



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA,  
MANAGUA

UNAN - MANAGUA

**RECINTO UNIVERSITARIO "RUBEN DARIO"  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD "DR LUIS FELIPE MONCADA"  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:**

**Licenciatura en Bioanálisis clínico**

**Tema:**

**FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS Y NO FERMENTADORES  
PORTADORES DE GENES VIM, IMP Y NDM, AISLADOS DE  
HEMOCULTIVOS, EN PACIENTES INTERNOS EN EL HOSPITAL  
ALEMÁN NICARAGÜENSE EN EL PERIODO DE ENERO A DICIEMBRE,  
2019.**

**AUTORES:**

- Br. Anthony Josué Brizuela Jiménez
- Br. Elton Jenner Maradiaga Siles

**TUTOR:**

Lic. Yader Antonio Lanzas Baca.

**ASESOR (A):**

Lic. Daniela Magaly Ruiz Saldívar

**MANAGUA, MARZO 2020.**

## **Agradecimientos:**

Primeramente, a Dios por permitirnos llegar hasta la última etapa de nuestras carreras y resguardarnos en todo el camino y dotarnos de sabiduría.

A nuestros padres y familiares por ser nuestros soportes incondicionales y estar al lado de nosotros en momentos de dificultad sin su apoyo y motivación no fuese sido posible cumplir esta meta.

A nuestros compañeros más cercanos que fueron una segunda familia y estuvieron a lado de nosotros en el proceso de aprendizaje.

A nuestros maestros por la paciencia y entrega a su labor de enseñar ya que sin ellos no tendríamos el conocimiento y la base científica para elaborar esta tesis.

Al hospital Alemán Nicaragüense por permitirnos el permiso de poder realizar nuestra investigación y el personal de trabajo por su disponibilidad y accesibilidad en todo momento.

A nuestros tutores por su dedicación y entrega a con nosotros fueron el pilar principal y sin su confianza y conocimientos al inicio de esta investigación no fuese sido posible cumplir los objetivos planteados.

De manera especial dar las gracias por la ayuda a la Lic. Julissa Ávila especialista en laboratorio de salud en CNDR por su apoyo en la parte molecular y guía en esta investigación ya que con sus conocimientos aprendimos con mayor claridad a cerca de nuestro tema de investigación.

## **Dedicatoria**

Para honra de mis padres ya que sin su apoyo no hubiera sido posible culminar, este logro se los dedico como agradecimiento a su esfuerzo conmigo, ya que siempre estuvieron a mi lado aconsejándome asimismo enseñándome a valorar todo lo que tengo y a la vez fomentando en mí el deseo de alcanzar mis metas, siempre serán mi motivo de superación.

A mis hermanos por confiar en mí en todo momento y estar al tanto de mí prestando atención a mis necesidades, también a mis familiares y amigos que me ayudaron a lo largo del camino estando presente en cada proceso de mi formación, a su lado cada etapa fue especial.

**Anthony Josué Brizuela Jiménez.**

## **Dedicatoria**

### **A Dios:**

Por la oportunidad de cada día, por la capacidad y su misericordia de traerme hasta acá.

### **A mis padres:**

Máxima y Salomón

Con infinita gratitud, por la fe que me tienen, por creer en mí y porque, desde siempre, han tenido algo que enseñarme cada día; por estar siempre dispuestos, atentos. Por todo lo que hacen, por el enorme sacrificio que han hecho y por hacerme entender que hay que luchar siempre por nuestras ideas y metas con amor y empeño.

### **A mis hermanos:**

Porque también me acompañan, por la unión y el esfuerzo que hacen para conmigo.

### **A los abuelos:**

Por abonar este proyecto de vida desde sus inicios y el aprecio de ellos que han sido un motor para luchar y salir adelante.

Y, a los que el mérito les reconoce su aporte, que también siempre les es agradecido y nunca olvidado.

**Elton Jenner Maradiaga Siles**

## RESUMEN

La resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos, las enfermedades infecciosas bacterianas comunes son cada vez más difíciles y a veces imposibles de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia. Los carbapenémicos son antibióticos betalactámicos que poseen una actividad bactericida extremadamente amplia y es administrable por vía parenteral.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo no experimental con un enfoque cuantitativo de carácter transversal, realizado en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN). Se llevó a cabo un muestro no probabilístico por conveniencia. De las 82 cepas de bacilos gram negativos aislados en hemocultivo que conformaron el universo de la investigación, únicamente 43 cepas presentaron resistencia a carbapenémicos lo que representa un 52.4% del total de las muestras. Las cepas resistentes se estudiaron con el método Blue-Carba Test y luego con el método de difusión por triple disco en agar con el objetivo de corroborar la presencia de enzimas Metallo- $\beta$ -lactamasas en donde todas las 43 resultaron positivas.

Se usó la PCR Multiplex para la detección de genes de resistencia presentes en las 43 cepas seleccionadas con sinergia positiva, donde los resultados obtenidos arrojaron la presencia de genes tipo: Gen NDM-1 con 69%, 28% IMP y 26% VIMP respectivamente. Hay que resaltar que, se encontraron 10 cepas con más de un gen, en las cuales fueron encontrados dos genes en 9 cepas de *P. aeruginosa* y en 1 cepas de *Enterobacter cloacae* y, en todos los casos antes mencionados los genes encontrados fueron VIM e IMP, genes que codifican Metallo- $\beta$ -lactamasas.

El mayor porcentaje de aislamientos positivos que presentaron resistencia a carbapenémicos corresponde a la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología con 31 cepas provenientes de esa sala representando un 72% del total de la muestra poblacional estudiada. El predominio de los microorganismos en el estudio es: *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* con un 34% respectivamente, en el caso de *Enterobacter cloacae*, un 18% y las que resultaron con una menor frecuencia están, *Escherichia coli* 4% y *Pantoea agglomerans* y con 2%.

## VALORACIÓN DEL TUTOR

Constantemente estamos escuchando de la aparición de “súper bacterias” que destacan por su habilidad de resistir a múltiples familias de antimicrobianos; las estimaciones y pronósticos no son alentadores para los hospederos, en la actualidad las estrategias para combatirlas van dirigidas a medidas de contención en la diseminación y de higiene establecidas en las normativas de salud pública.

Sin las bacterias la vida misma no sería posible, pensar en su erradicación es imposible y su evolución normal es un proceso tan rápido que les ha permitido establecerse en un escalafón superior; pese a tratarse de seres unicelulares. He aquí la importancia de conocerlas y entender cuáles son estos mecanismos que les han permitido perdurar.

Los esquemas de tratamientos intrahospitalarios en nuestro sistema de salud pública, incluyen a las familias de  $\beta$ -lactámicos como la principal terapia a ser utilizados gracias a sus bajos efectos adversos y costos. Es por ello que la aparición de enzimas de tipo carbapenemasas, con su capacidad de hidrolizar carbapenémicos; última línea de tratamientos de esta familia, reduce drásticamente las alternativas terapéuticas sostenibles en aquellos pacientes que además aquejan múltiples patologías preexistentes.

Considero que éste trabajo de monografía con la temática “**frecuencia de enterobacterias y no fermentadores portadores de genes VIM, IMP y NDM, aislados de hemocultivos, en pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019.**”, tiene relevancia porque permite establecer la continuidad en el aprendizaje y conocimiento de ésta pandemia que aqueja a nuestros pacientes en los centros hospitalarios; cuyo fin será redirigir los protocolos y esquemas de tratamientos en base a los datos epidemiológicos que tengamos tanto a niveles locales como nacional.

TUTOR: Yader Antonio Lanzas Baca  
Especialista en Bacteriología médica.  
Licenciado en Bioanálisis Clínico.

## VALORACIÓN DEL ASESOR METODOLOGICO

En la última década el aumento de la incidencia de infecciones causadas por bacterias gramnegativas resistentes a múltiples fármacos, incluyendo enterobacterias multirresistentes (MR), estos microorganismos generalmente están implicados en infecciones graves, por lo que actualmente suponen un gran problema de salud pública mundial. Este aumento de resistencias antimicrobianas, unido al poco desarrollo de nuevos antibióticos hace que cada vez dispongamos de menos opciones terapéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades infecciosas.

El aislamiento de bacterias en la sangre de un paciente posee importancia diagnóstica y de pronóstico, y se asocia a un cuadro clínico de gravedad. Ello se relaciona con la gravedad de las infecciones que pueden causar, las dificultades para establecer un tratamiento empírico (e incluso dirigido) correcto, la facilidad para la dispersión de la multirresistencia y la ausencia de nuevos antimicrobianos activos frente a estos patógenos. Siendo las infecciones del torrente sanguíneo muy importantes, pues su mortalidad oscila entre 13.6 y 38%.

Por tal razón considero que este trabajo monográfico será de mucha utilidad para contribuir a la realización de futuras investigaciones, al desarrollo científico de los profesionales en nuestra especialidad y todas aquellas afines a nuestro perfil. Por consiguiente, el trabajo con el Tema: **“frecuencia de enterobacterias y no fermentadores portadores de genes VIM, IMP y NDM, aislados de hemocultivos, en pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019.”** reúne todos los requerimientos científicos y metodológicos para ser presentado y defendido por sus autores.

**Asesora metodológica: Lic. Magaly Ruiz Saldívar.**

Docente Dpto. Bioanálisis Clínico

POLISAL-UNAN-Managua

## GLOSARIO

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AMC:** Amoxicilina-Ácido clavulánico

**ATCC:** American Type culture collection

**AMK:** Amikacina

**ATM:** Aztreonam

**AMP:** Ampicilina

**AMP-C:** Cefalosporinas de clase C.

**APB:** Ácido fenil-borónico

**BGN:** Bacilos gram negativos

**BLEE:**  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

**CAR:** Carbenicilina

**CAZ:** Ceftazidime

**CC:** Control de Calidad

**CEC:** Cefaclor

**Cx:** Sala de cirugía

**CHL:** Cloranfenicol

**CIM:** Concentración Mínima Inhibidora

**CMB:** concentración mínima bactericida

**CIP:** Ciprofloxacino

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

**CNDR:** Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia



**COL:** Colistín

**CRO:** Ceftriaxona

**CXM:** Cefuroxime

**dNTP's:** Desoxirribonucleótidos libres

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**ERT:** Ertapenem

**FEP:** Cefepime

**FOX:** Cefoxitin

**GEN:** Gentamicina

**GIM:** German imipenemasa

**HAN:** Hospital Alemán Nicaragüense

**I:** Intermedio

**IAAS:** Infecciones asociadas a la asistencia sanitaria

**IMP:** Imipenem

**IMP:** Imipenemasa

**KPC:** Klebsiella pneumoniae Carbapenemasa.

**LPS:** Lipopolisacárido

**LVX:** Levofloxacino

**MgCL2:** Cloruro de magnesio

**MBL:** Metalobetalactamasas

**MNO:** Minociclina

**MH:** Mueller Hinton

**MI:** Sala de medicina interna

**MER:** Meropenem

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NAL:** Ácido Nalídixico

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

**NDM:** New Delhi métalo-beta- lactamasa

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización panamericana de salud

**OXA:** Oxacilinas

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PIP:** Piperacilina

**PBP:** Proteínas fijadoras de penicilina

**R:** Resistente

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SO<sub>4</sub>Zn:** Sulfato de cinc

**S:** Sensible

**SAM:** Ampicilina sulbactam

**SIM:** Seoul imipenemasa

**SPM:** Sao Paulo métalo-beta-lactamasa

**SXT:** Trimetoprim-Sulfametoxazol

**TAE O TBE:** Tris- borato-EDTA

**TSA:** Trypto-Casein Soy Agar

**TGC:** Tigeciclina

**TIC:** Ticarcilina

**TZP:** Piperacilina- Tazobactam

**UCI:** Unidad de cuidados intensivos de adultos

**UCIP:** Unidad de cuidados intensivos pediátrica

**UCIN:** Unidad de cuidados intensivos neonatal

**UFC:** Unidad formadora de colonias

**VIM:** Verona imipenemasa

**Zn+2:** Ion Zinc

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
II. ANTECEDENTES.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	6
IV. OBJETIVOS.....	7
V. MARCO TEÓRICO.....	8
5.1 Bacilos Gram negativos.....	8
5.1.1 Enterobacterias.....	8
5.1.2 No fermentadores.....	9
5.2 Carbapenemicos.....	10
5.2.1 Mecanismo de Acción de los Carbapenemes.....	11
5.3 $\beta$ -Lactamasas.....	11
5.3.1 Carbapenemasas tipo A.....	12
5.3.2 Carbapenemasas tipo B o metalo- $\beta$ -lactamasas.....	12
5.3.3 Carbapenemasas Tipo OXA, Clase D.....	14
5.4 Antibiograma.....	15
5.5 Detección de carbapenemasas.....	16
5.5.1 Detección fenotípica.....	17
5.5.2 Detección por métodos moleculares.....	18
5.5.3 PCR multiplex.....	18
VI. DISEÑO METODOLÓGICO.....	20
6.1 Área de estudio.....	20
6.2 Tipo de estudio.....	20
6.3 Universo.....	20
6.4 Muestra.....	20
6.5 Tipo de Muestreo.....	20
6.6 Unidad de análisis.....	21
6.6 Criterios de inclusión.....	21
6.7 Criterios de Exclusión.....	21
6.8 Recolección de datos e información.....	21
<b>6.9 Operacionalización de las variables.....</b>	<b>23</b>

6.10 Procesamiento de muestras .....	25
6.10.1 Identificación bacteriana .....	25
6.10.2 Perfil de susceptibilidad (Kirby-Bauer) .....	25
6.10.3 Clasificación de carbapenemasas mediante el uso de inhibidores .....	26
6.10.4 Blue carba test. ....	26
6.10.6 Extracción de ADN.....	28
6.10.7 PCR Multiplex para MBL.....	29
6.10.8 Preparación del Gel de Agarosa al (1%).....	30
6.10.9 Electroforesis en Gel de Agarosa (1%).....	30
6.10 Aspectos éticos.....	31
VII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	32
VIII. CONCLUSIONES .....	41
IX. RECOMENDACIONES .....	42
X. BIBLIOGRAFIA .....	43
XI. ANEXOS.....	46

## I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias no fermentadores y enterobacterias son patógenos hospitalarios relacionados ampliamente con las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), que afecta a pacientes críticamente enfermos y su control en los hospitales es muy difícil debido, a su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales extremas y posibilidad de transmisión cruzada y aérea. El mecanismo de transmisión más común es de persona a persona a través de las manos del personal médico o la transmisión desde superficies contaminadas.

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por la capacidad natural o adquirida de una cepa bacteriana a permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antimicrobiano, la ineficacia terapéutica en las infecciones intrahospitalarias se debe en gran medida al uso irracional de los antibióticos para tratar a pacientes con infecciones bacterianas, surgiendo así la resistencia de las bacterias a los antibióticos por diversos mecanismos y principalmente por expresiones de genes como los estudiados IMP, VIM y NDM; que elaboran enzimas que hidrolizan las moléculas de los antibióticos. Esto es una problemática que ha causado preocupación en la comunidad médica por el incremento de estas afecciones en su mayoría por bacterias oportunistas que con frecuencia son resistentes a varios tipos de antibióticos aumentando así la tasa de morbilidad y mortalidad en la población (Gastelo, Sipion, & Vargas, 2015).

En esta investigación se estudiaron los genes VIM, IMP y NDM, ya que estos confieren resistencia a los  $\beta$ -lactámicos usados como tratamiento de primera elección en el hospital en estudio, principalmente los carbapenémicos que anteriormente se usaba como el último eslabón dentro de los  $\beta$ -lactámicos, pero actualmente hay distintos mecanismos que le confieren resistencias a dichos antibióticos, siendo hoy en día en muchos casos ineficaces debido, a que los bacilos Gram negativos presentan resistencia natural o tienen capacidad de compartir genes de bacteria a bacteria como los que se estudiaron en esta investigación y a la vez son de relevante importancia epidemiológica ya que son los que más predominan según estudios realizados anteriormente en el hospital por eso se considera importante el tema; **frecuencia de enterobacterias y no fermentadores portadores de genes VIM, IMP y NDM, aislados de hemocultivos, en pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019.**

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el entorno hospitalario clínico uno de los problemas que tienen mayor relevancia son los altos niveles de resistencia a los antimicrobianos, como los carbapenemes antibióticos ampliamente utilizados como terapias en las infecciones graves, siendo epidemiológicamente importante saber que gen causante de este problema está predominante en el hospital en estudio.

Basado en este problema de salud pública se plantea la frecuencia de enterobacterias y no fermentadores portadores de genes VIM, IMP y NDM, aislados de hemocultivos, en pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019. Este estudio pretende identificar las cepas problemas los genes codificadores de enzimas anteriormente mencionados, que inhiben los tratamientos betalactámicos y la susceptibilidad a priori.

El grupo de las metalo- $\beta$ -lactamasas (MLBS) en especial las que son codificadas por genes VIM, IMP y NDM son unas de las más relevantes carbapenemasas debido a su diversificación estructural como a su rápida diseminación por plásmidos, el hospital Alemán Nicaragüense no está exento de este problema, por tanto, esta investigación basa los objetivos en el estudio de este problema epidemiológico en la unidad de salud de atención hospitalaria antes mencionada.

### **Preguntas directrices.**

1. ¿Cuál es el perfil de resistencia que poseen las enterobacterias y no fermentadores (*Pseudomona* y *Acinetobacter*) productores de carbapenemasas tipo MBL de las muestras en estudio?
2. ¿Cuál es la distribución por salas de enterobacterias y fermentadores productores de carbapenemasas tipo MBL aisladas de pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense?
3. ¿Existe relación alguna entre los resultados obtenidos del método Kirby Bauer por difusión en agar de triple disco y la técnica Blue –carba?
4. De los genes estudiados VIM, IMP y NDM ¿cuál predomina más en las cepas de Bacilos gram negativos no fermentadores y Enterobacterias identificados utilizando la técnica de PCR multiplex?

