



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA

UNAN - MANAGUA

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
Centro de Investigaciones y Estudios de la Salud
Escuela de Salud Pública de Nicaragua.



Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias de la Salud.

CIES - UNAN - Managua

Tema.

Perfil de resistencia antimicrobiana en enterobacterias y bacterias no fermentadoras en pacientes de hospitales en Managua-Nicaragua, periodo 2017-2019.

Autor:

MSc. Oscar Arbizú Medina.

Tutor:

Abraham Salinas-Miranda, MD, PhD

Docente, CIES-UNAN-Managua.

Asesor:

Dr. Erick Amaya. PhD

Profesor Titular. UNAN- León

Facultad de Ciencias Médicas, Dto. Microbiología y Parasitología.

Managua - Nicaragua, 30 de agosto 2021.

CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	8
III. JUSTIFICACIÓN	11
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4.1 Formulación del problema	12
4.2 Preguntas directrices	12
V. OBJETIVOS	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos	13
VI. MARCO TEÓRICO	14
6.1 Bacterias Gram negativas	14
6.1.1 Enterobacterias	14
6.1.1.1 Escherichia coli	14
6.1.1.2 E. coli enterotoxigénica (ETEC)	15
6.1.1.3 E. coli enterohemorrágica (STEC)	15
6.1.1.4 E. coli enteroinvasiva (EIEC)	15
6.1.1.5 E. coli enteropatógena (EPEC)	15
6.1.1.6 E. coli enteroagregativa (EAEC)	16
6.1.1.7 E. coli Adherencia difusa (DAEC)	16
6.1.1.8 Klebsiella	16
6.2 Bacterias gram negativas no fermentadoras	16
6.2.1 Pseudomonas aeruginosa	17
6.2.2 Acinetobacter baumannii	17
6.3 Tipos de mecanismo de resistencia	17
	18

6.3.1 Mecanismo de eflujo	18
6.3.2 AMP-C	18
6.3.3 Permeabilidad disminuida	18
6.3.4 Modificación del sitio de acción	19
6.4 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	19
6.4.1 TEM.	19
Las TEM,	19
6.4.2 SHV	20
6.4.3 CTX-M	20
6.5 Carbapenemasas	20
6.5.1 Clase A	20
6.5.2 Clase B (MBL)	20
6.5.3 Clase D OXA	21
6.6 Antibióticos utilizados para bacterias Gram negativas	21
6.6.1 Betalactámicos	21
6.6.2 Carbapenémicos	21
6.6.3 Colistina	22
6.7 Métodos para detectar enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC)	22
6.7.1 Tamizaje	22
6.7.2 Fenotipo o método de triple disco	22
6.7.3 Método Molecular	22
6.8 Epidemiología de las cepas productoras de carbapenemasas	23
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	25
VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS	32
8.1 Discusión del Primer artículo	32
8.2 Discusión del Segundo artículo.	35
8.3 Manuscrito 3	36
IX. CONCLUSIONES	39
X. RECOMENDACIONES	40
XII. ANEXOS	45



CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS DE LA SALUD
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA
CIES- UNAN Managua



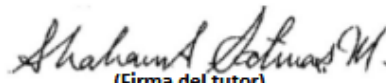
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
"Por una cultura de investigación, innovación y mejoramiento."

Aval para pre-defensa y defensa de tesis doctoral

Por este medio avalo que (nombre del candidato) de nacionalidad (país) se inscriba al proceso de pre-defensa y defensa de tesis doctoral ante la secretaría académica del CIES-UNAN Managua para proceder al nombramiento del comité de evaluación de tesis doctoral.

Título de tesis doctoral: Perfil de resistencia antimicrobiana en Enterobacterias y bacterias no fermentadoras en pacientes de hospitales en Managua-Nicaragua, periodo 2017-2019.
Nombre del tutor: Abraham Antonio Salinas Miranda, MD, PhD, MPH
Grado Académico: Doctor en Ciencias de la Salud
Institución: CIES-UNAN
País de residencia: Nicaragua
Fecha: 1/22/2021

Observaciones: Nombre del Estudiante: **Oscar Arbizú Medina**


(Firma del tutor)
Abraham Antonio Salinas Miranda
(Nombre del tutor)

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
APB	Ácido fenil borónico.
ARN	Ácido ribonucleico.
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute.
CMI	Concentración mínima inhibitoria.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EPC	Enterobacterias productoras de carbapenemasas.
GES	Guiana extends spectrum.
GIM	German imipenemase.
HEODRA	Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello
I –	Intermedio.
IMI	Imipenem hydrolizing β - Lactamase.
IMP	Active on Imipenem.
ITU	Infección del trato urinario
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase.
MBL	Metalo β - lactamasas.
NDM	Nueva Delhi Meta.
OXA	Oxacillin hydrolizing.
PBP	Proteínas de unión a la penicilina.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
R	Resistente.
RAM	Resistencia antimicrobiana.
S	Sensible.
SIM	Seoul imipenemase.
SHV	SHV es una familia de tipo de betalactamasas de espectro estrecho
TEM	TEM es una familiar de betalactamase de espectro estrecho
VIM	Verona integrón encoded metallo betalactamase.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, primeramente, a **Dios**, quien supo guiarme por el buen camino, alcanzar un nuevo logro que me parecía imposible, pero nunca deje de soñarlo, por darme fuerzas y sabiduría para seguir adelante y no desmayar ante los problemas, por brindarme la oportunidad de seguir viviendo y continuar investigando para nuestra sociedad.

En segundo lugar, a mí familia por el apoyo y comprensión, Ana Lucia Munguía Baldelomar, a mi hija María Fernanda Arbizú Munguía, a mis padres Oscar Arbizú Escoto, Carmen Medina Ballesteros y a mis hermanos, Benita, Martha, Rita, Bismarck, Jairo Arbizú Medina.

En tercer lugar, a mi tutor de tesis **Abraham Salinas-Miranda, MD, PhD**, y a mí asesor **Dr. Erick Amaya. PhD**, por haberme brindado su tiempo y orientarme la conducción de esta investigación.

Agradezco de manera especial al Dr. Juan Francisco Rocha López y MSc. Lorena Ortega Valdés, por su apoyo para finalizar este doctorado, Lic. Kenia García y MSc. Francisco Romero, por su colaboración en mis investigaciones, al personal de los hospitales por la información brindada.

RESUMEN

Las bacterias multirresistentes representan un problema de salud mundial ya que son causa de diversos procesos infecciosos como; neumonía, meningitis, infecciones post quirúrgicas, de las vías urinarias, ginecológicas, respiratorias asociadas a ventilación asistidas, infecciones de tejidos blandos y una variedad de infecciones hospitalarias tienden a tener evolución complicada debido a la disponibilidad limitadas de antibióticos efectivos (Seija et al., 2011). según la clasificación (Paterson and Doi., 2007) donde sólo nos queda una o dos opciones farmacológicas de última generación para tratar los procesos infecciosos. Por tanto, la línea de investigación de esta tesis doctoral es innovadora al centrarse en la determinación de la genotipificación responsable de la resistencia a antibióticos.

El resultado del primer artículo: se estudiaron 22 cepas de enterobacterias, la distribución fue: *Klebsiella pneumoniae* 14/21(66.6%), *Escherichia vulneris* 3/21(14.2%), *Escherichia coli* 1/21(4.7%), *Providencia rettgeri*, 1/21(5%), *Pantoea agglomerans* 1/21(5%) y *Kluyvera cryocrescens* 1/21(5%), todas las cepas fueron sensible a colistina.

Resultado del segundo artículo: Se estudió 22 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos (Prevalencia: 7.6%). 10 (45%), portaban combinación de genes VIM y GIM, 5 (23%) portaban combinación VIM y SPM, 2(9%), portaban SPM y SIM, 2(9%), portaban el gen VIM y 1(5%) presento IMP. L, las cepas estudiadas mostraron multiresistencia, pero fueron 100% sensibles a colistina.

Resultados manuscrito: La muestra comprendida por 16 cepas de *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos imipenem y meropenem durante el periodo de estudio, en la caracterización genotípicas se demostró diversidad de genes, las 16/16 (100%) de las cepas portaban OXA51 14/16(87.5%) portaban genes OXA40, pero combinado con OXA51, el 2/16(13%) presentaron una combinación de genes NDM con OXA51 1/16 (6%) de las cepas presentaron genes VIM, GIM en combinación OXA40 y OXA51 todas las cepas en estudio de *A. baumannii*, presentaron multiresistencia, pero el 100% fueron sensible a colistina.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana se ha incrementado en la última década y es visto como un problema de salud global las reducciones drásticas de las alternativas farmacológicas (escasas o nulas opciones terapéuticas) comprometiendo el pronóstico de vida de los pacientes en las áreas críticas de las unidades hospitalarias (Paterson and Doi 2007).

El surgimiento de bacterias resistentes sigue siendo un reto para las unidades hospitalarias. El aumento de la resistencia antimicrobiana en muchos de los microorganismos que circulan en las diferentes unidades hospitalarias tiene un impacto en la flora normal del paciente brindándoles nuevas características de resistencia debido a la variabilidad genética transferida entre los microorganismos lo que tiende a desarrollar una población bacteriana con características similares (Seija et al., 2011).

Las bacterias resistentes a los carbapenémicos se han asociado a altas tasas de mortalidad, con cifras que oscilan entre 40 y 80%. Las bacterias resistentes a los carbapenémicos se han asociado con las comorbilidades del paciente, la presencia de sepsis grave o shock séptico, la gravedad del episodio, y el tratamiento antimicrobiano empírico y dirigido, inapropiados (Antequera M. et al., 2020). Las enterobacterias y bacilos gram negativos no fermentadoras como, *Pseudomona*, *Acinetobacter baumannii*, tienen capacidad de sobrevivencia en condiciones ambientales desfavorables por largo tiempo representando un reservorio importante para mantener la prevalencia de infecciones y causar brotes hospitalarios y comunitarios (Brown, Young, & Amyes 2005).

Según la clasificación de las betalactamasas de Ambler (Hall, 2005; Ambler, 1980) las especies principales de enterobacterias portadoras de carbapenemasas (pertenecen a la clase A (KPC), clase B o metalobetalactamasas (VIM, IMP, SIM, GIM SPM y NDM) y clase D (OXA-24, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-92, OXA-143), en la región de centro América se han reportado aislamiento de diferentes colonizaciones y Nicaragua aún no reporta que genes están portando las bacterias resistentes es por eso la importancia de investigar está problemática (Pasteran et al., 2012, Vera et al., 2017).

II. ANTECEDENTES

En año 2014; en el hospital universitario Santiago de Chile. Se realizó un estudio denominado; Detección de Serino carbapenemasas de clase A y otros mecanismos de resistencia enzimática a β -lactámicos en cepas de enterobacterias con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, aisladas de pacientes. El objetivo fue caracterizar genotípica y fenotípicamente la resistencia enzimática a β -lactámicos en enterobacterias de las cuales se estudiaron 1,524 cepas de enterobacterias resultando 23 cepas resistentes a los carbapenémicos 18/23 *Klebsiella pneumoniae* y 5/23 *E. cloacae*. Resultados. 18 cepas (78,26%) correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* y 5 cepas (21,74%) a *Enterobacter cloacae*. Los análisis para PCR Serino carbapenemasas fueron negativas, en tanto, el test de Hodge fue positivo para 3/23 cepas, todas *E. cloacae*. Una cepa de *K. pneumoniae*, fue positiva para ácido fenilborónico (APB). Se detectó betalactamasas de espectro extendido en 14/23 cepas, Amp-C en 5/23 cepas y no se detectó betalactamasas tipo B. Las cepas estudiadas no se detectaron Serino carbapenemasas clase A. Probablemente los mecanismos la susceptibilidad disminuida a carbapenémicos, involucran resistencia enzimática, combinados con cambios en la permeabilidad de la membrana (de la Lastra et al., 2014).

En el año 2012, en el hospital infantil de Infectología y rehabilitación, y el hospital general San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, se reportó 2 casos de betalactamasas clase B, combinados con genes de betalactamasas de espectro extendido, en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala(Pasteran et al., 2012).

En año 2014; en Costa Rica, se reportó, un segundo caso importado de infección por enterobacterias carbapenemasas tipo metalobetalactamasas, New Delhi (NDM). Este caso fue importado de Nicaragua y aislado de urocultivo en *Klebsiella pneumoniae*, en un niño hospitalizado en el Hospital Manuel de Jesús Rivera “la mascota” (INCIENSA, 2014).

En el año 2008, en León Nicaragua en el Hospital Escuela Dr. Oscar Danilo Rosales Argüello (HEODRA), se realizó un estudio sobre *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. El objetivo fue evaluar la prevalencia de BLEE, en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aislado de recién nacidos con septicemia y las del medio ambiente de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN). Se estudiaron 135 neonatos ingresados en la UCIN, entre agosto y octubre de 2005, con vigilancia prospectiva. Se recolectaron 98 muestras de la evaluación ambiental de la UCIN. *Klebsiella pneumoniae*, las cuales presentaron multiresistencia. No hubo diferencia significativa en antibióticos resistencia entre las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de recién nacidos con septicemia en comparación con cepas aisladas del medio ambiente ($P > 0,05$) (Amaya et al., 2008).

En año 2010, en León Nicaragua, en otro estudio en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Argüello. Se realizó un estudio en busca de patrones de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativos y gram positivas que causan septicemia en recién nacidos. Se hizo una correlación con muestras ambientales. El objetivo del estudio fue identificar las bacterias causantes de septicemia neonatal, en la Unidad Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN), en León, Nicaragua y su relación con la bacteria aislado del entorno. Los datos mostraron que 74% (34/461) de las bacterias relacionadas con los recién nacidos con septicemia fueron Gram-negativos y altamente resistentes a β -lactámicos (> 85%) y amiglicósidos (80%), que conduce al fracaso del tratamiento en 10 neonatos con desenlace fatal. Aunque, la prevalencia de bacterias Gram-positivas (25%) fue menor que las bacterias Gram negativas, *Staphylococcus epidermidis*, se relacionó con la muerte de tres nuevos recién nacidos; No se encontró similitud clonal entre *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Serratia* (Amaya et al., 2010).

En año 2010, también en el HEODRA-León Nicaragua, se estudió el aumento de la resistencia en las infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad, cinco años después de la implementación de las guías terapéuticas nacionales. El objetivo del estudio fue informar la presente etiología y susceptibilidad antimicrobiana de las infecciones urinarias, y los efectos de las directrices nacionales para las infecciones

urinarias introducido en 2003. Se recolectaron muestras de orina de 304 pacientes con sospecha clínica de ITU en el hospital universitario y centros de salud primaria de León, Nicaragua, se determinó alta resistencia a agentes betalactámicos y ciprofloxacina (Bours et al., 2010).

