0	0%	0	0%	3	100%	3
COL	11	100%	0	0%	0	0%	11
MOX	0	0%	0	0%	2	100%	2

Fuente: Libros de registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense.

Tabla N° 9. Perfil de resistencia de *Acinetobacter baumannii* productores de metalo β -lactamasas

Antibiótico	Frecuencia	Porcentaje Sensibles	Frecuencia	Porcentaje Intermedios	Frecuencia	Porcentaje Resistente	N° total de cepas
CAZ	0	0%	0	0%	3	100%	3
FEP	0	0%	0	0%	3	100%	3
PRL	0	0%	0	0%	3	100%	3
IMP	0	0%	0	0%	3	100%	3
MEM	0	0%	0	0%	3	100%	3
TZP	0	0%	0	0%	3	100%	3
SAM	1	33%	0	0%	2	67%	3
GEN	1	50%	0	0%	1	50%	2
CIP	1	33%	0	0%	2	67%	3
LVX	1	33%	1	33%	1	33%	3
AMK	0	0%	1	50%	1	50%	2
TET	1	33%	0	0%	2	67%	3
MNO	3	100%	0	0%	0	0%	3
STX	0	0%	0	0%	3	100%	3
CTX	0	0%	0	0%	3	100%	3
TG	0	0%	0	0%	3	100%	3
CRO	0	0%	0	0%	3	100%	3
COL	3	100%	0	0%	0	0%	3

Fuente: Libros de registro del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Alemán Nicaragüense.

Autorización del SILAIS Managua para la realización del estudio



Gobierno de Reconciliación
y Unidad Nacional

El Pueblo, Presidente!

2017

TIEMPOS DE *Por Gracia*
VICTORIAS! *de Dios!*

Managua, 04 de Diciembre del 2017.
DDI-GAL-11-849-17

Dra. Claudia Amador
Subdirectora Docente Hospital Aleman Nicaraguense
SILAI Managua
Su Oficina.

Estimada Dra. Amador:


Por este medio me dirijo a usted, para hacer de su conocimiento que se ha solicitado autorización para que la Bachilleres; **Braulio Renato Centeno Rizo, Francisco Antonio García Herrera y Abraham Enoc Molina Morales**, estudiantes de la carrera de Licenciatura en Microbiología del POLISAL-UNAN Managua, realicen trabajo de investigación titulado “ **Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de carbapenemasa en cepas de bacilos Gram Negativos no fermentadores aisladas de muestras clínicas de pacientes internos en salas del Hospital Aleman Nicaraguense, Noviembre 2017 a Enero 2018.**”

Tengo a bien expresarle que la información se recolectara a través de ficha estructurada de recolección de datos y se obtendrá en base a la información obtenida de los registros de bacteriología proveniente de muestras clínicas de pacientes hospitalizados. El periodo para la recolección de la información será a partir del 6 al 20 de Diciembre 2017, reiniciando con la recolección de la información del 3 al 31 de Enero 2018.

Por lo antes descrito contando con su anuencia, estamos autorizando a la Bachilleres antes mencionados para que se presente en la Unidad Hospitalaria a coordinar con Usted la actividad investigativa. Adjunto Protocolo de investigación.

Sin más a que hacer referencia me despido.

Atentamente,


Dra. Gilma Arías Linares
Directora Docente
SILAI Managua.
OFICINA DE DOCENCIA
C/c: Interesados
Archivo


FE,
FAMILIA
Y COMUNIDAD!

**CRISTIANA, SOCIALISTA,
SOLIDARIA!**

MINISTERIO DE SALUD-SILAI Managua.
Colonia Xolotlán, de la iglesia católica 1/2 C al lago
Managua, Nicaragua. PBX (505) 22515740
Email: silaismanagua@minsa.gob.ni

Ficha de recolección de datos

FICHA N°: 001



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
UNAN-Managua
Recinto Universitario Rubén Darío
Instituto Politécnico de la Salud
“Luis Felipe Moncada”
Departamento de Bioanálisis Clínico