## II. ANTECEDENTES

Paget et al., en el año 2006 al 2009 realizó un estudio descriptivo titulado; **Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas en el instituto hondureño de seguridad social**, el cual registraron 4,812 aislamientos procedentes de diversas k. pneumoniae, *Echerichia coli* y *Burkholderia cepacia*. La *Echerichia coli* presentó alta resistencia a quinolonas, de 37% a 42%; *Pseudomona aeruginosa* tercera generación y quinolonas, aumentando de 30% en el 2006 a más del 40% en el 2009. *Acinetobacter baumannii* tiene una alta resistencia a todos los antibióticos incluso a los carbapenémicos. resistente a meticilina incrementó de 20% en 2007 hasta 36% en el 2009 (Paget et al., 2009).

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

Cajina durante el año 2015 en la tesis final titulada; **Infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* 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**. Concluyo que se encontró resistencia a Cefotaxima en 103 casos (49%), Cefepime en 102 casos (48.6%), Piperazilina/tazobactam en 95 casos (46.6%); se encontró resistencia a Imipenem en 37 casos (17.6%), al igual que meropenem. Gentamicina se encontró resistente en 120 casos (58.8%), amikacina en 121 casos (57.9%). Ciprofloxacino se encontró resistente en 120 casos (58%). Se reportó 0 casos resistentes a Colistín y Polimixina. Es notorio que casi el 50% del número de fallecidos se encontró en el grupo que era carbapenemasa (+) y probable carbapenemasa; o sea resistente a Imipenem y meropenem, el mayor porcentaje, casi la mitad de todos los fallecidos registrados se encontró en el año 2014, lo que se relaciona como dijimos anteriormente con el mayor porcentaje de resistencia en este año (Cajina 2015).



González y Potoy en el año 2017 titulado, **Frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero-septiembre, 2017**. En donde: Se analizaron cepas resistentes a carbapenemicos aisladas e identificadas dentro de la familia de las enterobacterias de las cuales se estudiaron un total de 21 cepas productoras de carbapenemasas tipo B, confirmadas fenotípicamente por método de difusión de triple disco; como resultado la frecuencia de genes fue de un 86% para NDM-1 y de 14% para IMP teniendo un impacto en el sistema de salud pública por el incremento en el porcentaje de mortalidad atribuido a estos genes; la mayoría de las muestras provinieron de hemocultivos de pacientes ingresados (Gonzales & Potoy, 2017).

Acevedo, Dávila y Montenegro 2017 en la tesis titulada; **Caracterización fenotípica y genotípica de genes de resistencia productores de enzimas carbapenemasas tipo metalo B lactamasas en enterobacterias aislados de pacientes internos en el Hospital Alemán Nicaragüense (HAN) en el periodo enero a diciembre 2017**, encontraron El fenotipo de resistencia perteneciente al tipo MBL en 27 cepas; mediante la técnica de difusión por disco, colocando discos de carbapenémicos de IMP y MER frente a un disco o inhibidor ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); en este estudio, el gen con mayor frecuencia encontrado a través de la técnica de la PCR convencional fue el gen NDM-1, con un 61.77% seguido del gen IMP con un 17.65%, el gen SPM con un 11.76% y finalmente el gen VIM, GIM y SIM con un 2.94% respectivamente. De las cepas estudiadas, se encontraron 5 cepas que eran portadoras de más de 2 genes diferentes, asimismo, se aisló 1 cepa con la presencia de más de dos genes (Acevedo, Dávila y Montenegro 2017).

Arbizú et al. 2018 realizaron otro estudio titulado **Nueva Delhi metalo-b-lactamasa en especies de Enterobacteriaceae aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua**, de donde: Analizaron un total de 45 cepas, de las cuales 43 dieron positivas para el test de sinergia con EDTA; 21 portaban el gen de Nueva Delhi; el 66% de Metalo-b-lactamasa Nueva Delhi se encontró en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, seguida de *Escherichia vulneris*, en un 14%, *Escherichia coli* en un 5%, *Providencia rettgeri* en un 5%, *Pantoea agglomerans* en un 5% y *Kluyvera cryocrecens* en un 5% (Arbizú Medina et al., 2018).

Arias y Bracamonte en el año 2019 determinan en el tema; **Validación del método BLUE CARBA para la detección rápida de carbapenemasas tipo metalobetalactamasas en cepas de bacilos gram negativos procedentes de los diferentes hospitales pertenecientes a la red nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos**, Del total de las cepas utilizadas e identificadas en este trabajo, el 49% fueron cepas de No Fermentadores predominando *P. Aeruginosa* y el 51% fueron de Enterobacterias en su mayoría *K. pneumoniae*; genotípicamente, del 100% de las cepas estudiadas, el 79% eran productoras de carbapenemasas tipo VIM, IMP y NDM, el resto 14% eran cepas productoras de BLEE que solo les confieren resistencia a las cefalosporinas, el 5% presentaban impermeabilidad pura, que les confiere resistencia a los carbapenemicos, pero son sensibles a las cefalosporinas y el 2% presentaba AMP-C+BLEE; seguido a esto, al momento de evaluar el perfil de susceptibilidad el 98% de las cepas de Enterobacterias presentó una resistencia a AMP, CEC, AMC, ERT, CRO y LEV, mientras que un 70.5% presentó una resistencia a NAL, FEP, ATM, IMP. El antibiótico que presentaba sensibilidad en el 90% de las cepas fue COL. De las cepas de *P. aeruginosa* el mayor porcentaje de resistencia lo obtuvieron IMP y MEM con 97% mientras que el otro 3% presentaba sensibilidad a estos, pero con resistencia a las cefalosporinas proporcionada por las BLEE. Solo un 16% presentó sensibilidad a CAZ y FEP y el 100% a COL. En las cepas de *A. baumannii* el mayor porcentaje de sensibilidad lo obtuvieron COL y TGC con 100%, seguido de MNO con 78%, mientras que, para SAM, FEP, CAZ, MEM, IMP, TZP, PIP y SXT el 100% de las cepas presentaron resistencia en su totalidad (Aria & Bracamonte, 2019).

### III. JUSTIFICACIÓN

Los bacilos gram negativos, en situaciones donde el huésped es vulnerable son patógenos nosocomiales potenciales, que tienen la capacidad de presentar multiresistencia a la última línea de antibacterianos  $\beta$ -lactámicos (carbapenémicos), volviéndose un problema de salud pública con prioridad. Estas bacterias poseen una alta capacidad de diseminarse en el ambiente hospitalario y han sido relacionadas en muchos estudios con altos porcentajes de morbilidad y mortalidad. Con el paso del tiempo el grupo de Carbapenemes se han considerado los agentes más efectivos y más utilizados para el tratamiento de las bacterias multirresistentes, esto por tener un bajo costo, poseer un amplio espectro y mayor actividad es por eso que se realizó esta investigación: frecuencia de enterobacterias y no fermentadores portadores de genes VIM, IMP y NDM, aislados de hemocultivos, en pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019. Estos genes son los causantes de la producción de carbapenemasas que hidrolizan este grupo importante de betalactámicos, como NDM, un gen relevante ya que la OMS/OPS en el 2014 subrayó la importancia de reforzar la vigilancia y establecer estrategias de control para prevenir la diseminación de metalobetalactamasas tipo New Delhi.

Este estudio tiene la finalidad científica de sumarse al esfuerzo de atender y actualizar los datos epidemiológicos en el hospital Alemán Nicaragüense, donde se han hecho estudios sobre resistencia bacteriana, sin embargo es necesario hacer más investigaciones con el objetivo de contribuir para actualizar la información de la red de vigilancia de resistencia, a su vez es de importancia clínica trabajar con un líquido estéril como lo es la sangre procedente de hemocultivos, siendo estos analizados en el laboratorio del hospital en estudio y también en el CNDR, asimismo se contribuye a mejorar el diagnóstico microbiológico mediante la utilización de pruebas rápidas como la prueba Blue Carba utilizada por primera vez en el hospital de estudio. Esta investigación además permite que se comprendan las directrices de las investigaciones a futuro en este hospital de la misma manera de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua y que la comunidad de investigadores tengan pautas que les permita consolidar sobre los estudios científicos enfocados en la resistencia bacteriana.

## **IV. OBJETIVOS**

### **General.**

Determinar la frecuencia de enterobacterias y no fermentadores portadores de genes VIM, IMP y NDM, aislados de hemocultivos, en pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019.

### **Específicos.**

1. Evaluar el perfil de resistencia que poseen las enterobacterias y no fermentadores (*Pseudomonas* y *Acinetobacter*) productores de carbapenemasas tipo MBL de las muestras en estudio.
2. Determinar la distribución por salas de cepas productoras de carbapenemasas tipo MBL aisladas de pacientes internos en el hospital Alemán Nicaragüense en periodo de estudio.
3. Relacionar los resultados obtenidos de las cepas estudiadas por el método Kirby-Bauer por difusión en agar de triple discos con la prueba BLUE-CARBA.
4. Identificar los genes presentes en las cepas de estudio que codifican enzimas metalo- $\beta$ -lactamasas VIM, IMP y NDM mediante la técnica PCR multiplex.

## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Bacilos Gram negativos

Las bacterias Gram negativas son una familia con mucha diversidad tanto morfológica como estructuralmente por eso diferenciarlas primordialmente por medio de la tinción de Gram es muy importante para su clasificación y es la más utilizada en la actualidad. Jawetz, Melnick & Adelberg (2016) refiere:

La mayor parte de las bacterias se clasifican como gram positivas o gram negativas con base a su respuesta al procedimiento de tinción de Gram. El procedimiento recibió su nombre por el histólogo, Hans Christian gram, quien desarrollo este procedimiento de tinción diferencial en un intento para teñir las bacterias en tejidos infectados. (p.23)

Los bacilos Gram negativos es un grupo muy heterogéneo de especies con fines prácticos donde se establecen 4 grupos:

Bacilos de crecimiento rápido en medios de cultivo usuales, que fermentan la glucosa (bacilos fermentadores) 2. Bacilos de crecimiento rápido en medios de cultivo usuales, que NO fermentan la glucosa (bacilos no fermentadores) 3. Bacilos de crecimiento rápido o lento, que pueden o no fermentar la glucosa, pero que necesitan de condiciones y medios de cultivo especiales para su crecimiento. 4. Bacilos Gram-negativo anaerobios estrictos (Zepeda, sf).

#### 5.1.1 Enterobacterias.

La familia Enterobacteriaceae es un grupo muy variado y extenso de bacilos gramnegativo la familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2016). El nombre enterobacteria se empleó por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre (Garcia & Rodriguez, 2010, p. 3426).

### **5.1.1.2 Características**

Las características para este grupo heterogéneo se basan en pruebas de crecimientos en cultivos y pruebas bioquímicas en donde se les agrupa por similitudes (García & Rodríguez, 2010) clasifica: Características típicas y distintivas de las enterobacterias:

- Son aerobios no formadores de esporas que pueden crecer en anaerobiosis.
- (anaerobios facultativos).
- Reducen los nitratos a nitritos (con algunas excepciones).
- No licuan el alginato.
- Fermentan la glucosa a ácido con producción de gas o sin ella.
- Son oxidasa-negativos, a excepción de *Plesiomonas*.
- Producen catalasa.
- No ven favorecido su crecimiento por la presencia de NaCl.
- La mayoría son móviles (con flagelos peritricos).
- No formadores de esporas.

### **5.1.2 No fermentadores**

Son bacilos o cocobacilos gram negativos, aerobios estrictos, este grupo de bacterias se le emplea el término no fermentadores ya que no fermenta los hidratos de carbono, y lo utilizan por vía oxidativa, sin formación de gas. Generalmente son oxidasa positiva, pueden ser móviles o inmóviles, presentan flagelos polares, bipolares y peritricos.

Este gran grupo de bacilos Gram negativos incluye gérmenes pertenecientes a diferentes familias y otros géneros de incierta clasificación. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, son algunos de ellos, en general desprovistos de grandes atributos de virulencia demostrables, no producen enfermedad en el individuo sano, pero pueden comportarse como oportunistas en enfermos inmunodeprimidos (Algorta, 2002).

### 5.1.2.1 Características

Las características en morfología y otros aspectos en metabolismo son similares a las anteriormente descritas enterobacterias, sin embargo, este grupo tiene características diferentes entre estas:

- Bacilos no esporulados aerobios.
- No utilizan hidratos de carbono como fuente de energía o los degradan a través de vías metabólicas distintas a las habituales.
- Muestran crecimiento en la superficie Agar hierro de kligler (kIA) o Agar triple de Azúcar-Hierro (TSI) pero ninguno crece en el extremo ni lo acidifica.

## 5.2 Carbapenemicos

Los fármacos de este grupo presentan un espectro de acción muy amplio, en el que se incluyen bacterias gram positivas y gram negativas aerobias y anaerobias. Carecen de actividad frente a *S. aureus* resistente a la meticilina, *Enterococcus faecium*, *Corynebacterium jeikeium* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Existen pequeñas diferencias entre los componentes actuales del grupo: así, el Imipenem es más activo frente a los microorganismos grampositivos, mientras que el meropenem lo es frente a algunos gram negativos. El Ertapenem presenta escasa actividad frente a *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp y otros bacilos gram negativos no fermentadores (Lorenzo, et al., 2008).

Sus características principales son: amplio espectro de actividad frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, tanto aerobias como anaerobias, rápida penetración a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, gran estabilidad a la hidrólisis por betalactamasas plasmídicas o cromosómicas porque poseen una cadena trans hidroxietilo en la posición 6 del anillo estructural betalactámico, buena unión a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), rápida acción bactericida frente a gramnegativos y grampositivos, con una concentración mínima bactericida (CMB) en torno a dos veces la concentración mínima inhibitoria (CMI), efecto postantibiótico de hasta dos horas frente a gramnegativos y mayor para grampositivos (Gobernado & Acuña, 2007).

### **5.2.1 Mecanismo de Acción de los Carbapenemes**

En 1976, se obtuvieron los carbapenemes de la tienamicina que es una sustancia antibiótica extraída de los cultivos de *Streptomyces catleya*, a partir de este núcleo se obtuvo por síntesis la formidoil-tienamicina con actividad antibacteriana mayor que los demás antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

El primer derivado que se usó fue el Imipenem en 1985. Los antibióticos carbapenémicos son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que presentan mayor espectro y actividad. Actúan como otros  $\beta$ -lactámicos uniéndose covalentemente a las proteínas de unión a penicilina (PBPs) PBP-2 1a y PBP-2 1b con lo que inhiben la síntesis de la pared celular y activan las autolisinas endógenas, esto genera la muerte celular. Debido a su bajo peso molecular y su estructura hidrofílica estos compuestos penetran en las bacterias Gram negativas a través de porinas. El Meropenem es más estable ante la acción enzimática. Las bacterias han creado mecanismos de resistencia contra casi todos los antibióticos incluyendo este último grupo de  $\beta$ -lactámicos (Betancourt, Morales, Rivera, & Gonzalez, 2006, p. 132).

### **5.3 $\beta$ -Lactamasas**

La clasificación de las  $\beta$ -lactamasas puede ser definida con base a dos propiedades que son: La funcional y la molecular. Antes de que los genes fueran clonados y secuenciados las  $\beta$  lactamasas fueron analizadas bioquímicamente por el aislamiento de la proteína determinando su punto isoelectrico; seguido por su estudio enzimático para determinar la hidrólisis del sustrato y características de inhibición (Brown & Amyes, 2006, p.1).

Esta clasificación funcional dividió a las  $\beta$ -lactamasas en cuatro grandes grupos funcionales con múltiples subgrupos según Bush, Jacoby, & Medeiros, (1995) refiere: “El grupo 2 está diferenciado con base al grupo de sustrato sobre el que actúa la enzima. En este esquema de clasificación funcional las Carbapenemasas se encuentran principalmente en los grupos 2d, 2f y 3” (Bush, Jacoby, & Medeiros, 1995, p. 1211).

La clasificación basada en la homología de aminoácidos ha dado como resultado 4 grandes grupos. Queenan & Bush, (2007) refieren:



Las clases moleculares A, C, y D incluyen a las  $\beta$ -lactamasas con serina en su sitio activo, la clase molecular B, son todas las metaloenzimas con un centro activo de zinc. Las carbapenemasas son  $\beta$ -lactamasas con eficiencia catalítica para hidrólisis de carbapenemes, tienen elevados MICs (CMI) para los carbapenemes, e incluyen enzimas de clase A, B y D. (p. 440)

Las  $\beta$ -lactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico inactivándolo. Al unirse al antibiótico forman un complejo reversible no covalente y el grupo ester del anillo  $\beta$ -lactámico es acilado por el grupo hidroxilo libre del residuo de serina, que es el sitio activo de la enzima; finalmente hay un proceso de hidrólisis por el cual se reactiva la enzima y libera el antibiótico inactivo (Sánchez, 2007).

### 5.3.1 Carbapenemasas tipo A

Las Carbapenemasas clase A pertenecen al grupo 2f aparecen de forma esporádica en aislamientos clínicos desde que fueron descubiertas hace 20 años.

Estas  $\beta$ -lactamasas han sido detectadas en *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella spp* y en brotes pequeños. Tres grandes familias de esta clase incluyen las enzimas NMC/IMI, SME y KPC. Todas ellas tienen la habilidad de hidrolizar a una variedad de  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, incluyendo carbapenemes, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam y todos son inhibidos por clavulanato y tazobactam (Queenan & Bush, 2007, p. 440).