En el año 2012-2016; en Nicaragua, se estudió la prevalencia, sensibilidad y resistencia de las cepas bacterianas de *Acinetobacter baumannii*, *A. junii* y *A. Iwoffii*, multirresistentes utilizando los registros del laboratorio de bacteriología del Hospital Manuel de Jesús Rivera “la mascota” en el periodo del año 2012 a 2016. Se encontró que las infecciones por *Acinetobacter*, multirresistentes afecta más a los niños 75 (56%) que a las niñas 58 (44%) y principalmente a los menores de 3 años 97 (39% niños, 34% niñas) de edad. La mayoría de las infecciones por *Acinetobacter*, se produjeron en sepsis 43 (32%) y neumonías 40 (30%) debido a la presencia de un catéter intravenosos o una larga estancia en las instalaciones hospitalarias y asociación a ventiladores. La resistencia presuntamente se debe a los mecanismos de carbapenemasas de tipo OXA, se encontraron en el 90% (Sáenz., 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

La aparición de bacterias multirresistentes en los hospitales como en la comunidad asociados a elementos genéticos transferibles es un motivo de preocupación para la Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud clasifica de prioridad crítica; *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y las enterobacterias productoras de carbapenemasas (OMS, 2017). Estas bacterias, comprometen el pronóstico de vida de los pacientes en las áreas críticas de las unidades hospitalarias debido a la resistencia extensa y panresistente dejando escaso o nula alternativa terapéutica (Seija et al., 2011).

Las enfermedades infecciosas siguen siendo todo un desafío, para las unidades hospitalarias por la resistencia en aumento de muchos microorganismos que circulan en las diferentes unidades hospitalarias. Estos microorganismos son reemergentes y están desarrollando nuevas características de resistencia debido a la variabilidad genética transferida dando origen a una mayor población bacteriana con características similares (Seija et al., 2011). Este aumento de la resistencia al tratamiento en diferentes géneros de bacterias, se atribuye en gran manera por el abuso de los antimicrobianos aumentando el tiempo de hospitalización, costos médicos y riesgo de mortalidad (OMS., 2017).

Es una necesidad conocer el perfil de resistencia y los mecanismos que están generando este creciente problema. Las bacterias tienen diversos mecanismos para evitar los efectos farmacológicos incluyendo la transferencia de genes mediante plásmidos que codifican para enzimas carbapenemasas que hidrolizan diversos grupos de antibióticos de última línea. Se necesitan más investigaciones sobre multiresistencia antimicrobiana, para el manejo adecuado de los procesos infecciosos ya que este problema constituye reducciones drásticas de las alternativas antimicrobianas. Así mismos, las investigaciones deben darse a conocer al ministerio de salud y a las unidades hospitalarias con el objetivo de formar un plan de desarrollo nacional sobre la importancia de estudiar la resistencia en humanos, animales y alimentos.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos han venido desarrollando estrategias muy efectivas para resistir a la exposición constante a diferentes antibióticos. La resistencia antimicrobiana ha conllevado a una crisis global en el manejo terapéutico de los procesos infecciosos debido a la reducción de las alternativas de opciones terapéuticas las estrategias van desde la reducción de porinas, modificaciones de los sitios de acción y enzimas hidrolíticas.

Las carbapenemasas clase B y las carbapenemasas clase D, son frecuente reportadas en países latino americanos como Venezuela, Bolivia, México, Guatemala, Estados Unidos, Brasil, Guatemala, Costa Rica, reportan carbapenemasas tipo clase B. En cambio los países Europeos como España reportan carbapenemasas clase A, este comportamiento epidemiológico de estas cepas implica un abordaje diferente en el manejo terapéutico, debido a los escasos reportes en Centro América es que surge el siguiente planteamiento((Lipari et al., 2020 ,Pasteran et al. 2012) .

4.1 Formulación del problema

¿Cuál es el perfil de resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacterias Gram negativas no fermentadoras en pacientes de hospitales en Managua Nicaragua, periodo 2017-2019?

4.2. Preguntas directrices

¿Cuál será la prevalencia de cepas resistentes a los carbapenémicos en enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* mediante el método Kirby Bauer test de doble disco como método de tamizaje?

¿Cuáles son los principales genes asociados a los mecanismos de resistencia en las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* que son resistentes a los antibióticos carbapenémicos (clase A, clase B, clase D), mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa?

¿Cuál será el perfil de resistencia antibiótica a los que presentan resistencia las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*?

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacterias Gram negativas no fermentadoras en pacientes de hospitales en Managua-Nicaragua, periodo 2017-2019.

Objetivos Específicos

1. Identificar la prevalencia de enterobacterias y bacilo Gram negativo no fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*), resistentes a los carbapenémicos por el método Kirby Bauer, test de doble disco como método de tamizaje.
2. Caracterizar los genes de resistencia que portan las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, resistentes a los carbapenémicos (clase A, B y D), mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa.
3. Evaluar los principales antibióticos a los que presentan resistencia las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, que presentan carbapenemasas confirmada de las cepas en estudio.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1 Bacterias Gram negativas

6.1.1 Enterobacterias

Las enterobacterias es el grupo de familia más grande de microorganismo integrada por diferentes géneros caracterizada de ser bacilos gram negativos son aerobias facultativas, oxidasas negativas, lactosas positivas, fermentadoras de glucosas, en anaerobiosis producen gas, algunos géneros presentan flagelos y azufre, crecen a 37⁰c, miden de 0.3 a 0.6 µm de largo por 0.5 µm de ancho tienen capacidad de reducir nitratos a nitritos no forman esporas poseen antígenos O de origen polisacáridos, antígeno flagelar H, antígeno capsular K, estas son flora intestinal del humano y de algunos animales actuando como oportunistas causando meningitis, infecciones respiratorias bajas, septicemia, infecciones urinarias, digestivas tienen la capacidad de compartir materia genética que le pueden conferir resistencia a diferente familia de fármacos y adquirir nuevo material genético para producir nuevas patologías conocido como microorganismo reemergente.

Las Enterobacterias están conformadas por; *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Shigella*, *Plesiomonas*, *Edwarsiella*, *Ewingella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella rhinoscleromatis* y un grupo especial de *Escherichia coli* O157:H7.

6.1.1.1 *Escherichia coli*

Es la especie de bacteria más común colonizando el intestino humano y de animales, produciendo enfermedades diarreicas debido a la toxina de Shiga. Las *E. coli* se clasifican en 6 subgrupos. enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) también puede causar diferentes procesos infecciosas debido a su capacidad adaptativa (Rodríguez., 2002).

6.1.1.2 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Es una causa frecuente de “diarrea del viajero” y es una causa muy importante de diarrea en los lactantes de países en vías de desarrollo. Presenta exotoxina LT, que se caracteriza por unirse a los gangliósidos está activa a la adenilciclase que incrementa notablemente la concentración local del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), lo cual produce una secreción intensa y prolongada de agua y cloruros e inhibe la reabsorción de sodio tiene alta afinidad con la toxina de vibrión cólera, caracterizando la diarrea muy líquida y persistente con pérdidas de abundantes líquidos. También hay que considerar que pueden presentar enterotoxina termoestable ST, igual que la LT, son compartidas mediante plásmidos (Brooks et al., 2010).

6.1.1.3 *E. coli* enterohemorrágica (STEC)

Productora de toxina Shiga, presenta dos formas antigénicas de la toxina designadas como toxina similar a Shiga 1 y toxina similar a Shiga 2. STEC se ha relacionado con colitis hemorrágica, una forma grave de diarrea, y con el síndrome hemolítico urémico, una enfermedad que desencadena insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, los serotipos de *E. coli* que producen toxina Shiga, O157:H7 (Brooks et al. 2010).

6.1.1.4 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Produce una enfermedad similar a la shigelosis. Con más frecuencia puede ocurrir en niños. EIEC produce enfermedad al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal (Brooks et al., 2010).

6.1.1.5 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Es una causa importante de diarrea en los lactantes, sobre todo en los países en vías de desarrollo. EPEC se relacionaba con brotes epidémicos de diarrea en guarderías de países desarrollados.

6.1.1.6 *E. coli enteroagregativa* (EAEC)

Esta produce una diarrea aguda hasta un cuadro crónica que puede durar mayor de 14 días transmitidas por alimentos, se caracterizan por sus pautas específicas de adherencia a las células humanas Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos (Rodríguez., 2002).

6.1.1.7 *E. coli Adherencia difusa* (DAEC)

Este tipo de *E. coli* se adhieren a células Hep-2 formando el fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27 (Rodríguez., 2002).

6.1.1.8 *Klebsiella*

Es una superbacteria resistente a muchos antibióticos, es un microorganismo oportunista que comúnmente pueden estar produciendo infecciones nosocomiales, *Klebsiella*, es una bacteria altamente trasmisible, por tal razón puede producir brote hospitalario, por su mecanismo de adaptación, es parte de la flora intestinal, obteniendo como resultado el contagio del paciente por contacto directo) auto infectarse, ocasionando que todos los pacientes estén en riesgo.

6.2 Bacterias gram negativas no fermentadoras

Los bacilos gram negativos no fermentadores son aerobios y no utilizan los hidratos de carbono como fuente de energía este género incluye; *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Eikenella*, *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Kingella*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Agrobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Flavimonas*. Se caracterizan por adquirir una alta gama de genes de resistencia y causando muchos procesos infecciosos en las unidades hospitalarias ubicándose en lugares húmedos como nebulizadores en soluciones desinfectantes y ventiladores causando diferentes procesos infecciosos, los que más predominan es *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Pérez & González., 2017).

6.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

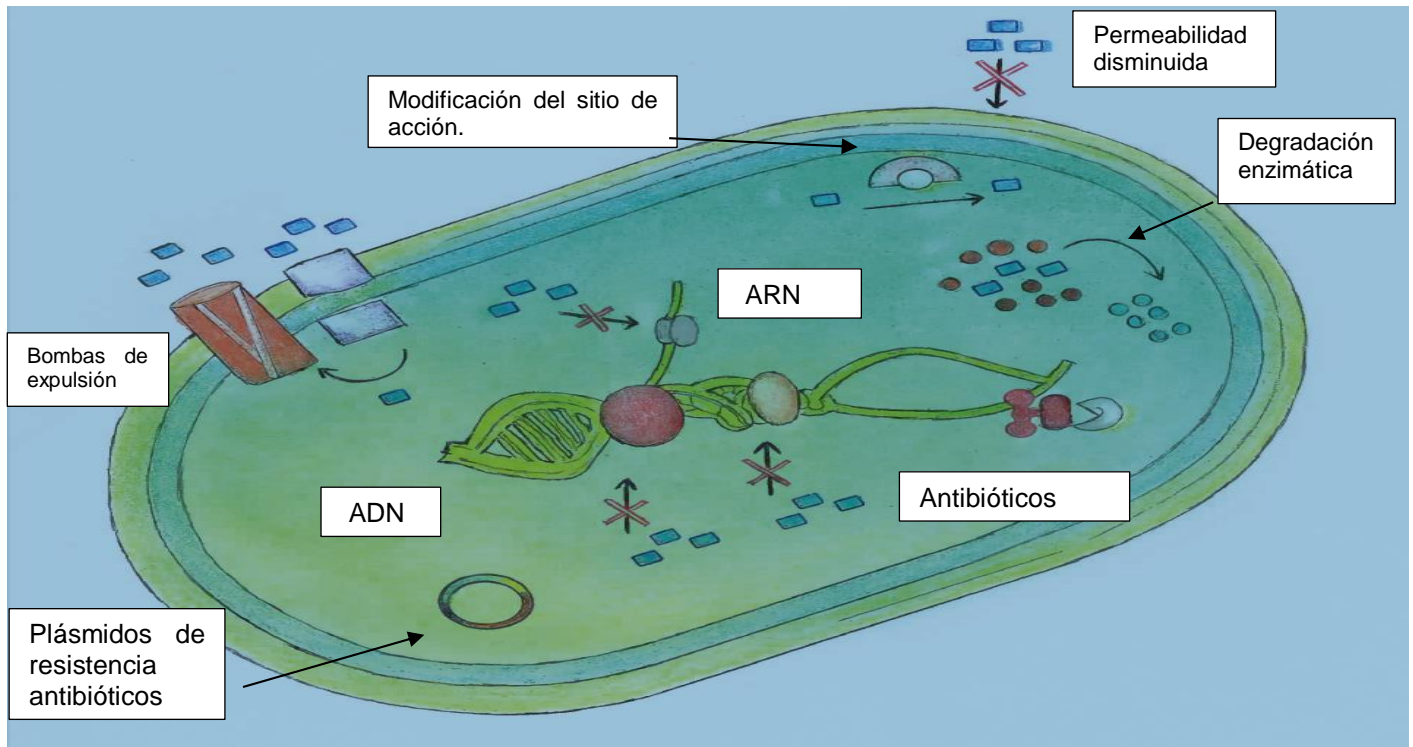
Es un bacilo recto gram negativo o ligeramente curvo de un tamaño aproximado 0.5 a 1 μ l, presenta movilidad debido a los flagelos, es aerobio facultativo, catalasa y oxidasa positiva, caracterizada por presentar diversa pigmentaciones, piocinina de color verdoso, pioverdina color verde, piorrubina de color rojo, el reservorio suele ser el humano y animales pudiendo encontrarse en aguas de piscinas es un microorganismo oportunista asociados muchas veces a infecciones intrahospitalaria debido que este patógeno ha desarrollado capacidad de adaptación hospitalaria teniendo particularidades de desarrollo de resistencia a muchas familia de fármacos (Vanegas & Jiménez., 2014).

6.2.2 *Acinetobacter baumannii*

Es un cocobacilo gram negativo no forman espora aerobios estricto, catalasa positiva, oxidasa negativa, crecen a 35-37 °c, no es microorganismo muy exigente, puede crecer en medios de cultivos comunes para bacterias gram negativa; este microorganismo es común encontrarlo en áreas hospitalarias causando infecciones nosocomiales, presentan alto nivel de resistencia en la última década ha recobrado mucha importancia debido que alto nivel de resistencia carbapenemasas clase D, dificultando el tratamiento por la drástica reducción de las alternativas farmacológicas, esto prolonga la estancia hospitalaria mayor gastos económicos para el sistema de salud y familiares (Vanegas et al., 2014).

6.3 Tipos de mecanismo de resistencia

Se representa en la figura 1. (Moreno M et al., 2009, Pinilla et al., 2012, Nicolau & Oliver., 2010). Figura 1.



6.3.1 Mecanismo de eflujo

Se caracteriza por expulsar el antibiótico al exterior evitando alcanzar las concentraciones necesarias, para que el antimicrobiano ejerza su efecto (Moreno, González & Beltrán., 2009).

6.3.2 AMP-C

Se caracteriza por presentar resistencia a cierto β -lactámicos como amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, cefotetan, estas no son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas, su origen es cromosómico en algunos microorganismos, pero algunos tienen origen plasmídico (Martínez., 2009).

6.3.3 Permeabilidad disminuida

Es la capacidad del microorganismo de disminuir las porinas que son canales de difusión de la membrana externa de constitución lipídica, que actúan como barrera intrínseca impidiendo penetración del antibiótico (Nicolau & Oliver., 2010).