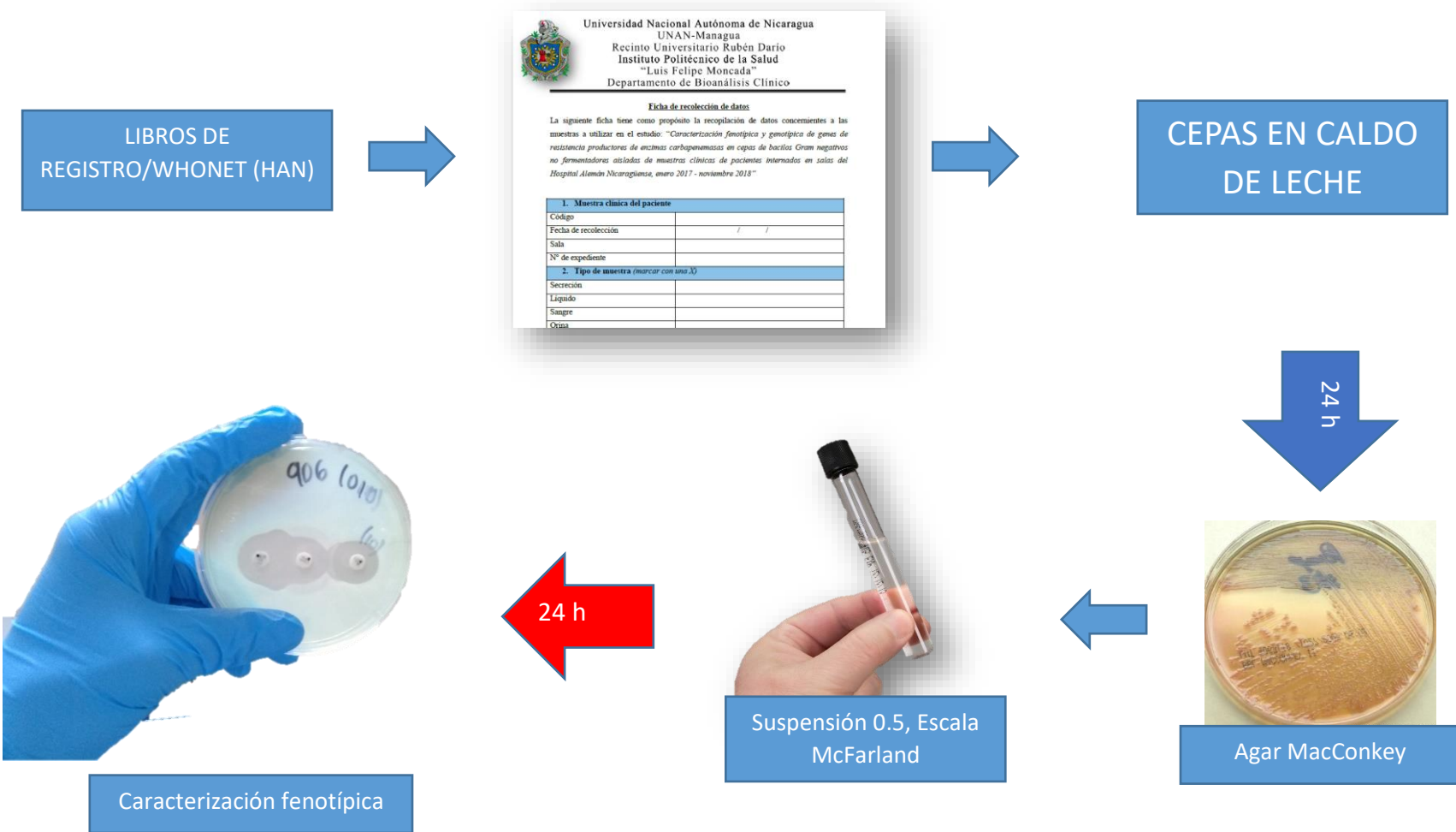
Ficha de recolección de datos

La siguiente ficha tiene como propósito la recopilación de datos concernientes a las muestras a utilizar en el estudio: “Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de metalo β -lactamasas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018”

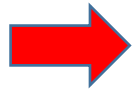
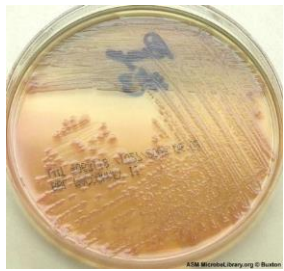
1. Detalles del paciente				2. Microorganismo aislado		
ID de muestra Lab “HAN”						
Edad del paciente				3. Detalles de la muestra		
Sexo del paciente				Con Antibiótico* (SI/NO)		
Fecha de aislamiento				Hemocultivo		
Sala				Secreción		
N° de expediente*				Líquido		
ID de ingreso a Lab.				Orina		
				*En caso que la información esté disponible		
Observaciones						
4. Mecanismo de resistencia fenotípico				5. Mecanismos de resistencia genotípicos		
Metalo β -lactamasa (Sinergia EDTA)				M β L	IMP	
Sin sinergia con EDTA					VIM	
6. Perfil de resistencia fenotípico					GIM	
Fármaco	Estado (S, I, R)	Kirby-Bauer (mm)	Vitek 2.0 (CIM)		SIM	
CAZ					SMP	
AMC					NDM	