### 5.3.2 Carbapenemasas tipo B o metalo- $\beta$ -lactamasas

Las metalo- $\beta$ -lactamasas son metalo enzimas que requieren uno o dos iones de zinc para su actividad según Bebrone, (2007) refiere:

Estas enzimas pueden degradar toda clase de  $\beta$ -lactámicos; excepto monobactámicos y son especiales para la constante y eficiente actividad de carbapenemasa. La primer metalo- $\beta$ -lactamasa se detectó en 1966 en *Bacillus cereus* cuando Sabbath y Abraham demostraron que la actividad de cefalosporinasa producida por *B. cereus* era inhibida por EDTA. Durante 20 años esto fue considerado como una curiosidad bioquímica, pero en 1980 estas enzimas fueron descubiertas en gran número de cepas de *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophily*, *S. marcescens* productoras de brotes nosocomiales. (p. 1686)

La mayoría de estas enzimas son del tipo Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM), IMP y más recientemente del tipo New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). Todas ellas hidrolizan todos los antibióticos betalactámicos excepto aztreonam. Sin embargo, muchas de las bacterias portadoras poseen además mecanismos de resistencia complementarios que las hacen también resistentes a este antibiótico. A menudo se identifican en estas bacterias betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que si son capaces de hidrolizar el aztreonam. Se caracterizan por su resistencia a los inhibidores de betalactamasas comerciales, y su susceptibilidad a los agentes quelantes como el EDTA, debido a la estructura metálica de su centro activo metálico. según Alcalá, (s.f) refiere:

Las carbapenemasas de tipo IMP fueron identificadas por primera vez en una cepa de *P. aeruginosa*, recogida en Japón en 1988. Su nombre hace referencia a la resistencia a imipinem, antibiótico carbapenémico, que presentaba dicha cepa. El gen que codificaba la enzima, blaIMP, estaba localizado en un plásmido por lo que su transmisión entre cepas de *P. aeruginosa* fue muy rápida. A los 5 años de esta primera notificación el gen fue encontrado entre enterobacterias en otros hospitales japoneses.

Por otro lado, las enzimas de tipo VIM fueron aisladas en Francia en 1996 y en Verona, Italia, en 1997, en cepas de *P. aeruginosa*. Actualmente las cepas productoras de enzimas de tipo VIM e IMP son endémicas de Grecia, Taiwan y Japón, aunque también se han notificado brotes esporádicos así como casos aislados en otras partes del mundo. *Klebsiella pneumoniae* multirresistente nosocomial es la bacteria productora de estas enzimas más prevalente. (pp.10-12)

Existen otras enzimas, siempre de la familia de las carbapenemasas que cobran protagonismo a nivel mundial por su reciente descubrimiento y las implicaciones en las que se ha reportado en diferentes partes en varios continentes. De acuerdo Alcalá (sf) en su trabajo de grado afirma que, tal es el caso de **New Delhi metallo-beta-lactamasa-1 (NDM-1)**, una enzima que por primera vez se reportó en el 2007. Se trataba de un paciente sueco previamente hospitalizado en Nueva Deli, que padecía una infección urinaria causada por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. Desde 2010, los productores de NDM-1 se han identificado en todos los continentes, excepto en ciertas partes de América, con una relación directa con India, su principal reservorio. Además se comienzan a observar casos no relacionados con India, que provienen de diferentes localizaciones como la región de los Balcanes, y el medio

oriente. Estas regiones podrían constituir un segundo reservorio de los productores de NDM-1.

### **5.3.3 Carbapenemasas Tipo OXA, Clase D**

Dentro de las enzimas de las Carbapenemasas se encuentran los tipos OXA, clase D los autores Queenan & Bush, (2007) definen: “Las enzimas tipo OXA representan a una de las familias de  $\beta$ -lactamasas codificadas por plásmidos y actualmente se han descrito también en el cromosoma” (Queenan & Bush, 2007, p. 440).

Estas enzimas se identifican principalmente en enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Son funcionalmente descritas como penicilinasas capaces de hidrolizar a oxacilina y cloxacilina. En general son inhibidas pobremente por el ácido clavulánico y el EDTA. La primer  $\beta$ -lactamasa tipo OXA con actividad carbapenemasa fue descrita por Paton y Cols en 1993. Esta enzima fue purificada de una cepa multidroga resistente de *A. baumannii* que fue aislada en 1985 de un paciente en Escocia. La enzima fue llamada ARI-1 (*Acinetobacter* resistente a Imipenem) después fue renombrada como OXA-23. Desde 1998 las enzimas OXA han sido identificadas en especies de *Acinetobacter* en todo el mundo, por ejemplo: OXA-23 ha sido identificada en brotes de *Acinetobacter* resistentes a carbapenemes en Brasil, Korea y Tahiti. OXA-24 y OXA-40 se encontraron en brotes clonales de hospitales de España y Portugal (Bou, Oliver, & Beltran, 2000, p. 1556).

Las cepas de *Acinetobacter* con OXA-23 y OXA-58 causaron múltiples infecciones en militares y civiles que sirvieron en Irak y Afganistán en 2003-2005. Actualmente hay 102 secuencias de OXA identificadas, 9 de las cuales son de espectro extendido y como mínimo 37 están consideradas como Carbapenemasas. Los subgrupos 1, 2 y 3 están basados en las secuencias de OXA-23, OXA-24 y OXA-51 respectivamente. OXA-51 ha sido encontrado en todas las cepas de *A. baumannii* probadas y es un componente natural del cromosoma de esta especie (Queenan & Bush, 2007, p. 445).

## 5.4 Antibiograma

El método utilizado con mayor frecuencia para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos es la denominada prueba de difusión del disco. Esta técnica fue estandarizada por Kirby y Bauer en 1966, de allí que dicho método también se le conozca con el nombre de “prueba de Kirby-Bauer”. Es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina que sólo brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado, sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibioticoterapia (Velasco, et al., 2008). La Interpretación de los halos de inhibición permite expresar los resultados como sensibles, sensibilidad intermedia o resistente. Estas Categorías indican lo siguiente:

**Sensible (S):** la infección debida al microorganismo aislado puede ser tratada apropiadamente con el antibiótico a la dosis recomendada, de acuerdo a la gravedad de la infección. Sin embargo, para la prescripción definitiva del medicamento, el médico tratante tendrá en cuenta algunos factores tales como biodisponibilidad del antibiótico en el tejido o sistema afectado, presentación del medicamento, edad del paciente, condiciones patológicas subyacentes o fisiológicas, entre otras (Velasco, et al., 2008).

**Intermedia (I):** indica que el antibiótico tiene aplicabilidad clínica en sitios corporales Donde el antibiótico alcance concentraciones terapéuticas adecuadas, como es el caso de  $\beta$ -lactámicos y quinolonas en el tracto urinario. En otros casos, puede utilizarse el medicamento con seguridad en dosis elevadas que no alcancen los niveles de toxicidad pero que garanticen actividad terapéutica. Sin embargo, es recomendable evitar el uso de la categoría “intermedia” cuando sea posible (Velasco, et al., 2008).

**Resistente (R):** la bacteria aislada no es inhibida por el antibiótico a las concentraciones Terapéuticas ideales o la bacteria ha generado mecanismos de resistencia que evaden la actividad del antibiótico, por lo tanto, la eficacia clínica de este no es confiable. Es Recomendable que ante el aislamiento de un microorganismo multirresistente clínicamente significativo se ensayen otras pruebas de susceptibilidad adicionales (CIM), tal es el caso de cepas de *Staphylococcus* resistentes

a la vancomicina. El Reporte de los resultados del antibiograma debe ser realizado en forma clara y precisa y enviados en forma inmediata al médico tratante (Velasco, et al., 2008).

### **5.5 Detección de carbapenemasas**

El screening de bacilos gram negativos con carbapenemasa en muestras clínicas está basada en el análisis de susceptibilidad a los carbapenémicos de los aislados productores de carbapenemasas comparados con los aislados de la población wild Type. Las CMI de Imipenem y meropenem de  $\geq 1$  mg/l y Ertapenem de  $\geq 0,5$  mg/l pueden indicar una posible producción de carbapenemasas. El Ertapenem parece ser un buen candidato para la detección de la mayoría de los bacilos gram negativos, sobre todo de KPC, ya que los valores de CMI de Ertapenem a menudo son más altos que los de otros carbapenémicos. El inconveniente es que le falta especificidad porque una permeabilidad disminuida combinada con enzimas BLEE o AmpC puede afectar a las CMI de Ertapenem. Los otros 2 carbapenémicos, Imipenem y meropenem, tienen mayor especificidad. En la gran mayoría de los casos el meropenem es el carbapenémico más activo, puesto que sus CMI suelen ser las más bajas. Por ello, este carbapenémico no sería el más adecuado para la detección de carbapenemasas en enterobacterias y no fermentadores, ya que tendría poca sensibilidad. Todo esto, hace que el Imipenem sea el carbapenémico de elección para un primer paso en la detección de Carbapenemasa, aunque hay que tener en cuenta que las CMI de Imipenem suelen ser elevadas en caso de *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.* y *M. morganii* debido a otros mecanismos de resistencia (Viña, 2016).

El screening o la detección de las carbapenemasas se puede hacer mediante la técnica de discos o se puede llevar a cabo mediante sistemas automatizados para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, que están basados en la reconstitución con una suspensión bacteriana de diferentes concentraciones de una serie de antimicrobianos liofilizados en unos paneles y su posterior lectura, realizando la interpretación de sensible, intermedio o resistente de acuerdo a los puntos de corte establecidos en cada caso. Además, tienen configurados unas recomendaciones de “sistemas expertos” que permiten inferir mecanismos de resistencia a través de las CMI de los antimicrobianos obtenidas. Ejemplos de sistemas automatizados son: Wider, Vitek, MicroScan, Phoenix (Viña, 2016).

### 5.5.1 Detección fenotípica

Estos métodos detectan la producción de una carbapenemasa por una cepa productora de esta enzima. En contraste con las técnicas moleculares tienen la ventaja de que no sólo detectan las carbapenemasas conocidas, sino que son capaces de detectar nuevas carbapenemasas. El principal inconveniente es que no son capaces de identificar con precisión la carbapenemasa producida.

**El test de Hodge modificado (THM):** es un método basado en la degradación de un carbapenémico por una cepa productora de carbapenemasa que permite que una cepa sensible a carbapenémicos se extienda creciendo más cerca del disco que contiene el carbapenémico, distorsionando el halo de inhibición (Viña, 2016).

**Los métodos basados en la inhibición por EDTA:** se utilizan para la detección de MBL. El EDTA es un compuesto que se une al centro activo de las enzimas de clase B de Ambler que contiene iones de  $Zn^{+2}$  (Viña, 2016).

**Los métodos basados en la inhibición por ácido borónico:** se utilizan para la detección de carbapenemasas de la clase A. Tienen algunas limitaciones en las especies de enterobacterias productoras de AmpC (*Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *M. organii*, *Providencia spp*, *Serratia spp*...) porque el ácido borónico también les afecta. La inhibición de la actividad de las cefalosporinasas se consigue mediante el uso de cloxacilina. Combinando el ácido borónico y la cloxacilina se consigue diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas clase A de las cepas productoras de AmpC (Viña, 2016).

**El test Blue- carba o Carba NP (CNP):** son test bioquímicos que están basados en la hidrólisis in vitro del Imipenem. La hidrólisis es detectada por un cambio en el valor del pH en caso de blue carba el viraje de color es de azul a amarillo y para Carba NP el colorante pasa de rojo a amarillo/naranja (Viña, 2016).

### **5.5.2 Detección por métodos moleculares.**

Las técnicas moleculares siguen siendo el método de referencia para la identificación de genes que codifican enzimas carbapenemasas. Las ventajas de estas técnicas son el poco tiempo que necesitan (sobre todo las PCR a tiempo real), una elevada sensibilidad y especificidad. Por el contrario, las principales desventajas son el alto coste, el requerimiento de microbiólogos entrenados y que se puede perder la detección de nuevos genes que codifiquen carbapenemasas.

La mayoría de estas técnicas están basadas en la PCR y pueden estar seguidas de una secuenciación si es necesaria la identificación exacta del gen. Existen técnicas de PCR de detección de un único gen o de múltiples genes de las carbapenemasas más prevalentes (VIM, IMP, NDM, KPC y OXA) (Viña, 2016).

Otros métodos moleculares son los microarrays. Estos son métodos más versátiles que pueden ser implantados en la rutina para detectar todas las clases de carbapenemasas con una alta sensibilidad y especificidad. Estas técnicas tienen interés epidemiológico, no clínico, ya que no es necesaria una identificación precisa del tipo de carbapenemasa para tratar a los pacientes o para prevenir brotes (Viña, 2016).

### **5.5.3 PCR multiplex**

Se basa en la detección del múltiple producto de amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. los productos amplificados se visualizan mediante una banda, la intensidad de esta banda es proporcional a la cantidad del producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular comercial de longitudes conocidas estas luego se miden en un software (Salazar, Rodriguez, & Borunda, 2013).

#### **5.5.3.1 Pasos de la PCR**

**Desnaturalización:** en este paso es necesario una temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de ADN, en el caso del ADN genómico, o el rompimiento de estructuras secundarias, en el ADNc lo que permite el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementaria (Salazar et al., 2013).

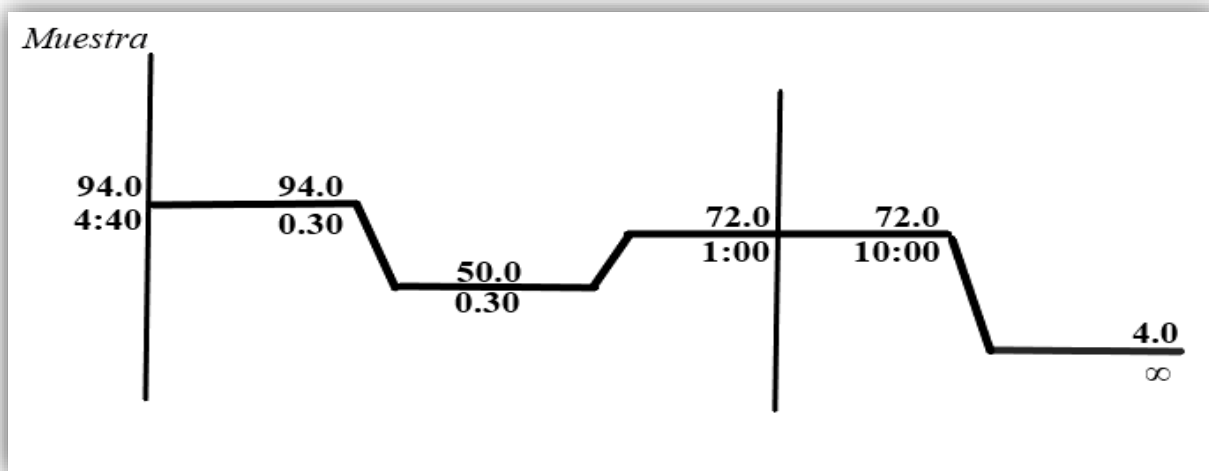
**Alineación:** en esta fase, la temperatura se encuentra en un rango entre 55°C y 60°C en el cual la mayoría de los iniciadores hibridan; esto es, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de ADN su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrogeno con la cadena molde, dejando el extremo 3'OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por el ADN polimerasa (Salazar et al., 2013).

**Extensión:** se produce a la temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa empleada, por lo que dependerá de esta para la PCR en el caso de la Taq polimerasa, la más utilizada es de 72°C (Salazar et al., 2013).

**Amplificación final:** una vez terminados los ciclos designados para la PCR, la temperatura de extensión (72°C) se mantiene por cinco minutos, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida (Salazar et al., 2013).

**Almacenamiento temporal:** durante la programación de los ciclos de la PCR se programa también un ciclo final de 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retire los tubos de reacción del equipo (Salazar et al., 2013).

Figura: Amplificación del DNA por PCR Multiplex.



*Fuente:* Esquema elaborado por los autores del trabajo.



## VI. DISEÑO METODOLÓGICO

### 6.1 Área de estudio

Esta investigación se realizó en el Hospital Alemán Nicaragüense, ubicado en el departamento de Managua de donde fue la SIEMENS 300 varas al sur, en el cual son procesadas todas las muestras de carácter bacteriológico de sus diferentes áreas clínicas en el laboratorio de bacteriología.

### 6.2 Tipo de estudio

El tipo de investigación es de carácter **descriptivo no experimental**, y de carácter **transversal** debido a que la presente investigación se desarrolló en un espacio de tiempo determinado el cual no se extendió a más de un año y se utilizaron instrumentos en donde se mide y verifica las variables a estudiar, ya que se profundizó sobre el tema frecuencia de enterobacterias y no fermentadores portadores de genes VIM, IMP y NDM, aislados de hemocultivos, en pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019.

### 6.3 Universo

El universo estuvo conformado por 82 cepas de bacilos gram negativos procedentes de hemocultivos positivos de pacientes que ingresaron a las salas del Hospital alemán nicaragüense, en donde fueron aisladas por el personal del Hospital Alemán Nicaragüense en el año 2019.

### 6.4 Muestra

La muestra fueron 43 cepas de enterobacterias y no fermentadores (*Pseudomona* y *Acinetobacter*) con resistencia a carbapenémicos con enzimas tipo MBL (Metallo-B-lactamasas), seleccionadas según los estándares de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana brindados por la CLSI 2019.

### 6.5 Tipo de Muestreo

Se realizó un muestreo no Probabilístico por conveniencia, este tipo de estudio permite seleccionar aquellos casos accesibles que acepten ser incluidos. Esto, fundamentado en la conveniente accesibilidad y proximidad de los sujetos o de la muestra para el investigador (Otzen & Manterola, 2017).

## **6.6 Unidad de análisis**

La unidad de análisis estuvo conformada por todas las bacterias Gram negativas con resistencia a carbapenémicos con MBL positiva.

## **6.6 Criterios de inclusión**

- Cepas puras de Enterobacterias y No fermentadores (Pseudomona y Acinetobacter) con resistencia a carbapenémicos aislados de hemocultivos del hospital Alemán Nicaragüense.
- Que las cepas en estudio presenten resistencia a los carbapenemicos con una CMI de 2-4 µg/ml en Imipenem y meropenem y un corte de <19 mm, en la técnica de difusión de disco en agar.
- Que las cepas presenten sinergia con EDTA y positividad con técnica BLUE-CARBA.