6.3.4 Modificación del sitio de acción

Este mecanismo está condicionado por la modificación de las PBP a nivel de pared, fijadora de las penicilinas confiriéndoles resistencia a los β -lactámicos a nivel del ribosoma afecta la subunidad 50s y 30s, en este nivel actúa la familia de los macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol y tetraciclina, la modificación de las quinolonas, lo realizan mediante las mutaciones de GirA y GirB, que codifican para las topoisomerasas I y IV (Suarez et al., 2006).

6.4 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

La resistencia microbiana tipo BLEE; es una resistencia de tipo enzimática que se caracteriza por agotar el último recurso antimicrobianos de tipo penicilina y cefalosporina de primera y cuarta generación, las BLEE, están codificadas por los genes TEM, SHV y CTX. Este tipo de resistencia también se han encontrado en bacterias gram negativas no fermentadores. En Nicaragua, es muy común encontrar este tipo de resistencia en bacterias provenientes de las áreas hospitalarias (Amaya et al., 2008). Muchos países latinoamericanos han publicado una alta incidencia, lo que conlleva a un desafío para tratar los procesos infecciosos.

Desde que fue aislada en *Klebsiella ozaenae*, en Alemania en 1983, siempre ha tenido incidencia en las unidades hospitalarias y extendiéndose a la comunidad provocando diferentes procesos infecciosos. Este tipo de cepas se caracterizan por poseer plásmidos conjugativos lo que favorece la rápida diseminación a otro grupo de bacterias gram negativas cercanas, cómo a otras familias, las BLEE, pertenece a la clase A de Ambler (Bush and Jacoby, 2010), es un grupo selectivo que transmite sus genes muy eficiente por transposones o integrones (Amaya et al., 2010, Nicolau & Oliver, 2010).

6.4.1 TEM. La TEM -1 y TEM-2

Las TEM, pertenece a la clasificación grupo 2b, de Bush, Jacoby y Medeiro, debido a sus mutaciones de su centro activo hidrolizan la penicilina y cefalosporinas, TEM, ha causado

brotos en países europeos, también en Nicaragua estuvo involucrado, causando sepsis neonatal (Nicolau & Oliver, 2010, Amaya et al., 2008).

6.4.2 SHV

Fue descrita en Alemania 1983, desde entonces se ha extendido en diferentes países, encontrándose en diferentes bacterias gram negativas

6.4.3 CTX-M

Se caracteriza por ser codificada en plásmidos, la que le confiere resistencia Cefotaxima y una gran variedad de antibióticos como Ceftazidima, este gen es considerado un mayor problema epidemiológico del grupo de las BLEE, debido a la capacidad para diseminarse, mediante integrones, se conocen unas 120 variantes de CTX-M (Lipari et al., 2020, Millan et al., 2013).

6.5 Carbapenemasas

Estas son enzimas muy desarrolladas capaces de hidrolizar, un amplio grupo de antibióticos como, los β -lactámicos y los Carbapenémicos, siendo, estos el último recurso ante las cepas resistente a los β -lactámicos estos se dividen en diferentes clases como (Vera et al., 2017)

6.5.1 Clase A

Estas carbapenemasas poseen un residuo de serina en su centro activo, corresponden NMC (por not metallo enzyme carbapenemase), IMI (Imipenem-hydrolyzing beta lactamase), SME (Serratia marcescens enzyme) GES (Guiana extended spectrum), KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (Vera et al., 2017)

6.5.2 Clase B (MBL)

Estas se caracterizan por presentar uno o dos iones de zinc como cofactor, inhibida por EDTA (Ácido etilen-diamino-tetra-acético), la cual se les denomina metalo-beta-lactamasas, tienen capacidad de hidrolizar a los carbapenémicos, excepto Aztreonam, estas comprenden, VIM (Verona integron-encoded metallo- β lactamasas), GIM (German

Imipenemase), SIM (Seoul Imipenemase), IMP (Active on Imipenem), NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase), SPM (Sao Paulo metallo-β-lactamase), AIM, KHM, LIM, DIM(Nicolau & Oliver., 2010).

6.5.3 Clase D OXA

Estas enzimas son llamadas oxacilinasas, hidrolizan eficientemente a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, oxacilina, cloxacilina, estas comprenden OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-92, OXA-143 (Vera et al., 2017).

6.6 Antibióticos utilizados para bacterias Gram negativas

6.6.1 Betalactámicos

El anillo betalactámico forma parte de la estructura de varias familias de antibióticos. Este consiste en un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno, su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del peptidoglicano mediante el bloqueo de la última etapa de producción de la transpeptidación, también actúa activando la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (García & Hernández., 2015).

6.6.2 Carbapenémicos

Son antibióticos betalactámicos sintéticos bicíclicos que poseen un núcleo común llamado carbapenem. Tienen un mecanismo de acción similar a las penicilinas al actuar en la última fase de la síntesis del peptidoglicano de la pared celular al unirse a una transpeptidasa llamada PBP responsable de la producción de los enlaces cruzados entre las cadenas del péptido confiriendo mayor rigidez a la pared celular, Ertapenem se une a las PBP 2, Meropenem tiene afinidad por la PBP_{2,3}, imipenem tiene afinidad por la PBP 1 y 2. Estos antibióticos son utilizados en aquellas bacterias que presentan resistencia tipo betalactamasa de espectro extendido (Montesinos et al., 2014).

6.6.3 Colistina

Es un antibiótico polimixina es una mezcla de polipéptido cíclico colistín A y B. Polipéptido activo frente a diversas bacterias aeróbicas Gram negativo agente tensioactivo que altera la permeabilidad de la membrana celular bacteriana produciendo muerte celular. El colistimetato de sodio es un profármaco de la colistina. Su mecanismo de acción interactúa con la membrana con la membrana citoplasmática bacteriana, cambiando su permeabilidad, último recurso para bacterias resistente a los carbapenémicos (Medina et al., 2017).

6.7 Métodos para detectar enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC)

6.7.1 Tamizaje

El método enzimático como el Blue-Carba, usa como indicador el azul de bromotimol, el CarbAcineto, para la identificación para las carbapenemasas Clase D, también mediante medios cromógenos como: CHROMID-CARBA SMART, podemos detectar OXA48, KPC y New Delhi, algoritmo de determinación de carbapenemasas (Oteo et al., 2017).

6.7.2 Fenotipo o método de triple disco

El test de triple disco para ver el efecto inducido por EDTA, como inhibidor, con sensidiscos de carbapenémicos, debido que las cepas productoras de enzimas carbapenemasas clase B, sólo serán inhibidas mediante el EDTA, mientras que las cepas productoras de enzimas carbapenemasas clase A, serán inhibidas por APB. Se observará el efecto huevo, debido a la sinergia ejercida con los carbapenémicos. En cambio las carbapenemasas clase D, no tienen inhibidores de enzimas dificultando su identificación mediante este método (Suarez et al., 2006).

6.7.3 Método Molecular

Basado en la Reacción en cadena de la Polimerasa PCR, primer diseñado para un PCR, multiplex, dirigido a una región blanco, amplificando de manera exponencial la región específica (Constanza Muñoz, 2017). La reacción en cadena de la polimerasa PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular

desarrollada por Kary Mullis en el año 1986, el principio de la técnica es obtener un gran número de copia de un fragmento de ADN molde o blanco que se desea estudiar, esta amplificación, es exponencial por su altamente sensible y específica, es aplicable en diferente tipos de estudio como en forense, medicina legal, enfermedades producidas por virus, bacterias, para determinar genes mutados de origen hereditario, consta de 3 momentos (Amado., 1999).

6.8 Epidemiología de las cepas productoras de carbapenemasas

El aumento de cepas productoras de carbapenemasas, es generalizado a nivel mundial, la Unión Europea a través del Centro Europeo para la prevención y el control de las enfermedades (ECDC). Desde el año 2012, se realizan actividades de capacitación continua para mejorar la comprensión, aumentar los conocimientos, comprender la epidemiología de propagación y contribuir las capacidades diagnóstica, y una vigilancia activa, debido que, a partir del año 2000, iniciaron las primeras cepas tipos KPC.

En Estados Unidos en el año 1996, esta se dispersó a diversos continentes, el vehículo de transporte son los viajeros colonizados con cepas resistentes que migran favoreciendo la dispersión, actualmente existen diversas variantes de KPC (Yigit et al., 2001).

En Madrid España reportan un alto porcentaje de cepas carbapenemasas tipo OXA48, estas serían carbapenemasas de clase D, con 91.9%, también reportan frecuente VIM, 6,6%, con porcentaje muy bajo la NDM (López et al., 2017).

En Argentina en el 2013, en el servicio antimicrobiano del INEI-ANLIS, Dr. Carlos G. Malbrán (Laboratorio Nacional de Referencia, LNR), reporto el primer hallazgo de cepas New Delhi, en enterobacterias(Malbrán, 2013).

En Perú en el año 2011, se aisló cepas de *Pseudomonas*, resistente a los carbapenémicos, estos eran de tipo MBL, de tipo bla IMP (Gonzales et al., 2014).

En Venezuela en el año 2012, se detectó carbapenemasas de tipo clase D, en *A. baumannii*, en diferentes centros de salud. La principal OXA, fue blaOXA-23, con 93.4%, blaOXA-58, con 96.6% (Margot et al., 2012).

En Guatemala en el año 2012, Pasteran et al., reportan diversos casos de cepas carbapenemasas, pero estas eran de tipo New Delhi, encontradas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, estos fueron en pacientes hospitalizados del el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación y del Hospital General San Juan de Dios (Pasteran et al., 2012).

En Costa Rica en el año 2014, reporta, segundo caso importado de infección por enterobacterias carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas, New Delhi (MBL-NDM). Importado de Nicaragua, aislado de urocultivo en *Klebsiella pneumoniae*, en niño hospitalizado en el Hospital Manuel de Jesús Rivera la Mascota(INCIENSA, 2014).

En el Salvador en el año 2015, registra brotes de *Acinetobacter baumannii*, ocurridos en las unidades de cuidados intensivos neonatales y servicios de neonatología del hospital nacional de niños Benjamín Bloom y del hospital nacional de San Miguel, El Salvador, enero a mayo de 2015. Se estudió 31 cepas resultando pan-resistentes (Martínez, 2009).

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio

Descriptivo de corte transversal, con un enfoque cuantitativo. Se determinó la prevalencia de las diferentes carbapenemasas clase B (IMP, VIM, GIM, SIM, SPM, SPM, NDM) y clase D. OXA (OXA58, OXA23, OXA51, OXA40), que portaban cada cepa en estudio en enterobacterias y bacterias no fermentadoras, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, como el perfil de resistencia antimicrobiana. Esta disertación consta de 2 artículos publicados y un manuscrito sometido. La metodología se puede observar en cada uno de los artículos. Ver el link del anexo 1.

Área de estudios

El análisis se realizó en cepas (microorganismos unidades formadoras de colonias), que fueron resistentes a los carbapenémicos para determinar los genes que portaban y poder determinar las implicaciones clínicas y de salud pública. Por tanto, se debe recalcar que no se realizó ninguna toma de muestra a los pacientes, estas cepas fueron tomadas de las bases de cepario de los hospitales, transportadas en caldo leche con glicerol y resguardadas en el *Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”*, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua. Dichas muestras provenían de múltiples centros, a continuación:

- Hospital Alemán Nicaragüense, ubicado de la Siemens, Carretera Norte, 2 cuadras al sur, Managua, Nicaragua.
- Hospital Central Managua, ubicado del Centro Comercial Managua, 30mts abajo
- Hospital solidaridad avenida Xolotlán Managua.

Sin embargo, este estudio no representa prevalencia específica por centro ya que no fue el propósito de estudio. El estudio se limitó a estimar la prevalencia puntal basadas en muestras obtenidas y registradas en el Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”.

Universo

Estuvo comprendido por las bacterias resistentes a los carbapenémicos aisladas de muestras provenientes de los hospitales mencionados. Estos microorganismos fueron enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Estas se tomaron de los ceparios guardados de los hospitales Alemán Nicaragüense, Hospital Central Managua y Hospital Solidaridad, las cuales comprendieron 553 cepas. De estas, 249 enterobacterias cepas que se utilizarían para el análisis del primer artículo, las cuáles eran las enterobacterias únicamente del Hospital Alemán Nicaragüense. Posteriormente, se estudiaron, 288 cepas de bacterias gram negativas no fermentadoras pertenecientes a las tres unidades en estudio, *Pseudomonas aeruginosa* (Hospitales Alemán Nicaragüense, Hospital Central Managua y solidaridad) para el artículo II. *Acinetobacter baumannii*, pertenecen solo al Hospital Alemán Nicaragüense, del análisis de estas cepas dio origen al manuscrito.

Tipo de muestreo

No probabilístico, por conveniencia. Estas fueron de segunda fuente, cepas guardadas en el *Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”*, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua.

Muestra

1. Enterobacterias 45/249 (18%), cepas de enterobacterias que cumplieron los criterios inclusión, este estudio dio origen al primer artículo.
2. *Pseudomona aeruginosa* 22/288 (7.6%), *Pseudomonas aeruginosa* de las cepas Gram negativas no fermentadoras, dando origen al segundo artículo.
3. *Acinetobacter baumannii* 16/288 (5.5%), *Acinetobacter baumannii*, de las cepas Gram negativas no fermentadoras, dando origen al tercer manuscrito.

Estas cepas fueron resguardadas en el Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua.

Criterio de inclusión

1. Cepas resistentes a los carbapenémicos perteneciente a las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, clasificada por OMS de prioridad crítica.
2. Las cepas tienen que pertenecer a los hospitales en estudio.
3. Los valores de corte para los carbapenémicos CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$.
4. Que cumplan la caracterización fenotípica.

Criterio de exclusión

1. Cepas clasificadas según la OMS, en prioridad elevada y media.
2. Que el origen de las cepas sea de otro hospital.
3. Que las cepas estén mal codificadas.

Métodos instrumento recolección de la información

Se usó una ficha de recolección de la información que describe los datos de las cepas, la sala o servicios, origen biológico, datos tomados del registro del laboratorio de Biología Molecular.

Consideraciones éticas

El análisis se realizó en cepas (microorganismo), la cual resultaron resistentes a los carbapenémicos. No se utilizó la información de los pacientes, según recomendaciones del comité de ética para el resguardo de la confidencialidad. El objetivo fue publicar artículos científicos que puedan ser de utilidad a las unidades hospitalarias y al Ministerio de Salud. No se tomó ninguna muestra directamente a seres humanos en este estudio; ya que estas cepas fueron seleccionadas de las bases de ceparios de los hospitales, transportadas en caldo leche con glicerol y resguardadas, *Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua*, es un análisis

secundario. Se obtuvo una carta de autorización del director del Instituto Politécnico de la Salud "Luis Felipe Moncada " y una carta del comité de ética del POLISAL.

Plan de análisis estadístico

Se realizó una base de datos de los registros del laboratorio Biología Molecular "MA. Elmer Cisneros in memoriam", Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua.