FEP				*Fecha reactivación de cepa: *Fecha fenotipo: *Fecha Extracción ADN: *Fecha Amplificación y electroforesis:
ATM				
PRL				
IMP				
MEM				
TZP				
SAM				
GEN				
CIP				
LVX				
AMK				
TET				
MNO				
STX				
RIP				
CRO				
COL				

Algoritmo N° 1: Procesamiento de muestras para la parte fenotípica (Recolección de información, reactivación y búsqueda de mecanismo de resistencia a carbapenémicos)



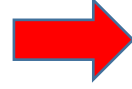
Algoritmo N° 2: Procesamiento de muestras para la parte Genotípica (Extracción, amplificación y electroforesis de ADN)



Pool de células/UFC



Baño maría en ebullición/



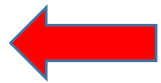
Centrifugación



Extracción ADN



Amplificación ADN



Electroforesis

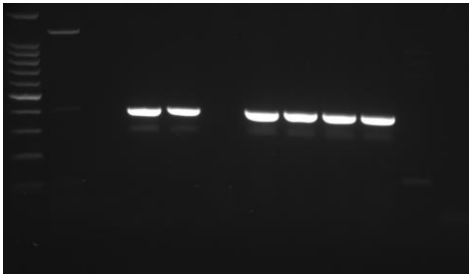
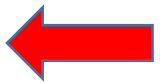
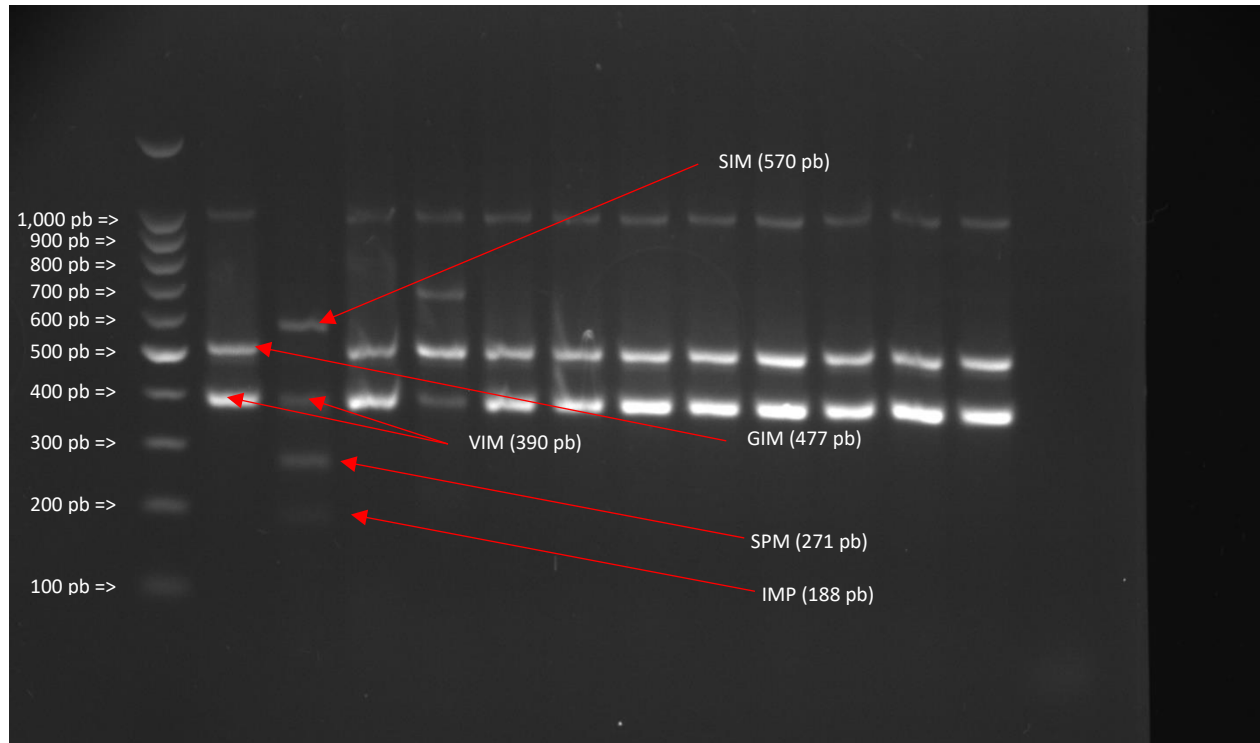
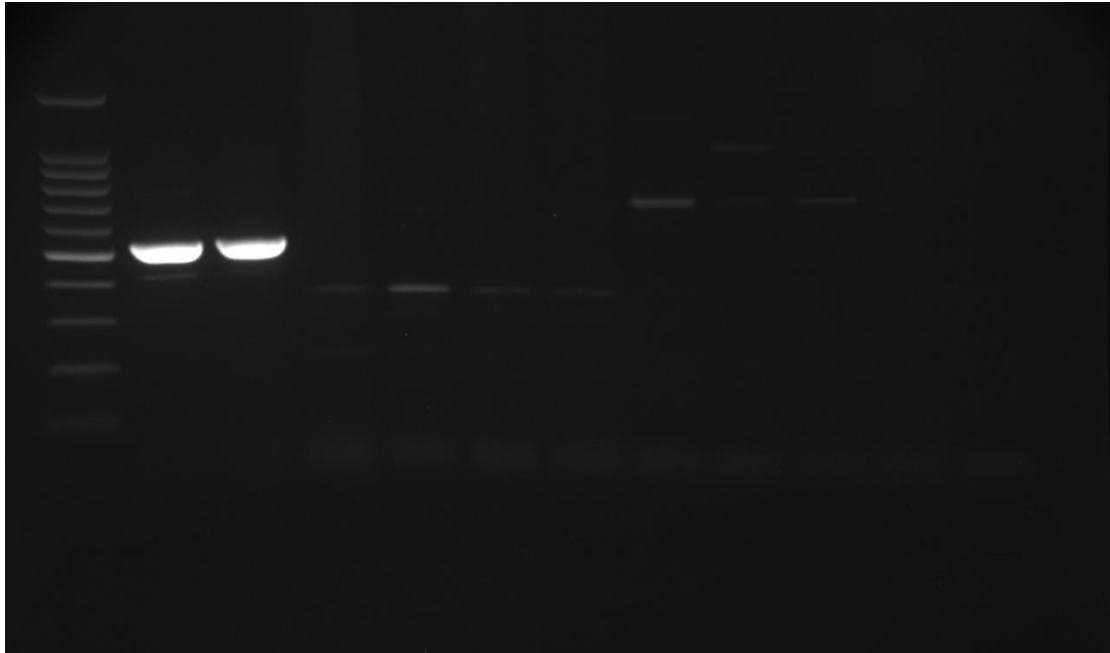