## **6.7 Criterios de Exclusión**

- Cepas que no sean Enterobacterias y No fermentadores (Pseudomona y Acinetobacter) con resistencia a carbapenémicos aislados de hemocultivos del hospital Alemán Nicaragüense.
- Que las cepas en estudio no presenten resistencia a los carbapenémicos con una CMI de 2-4 µg/ml en Imipenem y meropenem y un corte de <19 mm, en la técnica de difusión de disco en agar.
- Bacilos Gram negativos con resistencia natural a carbapenemicos.

## **6.8 Recolección de datos e información**

Para iniciar la recolección de datos en este estudio fue necesario contar con la autorización y aprobación del tema por parte del SILAIS-Managua, a su vez constar con el consentimiento del Hospital Alemán Nicaragüense y Centro Nacional de Diagnóstico de Referencia (CNDR). Basados en el tipo de investigación se trabajó con el siguiente instrumento de recolección de información el cual fue el llenado de las fichas de recolección de datos.

La información se constató del libro de rutina usado en el Laboratorio, el resultado de identificación y resistencia respectiva de cada bacteria se agregó en la ficha de recolección de datos, y las cepas

fueron establecidas por los criterios de inclusión y de exclusión anteriormente mencionados, obtenidos los resultados se especificaron los puntos como el género, especie y perfil de resistencia asignado en Kirby-Bauer y en Vitek Compact®2 (CIM) y también el resultado de sinergia con EDTA.

Los resultados obtenidos por análisis molecular (genotipo) y técnica Blue Carba test se corroboraron en el cuaderno de trabajo de PCR y cuaderno de Control de calidad del área de bacteriología CNDR.

Para la realización del trabajo se utilizó el programa Microsoft Office Word 2019 a la vez se realizó una base de datos en programa Microsoft Office Excel 2019 para la elaboración de las gráficas en donde se incluyeron todas las variables estudiadas planteadas en nuestras fichas de recolección de la información. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa (IBM SPSS) en donde se calculó el porcentaje y frecuencias de cada una de las variables y para la creación y edición de diagramas y esquemas al igual que imágenes, se utilizó el programa Paint 3D.

### 6.9 Operacionalización de las variables

Variables	Sub-VARIABLES	Indicador	Valores			Criterios
<b>Bacilos Gram Negativos.</b>	Enterobacterias.	Lactosa positiva.				Positivo
	No Fermentadores.	Lactosa negativa.				Negativo
<b>Distribución de Salas</b>	<b>Unidad de cuidados intensivos</b>	Neonato	Cepas positivas por salas			Carbapenemasas positivas
		Pediátrico				
		Adultos				
<b>Susceptibilidad del antibiograma</b>	Resistencia a carbapenémicos.	CMI µg/mL (Vitek Compact 2).	<b>IMP</b>	<b>MER</b>	<b>ERTA</b>	
			≤ 1 µg/mL	≤ 1 µg/mL	≤ 0.5 µg/mL	Sensible
			2 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	Intermedio
		≥ 4 µg/mL	≥ 4 µg/mL	≥ 2 µg/mL	Resistente	
		Medición de los halos de inhibición (mm) por el método Kirby-Bauer CLSI 2019.	<b>IMP</b>	<b>MER</b>	<b>ERTA</b>	
			≥ 23mm	≥ 23mm	≥ 22mm	Sensible
			20-22 mm	20-22 mm	19-21 mm	Intermedio
			≤ 19 mm	≤ 19 mm	≤ 18 mm	Resistente

<b>Detección de Resistencia a carbapenémicos con pruebas fenotípicas con inhibidores y Blue-Carba Test</b>	MBL	Sinergia con EDTA		Positivo Negativo
	MBL KPC OXA	Viraje de color del reactivo		Positivo Negativo
<b>Genotipo</b>	MBL	NDM	512 pb	Positivo
		IMP	404 pb	Negativo
		VIM	261 pb	
<b>Tipo de muestra</b>	Hemocultivo	Tipos de bacterias aisladas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	Crecimiento positivo Crecimiento negativo

## **6.10 Procesamiento de muestras**

Las cepas fueron procedentes del Hospital Alemán Nicaragüense, en donde se realizó su identificación de género y especie, antibiograma, clasificación fenotípica utilizando EDTA, siendo las positivas emitidas al CNDR en donde se les evaluó con un control de calidad externo trabajando en conjunto con el CNDR, donde se realizó el PCR multiplex en búsqueda de los genes VIM, IMP y NDM de las cepas de BGN con resistencia a Carbapenemes.

### **6.10.1 Identificación bacteriana**

Para poder identificar a las bacterias se utilizó el equipo automatizado VITEK Compact 2, el cual realiza baterías de pruebas bioquímicas de forma automatizada identificando y realizando el antibiograma de los microorganismos del estudio, y se corroboró utilizando en la técnica de difusión de disco en agar.

### **6.10.2 Perfil de susceptibilidad (Kirby-Bauer)**

- Se preparó una suspensión con solución salina (0.85%) estéril con una densidad óptica de 0.5 McFarland del inóculo en tubos de ensayo, utilizando un densitómetro.
- Luego se procedió a sumergir un hisopo estéril en la suspensión preparada y escurrirlo en las paredes internas del tubo para retirar el excedente de suspensión.
- Se sembró por el método de rayado tri- direccional en agar Mueller Hilton (MH).
- Luego se colocaron los sensi disco de manera estratégica para poder detectar los mecanismos de resistencia en las cepas en estudio.
- Se incubó a 37°C durante 24 horas.
- Luego de las 24 horas se procedió a la lectura de los halos con un caliper, según las normas de CLSI 2017.

### 6.10.3 Clasificación de carbapenemasas mediante el uso de inhibidores

- Se inocula una placa de agar Mueller- Hilton, por el método Kirby Bauer.
- Colocar los discos de la siguiente manera IMI-EDTA-MEM para la identificación de metalobetalactamasas: con una distancia de 15 mm entre centro de los discos e incubar a 37°C durante 24 horas.

#### Interpretación

Se observará sinergia en una cepa positiva con enzimas metalo-betalactamasa entre los discos IMI-EDTA-MEM.

Para *P. aeruginosa* también se observará sinergia entre CAZ-EDTA.

### 6.10.4 Blue-Carba Test

#### Preparación

Solución A (csp 100 ml):

- Disolver 40 miligramos de azul de bromotimol en 100 ml de agua (concentración final 0.04%).
- Disolver en la SN anterior 1,6 miligramos de  $\text{SO}_4\text{Zn}$  (concentración final 0.1 mmol/L).
- Medir PH de la SN y ajustar a 7.0 en el caso que nos diese diferente.
- Filtrar con Millipore (opcional).

#### Procedimiento

1. Por cada cepa a ensayar, utilizar 2 pocillos de una poli cubeta de 96 pocillos s o dos tubos eppendorf. En cada uno de ellos agregue:

- A. 100 micro litro de solución A (pocillo/ tubo control).
- B. 100 micro litros solución Imipenem 3 mg/ml (pocillo/ tubo de reacción).

2. Agregar a cada pocillo o tubo, un asa de 5 micro litros completa con colonias crecidas en placa de MH, TSA o Agar MacConkey y suspenderlas en el líquido de reacción.

3. Tapar la poli cubeta o los tubos eppendorf.

4. Incubar a 35- 37°C por un máximo de dos horas en agitación y si no cuenta con un agitador continuo, agite manualmente cada 15 minutos.

## Lectura e interpretación

Color tubo control (sin Imipenem)	Color tubo reacción (con Imipenem)	Interpretación	Criterio
Azul	Amarillo	Carbapenemasa positivo	I
Azul	Verde	Carbapenemasa positivo	II
Verde	Amarillo	Carbapenemasa positivo	III
Azul	Azul	Carbapenemasa negativo	IV
Verde	Verde	Carbapenemasa negativo	V
Amarillo	Azul o verde o amarillo	Test invalido	VI

Fuente: INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán

### 6.10.5 Recuperación del microorganismo

Después de haber sido aisladas e identificadas las cepas fenotípicamente, pasaron a almacenarse bajos los criterios establecidos y luego se procedió al llenado de la ficha de recolección de datos, después se inoculó en Agar MacConkey o Mueller Hilton para proceder al envío al CNDR, del cual se encargó el personal del laboratorio, para después realizar el control de calidad externo y genotipificación.

#### Procedimiento:

- Rotular placas de Agar MacConkey y atemperar respectivamente.
- Con un hisopo estéril se toma una muestra de la cepa en estudio y se inocula en la placa de Agar dejar que el inoculo sea absorbido por el agar.
- Realizar el rayado de la siembra por agotamiento de estrías para obtener colonias aisladas e identificables.
- Los platos inoculados se incuban en posición invertida con temperatura de  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.
- Luego de las 24 horas observar colonias características y crecimientos sin contaminaciones por otros microorganismos.
- Si se observa crecimiento de colonias atípicas o características de contaminación se realizará un segundo aislamiento a partir de la colonia de interés.



- Sellar las placas con papel Parafilm, colocar en bolsas de seguridad guardado en termo para su transporte al CNDR.

**Control de calidad:**

*Escherichia coli* ATCC 25922: Resultado UFCs fermentadoras de lactosa con colonias que se observan de color rosa.

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: Crecimiento de colonias incoloras, transparentes, con un brillo metálico característico, planas de bordes irregulares con olor característicos a uvas o tamal pizque después de 24 horas de inoculación.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923: Sin crecimiento.

**6.10.6 Extracción de ADN**

Las cepas analizadas en el estudio y los controles se cultivaron en agar McConkey y en TSA, el cual se incubó por 24 horas a 37°C. Se tomaron 3 UFC, las que fueron inoculadas en viales Eppendorf con 100 µl de agua libre de nucleasas. Estos viales se ingresan en baño maría durante 10 minutos en ebullición, seguido de 5 minutos colocadas en hielo para luego ser centrifugadas por 5 minutos a 12,000 RPM. Luego, se extraen 50 µl del sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf.

**Tipos de primers empleados para el estudio**

<b>Primers</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño del producto</b>
<b>IMPF</b>	5'GGYGTTTWTGTTTCATACWTCKTTYGA 3'	<b>404pb</b>
<b>IMPR</b>	5'GGYARCCAAACCACTASGTTATCT 3'	
<b>VIMF</b>	5'AGTGGTGAGTATCCGACAG 3'	<b>261pb</b>
<b>VIMR</b>	5'AGTAAAGTGCGTGGAGAC 3'	
<b>NDMF</b>	5'AGCACACTTCCTATCTCGAC 3'	<b>512pb</b>
<b>NDMR</b>	5'GGCGTAGTGCTCAGTGTC 3'	

**Fuente:** Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

### 6.10.7 PCR Multiplex para MBL

Mezcla para PCR para MBL tipo NDM, IMP Y VIM.

Reactivo	Volumen	15 cepas
<b>Buffer 10X</b>	3.25 µl	48.75
<b>MgCL<sub>2</sub> (25 mM)</b>	0 µl	0
<b>dNTP's (10mM)</b>	0,5 µl	7.5 µl
<b>Taq DNA pol (5U/ul)</b>	0,2 µl	6 µl
<b>Primer VIM-F (10 µM)</b>	0,4 µl	6 µl
<b>Primer VIM-R (10 µM)</b>	0,4 µl	6 µl
<b>Primer NDM-F (10 µM)</b>	0,4 µl	6 µl
<b>Primer NDM-R (10 µM)</b>	0,4 µl	6 µl
<b>Primer IMP-F (10 µM)</b>	1	15 µl
<b>Primer IMP-R (10 µM)</b>	1	15 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	15 µl	225 µl
<b>DNA</b>	2.5	
<b>VOL. Final</b>	<b>25 µl</b>	

**Fuente:** Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

### **Condiciones de reacción para la PCR**

La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa para MBL:

Se usó el programa de amplificación, desnaturalización 94°C, por 4:40 minutos, seguido de 30 ciclos, 94°C por 30 segundos, hibridación 50°C por 30 segundos, amplificación 72°C por 60 segundos, extensión final 72°C por 10 min, final 4°C ∞, haciendo uso del Termociclador Gene Amp PCR system 9700.

#### **6.10.8 Preparación del Gel de Agarosa al (1%)**

En una balanza electrónica (BE) se pesó la cantidad de 1.00 gr de Agarose (*SIGMA-ALDRICH*), con la ayuda de un Beaker® de 250 ml se mezcló con 100 ml de TBE 1X, una vez agitado se procedió a calentar la dilución durante 1:00 minuto en un microondas con el objetivo de conseguir un aspecto transparente; pasado el minuto y una vez conseguido el aspecto deseado se esperó que se enfriara para verterlo en la cámara y el peine para las ranuras en el gel una vez conseguido el aspecto de gel.

#### **6.10.9 Electroforesis en Gel de Agarosa (1%)**

Al finalizar el tiempo de los ciclos establecidos se tomaron los viales con el producto amplificado, para proceder a mezclar bien agregando un buffer de carga.

Para luego agregarlos sobre los pozos en el gel de agarosa (1%) previamente preparada, según el protocolo de corrida, a su vez se incluyó el marcador molecular y los controles positivos y control negativo interno usados en el área de Biología Molecular del laboratorio de Bacteriología en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), además se utilizó agua libre de DNAsa como mezcla de reacción como validación en cada corrida. La corrida de electroforesis se realizó con un programa de trabajo usando un voltaje de 160 voltios por 1 hora 40 minutos, evaluando así la migración de las moléculas por la separación del tamaño de pb utilizando una cámara con luz ultravioleta.

#### **Control de calidad para la técnica de PCR Multiplex:**

**Control Negativo:** E. coli 25922 PCR

**Control positivo:** ETBRC 1-37-37 (NDM)

**Control positivo:** OPS 222 (IMP)

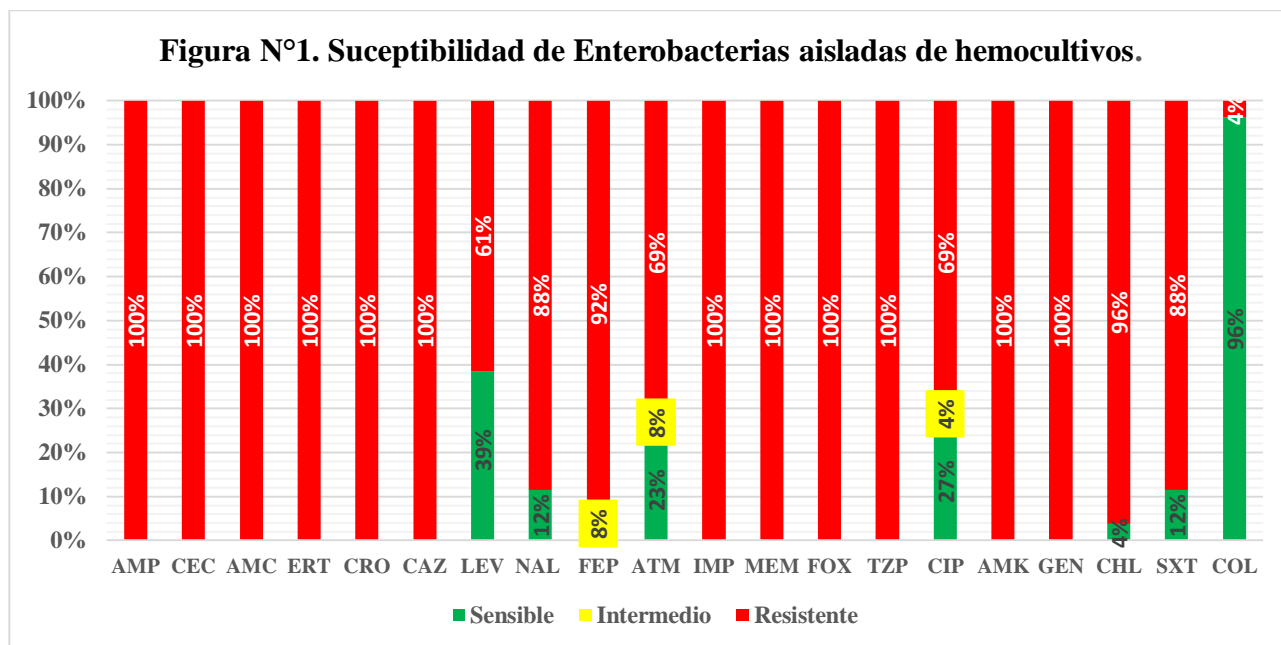
**Control positivo:** OPS 188 (VIM)

Los controles fueron brindados por el CNDR.

### **6.10 Aspectos éticos**

Las cepas a estudiar fueron obtenidas y facilitadas por el Hospital Alemán Nicaragüense, por lo que con anticipación se hizo una petición al SILAIS-Managua y Docencia del Hospital Alemán Nicaragüense, para obtener la aprobación y el permiso de poder investigar la resistencia en enterobacterias y no fermentadores en el periodo del año 2019, por lo cual los resultados obtenidos serán manejados con privacidad y confidencialidad, con el compromiso de que los datos conseguidos de este estudio se usen únicamente con fines académicos y epidemiológicos por parte del hospital. En general esta investigación se realizó basado en los principios básicos de la bioética recomendados en este tipo de estudio.