Dado que todas las variables fueron categóricas, se analizaron conteo simple, frecuencia, frecuencias relativas y porcentajes (la prevalencia porcentual) de los genes encontrados. Los porcentajes se utilizaron para la construcción de tablas de contingencia y gráficos de barra y pastel utilizando Microsoft Excel.

Se empleó Microsoft office Word 2016, para levantado de texto y preparación de los manuscritos.

Limitaciones del estudio

Es un estudio de fuente de datos secundaria con muestras pequeñas y por conveniencia de sólo algunos centros selectos de la capital, lo cual limita la generalizabilidad del estudio. Debido a la situación de la pandemia, no fue posible correlacionar los datos de biología molecular con el riesgo de morbilidad y mortalidad de los pacientes. Esto fue un planteamiento inicial para tener una mayor información sobre las características clínicas de los pacientes y el impacto sobre la morbilidad y mortalidad. Por tanto, se necesitan otros estudios que incorporen características clínicas para reconocer los casos donde están emergiendo las cepas multirresistentes. Dado que el estudio fue de fuente secundaria, no es posible acceder a variables hospitalarias tampoco. Por tanto, el estudio es solamente descriptivo de las muestras ya obtenidas. Sin embargo, ya que no existen estudios con genotipificación de genes que codifican carbapenemasas en Nicaragua, este estudio es innovador e indica la importancia de monitorear cercanamente la resistencia y el surgimiento de las nuevas variantes de genes de betalactamasas como

NDM. El último manuscrito fue enviado a la revista Torreón FAREM Carazo Unan-Managua, está en el informe final como manuscrito.

Procedimientos y Análisis de las muestras

Transporte de las muestras

Las cepas fueron reactivadas en agar MacConkey en los hospitales en estudio guardadas en caldo leche para ser transportadas a la Universidad siguiendo las recomendaciones de la OMS, utilizando triple embalaje, estas fueron congeladas a -80 °C, hasta su análisis, estas se reactivaron nuevamente en agar MacConkey, para sus análisis genotípicos, fenotípico y perfil de resistencia. Se realizó una copia y se resguardo en la Universidad Nacional autónoma de Nicaragua. UNAN– Managua, en caldo leche con glicerol a -80 °C.

Caracterizaciones fenotípicas

- a) Se reactivaron las cepas en agar MacConkey este fue incubado por un periodo de 18-24 horas a 37°C.
- b) Se realizó un inóculo de las UFC, con un patrón de turbidez Macfarlán 0.5. En un tubo que conteniendo 3 ml de solución salina.
- c) Se introdujo un hisopo de algodón estéril en la suspensión ajustada. El hisopo fue rotado varias veces y luego presionado firmemente sobre la pared interna del tubo, el objetivo es extraer el exceso del inóculo del hisopo.
- d) Se procedió a rayar el agar Mueller Hinton de manera homogénea en toda la placa, se aplicó los discos en tiempo menor de 15 minutos, se incubó por 18-24 horas a temperatura de 37 minutos.
- e) Lectura de la placa, transcurrido el tiempo se observó la zona de inhibición con fondo negro anti reflejante y se ilumino. Se buscó el fenómeno de sinergia entre APB, EDTA y los carbapenémicos (CLSI, 2017).

Caracterización genotípica por la técnica de PCR convencional

Extracción de ADN por calor.

- a) Se midió 100 µl de agua libre de ADN y se depositó en un tubo cónico de 1.5 ml.
- b) Se tomó un pool de célula/UFC, y se inóculo en el tubo que contiene el agua libre de nucleasas y se homogenizo mediante vórtex durante un minuto.

- c) Se sometió a ebullición por 10 minutos.
- d) Se retiró la muestra y se dejó enfriar en hielo por 5 minutos.
- e) Se realizó una centrifugación a 12,000 RPM por 5 minutos, se extrajo 80µl del sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo cónico 1.5 ml (Smyth et al., 2001).

Caracterización de genes clase B

El análisis de los genes de carbapenemasas tipo metalo-beta-lactamasas (MBL), se utilizó la secuencia de iniciadores para un PCR Multiplex. Ver anexo 2, tabla 1 y tabla 2.

Amplificación

Se utilizó el siguiente programa: desnaturalización 94°C, 5 min, seguido de 36 ciclos desnaturalización 94°C, 30 s, hibridación 52°C, 40s, amplificación 72°C, 50 s, extensión final de elongación 72°C, 5 min (Gonzales et al., 2014).

Caracterización de New Delhi

Se utilizó la secuencia de iniciadores. Ver anexo 2. Tabla 3 y Tabla 4.

Amplificación

Se utilizó el siguiente programa, desnaturalización 94°C, por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, 94°C por 30seg, hibridación 50°C por 30seg, amplificación 72°C por 60seg, extensión final 72°C por 10 min, final 4 °c, (Pasteran et al., 2012).

Caracterización de carbapenemasas clase D

Secuencia de los iniciadores de ADN, para la identificación de la detección de genes carbapenemasas clase D. fue un Multiplex PCR. Ver anexo 2, tabla 5 y tabla 6 para el protocolo de trabajo (Colón et al., 2009).

Amplificación

Utilizó el siguiente programa, desnaturalización 95 °c, por 4 minutos, seguido de 30 ciclos, 94 °c por 25seg, hibridación 52 °c por 40seg, amplificación 72 °c por 50seg, extensión final 72 °c por 6 min, final 4 °c (Colón et al., 2009).

Electroforesis

El producto de PCR, fue evaluado en un gel de Agarosa al 1.5 %, de la compañía Invitrogen, esta se disolvió en TBE, a una concentración 1x, se le añadió 0.5 µg/mL de bromuro de ethidium, la electroforesis se corrió 120 voltios por 60 minutos. Las bandas de ADN, fueron visualizadas en una cámara con luz ultravioleta (uv) y fotografiada.

VIII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1 Discusión del Primer artículo

Publicado: Oscar Arbizú-Medina, Kenia García-Rosales, Helen Cerda-Aragón, William Martínez-García, Asdrúbal Pérez-Martínez, Yader Lanzas Baca. Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en especies de Enterobacteriaceae aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua. ISSN 0001-6012/2018/60/2/15-18 Acta méd costarric Vol 60 (2), abril-junio 2018. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v60n2/0001-6002-amc-60-02-15.pdf>

Título: Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en especies de Enterobacteriaceae aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua.

Objetivo. Conocer la prevalencia de carbapenemasas tipo New Delhi (NDM), en aislado de enterobacterias proveniente de pacientes hospitalizados.

Método. Se realizó una investigación descriptiva, agosto 2015- octubre 2016, donde se estudiaron 45 cepas, que eran resistentes a los carbapenémicos, correspondiendo al 18% en pacientes hospitalizados del Hospital Alemán Nicaragüense, en las áreas más críticas (UCIN,UCIP, Neonatología, Medicina, Cirugía), la identificación se realizó en Vitek2 compact, la sospecha de resistencia a los carbapenémicos se tomó cuando la CMI ≤ 2 , se determinó la sensibilidad por Kirby Bauer y el test de sinergia triple disco, se realizó un PCR para New Delhi. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v60n2/0001-6002-amc-60-02-15.pdf>

Resultados

Se encontró el gen Nueva Delhi en 22 de las 45 muestras positivas para el test de sinergia. De las 22 cepas identificadas que portaban el gen New Delhi, la mayoría fueron aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* 15/22 (68%), seguidas de *Escherichia vulneris*, con 3/22 (14%) de las cepas, un aislamiento de las siguientes bacterias: *Escherichia coli* 1/22 (4.5%), *Providencia rettgeri* 1/22 (4.5%), *Pantoea agglomerans* 1/22 (4.5%) y *Kluyvera cryocrescens* 1/22 (4.5%).

Las rutas más críticas de las unidades hospitalarias con mayor posibilidad de adquirir algún proceso infeccioso durante la estancia hospitalaria suelen ser las Unidades de Cuidado Intensivos (UCI), por lo que es sumamente necesario tener un diagnóstico rápido para cambiar las opciones farmacológicas y reducir los costos en salud debido a las pocas alternativas terapéuticas que caracterizan a este tipo de microorganismo. La evolución rápida de los microorganismos multirresistentes es muy frecuente en muchos países de Latinoamérica y nuestro país no es la excepción (Amaya et al., 2008).

En Nicaragua estamos marcando el inicio de la identificación del primer estudio de New Delhi. Este gen se caracteriza por una diseminación rápida en bacterias del mismo género y gram negativas no fermentaras. Según el National Healthcare Safety Network (NHSN) la resistencia bacteriana es una amenaza para la salud mundial (Healthcare et al., 2018). En los Estados Unidos, se estima que 2 millones de personas se enferman y de estas 23, 000 mueren por bacterias multirresistentes (NHSN). El CDC de Estados Unidos publica que las personas que reciben atención medica también pueden contraer infecciones graves llamadas infecciones asociadas a la atención médica (HAI, por sus siglas en inglés), por el uso de catéter, sondas (CDC), dichas infecciones pueden causar septicemia.

La Organización Mundial de la Salud, estima que para el año 2,050, la resistencia podría matar hasta 10 millones de personas, igualmente, estima que para el año 2030, 24 millones de personas podrían caer en la pobreza extrema, por la crisis financiera de los países. Es necesario realizar en un nuevo estudio y secuenciar el gen circulante, ya que el gen que más se ha dispersado por el mundo fue la primera reportada en la india NDM-1 con un ST101, pudiendo transportar varios plásmidos y ser transferible a otras microorganismo gram negativos, es por tal razón el alto porcentaje de NDM, que puede dar lugar a un brote, si se descuida la asepsia en los ambientes de salud (Millan et al., 2013). Ver gráfico 1.

Gráfico 1. Cacterización Fenotipico de New Delhi

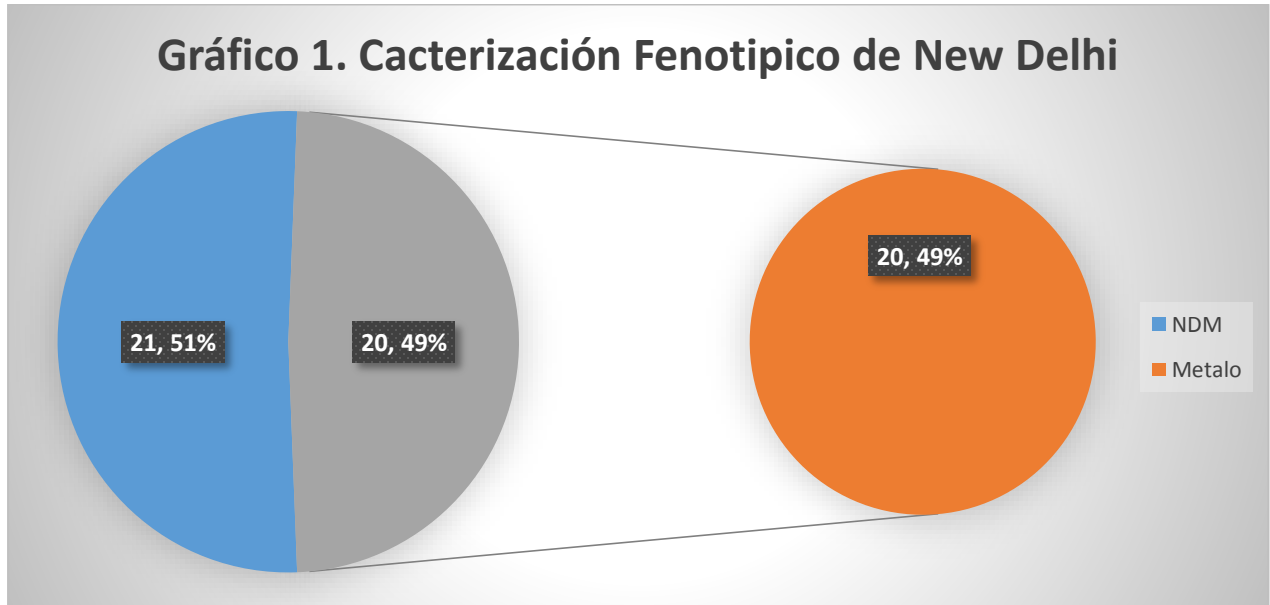
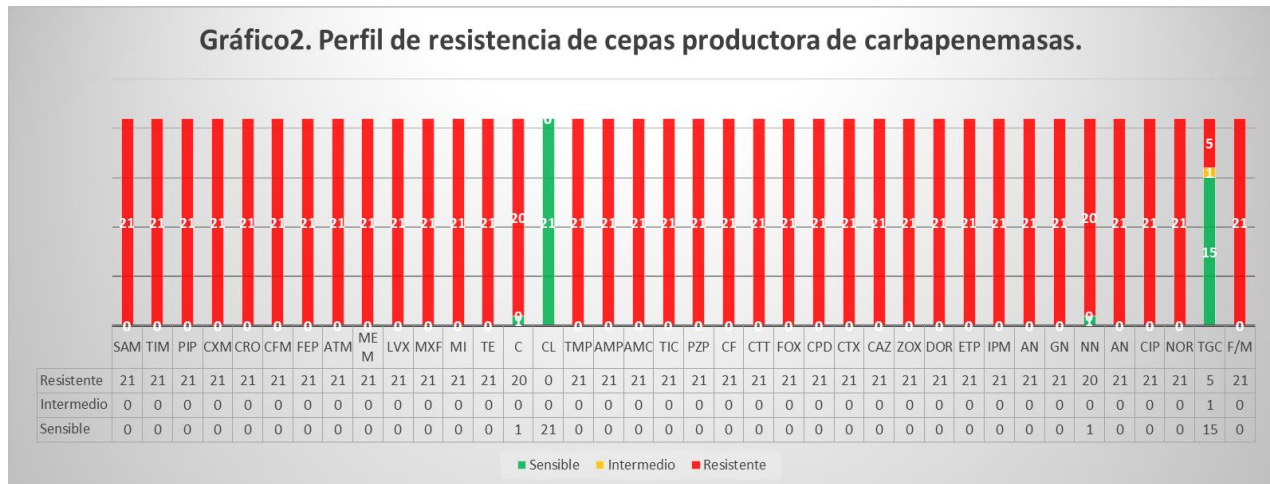


Gráfico2. Perfil de resistencia de cepas productora de carbapenemasas.



Al realizar el análisis de la resistencia de las cepas New Delhi, productoras a carbapenemasas, presentaron multiresistencia a diferente familia de antibiótico, pero el 100 % de las cepas fueron sensible a la colistina y el 68% a tigeciclina, siendo estas la alternativa terapéutica ante un evento con cepas que presenten este tipo de gen que las

caracteriza de ser altamente resistentes y difícil de tratar por la escasez de alternativas farmacológica. Ver gráfico 2, abreviaturas anexo 3.