Imagen N° 1: Electroforesis para metalo β -lactamasas (PCR-Múltiplex)



Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Pocillo 1: Marcador Molecular (100 pb); **Pocillo 2:** Control Positivo #1 (VIM, GIM), **Pocillo 3:** Control Positivo #2 (SIM, VIM, SPM, IMP); **Pocillos 4 al 13:** ADN de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (VIM, GIM), **Pocillo 14:** Control Negativo (Agua grado PCR). (Imagen cortesía de Laboratorio de Biología Molecular, POLISAL, UNAN-Managua ©)

Imagen N° 2: Electroforesis para metalo β -lactamasas (NDM)



Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Pocillo 1: Marcador Molecular (100 pb); **Pocillo 2:** Control Positivo (NDM, 512 pb), **Pocillo 3:** ADN de cepa de *Acinetobacter baumannii* (NDM, 512 pb); **Pocillos 4 al 13:** ADN de *Acinetobacter baumannii* (negativos), **Pocillo 14:** Control Negativo (Agua grado PCR). (Imagen cortesía de Laboratorio de Biología Molecular, POLISAL, UNAN-Managua ©)

Anexo N° 12 Presupuesto

- **Fase de caracterización fenotípica**

Unidades	Material	TOTAL, Costo (\$)
1	Agar MacConkey	76.6
1	Agar Mueller Hinton	69.4
150	Placas petri de 12 cm	29.3
3	Asas estériles	24
		\$ 205

- **Fase de caracterización genotípica**

Unidades	Material	Costo (\$)
-	Reactivos para PCR (Insumos, Primers, dNTPs, Agua, Enzima “DreamTaq Polimerase”, TBE 10 x, Agar Agarosa	2,357 (aprox)
-	Materiales para extracción de ADN	24
-	Materiales para electroforesis	145
		\$ 2,526

Otros gastos: Lapiceros, transporte, cinta adhesiva, etc. No se incluyen en el presupuesto total

COSTO TOTAL APROXIMADO DE LA INVESTIGACIÓN: \$ 2,731