## VII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

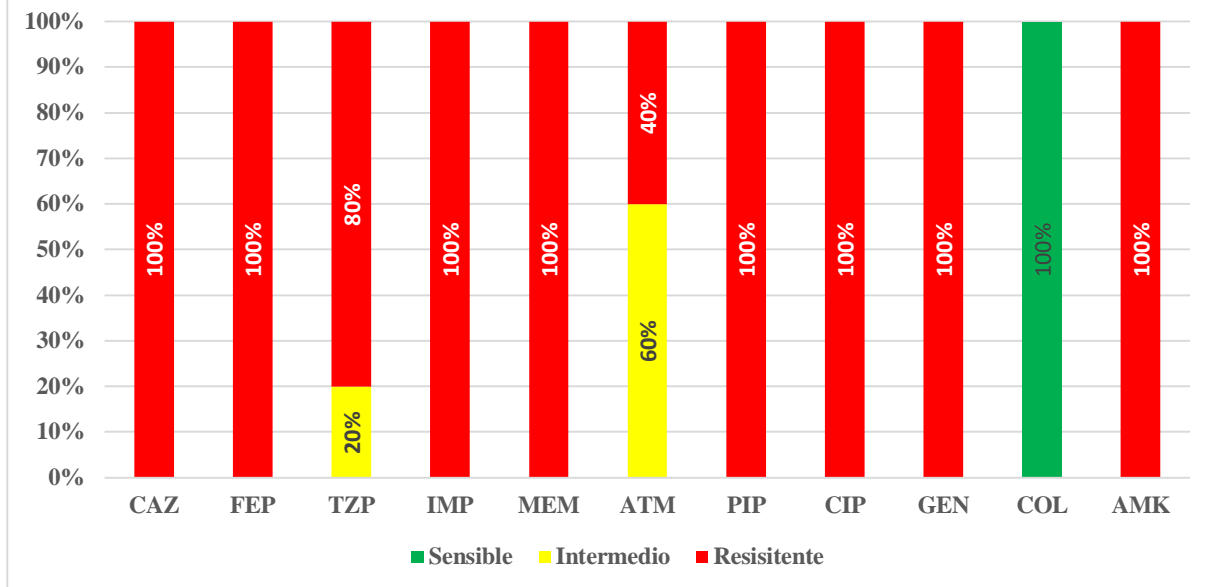


**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de susceptibilidad por el método CMI y por Kirby-Bauer realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

El comportamiento de la resistencia antes los diferentes antibióticos de las 26 cepas pertenecientes al grupo de enterobacterias, de las cuales todas presentaron metalo-betalactamasas fueron evaluadas utilizando antibióticos de la familia de betalactámicos, los cuales son específicos para inhibir la síntesis de pared celular bacteriana y muestran los menores efectos adversos al ser humano, a su vez fueron sometidas a pruebas otras familias de antimicrobianos que podrían ser una alternativa ante la resistencia a los betalactámicos.

El 100% de cepas presentó resistencia a AMP, CEC, AMC, ERT, CRO, CAZ, IMP, MEM, FOX, TZP, AMK y GEN. El 69% de las cepas resultaron resistentes a aztreonam y un 23% sensible, CHL 96% y 4% sensible. El comportamiento de las cepas que presentan los genes NDM, IMP y VIM muestran resistencia a penicilinas, cefalosporinas de 3 a 4 generación, pero sensibles ante Monobactam como Aztreonam en nuestro estudio hubo un 68% de cepas resistentes, siendo una causa posible la presencia de una BLEE. Con respecto a las Fluoroquinolonas CIP resultó 27% sensible y 69% resistente, NAL 12% sensible, 88% resistente, LEV 39% sensible, 61% resistente siendo aún todavía opciones de terapia a elegir, con respecto al Col el 96% fue sensible presentándose como la terapia opcional más relevante.

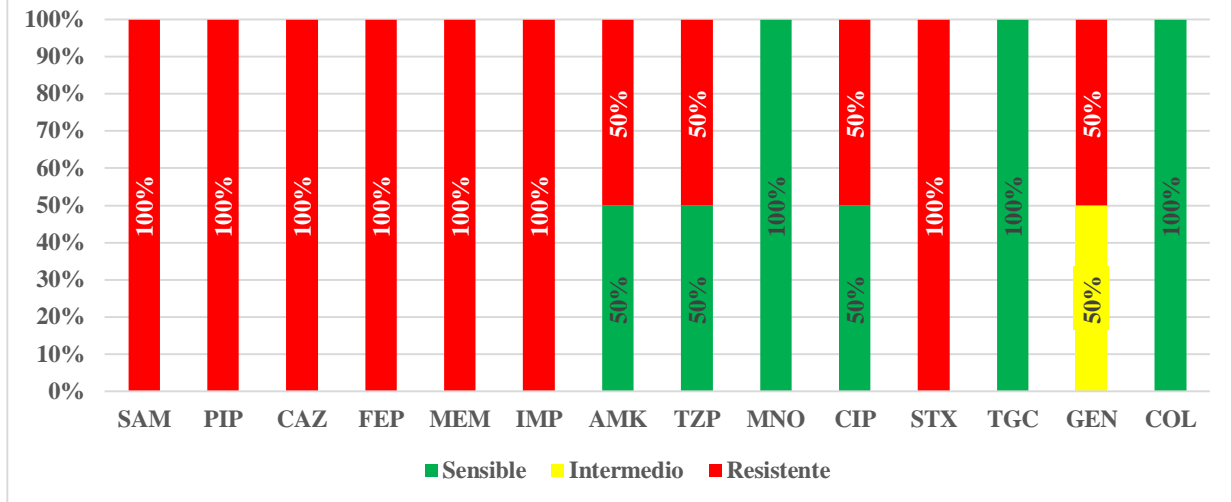
**Figura N°1.2 Suceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de Hemocultivos.**



**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de susceptibilidad por el método CMI y por Kirby-Bauer realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

De un total de 43 cepas, 15 (35%) fueron identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, el 100% presentó resistencia a CAZ, FEP, IMP, MEM, PIP, CIP, GEN y AMK resultando con resistencia variada, ATM 40% siendo el 60% intermedio y TZP 80% siendo el 20% intermedio, por otra parte, la única sensible fue COL en su 100%. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* poseían carbapenemasas haciendo estas más patógenas, esto se suma a que *Pseudomonas aeruginosa* posee resistencia natural a muchos antibióticos. Los resultados obtenidos se acercaron mucho al estudio realizado por Arias y Bracamonte de Validación del método BLUE CARBA para la detección rápida de carbapenemasas tipo metalobetalactamasas en cepas de bacilos gram negativos procedentes de los diferentes hospitales pertenecientes a la red nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, en donde testearon a todos los hospitales del país que pertenecen a la Red de vigilancia en donde obtuvieron un 84.4% de resistencia CAZ, FEP, PIP y un 97% de resistencia en IMP y MEM y un 100% de sensibilidad a COL.

**Figura N°1.3 Suceptibilidad de *Acinetobacter baumannii* en hemocultivos.**



**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de susceptibilidad por el método CMI y por Kirby-Bauer realizado en él HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

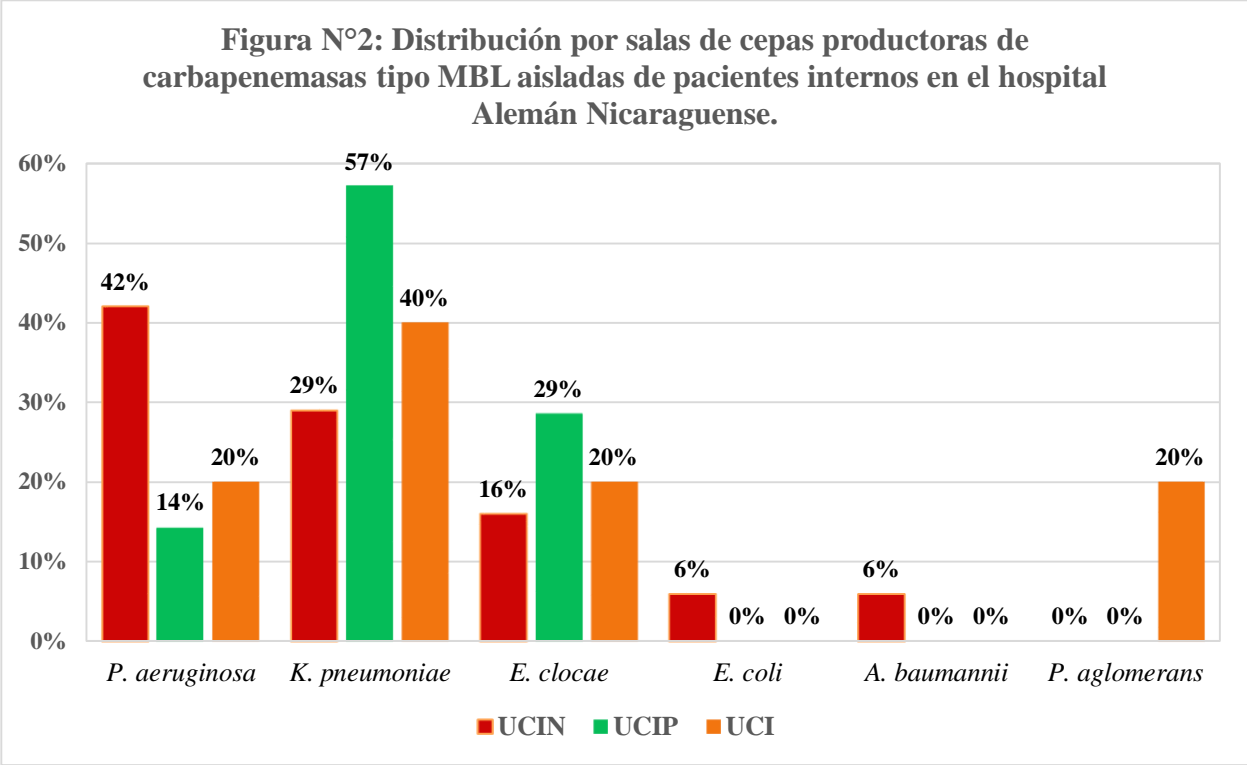
De todas las cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos solo dos fueron MBL positivas, presentado sinergia con EDTA incluyéndolas en el estudio según nuestro criterios de inclusión, los resultados obtenidos mostrados en el gráfico reflejan un 100% de resistencia a SAM, PIP, CAZ, FEP, MEM, IMP a la vez se observó resistencia variada, 93% de TZP, 50% de CIP, 50% de AMK, , resultandos sensibles en su 100%, TGC, MNO y COL como anteriormente se menciona colistín sigue siendo una de los antimicrobiano más relevantes terapéuticamente en casos de bacterias resistente a carbapenemasas.

La investigación es similar al estudio hecho por Arias y Bracamonte (2019) dado que en sus resultados también encontraron resistencia en un 100% para CAZ, PIP, FEP, MEM e IMP. En nuestro estudio el porcentaje de sensibilidad a MNO fue del 100% con respecto al resultado obtenido por Arias y Bracamonte siendo notablemente menor, en cifras, de un 78%. El estudio también concuerda con los resultados a otros antibióticos que se encontraron sensibles, siendo el caso de COL y TGC donde, en ambos casos el porcentaje es mayor al 90%.

La reintroducción de Colistín como terapia de última línea para el tratamiento de infecciones producidas por bacilos gramnegativos extensamente resistentes a fármacos (XDR, extensively drug resistant), es decir, resistentes a carbapenémicos y otros agentes antibacterianos sólo son susceptibles a Colistín y Tigeciclina en caso que no sean resistentes naturales a ellos, siendo la característica más importante de la era post-antimicrobiana ante esta enzima que hidrolizan los carbapenemicos.

El uso de colistín (COL) puede llegar a ser restringido debido a su toxicidad. Sin embargo, se debe considerar como opción terapéutica, evaluando la resistencia a los demás antibióticos y los factores de riesgo y beneficio al momento de utilizarlo como terapia antimicrobiana en el paciente.





**Fuente:** Datos obtenidos de los aislamientos de hemocultivos positivos en el HAN y a su vez de las fichas de recolección de datos del estudio.

En el gráfico 2 se observa la distribución de las bacterias con resistencias a carbapenémicos aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en las diferentes salas del hospital alemán nicaraguense, obteniendo los siguientes resultados: con mayor porcentaje de aislamientos *K. pneumoniae* con un 57% para una frecuencia de 4 aislamientos, seguido de *P. aeruginosa* como bacteria no fermentadora con un 42% en la sala de UCIN, teniendo una frecuencia de 13 aislamientos y, *K. pneumoniae* con un 40% para una frecuencia de 2 aislamientos en la sala de UCI y en menor frecuencia *E. coli* y *A. baumannii* con un 6%, siendo la frecuencia de 2 aislamientos respectivamente y, *P. agglomerans* únicamente encontradas en la sala de UCI con un 20% para una frecuencia de 1 aislamiento.

Los pacientes ingresados a la Unidad neonatal de cuidados intensivos, son por lo general los que presentan algún tipo de complicación al momento de nacer, dependen de factores maternos u otras complicaciones durante el embarazo y parto. La condición inmunológica no es favorable porque recién dejan de depender del sistema inmunológico de la madre y deben empezar a formar su propio sistema de defensa, la inmunodeficiencia y otras complicaciones recurrentes los vuelve

vulnerable a infecciones nosocomiales, en salas de este tipo de cuidados se presentan con mayor frecuencia por las características de los pacientes que están bajo supervisión médica.

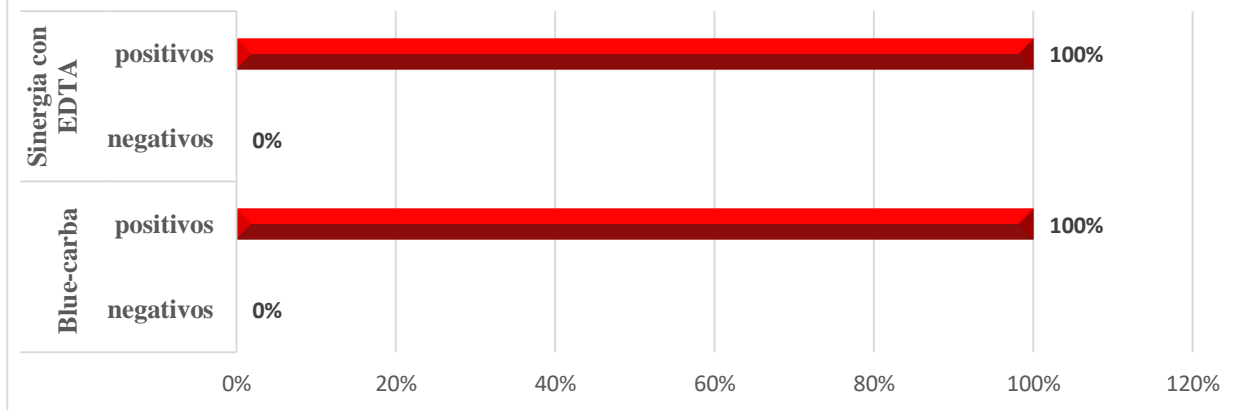
Según el estudio de Londoño., et al (2015), en Medellín, el estudio de tendencias de la resistencia antibiótica, revela que entre los factores relacionados con infecciones por bacterias multirresistentes, se reportan la hospitalización prolongada, enfermedades crónicas, intervenciones quirúrgicas, internación en UCI, inserción de dispositivos invasivos, incumplimiento de las normas de aislamiento y de las medidas de bioseguridad, y el uso inadecuado de antibióticos.

El estudio realizado por Felipe, C et al., donde los resultados obtenidos fueron; *Pseudomona spp* 71 (43%) y *Pseudomona aeruginosa* 58 (35%), haciendo un total de 78% de sepsis nosocomial por *Pseudomona*. El aislamiento de *Pseudomona aeruginosa* se acercó a los valores obtenidos en nuestro estudio que fue encontrada mayormente esta bacteria en la UCIN.

El estudio hecho por Fernández, B et al., explica que, los microorganismos patógenos inicialmente contaminan la piel y/o mucosas del recién nacido llegando al torrente circulatorio tras atravesar esta barrera cutáneo-mucosa, siendo la inmadurez de las defensas del neonato, sobre todo si es un recién nacido con muy bajo peso, el principal factor de riesgo que predispone al desarrollo de la infección.

La investigación realizada por Valdés, D et al., sugiere que la prevalencia de las Enterobacterias productoras de carbapenemasas ha aumentado en los últimos años, principalmente en *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa representa un serio problema emergente. La prevalencia a nivel mundial varía en las diferentes regiones geográficas, la mayoría son adquiridas nosocomialmente, y con tasas entre el 7,5 y el 44%. La tasa de KPC ha sido del 44 % en Latinoamérica, sin embargo, en otro estudio de Delgado, C et al., se encontraron en su mayoría *Klebsiella pneumoniae* con enzimas de tipo metalo. Se describen casos de *Klebsiella pneumoniae* NDM, como agentes infecciosos o colonizantes, en pacientes críticamente enfermos lo que explica la presencia en salas como la UCI pediátrica o la UCI con una población más generalizada donde los pacientes se aíslan por otros problemas relacionados a nacimientos prematuros o enfermedades de otra índole.

**Figura N°: 3. comparación de resultados obtenidos del método Kirby-Bauer por difusión en agar de triple discos con la prueba Blue-Carba.**

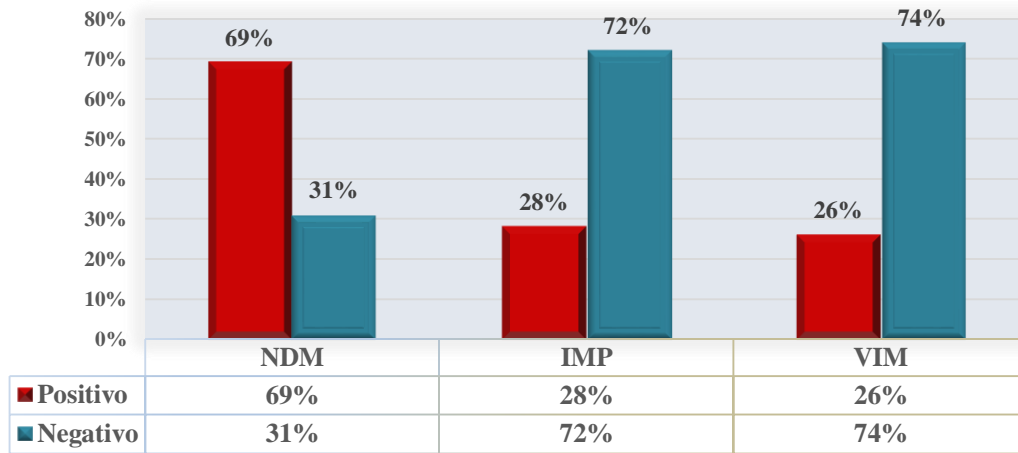


**Fuente:** Datos obtenidos de sinergia con EDTA y BLUE CARBA realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en CNDR.