8.2 Discusión del Segundo artículo.

Publicado: Arbizú Medina, O, García Rosales, K, Castillo Gómez, B, Mejía Alvares, A, Salinas-Miranda, A. (2019). Carbapenemase en *Pseudomonas aeruginosa* en los hospitales de Managua, Nicaragua. Revista Torreón Universitario. 8: 21 (febrero – mayo); 16-24. SSN 2410-5708 / e-ISSN 2313-7215

<https://www.lamjol.info/index.php/torreon/article/view/8851/9966>

Objetivo. Conocer la prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* metalo- β -lactamasas (MBL) y patrón de resistencia en pacientes hospitalizados. <https://www.lamjol.info/index.php/torreon/article/view/8851/9966>.

Método. Se realizó un estudio descriptivo en la que estudiaron 22/288(7.6%) cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, de pacientes hospitalizados, del hospital público Alemán Nicaragüense y dos clínicas privadas, Hospital Central Managua y Hospital solidaridad. La identificación del género, especie y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el sistema VITEK2 compact, la cual se tomó tres UFC del MacConkey, para la preparación del inóculo, luego se realizó una suspensión homogénea en un tubo de ensayo conteniendo 3ml de solución salina al 0.45%, para las tarjetas restantes se pasaron 145 μ l en tubos con 3ml de solución salina, se ajustó DenSiCheK Plus al del estándar 0.5-6.3 de McFarland, y se procedió a montar (GN, AST -XN06 y AST- GN69), GN: 64 pruebas bioquímicas, AST XN06: AN, ATM, CF, CTX, CTT, FOX, CPD, CZX, CXM, DOR, MEM, MXF, NA, NOR, PIP, TE, TIC, TCC, TGC, AST GN69: AMC, AM, SAM, CZ, FEP, CAZ, CRO, CIP, ETP, GM, IPM, LEV, FT, TZP, . TM, SXT. ver abreviaturas anexo 4. El control de calidad de las tarjetas fueron establecidas con el uso de cepas de referencias, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC35218, *K. Pneumoniae* ATCC700603, la sospecha de cepas productora de carbapenemasas, se tomó cuando imipenem y meropenem tuvieran

una CMI, 2-4 µg/mL y para ertapenem 2 µg/mL, se realizó un tamizaje del Test de sinergia con EDTA (10µg o 0.1 M), se preparó la escala McFarland 0.5 de las cepas a evaluar a partir del método Kirby Bauer, se incubó 18-24hrs. Se hizo el Test de Hodge, como método complementario, utilizando cepas de referencia ATCC25922 de *E. coli*.

Resultados. Según Nicolau & Oliver, 2010, los genes IMP y VIM, son más frecuente en este tipo de microorganismo nuestro hallazgo coincide con lo expuesto por este autor la prevalencia encontrada fue del 68%, esto hace indicar que los mecanismo de resistencia se están compartiendo de manera horizontal, esto podría aumentar la resistencia a un grado muy alto nunca visto en nuestro país Nicaragua, la prevalencia es baja en comparación a países de sur américa, pero debemos estar alerta y con una vigilancia activa, porque colistina que no es la mejor alternativa farmacológica por las diversas reacciones adversas que produce, estas cepas se está detectando con sensibilidad muy reducida. Ver artículo 2, gráfica 2.

<https://www.lamjol.info/index.php/torreon/article/view/8851/9966>.

En cuanto la resistencia *Pseudomonas aeruginosa*, presenta multiresistencia a diversos antibióticos y esto se complementa con la diversidad de genes que estos microorganismos están portando y compartiendo con microorganismo muy cercanos, esta característica de hidrolizar a diversos tipos de antibióticos dificulta la alternativa farmacológica, aumentando el costo hospitalario y causando a un fracaso terapéutico (O'Neill, 2014).

8.3 Manuscrito 3

Caracterización genética de *Acinetobacter baumannii*, resistentes a carbapenémicos aislados de muestras clínicas de pacientes hospitalizados Managua-Nicaragua.

MSc. Oscar Arbizú Medina¹, MSc. Francisco Romero Oviedo¹, Lic. Kenia García Rosales¹, Lic. Abraham Enoc Molina Morales², Lic. Francisco Antonio García Herrera², Lic. Braulio Renato Centeno Rizo², Yader Lanzas Baca², Dr. Abraham Salinas² USF, PhD. Erick Amaya².

Objetivo: Caracterización genética de *Acinetobacter baumannii*, resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018.

Métodos. Se realizó un estudio descriptivo con el objetivo de caracterizar genéticamente *A. baumannii*, productora de carbapenemasas clase D, en las que se estudiaron, 16 cepas resistentes a los carbapenémicos aisladas de pacientes internados en el hospital público Alemán Nicaragüense. La identificación del género, especie y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el sistema VITEK2 compact, a partir del cultivo en MacConkey se tomaron tres unidades formadoras de colonias (UFC), para la preparación del inóculo, luego se realizó una suspensión homogénea en un tubo de ensayo conteniendo 3ml de solución salina al 0.45%, para las tarjetas restantes se pasaron 145µl en tubos con 3ml de solución salina, se ajustó al estándar 0.5 de McFarland por medio del DenSiCheK Plus, y se procedió a montar (GN, AST -XN06 y AST- GN69), GN: 64 pruebas bioquímicas, AST XN06: AN, ATM, CF, CTX, CTT, FOX, CPD, CZX, CXM, DOR, MEM, MXF, NA, NOR, PIP, TE, TIC, TCC, TGC, AST GN69: AMC, AM, SAM, CZ, FEP, CAZ, CRO, CIP, ETP, GM, IPM, LEV, TZP, TM, SXT. ver abreviaturas anexo 3; se consideraron cepas sospechosas productoras de carbapenemasas al presentar Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de 2-4 µg/mL para imipenem, meropenem, y 2 µg/mL para ertapenem según CLSI 2017M100-ED30 (CLSI., 2017). Se realizó el test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (10µg o 0.1 uM), a partir de la escala 0.5 McFarland de las cepas a evaluar, también se evaluó mediante Kirby Bauer el halo de inhibición ≤ 21 mm se incubó 18-24hrs. Para la caracterización genotípica, se realizó un múltiplex PCR para *blaOXA23*, *blaOXA40*, *blaOXA51* y *blaOXA58*, (Colón et al., 2009), Para conocer, si portaban el gen NDM, realizó un PCR: para *blaNDM*, (Pasteran et al., 2012). Para determinar los genes clase B, se realizó un PCR, múltiples para *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSIM*, *blaSPM* (Gonzales et al., 2014).

Resultados

La muestra comprendida por 16 cepas de *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos imipenem y meropenem durante el periodo de estudio, en la caracterización genotípicas se demostró diversidad de genes, las 16/16 (100%) de las cepas portaban OXA51 14/16(87.5%) portaban genes OXA40, pero combinado con OXA51, el 2/16(13%) presentaron una combinación de genes NDM con OXA51 1/16 (6%) de las cepas presentaron genes VIM, GIM en combinación OXA40 y OXA51 todas las cepas en estudio de *A. baumannii*, presentaron multiresistencia, pero el 100% fueron sensible a colistina. Ver gráfico 2. Anexo 1 manuscrito.

Discusión. *A. baumannii*, tiene resistencia a diferentes fármacos, debido a la diversidad de mecanismos de resistencia como: AMP-C, estos hidrolizan a los aminopenicilinas, también hidrolizan a los β -lactámicos y muy eficientemente a cefepime, igualmente posee serino carbapenemasas clase D, estos hidrolizan muy eficientemente a los carbapenémicos (Vanegas et al., 2014). En la tabla 4, se puede observar la diversidad de genes que están portando las cepas de *A. baumannii*.

Las 16/16 (100%) de las cepas portaban OXA51 combinados con OXA40 14/16(87.5%), el 2/16(13%) presentaron una combinación de genes NDM con OXA51 1/16 (6%) de las cepas presentaron genes VIM, GIM en combinación OXA40 y OXA51 (Nicolau and Oliver, 2010, Gonzales et al., 2014, Colón et al., 2009).

A. baumannii tiene resistencia a diferentes fármacos, debido a la diversidad de genes de resistencia que hidrolizan a los antibióticos muy eficientemente mediante enzimas β lactamasas hasta las carbapenemasas brindada por los diferentes genes de carbapenemasas de clase B y clase D (Vanegas et al. 2014). Esto sería muy alarmante debido que esta es la alternativa farmacología aunque no muy segura como reportan algunos investigadores por las reacciones adversas que este pueda generar, pero es la alternativa (Colón et al., 2009).

IX. CONCLUSIONES

1. Los hallazgos del presente estudio en enterobacterias son una advertencia clara sobre la circulación de cepas de Nueva Delhi que codifican la resistencia a los carbapenémicos en los hospitales de Nicaragua. Es fundamental tener esto en consideración en la práctica clínica, dada la reducción drástica de opciones terapéuticas para los pacientes con infecciones por estas cepas.
2. La prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes carbapenémicos, en hospitales de Nicaragua, es debido a la diversidad de genes combinados, como; VIM y GIM, VIM y SPM, que le confieren alta capacidad hidrolítica.
3. La multiresistencia en *A. baumannii* a carbapenémicos se debe al blaOXA51, gen intrínseco y a las combinaciones de genes como; VIM, GIM, NDM y OXA40. Estos genes aumentan la capacidad hidrolítica a estos antibióticos y se comparten mediante plásmidos facilitando la transferencia horizontal.
4. Los microorganismos en estudio presentan multiresistencia a diferentes familias de antibióticos, colistina se muestra sensible ante las cepas resistentes a los carbapenémicos siendo la alternativa farmacológica.

X. RECOMENDACIONES

La resistencia antimicrobiana es una grave amenaza para la salud mundial, se requiere de acciones mundiales para reducir la diseminación y mitigar los efectos negativos de las bacterias. El compromiso político de los gobiernos, con el apoyo de los diferentes actores involucrados en la lucha contra la RAM, representan un papel importante en el cumplimiento de las acciones para disminuir la prescripción inadecuada de antimicrobianos incluyendo promover el uso responsable, asegurarse que los medicamento son de calidad, controlar las ventas de los medicamentos, la implementación de medidas de prevención y control de las infecciones, aplicación de medidas de limpiezas y desinfección del ambiente o superficies y el fortalecimiento de la vigilancia de los patógenos resistentes a los antibióticos en humano, animal y alimentos. Además, se necesita compromiso de las organizaciones como; OMS, FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), con fortalezas y desafíos.

Se recomienda educación continua al personal de salud en todo el país sobre la RAM: se deben realizar charlas educativas, talleres nacionales e internacionales, simposios, reuniones y pasantías organizados al personal hospitalario para mejorar la percepción del riesgo de las cepas resistentes a los carbapenémicos. Estas estrategias educativas pueden mejorar el apego a las normativas de higiene de las manos, para disminuir la transmisión y mejorar la comprensión sobre la importancia de controlar la diseminación de cepas multirresistentes.

Se recomienda el Fortalecimiento de alianzas estratégicas entre los Laboratorios Nacionales de Referencia y con las redes latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (RELAVRA), Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonía y Meningitis (SIREVA), Alianza para el uso de Vacunas (GAVI) y el Sistema de Vigilancia Externa del Desempeño para Patógenos Entéricos (EQAS/WHO) y la Red Mundial de Infecciones Transmitidas por los Alimentos (WHO-GFN).

Además, se recomienda impulsar más investigaciones científicas multidisciplinarias enfocada a la problemática de resistencia antimicrobiana como un problema de salud global y fortalecer las relaciones con el MINSA, para realizar investigaciones conjuntas y tener un abordaje completo del comportamiento epidemiológico.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Amado, Andrés. 1999. "Reacción En Cadena de La Polimerasa." *Revisiones bibliográficas reacción* 68–70.
- Amaya, E., M. Cáceres, A. Fang, A. Torres, C. Palmagren, and Nord Weintraub. 2010. "G0 [y Lor RriuatG Use Only G0 [y for RriuatG UsG Only." 22.
- Amaya, Erick, Mercedes Caceres, Hong Fang, Angel Ramirez, Ann Palmgren, Carl Nord, and Andrej Weintraub. 2008. "Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Klebsiella Pneumoniae in a Neonatal Intensive Care Unit in León, Nicaragua." *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(4):386–87.
- Brooks, G., J. Butel, L. Ornston, E. Jawetz, J. Melnick, and E. Adelberg. 2010. *Microbiología Médica*. 25th ed. edited by S. A. de C. V. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.
- Bush, Karen and George A. Jacoby. 2010. "Updated Functional Classification of β -Lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3):969–76.
- Colón, Elena Fernández, Zulema Bustamante García, Jenny Zamora Balderrama, Silvia Zabalaga, Jenny Pinto Davalos, Fátima Funes Espinoza, Elena Sevillano Peña, and Adelaida Umaran. 2009. "Determinación de Carbapenemasas y Su Relación Con Estructuras Genéticas En Aislamientos Clínicos de Acinetobacter Baumanni de Hospitales de La Ciudad de Cochabamba." *Biofarbo* 17(1):30–38.
- Gómez, J., E. García, and A. Hernández. 2015. "Los Betalactámicos En La Práctica Clínica." *Rev Esp Quimioter* 28(1):1–9.
- Gonzales, Edgar, William Vicente, Roky Champi, Javier Soto, Wilfredo Flores, Margarita Lovera, Nancy Chuquiray, Carlos Bejarano, Maritza Puray, and Segundo León. 2014. "Metallo- β -Lactamasas En Aislamientos Clínicos de Pseudomonas Aeruginosa En Lima, Perú." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 30(2):241–45.
- Healthcare, National, Safety Network, Antimicrobial Use, and Standardized Antibiotic. 2018. "Antimicrobial Use and Resistance Module : A Tool to Manage , Use , and Report Hospital Antibiotic Use Data." 1–2.
- INCIENSA. 2014. "Segundo Caso Importado de Infección Por Enterobacteria Carbapenemasa Tipo Metalobetalactamasa New Delhi (MBL-NDM)." https://inciensa.sa.cr/actualidad/historico_noticias/segundo_caso_importado_infeccion_enterobacteria_metalotabatelacta.aspx.
- Institute, Clinical and Laboratory Standards. 2017. "https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/" Retrieved (https://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/clsi 2017.pdf).
- de la Lastra, Virginia, Francisco Silva, Teresa Ulloa, Eugenia Pinto, and Mario Vidal. 2014. "Detección de Serinocarapenemasas de Clase A y Otros Mecanismos de Resistencia Enzimática a β -Lactámicos En Cepas de Enterobacterias Con Susceptibilidad Disminuida a Carbapenémicos, Aisladas de Pacientes de Un