Se testaron todas las cepas que presentaron resistencia CMI ante los carbapenémicos, resultando un total de 43 cepas, y al utilizar la técnica por difusión en agar de triple disco con los antibióticos Imipenem y Meropenem con EDTA, resultaron 43 cepas (100%) resultaron resistentes a Meropenem y Imipenem y presentaron sinergismo con EDTA representado con el efecto huevo de las cuales son las incluidas en el estudio. Al relacionar los resultados de la sinergia de triple disco utilizando EDTA con carbapenémicos y los resultados obtenidos de la prueba rápida Blue-Carba Test, se obtuvo un resultado de 43 cepas equivalente al (100%) de resultados positivos para esta prueba.

La técnica de Blue carba test es un método muy práctico para detectar carbapenemasas tipo MBL, por lo tanto, aunque sea una prueba rápida, se puede usar para un diagnóstico eficaz de manera preliminar para la detección de carbapenemasas, según los ensayos realizados en los Servicio Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” la prueba tiene una sensibilidad y especificidad del 100% para todas las carbapenemasas (KPC, MBL y OXAs) a excepción de la OXA/48-OXA/48-LIKE, donde un resultado negativo con el BLUE-CARBA requerirá de pruebas adicionales para definir la presencia de esta carbapenemasa (2014).

**Figura N° 4: Genes codificadores de Metallo-β-lactamasas en Bacilos Gram Negativos No Fermentadores y Enterobacterias.**



**Fuente:** Datos obtenidos de la realización de la PCR Multiplex para detectar genes codificadores de enzimas carbapenemasas tipo Metallo. Técnica realizada en el Laboratorio de Bacteriología en el área de Biología Molecular en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

De las 43 cepas productoras de carbapenemasas con CMI de 2-4 µg/ml en Imipenem y meropenem y un corte de <19 mm, en la técnica de difusión de disco en agar solamente 43 cepas fueron positivas para metalobetalactamasas identificados por su sinergia con EDTA de las cuales se procedió a genotipificar los genes, resultando más frecuente el Gen NDM-1 con 69%, 28% IMP y 26% VIMP respectivamente.

El predominio del gen NDM-1 ha venido creciendo desde su primera detección en el 2016 cuando fue genotipificado por primera vez en Nicaragua por Arbízú Medina, et. Al., en enterobacterias de las cuales 22 cepas de 45 eran portadoras de NDM-1 el 48.89% equivalente, las cual se ha venido diseminando a medida de los años, esto se corrobora con la investigación realizada por Acevedo, Dávila y Montenegro (2017) donde obtuvieron 21 cepas con NDM de 27 un 61.77% siendo la mayoría, tomando en cuenta nuevamente de que los estudios anteriormente mencionados se realizaron en enterobacterias, se puede relacionar con nuestros datos ya que la mayoría de cepas con NDM son enterobacterias.

Esta investigación demuestra que la diseminación no solo se aísla en esta familia sino también se presentan en No fermentadores como *P. aeruginosa*, de las cuales 5 cepas fueron portadoras de NDM equivalentes al 11.6% de las 43 cepas MBL positivas.

El gen IMP aislado en la investigación realizada por Acevedo, Dávila y Montenegro (2017), fueron 6 cepas equivalentes al 17.65%, siendo así se puede reflejar la prevalencia y diseminación de este gen con respecto a nuestros datos obtenidos que fueron un 28% siendo mayor, por otra parte en el mismo estudio de Acevedo et al., con respecto al gen VIM en su estudio resultó un 2.94% que en contraste a nuestros datos presentaron un aumento considerable de la diseminación de este gen con un 26%; sin embargo, cabe recalcar que estos genes estuvieron presentes tanto en las enterobacterias como en géneros de No fermentadoras y a la vez fueron encontrados dos genes en una misma bacteria; 1 cepas de *Enterobacter cloacae*, 9 cepas de *P. aeruginosa* su facilidad de propagación por plásmidos hace de estos 3 genes uno de los principales epidemiológicamente por su fácil transmisión de bacteria a bacteria.

## VIII. CONCLUSIONES

1. La resistencia encontrada en enterobacterias productoras de MBL fue del 100% a todos los betalactámicos, incluyendo carbapenémicos e inhibidores, para la familia de Fluoroquinolonas hubo una sensibilidad del 39% y un 61% resistente, para aminoglucósidos un 100% de resistencia; para colistín resultó un 96% de sensibilidad y solo una cepa resistente equivalente al 4%. En el caso de los no fermentadores *P. aeruginosa* y *A. baumannii* presentó resistencia a cefalosporina de 3ra y 4ta generación, piperacilina en un 100% resistente. En el caso de Fluoroquinolonas y aminoglucósidos para *P. aeruginosa* un 100% de resistencia mientras que en *A. baumannii* solo el 50% de resistencia y, colistín con un 100% sensible en ambos casos.
2. Según la distribución de las bacterias con resistencia a carbapenémicos aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en las diferentes salas del hospital alemán nicaragüense, se obtuvo un mayor porcentaje de aislamientos con *K. pneumoniae* con un 57%, seguido de *P. aeruginosa* con un 42% en la sala de UCIP y UCIN respectivamente, *K. pneumoniae* en la sala de la UCI se aisló en un 40%, y en menor frecuencia *E. coli* y *A. baumannii* con un 6% respectivamente y, *P. agglomerans* únicamente encontrada en la sala de UCI con un 20%. *E. cloacae* presentó su mayor aislamiento en la UCIP con un 29% y en menor porcentaje en las demás salas.
3. Basado en los resultados positivos en un 100% de ambas técnicas, se determinó que el uso de la prueba rápida Blue-Carba Test es efectivo para detectar carbapenemasas tipo Metallo  $\beta$ -lactamasas de una manera práctica y sencilla, tomando en cuenta, como base, la relación con el método de sinergia en agar triple disco utilizando EDTA con carbapenémicos donde el resultado positivo es invariablemente indicativo de carbapenemasas de tipo MBL.
4. EL gen con mayor porcentaje aislados de los 3 genes investigados fue NDM con 25 cepas al cual equivalente a un 53 %, 22 % para IMP y 14% para VIMP, de las cuales se encontraron 10 cepas portadoras de dos genes, donde se utilizó la técnica de PCR multiplex.

## **IX. RECOMENDACIONES**

**A la UNAN-Managua:** Instar a los estudiantes de Ciencias de la Salud sobre la importancia de investigar sobre el comportamiento y diseminación de bacterias con resistencia antimicrobiana, y fomentar la investigación en esta y otras líneas de trabajo, a su vez estudiar los otros mecanismos de resistencia a carbapenemicos, creando así un ambiente de actualización continua de la información científica, además de permitir que sean más los que opten por la investigación científica.

Promover la integración del estudio de las nuevas técnicas automatizadas para de los mecanismos de resistencia e identificación de los mismos que permitan controlar este problema de salud pública.

**Al Hospital Alemán Nicaragüense:** Fomentar la comunicación entre el médico y el laboratorio clínico para encontrar las mejores opciones terapéuticas de acuerdo al perfil bacteriano reportado.

Sumarle la importancia que tiene el laboratorio de Bacteriología, facilitar de medios e instrumentos que dispone el área para el perfeccionamiento del diagnóstico con alta precisión

**Al Ministerio de Salud:** Fortalecer los sistemas de vigilancia a nivel nacional para contrarrestar la diseminación de estos microorganismos resistentes e implementar protocolos para el manejo efectivo de la terapia antibiótica en cada paciente.

Garantizar y proveer los insumos adecuados para la prevención, identificación, control y tratamiento de estas infecciones.

## X. BIBLIOGRAFIA

- Algorta, G. (2002). BACILOS GRAM NEGATIVOS NO EXIGENTES ENTEROBACTERIACEAE, VIBRIONACEAE, PSEUDOMONAS. *cefa*, 12.
- Betancourt, A., Morales, R., Rivera, M., & Gonzalez, G. (2006). Nuevos Betalactamicos. *rev MEDICRIT*, vol 3(6), p.133.
- Bou, G., Oliver, A., & Beltran, J. (2000). OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase, with Carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *rev Antimicrob Agents Chemother*, vol 44(6), p.1557.
- Brebone, C. (2007). Metallo- $\beta$ -lactamase (Clasificación, actividad genética organización, estructura, zinc coordinación) and their superfamily. *rev Bioch Pharmacol*, vol 74(1), pp.1686-1690.
- Brown, S., & Amyes, S. (2006). Oxa  $\beta$ -lactamasas in *Acinetobacter* the story so far. *rev J Antimicrob Chemother*, vol 57(1), p.3.
- Bush, K., Jacoby, G., & Medeiros, A. (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamasas and its correlation with molecular structure. *rev Antimicrob Agents Chemother*, vol 39(6), p.1215.
- Chinchilla, A., Tomas, B., & Morales, R. (2012). DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS TIPO NDM-1 Y KPC-2. *Tesis para optar a Medico y Cirujano*.
- Colomer, B. F., Sastre, J. L., Cotallo, G. C., Aparicio, A. R., & Fernández, A. I. (2008). Sepsis del recién nacido. *Sociedad Española de Pediatría*, 21, 189-205.
- García, A., & Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 3426.
- Gobernado, M., & Acuña, C. (2007). Ertapenem. *Rev Esp Quimioterap*, 277.
- Gomez, J., Alcantara, M., Simarro, E., Martínez, B., Ruiz, J., Guerra, B., . . . Valdes, M. (2002). Bacteriemias por *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiología, clínica y tratamiento. Estudio prospectivo de siete años. *Rev Esp Quimioterap*, 2.
- Gonzales, C. M. (2010). *Mecanismo de resistencia a cepas de carbapenemes en cepas de Acinetobacter baumannii causantes de infecciones intrahospitalarias*. (Tesis de maestria). Instituto Politecnico Nacional, Mexico, D.F.
- Hernandez, R., Fernandez, C., & Baptista, P. (2010). *Metodologia de la investigacion*. Mexico: MC Graw Hill.
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2016). *Microbiologia medica*. Mexico D.F: Mc Graw Hills.



- Lorenzo, p., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., & Portoles, A. (2008). *Velazquez Farmacologia basica y clinica*. Buenos Aires: Editorial medica panamericana.
- Londoño, J., Macias, I., & Ochoa, F. (2015). Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *ELSEVIER*, 78.
- Merida, C. (2010). Tecnicas y proceso de investigacion. *unidad didactica de investigacion*, 7.
- Newman, G. D. (2006). EL RAZONAMIENTO INDUCTIVO Y DEDUCTIVO DENTRO. *Laurus revista de educacion*, 184.
- Queenan, A., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *rev Clin Microbiol Rev*, vol 20(3), pp.441-442.
- Salazar, A., Rodriguez, A., & Borunda, J. (2013). *Biologia molecular fundamentos y aplicaciones en la ciencia de la salud*. Mexico: Mc Graw Hill.
- Sánchez, G. C. (2007). *Demostracion de  $\beta$ lactamasas de espectro extendido en cepas de Aeromonas spp.* (Tesis de Licenciatura para optar a la licenciatura en biomedicina). Biomedicina IPN-ENCB, Mexico,D.F.
- Paget et al., e. (2009). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas en el instituto hondureño de seguridad social. *Rev MEd Hondur*.
- Ponce, C. F., Madrid, W. A., & Pineda, I. J. (2016). Agentes bacterianos en la sepsis neonatal. Cuidados Intensivos Neonatales Hospital Mario Catarino Rivas. *Acta Pediátrica Hondureña*, 479-485.
- Resurrección-Delgado, Cristhian, Montenegro-Idrogo, Juan José, Chiappe-Gonzalez, Alfredo, Vargas-Gonzales, Renzo, Cucho-Espinoza, Carolina, Mamani-Condori, Dick Henry, & Huaroto-Valdivia, Luz María. (2017). Klebsiella pneumoniae nueva Delhi metalo-betalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo: Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(2), 261-267.
- Otzen, T., & Manterola, C. (2017). Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio. *International Journal of Morphology*, 35(1), 227-232.
- Velasco, J., Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., & Ramirez, A. (2008). *Manual práctico de bacteriología clínica*. Andes: Codepre.

Viña, I. (2016). *Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología*. (Tesis Doctoral para optar al grado de doctor). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Madrid.

Zaro Alcalá, M. M. Carbapenemasas: un mecanismo de resistencia bacteriana frente las carbapenemes, antibióticos de último recurso (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE).

Zepeda, C. J. (1981). BACILOS GRAM-NEGATIVO ANOTACIONES DE INTERES CLINICO. *REV. MEDICA HONDUR*, 105.

# **XI. ANEXOS**

**Anexos 1.**



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA,  
MANAGUA**  
UNAN - MANAGUA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD  
BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**Ficha de recolección de datos:**

El propósito principal de la siguiente ficha es la recopilación de datos de las bacterias procesadas en el estudio frecuencia de bacilos gram negativos no fermentadores y enterobacterias aislados en hemocultivos, portadores de genes vim, imp y ndm, en el hospital alemán nicaragüense en el periodo de enero a diciembre, 2019.

**I-Datos generales**

<b>Código de muestra ID</b>	
<b>Con antibiótico (si y no)</b>	
<b>Procedencia</b>	

**II- Identificación**

<b>Microorganismo aislado de hemocultivo (Género y especie)</b>

**III- perfil de resistencia (se reporta en mm)**

<b>Fármaco</b>	<b>Estado (S,I,R)</b>	<b>Kirby- Bauer(mm)</b>	<b>Vitek (CIM)</b>
<b>CAZ</b>			
<b>AMC</b>			

<b>FEP</b>			
<b>ATM</b>			
<b>PRL</b>			
<b>IMP</b>			
<b>MEM</b>			
<b>TZP</b>			
<b>SAM</b>			
<b>GEN</b>			
<b>CIP</b>			
<b>LVX</b>			
<b>AMK</b>			
<b>TGC</b>			
<b>MNO</b>			
<b>STX</b>			
<b>PIP</b>			
<b>CRO</b>			
<b>COL</b>			
<b>AMP</b>			
<b>CEC</b>			
<b>ERT</b>			
<b>NAL</b>			
<b>FOX</b>			
<b>CHL</b>			

#### **IV- Sinergia con inhibidor**

Sinergia a evaluar	Positivo	Negativo
Sinergia con EDTA (metalob-lactamasa)		

### V. Blue-Carba Test

<b>Blue-Carba Test</b>	Positivo	
	Negativo	

### VI- Mecanismo de resistencia genotípica

Métalo $\beta$ - lactamasa	IMP	
	VIM	
	NDM	
Fecha de extracción de ADN:		
Fecha de amplificación y electroforesis:		

**Tabla N°1: Distribución porcentual de Enterobacterias y No Fermentadores (*A. baumannii*, y *P. aeruginosa*) con MBL**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Válido	<i>P. Aeruginosa</i>	15	35%
	<i>A. baumannii</i>	2	5%
	<i>E. coli</i>	2	5%
	<i>K. pneumoniae</i>	15	35%
	<i>E. cloacae</i>	8	18%
	<i>P. aglomerans</i>	1	2%
	Total	43	100%

**Fuente:** Datos obtenidos en base de datos de identificación bacteriana mediante VITEK compact 2® y realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en CNDR.

**Tabla N°2: Porcentaje de aislamientos bacterianos por salas en el Hospital Alemán Nicaragüense**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Salas</b>	UCIN	31	72%
	UCIP	7	16%
	UCI	5	12%
	Total	43	100%

**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de identificación por el método CMI en Vitek® 2 Compact y por Kirby-Bauer realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

**Tabla N°: 2.1 Porcentaje de aislamiento bacteriano en la sala UCIN en el Hospital Alemán Nicaragüense**

		Frecuencia	Porcentaje
Válido	<i>P. aeruginosa</i>	13	42%
	<i>K. pneumoniae</i>	9	29%
	<i>E. cloacae</i>	5	16%
	<i>E. coli</i>	2	6.5%
	<i>A. baumannii</i>	2	6.5%
	<i>Total</i>	31	100%

**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de identificación por el método CMI en Vitek® 2 Compact y por Kirby-Bauer realizado en él HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

**Tabla N°: 2.2. Porcentaje de aislamiento bacteriano en la sala de UCIP en el Hospital Alemán Nicaragüense**

		Frecuencia	Porcentaje
	<i>K. pneumoniae</i>	4	57%
	<i>E. cloacae</i>	2	29%
	<i>P. aeruginosa</i>	1	14%
	<i>Total</i>	7	100%

**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de identificación por el método CMI en Vitek® 2 Compact y por Kirby-Bauer realizado en él HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.



**Tabla N°: 2.3. Porcentaje de aislamiento bacteriano en la sala UCI en el Hospital Alemán Nicaragüense**

	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>K. pneumoniae</i>	2	40 %
<i>P. aeruginosa</i>	1	20 %
<i>E. cloacae</i>	1	20 %
<i>P. aglomerans</i>	1	20 %
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>100 %</b>

**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de identificación por el método CMI en Vitek® 2 Compact y por Kirby-Bauer realizado en él HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

**Tabla N°3.1 Susceptibilidad de Enterobacterias aisladas de hemocultivos positivos de pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense**

ANTIBIOTICOS	Género y Especie											
	<i>P. agglomerans</i>			<i>E. cloacae</i>			<i>K. pneumonie</i>			<i>E. coli</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
AMP	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
CEC	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
AMC	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
ERT	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
CRO	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
CAZ	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
LEV	1	0	0	5	0	3	2	0	13	2	0	0
NAL	0	0	1	0	0	8	2	0	13	1	0	1
FEP	0	0	1	0	2	6	0	0	15	0	0	2
ATM	1	0	0	4	0	4	0	1	14	1	0	1
IMP	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
MEM	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
FOX	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
TZP	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
CIP	1	0	0	4	1	3	2	0	13	1	0	1
AMK	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
GEN	0	0	1	0	0	8	0	0	15	0	0	2
CHL	1	0	0	0	0	8	0	0	15	0	0	2
SXT	1	0	0	1	0	7	0	0	15	0	0	2
COL	1	0	0	7	0	1	15	0	0	2	0	0

**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de susceptibilidad por el método CMI y por Kirby-Bauer realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

**Tabla N°3.1 Susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de hemocultivos positivos de pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense**

	Género y Especie		
ANTIBIOTICOS	<i>P.aeruginosa</i>		
	S	I	R
CAZ	0	0	15
FEP	0	0	15
TZP	0	3	12
IMP	0	0	15
MEM	0	0	15
ATM	0	9	6
PIP	0	0	15
CIP	0	0	15
GEN	0	0	15
COL	15	0	0
AMK	0	0	15

**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de susceptibilidad por el método CMI y por Kirby-Bauer realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

**Tabla N°3.2 Susceptibilidad de *Acinetobacter baumannii* aisladas de hemocultivos positivos de pacientes internos en el hospital alemán nicaragüense**

ANTIBIOTICO	Género y Especie		
	<i>A. baumannii</i>		
	S	I	R
SAM	0	0	2
PIP	0	0	2
CAZ	0	0	2
FEP	0	0	2
MEM	0	0	2
IMP	0	0	2
AMK	0	1	1
TZP	0	1	1
MNO	0	0	2
CIP	0	2	1
STX	0	0	2
TGC	2	0	0
GEN	0	1	1
COL	2	0	0

**Fuente:** Datos obtenidos en base a la realización de susceptibilidad por el método CMI y por Kirby-Bauer realizado en el HAN corroborado con control de calidad hecho en el CNDR.