- Hospital Universitario de Santiago, Chile.” *Revista Chilena de Infectología* 31(6):670–75.
- Lipari, Flavio, Daniela Hernández, Mario Vilaró, Juan Caeiro, and Héctor Saka. 2020. “Caracterización Clínica, Epidemiológica y Microbiológica de Bacteriemias Producidas Por Enterobacterias Resistentes a Carbapenems En Un Hospital Universitario de Córdoba, Argentina.” *Revista Chilena de Infectología* 37(4):362–70.
- López, Marcos, Cornelia Bischofberge, David Saez, and Luisa Garcia. 2017. “Epidemiología de La Diseminación de Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas En Un Hospital Comarcal y Un Hospital de Media Estancia En Madrid.” *Revista de La Sociedad Española de Quimioterapia*. 6(0):458–63.
- Malbrán, C. 2013. “NDM * En Argentina *.” *Alerta Epidemiológico: Emergencia de Carbapenemasa tipo NDM. Serv. ANTIMICROBIANOS, INEI-ANLIS Malbrán. Boletín 3, 2013 Donde* 1–6.
- Margot, Nirvia, Cuaical Ramos, Yerismar Andreina, Delgado Borrero, Yelli María, Anzola Anzola, Daniel Marcano Zamora, and Luis Carlos Torres. 2012. “Artículo Original Detección de Carbapenemasas Tipo OXA En Aislados De.” 95–100.
- Martínez, Dianny Del Valle. 2009. “Betalactamasas Tipo AmpC: Generalidades y Métodos Para Detección Fenotípica.” *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología* 29(2):78–83.
- Medina, JulioDaniela PacielOfelia NocetiGloria Rieppi. 2017. “Actualización Acerca de Colistina (Polimixina E): Aspectos Clínicos, PK/PD y Equivalencias.” *Revista Medica Del Uruguay* 33(3):195–206.
- Millan, Beatriz, David Castro, María Araque, Bárbara Ghiglione, and Gabriel Gutkind. 2013. “ISCR1 Asociado Con Genes BlaCTX-M-1 y BlaCTX-M-2 En Plásmidos IncN e IncFIIA Aislados En Klebsiella Pneumoniae de Origen Hospitalario En Mérida, Venezuela.” *Biomedica* 33(2):268–75.
- Montesinos, E., F. Moraga, P. Soler, M. Oliveras, M. Escartín, X. Gómez, and C. Figueras. 2014. “Uso de Antibióticos Carbapenémicos En Enfermos Pediátricos Hospitalizados. Adecuación de Su Prescripción a Un Protocolo Terapéutico.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 32(10):647–53.
- Moreno, Claudia, Rubén González, and Constanza Beltrán. 2009. “Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana En Patógenos Respiratorios.” *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello* 69(2):185–92.
- Nicolau, Carlos and Antonio Oliver. 2010. “Carbapenemasas En Especies Del Género Pseudomonas.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28(SUPPL. 1):19–28.
- OMS. 2017. “Lista de Las Bacterias Para Las Que Se Necesitan Urgentemente Nuevos Antibióticos.” <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- Oteo, Jesús, Germán Bou, Fernando Chaves, and Antonio Oliver. 2017. *Microbiological*

- Pasteran, F., E. Albornoz, D. Faccone, S. Gomez, C. Valenzuela, M. Morales, P. Estrada, L. Valenzuela, J. Matheu, L. Guerriero, E. Arbizú, Y. Calderón, P. Ramon, and A. Corso. 2012. "Emergence of NDM-1-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in Guatemala." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(7):1795–97.
- Paterson, D. and Y. Doi. 2007. "A Step Closer to Extreme Drug Resistance (XDR) in Gram-Negative Bacilli." *Clinical Infectious Diseases* 45(9):1179–81.
- Perez, Barbara and Fernando González. 2017. "Infecciones Por Bacilos Gramnegativos No Fermentadores: Agentes Etiológicos de Infecciones Asociadas a La Atención Sanitaria." *Ccm* (4):1197–1200.
- Pinilla, G., L. Muñoz, J. Navarrete, and P. Arévalo. 2012. "El Ataque de Las Bacterias: Cómo Prevenirlo Sin Morir En El Intento." *Nova* 10(18):227.
- Rodríguez, Angeles. 2002. "Principales Características y Diagnóstico de Los Grupos Patógenos de *Escherichia Coli*." *Salud Publica de Mexico* 44(5):464–75.
- Seija, Veronica, Daniela Paciet, Jimena Prieto, Julio Medina, Rafael Vignoli, and Eduardo Savio. 2011. "Enterobacterias Productoras de KPC." *Revista Tendencias En Medicina* 12(9):47.
- Smyth, R. W., G. Kahlmeter, B. Olsson Liljequist, and B. Hoffman. 2001. "Methods for Identifying Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Hospital Infection* 48(2):103–7.
- Suarez, Carlos, Juan Kattán, Ana Guzmán, and Maria Villegas. 2006. "Mecanismos de Resistencia *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y Estrategias Para Su Prevención y Control." *Infectio* 10(2):85–93.
- Vanegas, Johanna, Gustavo Roncancio, and Judy Jiménez. 2014. "*Acinetobacter Baumannii*: Clinical Importance, Resistance Mechanisms and Diagnosis." *CES Medicina* 28(2):233–46.
- Vera, A., C. Barría, S. Carrasco, L. Lima, A. Aguayo, M. Domínguez, H. Bello, and G. González. 2017. "KPC: *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemasa, Principal Carbapenemasa En Enterobacterias KPC: *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase, Main Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*." *Revista Chilena de Infectología* 34(5):476–84.
- Vilchez, Samuel, Daniel Reyes, Margarita Paniagua, Filemon Bucardo, Roland Möllby, and Andrej Weintraub. 2009. "Prevalence of Diarrhoeagenic *Escherichia Coli* in Children from León, Nicaragua." *Journal of Medical Microbiology* 58(5):630–37.
- Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover. 2001. "Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella Pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(4):1151–61.

XII. ANEXOS

Anexo 1.

Lista de publicaciones

1. Oscar Arbizú-Medina, Kenia García-Rosales, Helen Cerda-Aragón, William Martínez-García, Asdrúbal Pérez-Martínez, Yader Lanzas Baca. Nueva Delhi metalo- β -lactamasa en especies de enterobacterias aisladas de pacientes hospitalizados, Managua, Nicaragua. ISSN 0001-6012/2018/60/2/15-18 Acta méd costarric Vol 60 (2), abril-junio 2018. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v60n2/0001-6002-amc-60-02-15.pdf>
2. MsC. Oscar Arbizú Medina, Lic. Kenia García Rosales, Lic. Benjamín Castillo Gómez, Lic. Arellys Mejía Alvares, Dr. Abraham Salinas. Carbapenemasa en *Pseudomonas aeruginosa* en los hospitales de Managua, Nicaragua. <https://doi.org/10.5377/torreon.v8i21.8851>.
<https://www.lamjol.info/index.php/torreon/article/view/8851/9966>.

3. Manuscrito.

Caracterización genética de *Acinetobacter baumannii*, resistentes a carbapenémicos aislados de muestras clínicas de pacientes hospitalizados Managua-Nicaragua.

MSc. Oscar Arbizú Medina¹, MSc. Francisco Romero Oviedo¹, Lic. Kenia García Rosales¹, Lic. Abraham Enoc Molina Morales², Lic. Francisco Antonio García Herrera², Lic. Braulio Renato Centeno Rizo², Yader Lanzas Baca², Dr. Abraham Salinas² USF, PhD. Erick Amaya².

Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua, Nicaragua. Correo electrónico: arbizu2006@yahoo.com.mx, tel.505-8834-3892.

Palabras claves. *Acinetobacter baumannii*, OXA40, OXA51, MBL, carbapenemasas clase D.

Objetivo: Caracterización genética de *Acinetobacter baumannii*, resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018.

Resumen.

Objetivo: Caracterización genética de *Acinetobacter baumannii*, resistentes a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes internados en salas del Hospital Alemán Nicaragüense, enero 2017 - febrero 2018.

Métodos. Se realizó un estudio descriptivo transversal con el objetivo de caracterizar genéticamente *Acinetobacter baumannii*, productora de carbapenemasas clase D, en las que se estudiaron, 16 cepas resistentes a los carbapenémicos aisladas de pacientes internados en el hospital público Alemán Nicaragüense. La identificación del género, especie y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el sistema VITEK2 compact. Se consideraron cepas sospechosas productoras de carbapenemasas al presentar Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de 2-4 µg/mL para Imipenem, Meropenem, y 2 µg/mL para Ertapenem. Se realizó el test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (10µg o 0.1 uM), a partir de la escala 0.5 McFarland de las cepas a evaluar, también se evaluó mediante Kirby Bauer el halo de inhibición ≤ 21 mm, se incubó 18-24hrs. Para la caracterización genotípica, se realizó un múltiplex PCR para *blaOXA23*, *blaOXA40*, *blaOXA51* y *blaOXA58*, para los de clase B, se realizó un múltiples *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSIM*, *blaSPM*, para determinar el gen NDM, se realizó un PCR *blaNDM*, este pertenece a la clase B, pero los primers no se alinean combinado.

Resultados. Se estudiaron 16 cepas de *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos imipenem y meropenem, durante el periodo de estudio, en la caracterización genotípicas se demostró diversidad de genes, el 100% de las cepas

portaron OXA51, 87.5% portaban genes OXA40, pero combinado con OXA51, el 13% presentaron una combinación de genes NDM con OXA51, el 6% de las cepas presentaron genes VIM, GIM en combinación OXA40 y OXA51. Todas las cepas en estudio de *A. baumannii*, presentaron multiresistencia, pero el 100% fueron sensible a colistina.

Conclusiones. La multiresistencia en *A. baumannii* a carbapenémicos se debe al blaOXA51, gen intrínseco de este microorganismo y a las combinaciones de genes VIM, GIM, NDM y OXA40, aumentando la capacidad hidrolítica a estos antibióticos, estos genes se comparten mediante plásmidos facilitando la transferencia vertical y horizontal.

Abstract.

A descriptive study was conducted with the objective to genetically characterize *Acinetobacter baumannii*, a bacterium that produce carbapenemases Class D. A total of 16 carbapenem-resistant strains were studied, isolated from patients admitted to the Aleman Nicaragüenses public hospital. The identification of the genus, species and the antimicrobial susceptibility test was realized using VITEK2 compact system. A carbapenemase-producing strain were considered like suspect whit a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 2-4 µg / mL for imipenem, meropenem, and 2 µg / mL for ertapenem. The synergy test was performed with ethylenediaminetetraacetic acid (10 µg or 0.1 uM), from 0.5 McFarland scale of the strains, the inhibition halo \leq 21 mm was also evaluated in 18- 24 hours by Kirby Bauer. The genotypic characterization was performed by multiplex PCR for *blaOXA23*, *blaOXA40*, *blaOXA51* and *blaOXA58*. To research NDM gene in the isolations, a PCR was carried out. A multiplex PCR was used to determinate class B genes: *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSIM*, *blaSPM*.

Results. We studied 16 strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to the carbapenems imipenem and meropenem. During the study period, genotypic characterization showed diversity of genes, 100% of the strains carried OXA51, 87.5% carried OXA40 genes but combined with OXA51, 13% presented a combination of NDM genes with OXA51, 6% of the strains presented VIM genes, GIM in combination OXA40 and OXA51. All the strains

under study of *A. baumannii* presented multi-resistance, but 100% they were sensitive to colistin.

Conclusions. Multiresistance in *A. baumannii* to carbapenems is due to blaOXA51, an intrinsic gene of this microorganism and to the combinations of VIM, GIM, NDM and OXA40 genes, which increases the hydrolytic capacity of these antibiotics. These genes are shared by plasmids facilitating vertical transfer and horizontal.

Introducción. *Acinetobacter baumannii*, (*A. baumannii*), ha tomado importancia clínica debido a la capacidad de desarrollar multiresistencia a diferentes familias de antibióticos, también por los diversos mecanismos que ha adquirido, como el hidrolisis mediada por enzimas, disminución de sus porinas, expulsión de los antibióticos; este patógeno oportunista se ha visto involucrado en algunos brotes endémicos en Bolivia, Colombia, Chile, España, teniendo gran importancia la caracterización genotípica que conlleva a la múltiple resistencia (Colón et al., 2009, Vanegas et al., 2014), según Frenadillo et al., 2015; tiene diferentes tipos de reservorios que le favorece el desarrollo de procesos infecciosos en pacientes como la limpieza deficiente de las áreas hospitalarias e instrumentos médicos del personal sanitario, como uno de las principales vías de infección además de la falta de lavado de manos, el uso constante del teléfono en áreas críticas, el deterioro de la salud de los pacientes, así como factores de comorbilidad, edad y estado inmunológico. Este patógeno emergente tiene capacidad de sobrevivir en condiciones adversas en las áreas hospitalarias, de desarrollar diversos procesos infecciosos y conducir al desarrollo de bacteriemia de muy mal pronóstico (Opazo et al., 2009, Frenadillo et al., 2015).

Acinetobacter baumannii, en el año 2017, fue ubicado en la lista de patógenos de prioridad crítica por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) por ser un microorganismo resistente a los carbapenémicos, los cuales se utilizan para tratar procesos infecciosos reservados presentándose refractarios ante la medición antimicrobiana, limitando las alternativas farmacológicas, también tiene alta capacidad para diseminarse, es eminentemente un peligro para la vida de los pacientes con estadías

prolongadas en las diferentes unidades sanitarias, aspectos importantes que se deben considerar en estos procesos infecciosos. Desde la aparición de los antimicrobianos se han implementado estrategias para tratar los procesos infecciosos quizás de manera no adecuada o de uso indiscriminado, pero estos microorganismos desarrollan múltiples maneras de defenderse de los ataques antimicrobianos dificultando cada día la estrategia para erradicar los procesos infecciosos. La dificultad de determinar fenotípicamente la resistencia *A. baumannii*, tipo OXA, es debido a la falta de inhibidores enzimáticos, lo que nos conlleva al uso indispensable de técnicas de biología molecular como la PCR, para conocer genéticamente los genes están portando las bacterias, es de mucha importancia desde el punto de vista de resistencia con transmisión plasmídico a otras bacterias Gram negativas, es por eso que no enfocamos en la detección de genes carbapenemasas clase B, clase D (Opazo et al., 2009, Vanegas et al., 2014).

Métodos. Se realizó un estudio descriptivo con el objetivo de caracterizar genéticamente *A. baumannii*, productora de carbapenemasas clase D, en las que se estudiaron, 16 cepas resistentes a los carbapenémicos aisladas de pacientes internados en el hospital público Alemán Nicaragüense. La identificación del género, especie y la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante el sistema VITEK2 compact, a partir del cultivo en MacConkey se tomaron tres unidades formadoras de colonias (UFC), para la preparación del inóculo, luego se realizó una suspensión homogénea en un tubo de ensayo conteniendo 3ml de solución salina al 0.45%, para las tarjetas restantes se pasaron 145µl en tubos con 3ml de solución salina, se ajustó al estándar 0.5 de McFarland por medio del DenSiCheK Plus, y se procedió a montar (GN, AST -XN06 y AST- GN69), GN: 64 pruebas bioquímicas, AST XN06: AN, ATM, CF, CTX, CTT, FOX, CPD, CZX, CXM, DOR, MEM, MXF, NA, NOR, PIP, TE, TIC, TCC, TGC, AST GN69: AMC, AM, SAM, CZ, FEP, CAZ, CRO, CIP, ETP, GM, IPM, LEV, TZP, TM, SXT. ver abreviaturas anexo 3; se consideraron cepas sospechosas productoras de carbapenemasas al presentar Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de 2-4 µg/mL para imipenem, meropenem, y 2 µg/mL para ertapenem según CLSI 2017M100-ED30 (CLSI., 2017). Se realizó el test de sinergia con ácido etilendiaminotetraacético (10µg o 0.1 uM), a partir de la escala 0.5 McFarland de las cepas a evaluar, también se evaluó mediante

Kirby Bauer el halo de inhibición ≤ 21 mm se incubó 18-24hrs. Para la caracterización genotípica, se realizó un múltiplex PCR para *blaOXA23*, *blaOXA40*, *blaOXA51* y *blaOXA58*, (Colón et al., 2009), Para conocer, si portaban el gen NDM, realizó un PCR: para *blaNDM*, (Pasteran et al., 2012). Para determinar los genes clase B, se realizó un PCR, múltiples para *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSIM*, *blaSPM* (Gonzales et al., 2014).

Extracción del ADN

fue mediante lisis por calor a partir del cultivo en agar MacConkey de 18-24 horas a 37°C, se tomó un pool de UFC, se inocularon en un vial de 1.5 mL que contenía 100µl de agua libre de nucleasas, se colocó en baño maría en ebullición por 10 minutos, luego se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se extrajo 80µl del sobrenadante, se determinó la concentración de ADN extraído en Nanodrop Lite 2763 (Vilchez et al., 2009).

Detección genotípica *blaOXA*; se realizó una PCR múltiplex, en aislados de *Acinetobacter baumannii*, en la que se utilizaron los siguientes cebadores (Colón et al., 2009). Ver Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de cebadores carbapenemasas clase B y clase D.			
Nombres del primer	Secuencia de cebadores	Peso molecular (Pb)	Referencia
OXA23F	5'- GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3	501 Pb	Colón et al., 2009.
OXA23R	5'- ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'		
OXA40F	5'- GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3	246 Pb	
OXA40R	5'- AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3		
OXA51F	5'- TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	353 Pb	
OXA51R	5'- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'		
OXA58F	5'- AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	599 Pb	
OXA58R	5'- CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC- 3'		
IMPF	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3'	188 Pb.	Gonzales et al., 2014.
IMPR	5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'		
VIMF	5'-GATGGTGTTTGGTTCGCATA-3'		

VIMR	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'		Gonzales et al., 2014.
GIMF	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3'	477 Pb.	
GIMR	5'-AACTTCCAACCTTTGCCATGC-3'		
SIMF	5'-TACAAGGGATTTCGGCATCG-3'	570 Pb.	
SIMR	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'		
SPMF	5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3'	271 Pb.	
SPMR	5'-ACATTATCCGCTGAAACAGG-3'		Pasteran et al., 2012.
NDMF	5' AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC 3'	512 Pb	
NDMR	5' GGC GTA GTG CTC AGT GTC 3'		

Amplificación la caracterización genética de carbapenemasas tipo D, se determinó mediante PCR, y se determinaron los genes OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58, la amplificación se realizó mediante las siguientes condiciones: desnaturalización 95°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos desnaturalización 94°C por 25 segundos, amplificación 52°C por 40 segundos, 72°C, por 50 segundos, extensión final 72°C por 6 minutos, temperatura final 4°C (Colón et al., 2009).

Detección de carbapenemasas clases B1, también conocidas como metalo betalactamasas (MBL), mediante PCR multiplex, se utilizó el siguiente programa de amplificación: Desnaturalización a 94 °C por 5 minutos; 36 ciclos desnaturalización a 94°C por 30 segundos; hibridación a 52°C por 40 segundos; amplificación 72°C por 50 segundos y una extensión final de 72 °C por 5 minutos (Gonzales et al., 2014). Ver tabla 1.

Determinación de New Delhi (NDM), se realizó mediante PCR convencional, en la mezcla se utilizó 2 µL de ADN, Buffer 10X (5 µL), dNTP's mix 40 mM (2,5 µL), Taq Polymerasa 5U/ul (0.5 µL), Primer Forward 10uM (0,5 µL), Primer Reverse 10uM (0,5 µL), agua libre de nucleasas (18 µL), para un volumen final 25 µL, (Pasteran et al., 2012).

Amplificación se utilizó el siguiente programa, desnaturalización 94°C, por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, 94°C por 30seg, hibridación 50°C por 30seg, amplificación 72°C por 60seg, extensión final 72°C por 10 min, final 4°C. La amplificación se realizó en un

MásterCycler, Marca Eppendorf, Modelo número 5341(Pasteran et al., 2012). Ver tabla 1.

Electroforesis el producto de PCR fue evaluado en un gel de agarosa al 2% con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, la electroforesis se corrió a 120 voltios por 60 minutos las bandas de ADN de los diferentes genotipos fueron visualizadas en una cámara con luz ultravioleta y fotografiada. Se evaluaron los pesos de las bandas con los controles positivos utilizados.(Colón et al., 2009) Ver figura 1 de electroforesis.

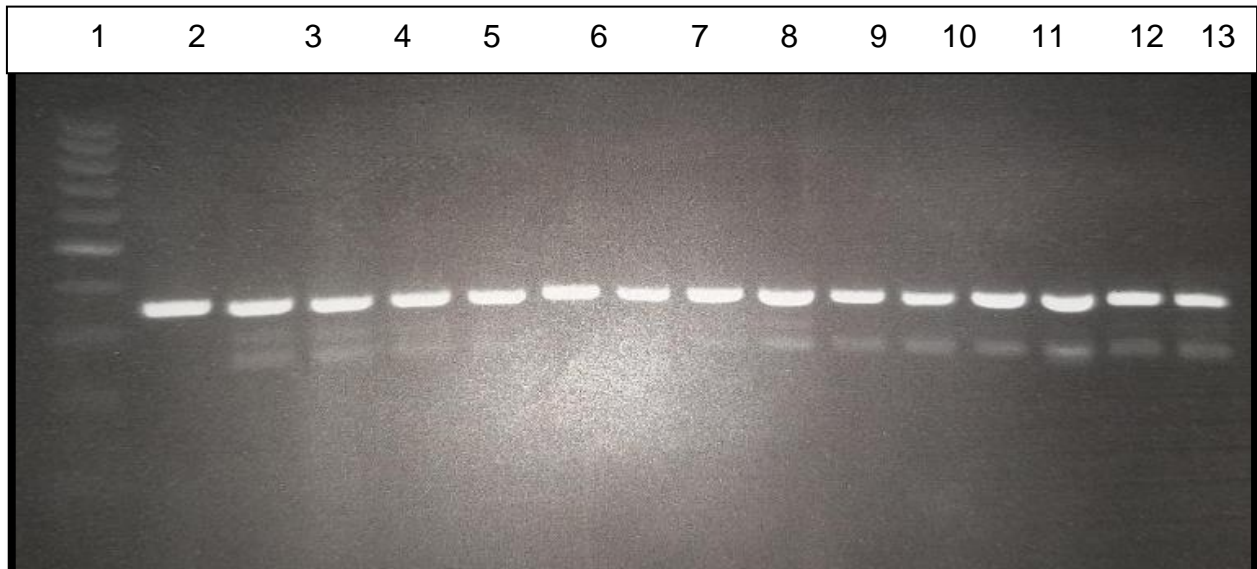


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, pozo 1 marcador molecular, pozo 2, control positivo de OXA51, peso molecular 553 Pb, Pozo 16 control positivo para OXA51 y OXA40 (peso molecular 296 Pb). , pozo , 3,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16 OXA40, pacientes

Resultados

La muestra comprendida por 16 cepas de *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos imipenem y meropenem durante el periodo de estudio, en la caracterización genotípicas se demostró diversidad de genes, las 16/16 (100%) de las cepas portaban OXA51 14/16(87.5%) portaban genes OXA40, pero combinado con OXA51, el 2/16(13%) presentaron una combinación de genes NDM con OXA51 1/16 (6%) de las cepas presentaron genes VIM, GIM en combinación OXA40 y OXA51 todas las cepas en estudio de *A. baumannii*, presentaron multiresistencia, pero el 100% fueron sensible a colistina. Ver gráfico 2.

Discusión. *A. baumannii*, tiene resistencia a diferentes fármacos, debido a la diversidad de mecanismos de resistencia como: AMP-C, estos hidrolizan a los aminopenicilinas, también hidrolizan a los β -lactámicos y muy eficientemente a cefepime, igualmente posee serino carbapenemasas clase D, estos hidrolizan muy eficientemente a los carbapenémicos (Vanegas et al., 2014). En la tabla 4, se puede observar la diversidad de genes que están portando las cepas de *A. baumannii*.

Las 16/16 (100%) de las cepas portaban OXA51 combinados con OXA40 14/16(87.5%), el 2/16(13%) presentaron una combinación de genes NDM con OXA51 1/16 (6%) de las cepas presentaron genes VIM, GIM en combinación OXA40 y OXA51 (Nicolau and Oliver, 2010, Gonzales et al., 2014, Colón et al., 2009).

A. baumannii tiene resistencia a diferentes fármacos, debido a la diversidad de genes de resistencia que hidrolizan a los antibióticos muy eficientemente mediante enzimas β lactamasas hasta las carbapenemasas brindada por los diferentes genes de carbapenemasas de clase B y clase D (Vanegas et al. 2014). Esto sería muy alarmante debido que esta es la alternativa farmacología aunque no muy segura como reportan algunos investigadores por las reacciones adversas que este pueda generar, pero es la alternativa (Colón et al., 2009).

Conclusión

La multiresistencia en *A. baumannii* a carbapenémicos se debe al blaOXA51, gen intrínseco de este microorganismo y a las combinaciones de genes VIM, GIM, NDM y OXA40, aumentando la capacidad hidrolítica a estos antibióticos, estos genes se comparten mediante plásmidos facilitando la transferencia vertical y horizontal.

Agradecimiento

Por la colaboración en el estudio al Ministerio de Salud de Nicaragua y al personal del Hospital Alemán Nicaragüense.

Financiamiento

Este estudio se realizó con el Fondo para Proyectos de Investigación (FPI) de la UNAN-Managua, dirigido por el Vicerrectorado de Investigación, Posgrado y Extensión Universitaria a través de la Dirección de Investigación.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto alguno.

Bibliografía

- Amado, Andrés. 1999. "Reacción En Cadena de La Polimerasa." *REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS Reacción* 68–70.
- Amaya, E., M. Cáceres, A. Fang, A. Torres, C. Palmagren, and Nord Weintraub. 2010. "G0 [y Lor RriuatG Use Only G0 [y for RriuatG UsG Only." 22.
- Amaya, Erick, Mercedes Caceres, Hong Fang, Angel Ramirez, Ann Palmgren, Carl Nord, and Andrej Weintraub. 2008. "Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit in León, Nicaragua." *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(4):386–87.
- Brooks, G., J. Butel, L. Ornston, E. Jawetz, J. Melnick, and E. Adelberg. 2010. *Microbiología Médica*. 25th ed. edited by S. A. de C. V. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.
- Bush, Karen and George A. Jacoby. 2010. "Updated Functional Classification of β -Lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3):969–76.
- Colón, Elena Fernández, Zulema Bustamante García, Jenny Zamora Balderrama, Silvia Zabalaga, Jenny Pinto Davalos, Fátima Funes Espinoza, Elena Sevillano Peña, and Adelaida Umaran. 2009. "Determinación de Carbapenemasas y Su Relación Con Estructuras Genéticas En Aislamientos Clínicos de *Acinetobacter Baumannii* de Hospitales de La Ciudad de Cochabamba." *Biofarbo* 17(1):30–38.
- Gómez, J., E. García, and A. Hernández. 2015. "Los Betalactámicos En La Práctica Clínica." *Rev Esp Quimioter* 28(1):1–9.
- Gonzales, Edgar, William Vicente, Roky Champi, Javier Soto, Wilfredo Flores, Margarita Lovera, Nancy Chuquiray, Carlos Bejarano, Maritza Puray, and Segundo León. 2014. "Metallo- β -Lactamasas En Aislamientos Clínicos de *Pseudomonas Aeruginosa* En

- Lima, Perú.” *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 30(2):241–45.
- Healthcare, National, Safety Network, Antimicrobial Use, and Standardized Antibiotic. 2018. “Antimicrobial Use and Resistance Module : A Tool to Manage , Use , and Report Hospital Antibiotic Use Data.” 1–2.
- INCIENSA. 2014. “Segundo Caso Importado de Infección Por Enterobacteria Carbapenemasa Tipo Metalobetalactamasa New Delhi (MBL-NDM).” https://inciensa.sa.cr/actualidad/historico_noticias/segundo_caso_importado_infeccion_enterobacteria_metalobetalactamasa.
- Institute, Clinical and Laboratory Standards. 2017. “[https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/.](https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/)” Retrieved (https://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/clsi_2017.pdf).
- de la Lastra, Virginia, Francisco Silva, Teresa Ulloa, Eugenia Pinto, and Mario Vidal. 2014. “Detección de Serinocarapenemasas de Clase A y Otros Mecanismos de Resistencia Enzimática a β -Lactámicos En Cepas de Enterobacterias Con Susceptibilidad Disminuida a Carbapenémicos, Aisladas de Pacientes de Un Hospital Universitario de Santiago, Chile.” *Revista Chilena de Infectología* 31(6):670–75.
- Lipari, Flavio, Daniela Hernández, Mario Vilaró, Juan Caeiro, and Héctor Saka. 2020. “Caracterización Clínica, Epidemiológica y Microbiológica de Bacteriemias Producidas Por Enterobacterias Resistentes a Carbapenems En Un Hospital Universitario de Córdoba, Argentina.” *Revista Chilena de Infectología* 37(4):362–70.
- López, Marcos, Cornelia Bischofberge, David Saez, and Luisa Garcia. 2017. “Epidemiología de La Diseminación de Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas En Un Hospital Comarcal y Un Hospital de Media Estancia En Madrid.” *Revista de La Sociedad Española de Quimioterapia*. 6(0):458–63.
- Malbrán, C. 2013. “NDM * En Argentina *.” *ALERTA EPIDEMIOLOGICA: Emergencia de CARBAPENEMASA Tipo NDM. Serv. ANTIMICROBIANOS, INE?ANLIS Malbrán. Boletín 3, 2013 Donde* 1–6.
- Margot, Nirvia, Cuaical Ramos, Yerismar Andreina, Delgado Borrero, Yelli María, Anzola Anzola, Daniel Marcano Zamora, and Luis Carlos Torres. 2012. “Artículo Original