**Tabla N°4. Resultados de Blue Carba test**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Válido</b>	<b>TEST POSITIVO</b>	43	100%
	<b>TETS NEGATIVO</b>	0	0%
	<b>Total</b>	43	100%

**Fuente:** Cuaderno de trabajo del HAN corroborado con control de calidad hecho en CNDR.

**Tabla N°5 Resultados de IMP y MEM totales con CMI**

	<b>IMP</b>	<b>MEM</b>
<b>Frecuencia</b>	43	43
<b>Porcentaje</b>	100%	100%

**Fuente:** Cuaderno de trabajo del HAN corroborado con control de calidad hecho en CNDR

**Tabla N°6. Frecuencia Bacilos Gram Negativos metalo betalactamasa**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Válido</b>	<b>EDTA Positivo</b>	43	52%
	<b>EDTA Negativo</b>	39	48%
	<b>Total</b>	82	100%

**Fuente:** Datos obtenidos de la técnica de Sinergia con EDTA para detectar y clasificar carbapenemasas. Técnica realizada en el CNDR.

***Tabla N°8. Frecuencia de Genes NDM en Bacilos Gram Negativos positivos fenotípicamente para metalo-betalactamasas***

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
% Válido	<b>Positivo</b>	25	51%
	<b>Negativo</b>	24	49%
	<b>Total</b>	49	100%

Fuente: Datos obtenidos de la realización de la PCR multiplex para detectar genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metalo. Técnica realizada en el Laboratorio de Bacteriología en el área de Biología Molecular en el (CNDR).

***Tabla N°9. Frecuencia de Genes IMP en Bacilos Gram Negativos positivos fenotípicamente para metalo-betalactamasas.***

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Válido	<b>Positivo</b>	11	22%
	<b>Negativo</b>	38	78%
	<b>Total</b>	49	100%

**Fuente:** Datos obtenidos de la realización de la PCR multiplex para detectar genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metalo. Técnica realizada en el Laboratorio de Bacteriología en el área de Biología Molecular en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

**Tabla N°10. Frecuencia de Genes VIM en Bacilos Gram Negativos positivos fenotípicamente para metalo-betalactamasas**

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Válido</b>	<b>Positivo</b>	7	14%
	<b>negativo</b>	42	86%
	<b>Total</b>	49	100%

**Fuente:** Datos obtenidos de la realización de la PCR multiplex para detectar genes productores de enzimas carbapenemasas tipo Metalo.  
Técnica realizada en el Laboratorio de Bacteriología en el área de Biología Molecular en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

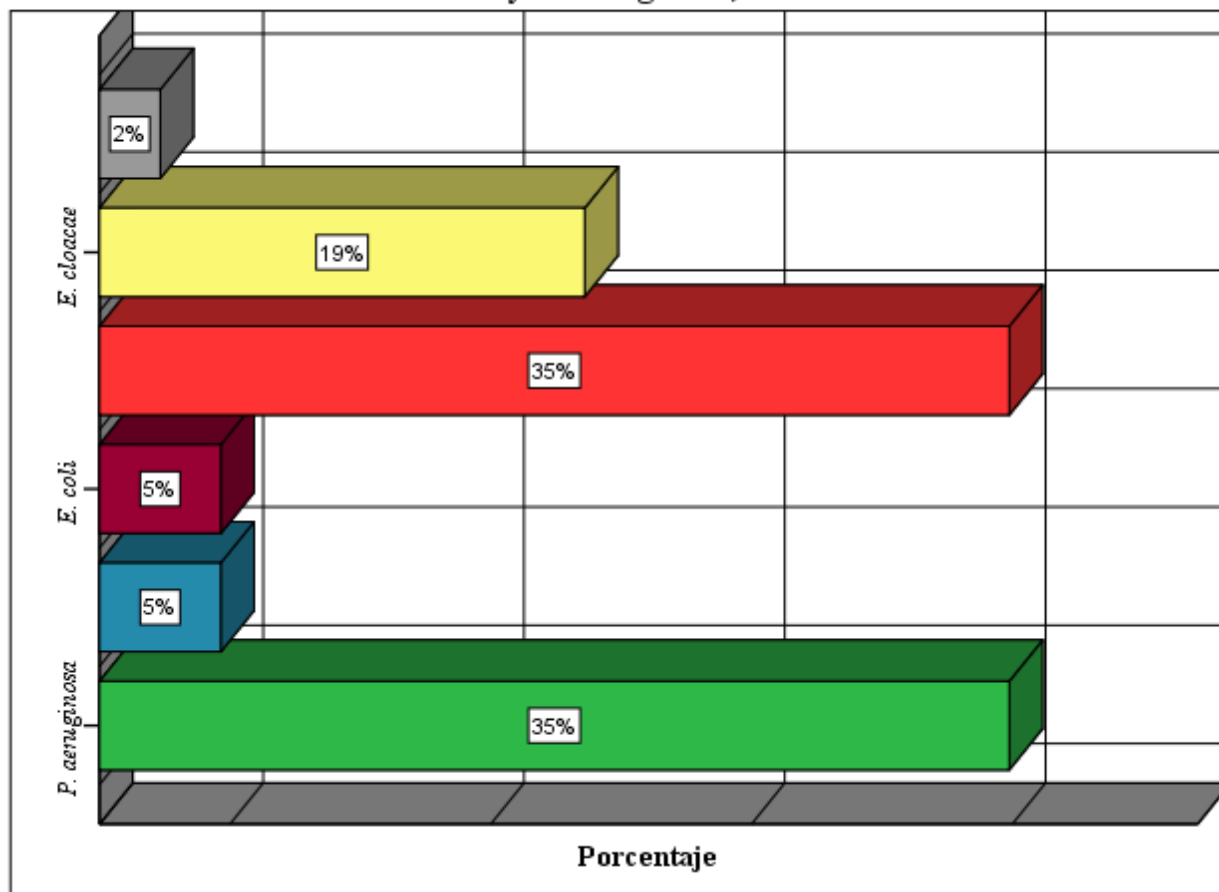
**Tabla N° 11. Base de datos de cepas en estudio estudiadas por las pruebas fenotípicas y genotípicas**

# Cepa	Código HAN	Código CNDR CC	Género y especie	Blue Carba Test	Sinergia con EDTA MBL	Gen amplificado
1	685688	208CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
2	687426	209CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
3	691232	42CC	<i>E. cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
4	693721	88CC	<i>E. coli</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
5	692074	92CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
6	691003	119CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
7	654106	120CC	<i>E. cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
8	695066	131CC	<i>E. cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
9	695029	134CC	<i>E. cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
10	6792935	180CC	<i>E. coli</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
11	70314	202CC	<i>E. cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP, VIM
12	704925	203CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
13	177815	209CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
14	707194	219CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
15	708822	220CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
16	750059	232CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
17	71320	241CC	<i>E. cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
18	760056	243CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
19	659685	246CC	<i>E. cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
20	700036	247CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
21	711411	248CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM



22	711516	249CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
23	152129	250CC	<i>E.cloacae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
24	659664	252CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
25	6796849	231CC	<i>P. aglomerans</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
26	698978	179CC	<i>K. pneumoniae</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
27	680268	207CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
28	683280	210CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
29	684712	40CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
30	SD	118CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
31	699842	132CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
32	SD	133CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
33	701315	177CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
34	692925	178CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
35	704919	204CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
36	706189	205CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP
37	704983	206CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
38	707108	207CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
39	704145	208CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	NDM
40	760683	239CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
41	SD	240CC	<i>P. aeruginosa</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP VIM
42	570301	201CC	<i>A. baumannii</i>	POSITIVO	POSITIVO	VIM
43	711632	242CC	<i>A. baumannii</i>	POSITIVO	POSITIVO	IMP

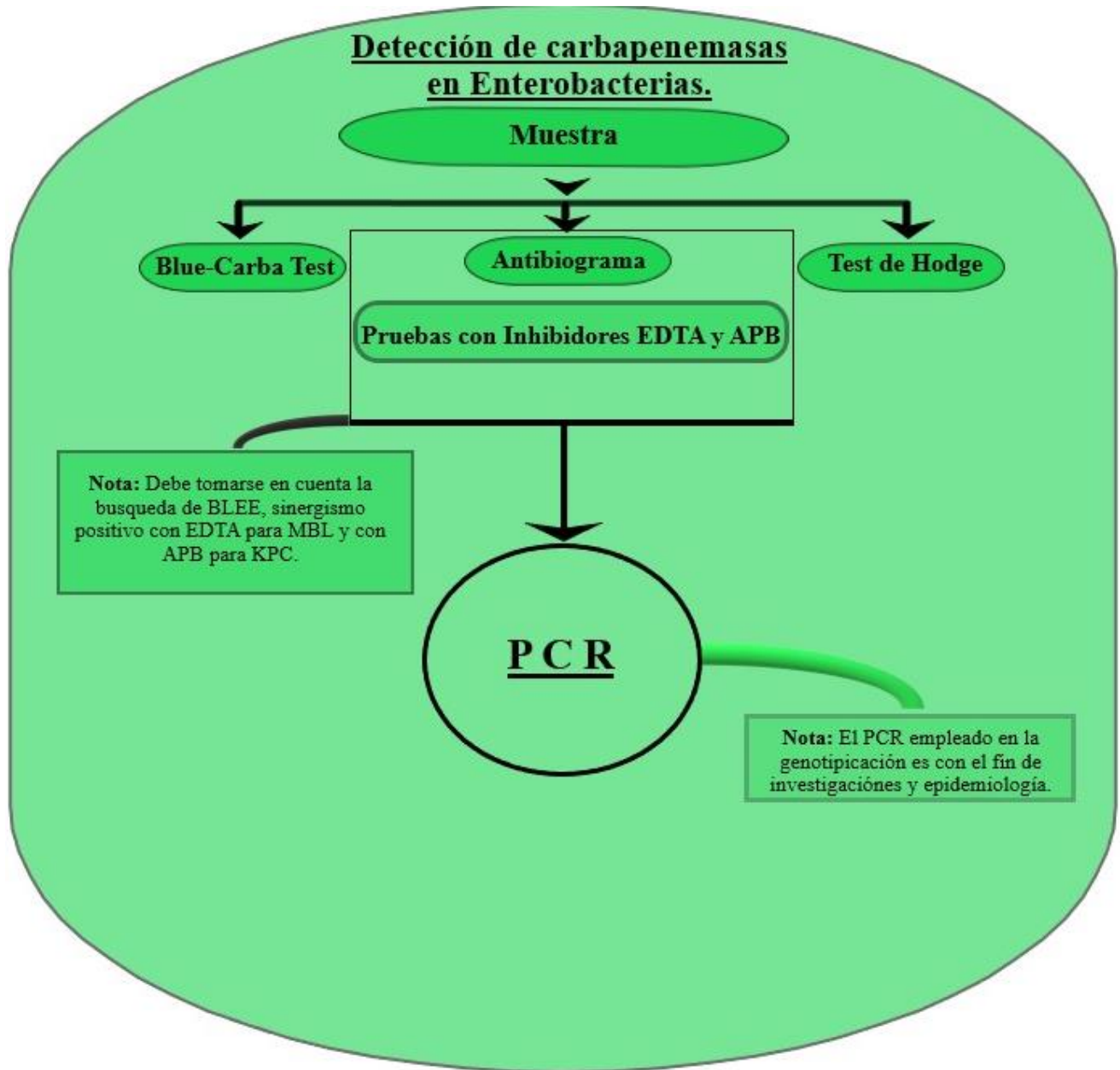
**Figura N°: 5** Distribucion porcentual de Enterobacterias y No Fermentadores ( *A. baumannii* y *P. aeruginosa*) con MBL.



**Fuente:** Datos obtenidos de los aislamientos de hemocultivos positivos en el HAN y a su vez de las fichas de recolección de datos del estudio.

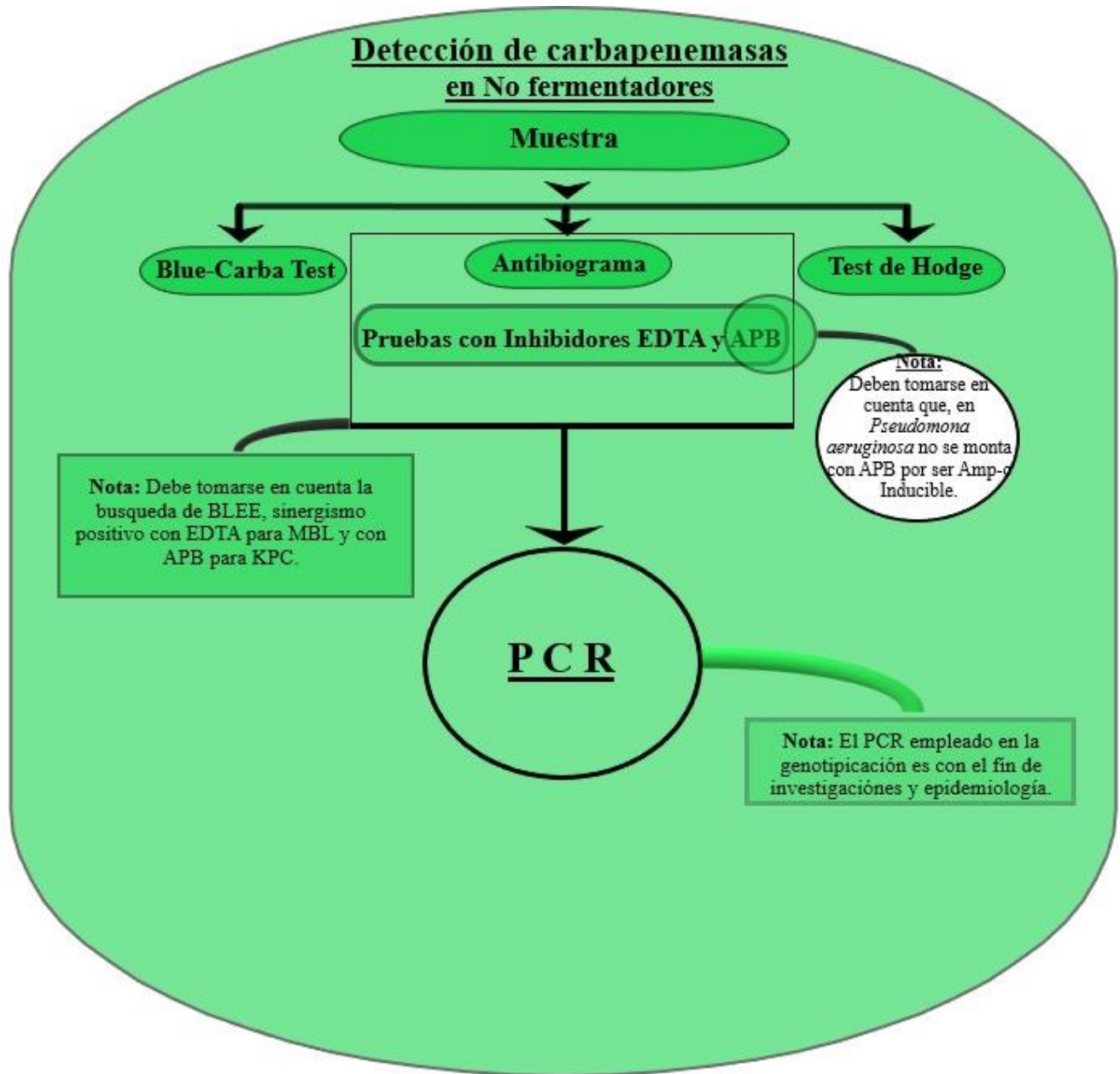
De las 43 cepas positivas para Metallo- $\beta$ -lactamasas, el 35% de los aislamientos corresponden a *Pseudomona aeruginosa*, de igual manera para *Klebsiella pneumoniae* con un 35% correspondiente a 15 cepas respectivamente, un 8% corresponden a *Enterobacter cloacae*. Además, hubo bacterias con menor cantidad de aislamientos en general, tal es el caso de *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii* con 5% de aislamientos respectivamente; cabe recalcar que, hubo un aislamiento de *Pantoea aglomerans* correspondiente al 2%.