- Detección de Carbapenemasas Tipo OXA En Aislados De.” 95–100.
- Martínez, Dianny Del Valle. 2009. “Betalactamasas Tipo AmpC: Generalidades y Métodos Para Detección Fenotípica.” *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología* 29(2):78–83.
- Medina, JulioDaniela PacielOfelia NocetiGloria Rieppi. 2017. “Actualización Acerca de Colistina (Polimixina E): Aspectos Clínicos, PK/PD y Equivalencias.” *Revista Medica Del Uruguay* 33(3):195–206.
- Millan, Beatriz, David Castro, María Araque, Bárbara Ghiglione, and Gabriel Gutkind. 2013. “ISCR1 Asociado Con Genes BlaCTX-M-1 y BlaCTX-M-2 En Plásmidos IncN e IncFIIA Aislados En Klebsiella Pneumoniae de Origen Hospitalario En Mérida, Venezuela.” *Biomedica* 33(2):268–75.
- Montesinos, E., F. Moraga, P. Soler, M. Oliveras, M. Escartín, X. Gómez, and C. Figueras. 2014. “Uso de Antibióticos Carbapenémicos En Enfermos Pediátricos Hospitalizados. Adecuación de Su Prescripción a Un Protocolo Terapéutico.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 32(10):647–53.
- Moreno, Claudia, Rubén González, and Constanza Beltrán. 2009. “Mecanismos de Resistencia Antimicrobiana En Patógenos Respiratorios.” *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello* 69(2):185–92.
- Nicolau, Carlos and Antonio Oliver. 2010. “Carbapenemasas En Especies Del Género Pseudomonas.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28(SUPPL. 1):19–28.
- OMS. 2017. “Lista de Las Bacterias Para Las Que Se Necesitan Urgentemente Nuevos Antibióticos.” <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- Oteo, Jesús, Germán Bou, Fernando Chaves, and Antonio Oliver. 2017. *Microbiological Methods for Surveillance of Carrier Status of Multiresistant Bacteria*. Vol. 35.
- Pasteran, F., E. Albornoz, D. Faccone, S. Gomez, C. Valenzuela, M. Morales, P. Estrada, L. Valenzuela, J. Matheu, L. Guerriero, E. Arbizú, Y. Calderón, P. Ramon, and A. Corso. 2012. “Emergence of NDM-1-Producing Klebsiella Pneumoniae in Guatemala.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(7):1795–97.
- Paterson, D. and Y. Doi. 2007. “A Step Closer to Extreme Drug Resistance (XDR) in

- Gram-Negative Bacilli." *Clinical Infectious Diseases* 45(9):1179–81.
- Perez, Barbara and Fernando González. 2017. "Infecciones Por Bacilos Gramnegativos No Fermentadores: Agentes Etiológicos de Infecciones Asociadas a La Atención Sanitaria." *Ccm* (4):1197–1200.
- Pinilla, G., L. Muñoz, J. Navarrete, and P. Arévalo. 2012. "El Ataque de Las Bacterias: Cómo Prevenirlo Sin Morir En El Intento." *Nova* 10(18):227.
- Rodríguez, Angeles. 2002. "Principales Características y Diagnóstico de Los Grupos Patógenos de Escherichia Coli." *Salud Publica de Mexico* 44(5):464–75.
- Seija, Veronica, Daniela Paciet, Jimena Prieto, Julio Medina, Rafael Vignoli, and Eduardo Savio. 2011. "Enterobacterias Productoras de KPC." *Revista Tendencias En Medicina* 12(9):47.
- Smyth, R. W., G. Kahlmeter, B. Olsson Liljequist, and B. Hoffman. 2001. "Methods for Identifying Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus." *Journal of Hospital Infection* 48(2):103–7.
- Suarez, Carlos, Juan Kattán, Ana Guzmán, and Maria Villegas. 2006. "Mecanismos de Resistencia Acinetobacter y Enterobacteriaceae y Estrategias Para Su Prevención y Control." *Infectio* 10(2):85–93.
- Vanegas, Johanna, Gustavo Roncancio, and Judy Jiménez. 2014. "Acinetobacter Baumannii: Clinical Importance, Resistance Mechanisms and Diagnosis." *CES Medicina* 28(2):233–46.
- Vera, A., C. Barría, S. Carrasco, L. Lima, A. Aguayo, M. Domínguez, H. Bello, and G. González. 2017. "KPC: Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase, Principal Carbapenemase En Enterobacterias KPC: Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase, Main Carbapenemase in Enterobacteriaceae." *Revista Chilena de Infectología* 34(5):476–84.
- Vilchez, Samuel, Daniel Reyes, Margarita Paniagua, Filemon Bucardo, Roland Möllby, and Andrej Weintraub. 2009. "Prevalence of Diarrhoeagenic Escherichia Coli in Children from León, Nicaragua." *Journal of Medical Microbiology* 58(5):630–37.
- Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover. 2001. "Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of Klebsiella

Pneumoniae.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(4):1151–61.

Anexo 2.

Tabla 1.

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

Tabla 2. Protocolo de trabajo de MBL.

Reactivo	Volumen de reactivo. 1 muestra	Volumen total para n=11
Reaction Buffer 10x	5 µl	55 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	11 µl
IMPforward (10 µm)	1 µl	11 µl
IMPreverse (10 µm)	1 µl	11 µl
SPMforward (10 µm)	1 µl	11 µl
SPMreverse (10 µm)	1 µl	11 µl
VIMforward (10 µm)	1 µl	11 µl
VIMreverse (10 µm)	1 µl	11 µl
GIMforward (10 µm)	1 µl	11 µl
GIMreverse (10 µm)	1 µl	11 µl
SIMforward (10 µm)	1 µl	11 µl
SIMreverse (10 µm)	1 µl	11 µl
ADN molde	2 µl	11 µl
Agua libre de nucleasas	31 µl	341 µl
Taq polimerasa	1 µl	11 µl
Total	50 µl	550 µl

Tabla 3.

Iniciadores	Secuencia	Peso molecular (Pb)
NDM forward	5-3 AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC'	512 Pb
NDM reverse	5-3 GGC GTA GTG CTC AGT GTC'	

Tabla 4. Protocolo de trabajo para NDM.

Reactivo	Volumen reactivo x Muestra	Volumen para 10 muestras
Reaction Buffer 10x	2.5 µl	25 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0.5 µl	5 µl
NDMforward (10 µM)	0.5 µl	5 µl
NDMreverse (10 µM)	0.5 µl	5 µl
ADN molde	2 µl	5 µl µl
Agua libre de nucleasas	18.5 µl	185 µl
Taq polimerasa	0.5 µl	5 µl
Volumen total	25 µl	235 µl

Tabla 5.

Iniciadores	Secuencia	Peso molecular (Pb)
OXA-23 F	5'- GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3	501 Pb
OXA-23 R	5'- ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	
OXA-40 F	5'- GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3	246 Pb
OXA-40 R	5'- AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3	
OXA-51 F	5'- TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	353 Pb
OXA-51 R	5'- TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	
OXA-58 F	5'- AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	599 Pb
OXA-58 R	5'- CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC- 3'	

Tabla 6. Protocolo de trabajo para carbapenemasas clase D.

Reactivo	Volumen reactivo. 1 muestra	Volumen para 10 muestras
Reaction Buffer 10x	2.5 µl	25 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0.5 µl	5 µl
OXA-23 F (10 µm)	1 µl	10 µl
OXA-23 R (10 µm)	1 µl	10 µl
OXA-40 F (10 µm)	1 µl	10 µl
OXA-40 R (10 µm)	1 µl	10 µl
OXA-51 F (10 µm)	1 µl	10 µl
OXA-51 (10 µm)	1 µl	10 µl
OXA-58 F (10 µm)	1 µl	10 µl
OXA-58 R (10 µm)	1 µl	10 µl
ADN molde	2 µl	20 µl µl
Agua libre de nucleasas	15.5 µl	155 µl
Taq polimerasa	0.5 µl	5 µl
Volumen total	25 µl	290 µl

Anexo 3.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA



Ficha N°: 001

Ficha de recolección de Datos.

La ficha tiene como objetivo recopilar los datos de las cepas reguardadas en los laboratorios de los hospitales que serán utilizadas en el estudio, Perfil de resistencia antimicrobiana en Enterobacterias y bacterias Gram negativas no fermentadoras y su asociación con riesgo de mortalidad en pacientes de hospitales en Managua-Nicaragua, periodo 2017-2019.

1. Datos generales.		2. Microorganismo	
Fecha		Tipo de muestra	
Nº de muestra lab.		Hemocultivo.	
Nº de expediente		Secreción	
Servicio sala		Liquido	
Sexo del paciente		Orina	
Edad		Punta de catéter	
Observación.			

1. UCI___ 2. Medicina interna ___ 4. Pediatría___ 5. Cirugía___ 5. Ginecología y Obste___ 6. Quirófanos___ 7. Ortopedia___ 8. Unidad de Hemodiálisis ___ 9. Consulta externa ___ 10. Infectología___ 11. Otros ___.

3. Datos de los laboratorio		4. Datos del laboratorio BM. POLISAL. Genotipos.	
Sinergia positiva EDTA		MBL	SERINO
Sinergia positiva APB		IMP	KPC
Fecha reactivación de la cepa.		VIM	OXA
fenotipo		GIM	OXA23
Extracción de ADN		SIM	OXA40

PCR		SPM		OXA51	
Electroforesis		NDM		OXA58	
Observaciones					
5. Perfil de resistencia					
Antibiótico	Kirby-Bauer (mm)	Valor cualitativo Sensible. (S) Intermedio(I) Resistentes (R)			Vitek 2.0 CIM
CAZ		S ()	I ()	R ()	
CRO		S ()	I ()	R ()	
AMC		S ()	I ()	R ()	
FEP		S ()	I ()	R ()	
ATM		S ()	I ()	R ()	
PRL		S ()	I ()	R ()	
IPM		S ()	I ()	R ()	
MEM		S ()	I ()	R ()	
ERT		S ()	I ()	R ()	
TZP		S ()	I ()	R ()	
SAM		S ()	I ()	R ()	
GEM		S ()	I ()	R ()	
CIP		S ()	I ()	R ()	
LVX		S ()	I ()	R ()	
AMK		S ()	I ()	R ()	
TET		S ()	I ()	R ()	
MNO		S ()	I ()	R ()	
STX		S ()	I ()	R ()	
RIP		S ()	I ()	R ()	
COL		S ()	I ()	R ()	

Siglas de antibióticos, según WHONET: ácido nalidíxico (NAL); amikacina (AMK); amoxicilina (AMX); amoxicilina-ácido Clavulánico (AMC); ampicilina (AMP); ampicilina-sulbactam (SAM); azitromicina (AZM); azlocilina (AZL); aztreonam (ATM); cefaclor (CEC); cefaloridina (CEF); cefalotina (CEP); cefalosporinas de tercera generación (C3G); cefazolina (CFZ); cefepime (FEP); cefoperazona (CFP); cefotaxima (CTX); cefotaxima-ácido Clavulánico (CTC); ceftazidima (CAZ); cefoxitina (FOX); ceftriaxona (CRO); cefuroxima (CXM); ciprofloxacina (CIP); claritromicina (CLR); clindamicina (CLI); cloranfenicol (CHL); colistín (COL); doxiciclina (DOX); enrofloxacina (ENR); eritromicina (ERI); estreptomina (STR); estreptomina de alta carga (STH); fosfomicina (FOS);

furazolidona (FRZ); gentamicina (GEN); gentamicina de alta carga (GEH); kanamicina (KAN); imipenem (IPM); levofloxacina (LVX); lincomicina (LIN); iomefloxacina (LOM); meropenem (MEM); minociclina (MNO); nitrofurantoína (NIT); norfloxacina (NOR); oxacilina (OXA); ofloxacina (OFX); penicilina (PEN); pefloxacina (PEF); piperacilina (PIP); piperacilina-tazobactam (TZP); rifampicina (RIF); sulfatiazol (SLF); sulfisoxazol (SOX); teicoplanina (TEC); tetraciclina (TCY); ticarcilina (TIC); trimetoprima+sulfametoxazol (SXT); tobramicina (TOB); vancomicina (VAN).

Anexo 4. Permiso para realizar el estudio.



“2017: AÑO DE LA UNIVERSIDAD EMPRENDEDORA”

Managua 06 de julio 2017

A QUIEN CONCIERNE

En carácter de Director del Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada” POLISAL/UNAN-Managua, por este medio autorizo al estudiante del doctorado Oscar Heriberto Arbizú Medina, para utilizar las cepas resguardadas *Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua*, estas serán utilizadas con el objetivo de analizar los genes que porta dichas cepas es importante para evaluar para predecir los genes en futuras cepas similares, porque según los genes que porten tendrán resistencia a diversos fármacos. Dicho estudio estará dando salida al tema de investigación que se titula. Perfil de resistencia antimicrobiana en Enterobacterias y bacterias no fermentadoras en pacientes de hospitales en Managua-Nicaragua, periodo 2017-2019. Cabe señalar que el análisis se realizará en los microorganismo no en humano.

Se extiende la presente, a solicitud del interesado. Dado en la ciudad de Managua, a los seis días del mes de julio del año 2017.

Atentamente,

Dr. Juan Francisco Rocha López
Director POLISAL/UNAN-Managua



Anexo 5. Presupuesto.

Material	Descripción y Unidades	Costo \$
Agar MacConkey	1 frasco 500 gr	\$80
Agar Mueller Hinton	1 frasco 500 gr	\$75
Platos Petri	250 unidades	\$100
Asas estériles	4 unidades/paquete 500 unidades	\$100
Tubos Eppendorf 2 MI	250 unidades	\$50
Tubos Eppendorf PCR 0.2MI	2500 unidades	\$250
Agua grado PCR	1 Lts	\$30
Taq polimerasa	5 unidades	\$450
Primers OXA, NDM, MBL	100 mmol de cada uno.	\$1250
Masters mix de PCR	2 KIT	\$400
Agarosa	100 gramos	\$150
kit de Extracción de ADN kit Qiagen	250 pruebas	\$1,575
Cuaderno de Acta	1 unidad	\$3
TBE	5 LTS	\$150
Papel fotográfico	1 rollo	\$20
Puntas 0-10 ul, 50- 250 ul	4000 unidades	\$300
Papel Toalla	10 rollos	\$20
Sensidiscos/inhibidores	5 tubos por antibióticos	\$600
Total		\$5,603

Anexo 7.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS DE LA SALUD
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE NICARAGUA



Acuerdo de Conformidad de Tutoría

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

"Por una cultura de investigación, innovación y mejoramiento."

Nombre del candidato: Oscar Heriberto Arbizú Medina
País de residencia: Nicaragua. Nicaragüense
Tema de tesis: Perfil de resistencia antimicrobiana en enterobacterias y bacterias gram negativas no fermentadoras y su asociación con riesgo de mortalidad en pacientes de hospitales en Managua-Nicaragua, periodo 2017-2019.
Firma del candidato: Oscar Arbizú Medina 
Nombre del tutor: Doctor. Abraham Salinas.
Grado Académico: licenciado en Bionálisis clínico, Posgrado en Farmacología Clínica, Maestría en Microbiología Médica.
Institución: UNAN-Managua POLISAL Dpto. de Bionálisis Clínico.
País de residencia: Nicaragua
Firma del tutor: 
Fecha: 22-03-2019

Dr. Miguel Angel Orozco Valladares
Director ejecutivo
CIES-UNAN Managua



Rotonda Sto. Domingo 75 vrs. al Sur, Tels.: 2278 3700 y 2278 4383 Fax: 2278 6775 Aptdo. Postal 3507, Managua, Nicaragua