Figura N°: 6. Flujoograma de detección de carbapenemasas



Fuente: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

Figura N°: 6. Flujograma de detección de carbapenemasas

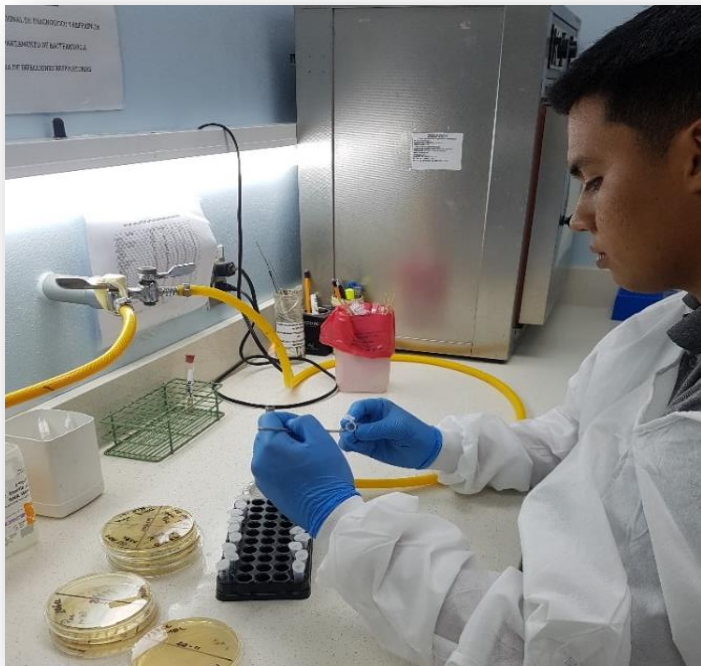


Fuente: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

### Anexo 3. Imágenes

#### Imagen 1.

Selección de cepas para extracción de Ácidos nucleicos.



#### Imagen 2.

Suspensión de cepas en tubos de PCR Eppendorf 1.5 ml en agua libre de DNAsa, RNAsas y proteasas.



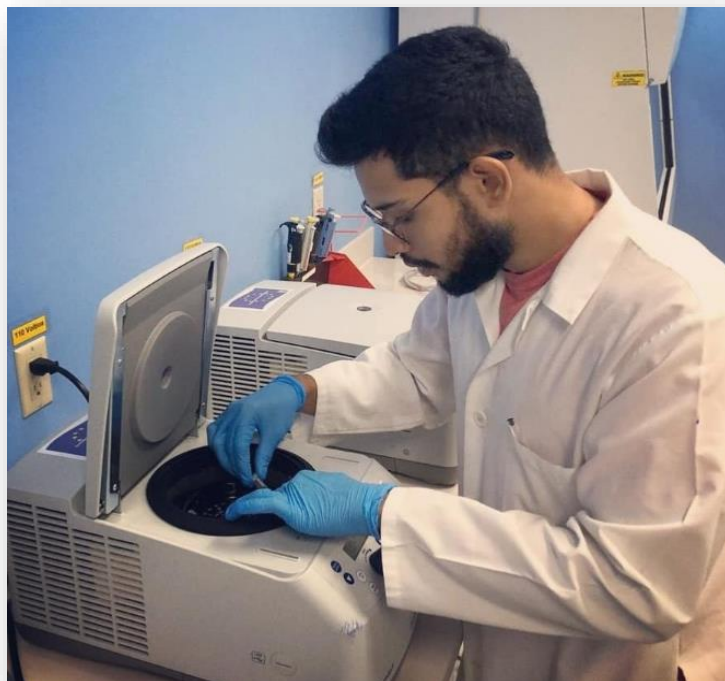


**Imagen 3.**

Thermomixer comfort Eppendorf usado para atemperar y mezclar líquidos en tubos de reacción cerrada para la liberación del ADN durante 10 minutos.

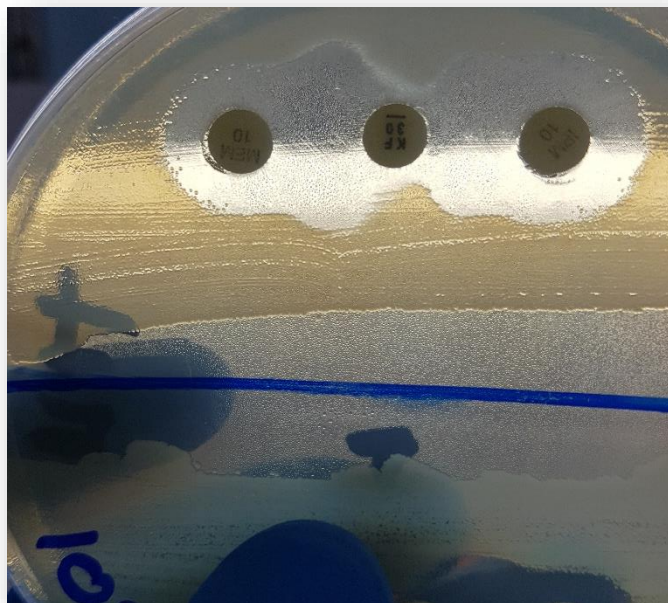
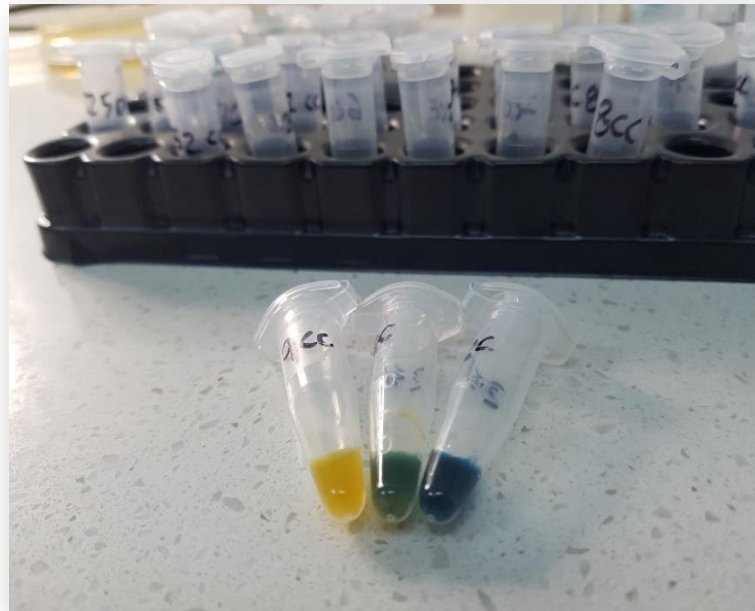
**Imagen 4.**

Centrifugación de las cepas luego del proceso del Thermomixer comfort Eppendorf a 5 minutos a 12,00 RPM para extraer 80  $\mu$ l del sobrenadante.



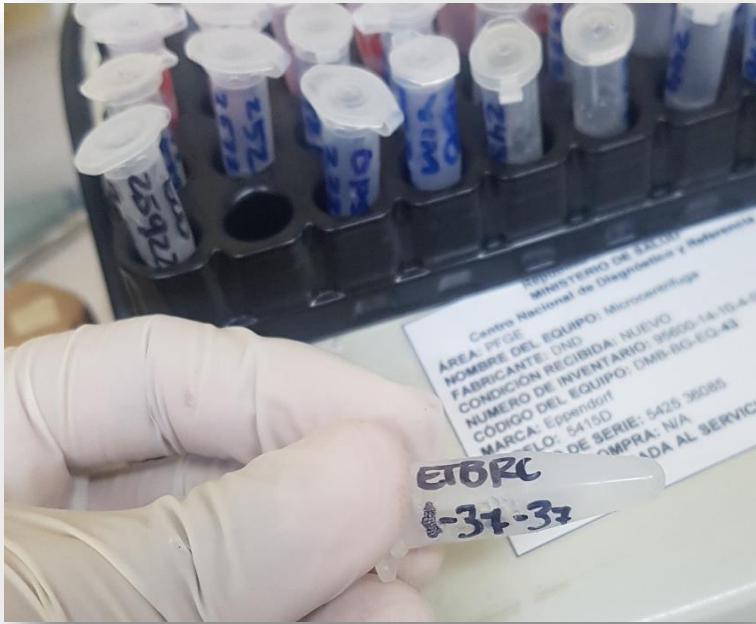
**Imagen 5.**

Resultado positivo para carbapenemasas por el método rápido Blue-Carba Test, reflejando el tubo con la coloración azul como test control negativo sin Imipenem, y el resultado de color amarillo y verde es la cepa trabajo reaccionando con el Imipenem.



**Imagen 6.**

Resultado positivo para carbapenemasas de tipo Metallo- $\beta$ -lactamasas por el método de triple disco en agar MH usando EDTA como inhibidor junto con Imipenem y Meropenem.



**Imagen 7.**

Selección de ADN de cepas trabajo y controles positivos ETBRC 137-37-37, OPS 188, OPS 222.

**Imagen 8.**

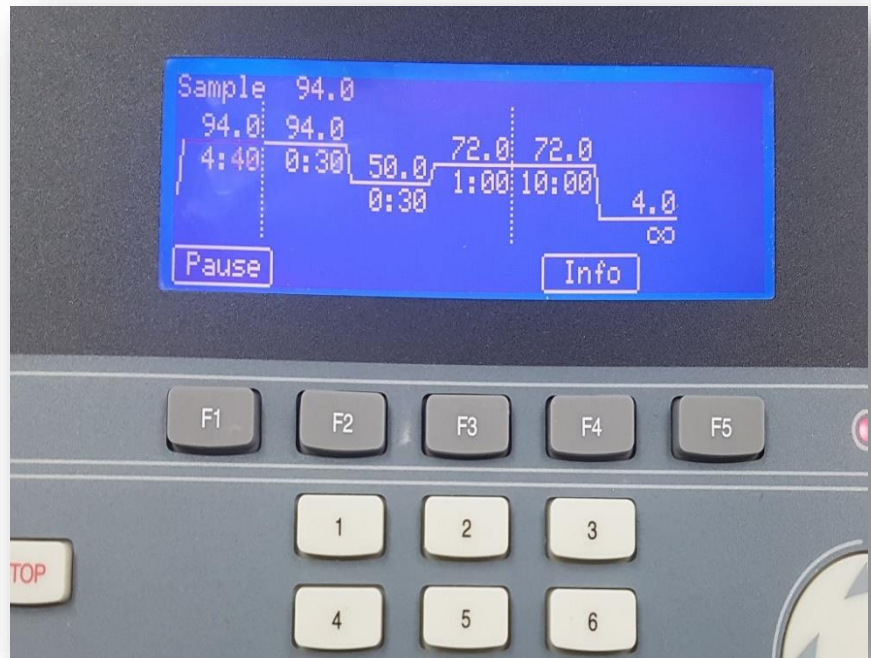
Ubicación de cepas trabajo y controles al termociclador Gene Amp PCR system 9700.





**Imagen 9.**

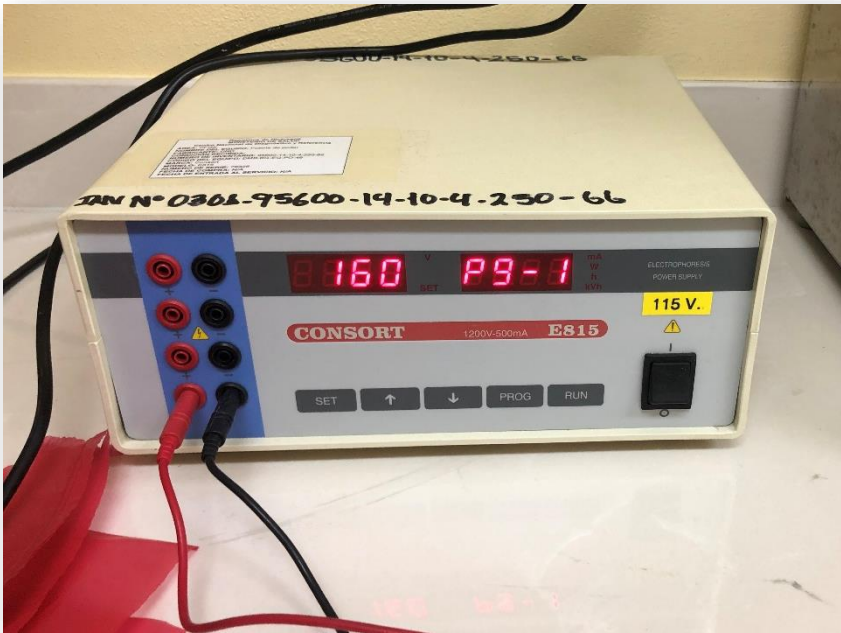
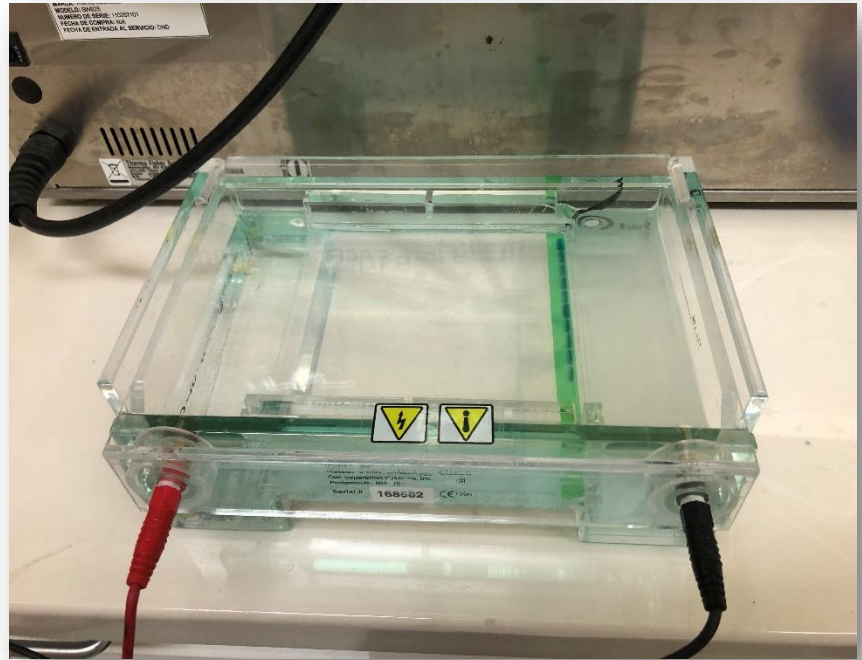
Inicio del programa de amplificación.



**Imagen 10.**

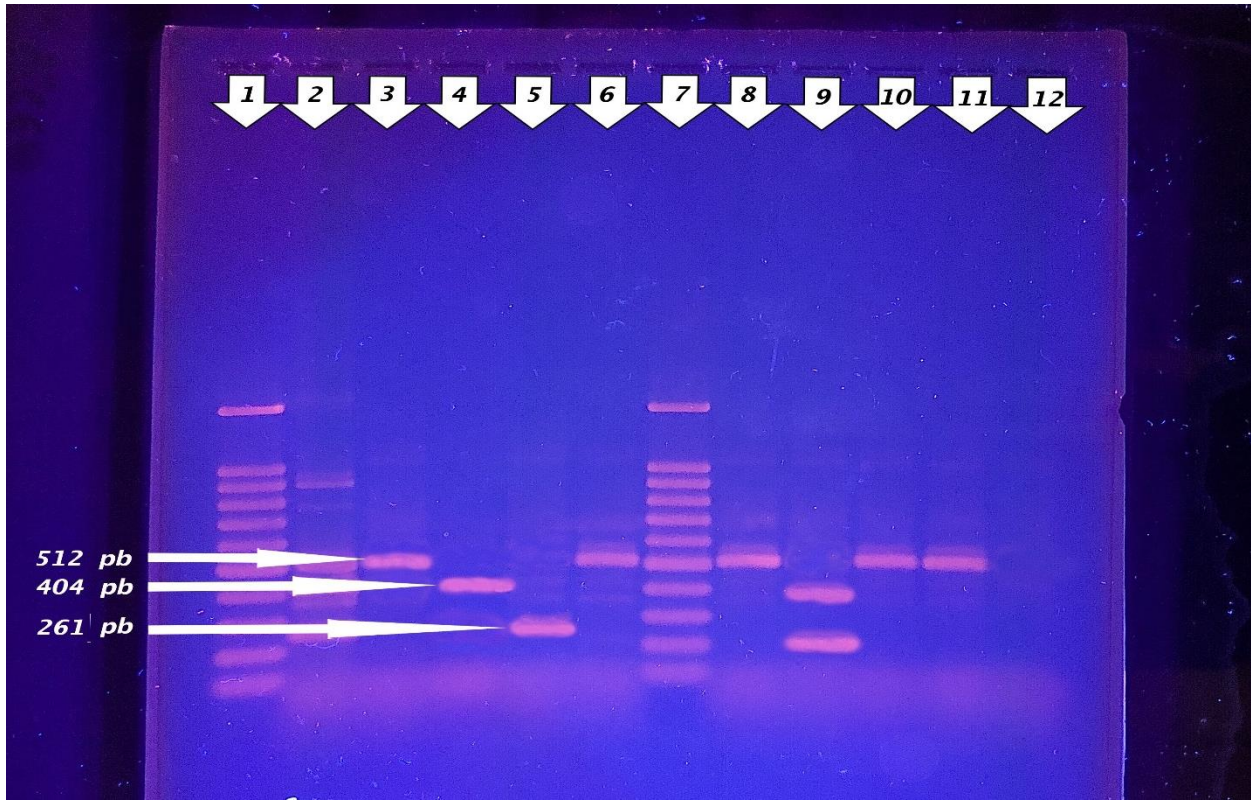
Preparación de TBE 1X y etiquetado de reactivo/buffer.

**Imagen 11.**  
Condiciones de corrida en  
Agarosa al 1%.  
TBE 1X, 160 V a 1.40 h.



**Imagen 12.**  
Fuente de poder utilizada  
para correr la  
electroforesis.

Imagen 14.



Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, TBE 1X 140 V a 1.40 h.

Peso Molecular	512 pb, 404 pb, 261 pb.
Pozo 1.	Marcador Molecular.
Pozo 2.	Mezcla de genes.
Pozo 3.	Control Positivo (NDM).
Pozo 4.	Control Positivo (IMP).
Pozo 5.	Control Positivo (VIM).
Pozo 6.	Aislamiento clínico 252CC.
Pozo 7.	Marcador Molecular.
Pozo 8.	Aislamiento clínico 2CC.
Pozo 9.	Aislamiento clínico 240CC.
Pozo 10.	Aislamiento clínico 5CC.
Pozo 11.	Aislamiento clínico 6CC.
Pozo 12.	Control Negativo s/DNA.