

UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN-MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD “LUIS FELIPE MONCADA”

**Trabajo monográfico para optar a título de:
Licenciatura en Microbiología.**

Título:

Frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense. Enero-septiembre, 2017.

Autores:

Br. Alisson Mardenilt González Picado
Br. Ronaldo Potoy Reyes

Tutor:

Msc. Oscar Arbizú Medina.
Profesor BAC y Microbiología
IPS UNAN- MANAGUA.

Asesor:

Msc. Francisco Romero
Microbiología Médica.

Managua, febrero 2018



Dedicatoria

A Dios, por habernos permitido alcanzar una meta tan importante en nuestras vidas y por darnos la fuerza de soportar y superar los obstáculos que en el camino se nos presentó.

A nuestros padres, por su apoyo incondicional, por alentarnos a seguir adelante y nunca darse por vencidos, por estar con nosotros cuando necesitamos de ellos, ya que la educación y valores que tenemos es el legado que ellos nos han de dejar.

A nuestros profesores, que a lo largo de la carrera nos inculcaron conocimientos los cuales adoptamos como nuestros, por su paciencia y dedicación con nosotros a la hora de impartirnos las clases que hicieron de estos años algo memorable.



Agradecimientos

El presente trabajo monográfico implicó dedicación y esfuerzo no sólo por parte de sus autores, pero igualmente por parte de aquellos que nos brindaron su apoyo en el ámbito profesional, y emocional durante este largo proceso.

A Dios,

Quisiéramos agradecer a quien nos brindó vida, fuerza, y paciencia durante no sólo el desarrollo de nuestro trabajo monográfico, sino en cada momento de nuestras vidas, por cuidar de nosotros incluso cuando no sabíamos que necesitábamos de su protección, por estar siempre presente en las palabras amables, en los consejos, en nuestras mejores y peores calificaciones, cuando dudábamos de nuestro desempeño. Por estar con su mano en los momentos más difíciles y regalarnos las risas que conseguían sino superarlos, al menos olvidarlos.

A nuestros Padres,

Gracias Mamá por siempre creer en mí, cuando yo no lograba hacerlo, por confiar en mi desempeño y siempre alentarme a esperar más, en mis estudios y en la vida. Gracias porque a pesar de estar separadas por miles de kilómetros tu amor nunca se sintió más cercano. A mi Papá, eres el hombre más respetable que conozco, tus principios y enseñanzas son los que me han mantenido en pie, conociendo que solo enfocados en nuestras prioridades y mediante trabajo duro se es capaz brillar por uno mismo. A mis hermanas y hermano por su apoyo incondicional, por hacerme reír, por sus consejos, por dejarme ser “la niña”. Gracias mamáChilo por tu amor y cuidados.

AlissonMardenilt González Picado

Gracias madre por cuidar de mí en todo momento, por estar pendiente de todo lo que hacía mientras avanzaba para que no perdiera mi camino y por aconsejarme cada vez que lo necesitaba. Gracias padre por proveerme de lo que necesitaba y de lo que quería, por escucharme siempre y reír conmigo, por valorar mis logros y animarme cuando fallaba para que me levantara y siguiera adelante. A ambos por respetar mis decisiones y confiar en mí ya que eso me daba el valor para dar el siguiente paso y desarrollarme como persona con valores, ética y moral. Por último, gracias hermana por ayudarme cada vez que te lo pedí y ser paciente conmigo y gracias Ricardo por darme una mano cuando te la pedí y necesité.

Ronaldo Potoy Reyes



A nuestros Educadores

Por ser guías en nuestra carrera, dedicar su tiempo en transmitir conocimientos en cada generación que llega a su regazo, por nutrirnos, exigirnos siempre ir más allá de lo que se nos es pedido, inculcarnos valores que como profesionales necesitaremos. Por tenernos inmensa paciencia cuando llegábamos a sus oficinas, por recibirnos aun si estuviéramos equivocados, por reír con nosotros, creer en nuestras capacidades. Gracias por transmitir su conocimiento y compartir su experiencia.



Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de los genes (VIM, GIM, IMP, NDM, SPM) precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras biológicas del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo de Enero-Septiembre, 2017, conocer el perfil de resistencia antimicrobiano presentes en las cepas de estudio e indicar la distribución por sala y tipo de muestra de los genes encontrados.

El total de cepas analizadas fueron 21, todas estas pertenecientes a la familia de enterobacterias. Todas ellas de origen hospitalario, y la mayoría provenientes de salas con enfoque a atención neonatal y cuidados intensivos con un 33.3% de incidencia. Un gran porcentaje de las cepas fueron de muestras tomadas para hemocultivo (67%) de líquidos y secreciones (19%) y urocultivos (14%). De las cuales (62%) eran *Klebsiella pneumoniae*, y *Serratia marcescens* (19%). De igual manera se encontraron en menor cantidad las especies de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E.aerogenes* y *E. vulneris* con una incidencia de 4.8% cada una de ellas. En el ensayo fenotípico, todas las cepas expresaron positividad para sinergia con Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) describiéndolas como carbapenemasas de clase B. La técnica molecular PCR determinó (86%) positivas para el gen NDM y (14%) con gen IMP.

Se concluyó que la frecuencia de los genes encontrados precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo de enero-septiembre, 2017, fue de 82% para NDM-1 y de 14% para IMP. Esto debe alertar al sistema de salud pública, ya que la presencia de estos genes implica un incremento en el porcentaje de mortalidad en los casos con estas infecciones, debido a la falta de opciones terapéuticas que se pueden implementar en el tratamiento y recuperación del paciente. Es necesario que se continúe apoyando esta línea de investigación para tener una visión más amplia y clara de la situación que el sistema de salud en Nicaragua está enfrentado, y poder plantear medidas que ayude en el manejo de casos y brotes relacionados a mecanismos de resistencia antimicrobiana.



Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. ANTECEDENTES	8
III. JUSTIFICACIÓN.....	10
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
Preguntas Directrices:.....	12
V. OBJETIVOS:.....	13
VI. MARCO TEÓRICO	14
1. Enterobacterias	14
1.1. Generalidades.....	14
2. Carbapenémicos.....	15
3. Resistencia bacteriana.....	17
4. Carbapenemasas	21
4.1. Generalidades.....	21
4.2. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos	22
5. Antibiograma.....	25
6. Detección de carbapenemasas	28
6.1. Fenotipificación.....	28
6.2. Genotipificación de carbapenemasas tipo metalo	32
7. Método de detección de genes productores de carbapenemasas	35
7.1. PCR	35
7.2. Extracción de ácido nucleico.....	37
7.3. Electroforesis.....	38
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	40
1. Tipo de estudio	40
2. Área de estudio	40
3. Universo	40
3.1. Muestra.....	40
4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de la información	41
5. Procedimientos para la recolección de datos e información.....	41
5.1. Aprobación de estudio y consentimiento.	41
5.2. Recuperación de cepas:	42
5.3. Detección Fenotípica (Sinergia con EDTA al 1.0 molar)	43



5.4. Extracción de ADN	44
5.5. PCR	45
5.6. Electroforesis en gel de agarosa	47
6. Plan de tabulación y análisis.....	48
VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.	49
IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
Gráfico 1	51
Gráfico 2.....	52
Gráfico 3.....	54
Gráfica 4	56
Gráfica 4.1	57
Gráfica 4.2	58
X. CONCLUSIONES.....	59
XI. RECOMENDACIONES	60
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	64



I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de gran relevancia ya que cepas anteriormente sensibles, llegan a ser resistentes a casi todos los antibióticos. Esto limita las opciones terapéuticas y perjudica al sistema de salud pública mundial.

La hidrólisis de los antibióticos betalactámicos por medio de las enzimas betalactamasas es el mecanismo más común de resistencia en bacterias Gram negativas. Dichos mecanismos se encuentran codificados en genes que les confieren a las bacterias un gran potencial de diseminación a otros patógenos, en las que se incluye el grupo de enterobacterias que son clínicamente importantes. Debido a que las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenémicos se incluyen en los tratamientos de mayor uso en enfermedades infecciosas, la presencia y caracterización de estas enzimas juega un rol crítico para la selección adecuada de la terapia.

En agosto de 2010, los sistemas de Vigilancia en Resistencia antimicrobiana reportaron la aparición de un mecanismo de resistencia en enterobacterias, el cual se determinó responsable de brotes en diferentes hospitales y se relacionaba con el aumento en la morbilidad intrahospitalaria en India, Pakistán e Inglaterra. Este mecanismo no había sido reportado en Latinoamérica; solo hasta el año 2011 se reportó el primer caso en Guatemala, con el aislamiento de dos cepas portadoras de New Delhi Metalo β -lactamasa (NDM-1), encendiendo alertas epidemiológicas en el continente.

La presente investigación fue realizada en el Hospital Alemán Nicaragüense de la ciudad de Managua, el cual nos brindó cepas aisladas de pacientes de las diferentes salas del hospital pertenecientes a la familia de enterobacterias, para su genotipificación por el método molecular de reacción en cadena de la polimerasa, en busca de genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas (Verona Integron Metalo- β -lactamasa, German Imipenemasa, Seoul Imipenemasa, Sao Pablo Metalo- β -lactamasa, Imipenemasa, New Delhi Metalo- β -lactamasa).



II. ANTECEDENTES

En la década de 1980 se reportó en Japón en un aislamiento de *Aeromonashydrophila* la primera carbapenemasa, enzima capaz de generar resistencia a carbapenémicos: Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem.(Monge, 2013)

La primera carbapenemasa de clase A era de naturaleza cromosómica y fue detectada por vez primera en 1982, incluso antes de la comercialización de los carbapenémicos. Esta enzima, denominada SME, se encontró por vez primera en *S. marcescens* y después en *E. cloacae* tanto en casos esporádicos como asociados a pequeños brotes epidémicos. (Cifarrelli, 2016)

Existen reportes sobre aislamientos de carbapenemasas tipo Seoul Imipenemasa (SME-1) en Londres en 1982 en cepas de *Serratia marcescens* e Imipenemasas (IMI-1) en California en 1984 en *Enterobacter cloacae* y posteriormente en 1990 en Francia de NMC-A, también en *Enterobacter cloacae*.(Morejón, 2012)

Las primeras carbapenemasas de origen plasmídico se describieron en Japón en el año 1991 en *P. aeruginosa* y con posterioridad en diversas especies de enterobacterias, entre ellas *S. marcescens*, y también en *Pseudomonasputida* y *Achromobacterxylooxidan*.

Así mismo, en el año 1997 se detectó en Italia, también en *P. aeruginosa*, una enzima, igualmente de clase B, de carácter transferible que recibió el nombre de VIM-1 y cuyo gen se asocia a integrones de clase 1. Esta enzima se detectó con posterioridad en Corea en *S. marcescens* y en Grecia en *E. coli* y en *K. pneumoniae* y está ampliamente distribuida en diferentes países, sobre todo en Europa. (Suarez, Kattán, & Villegas, 2006)

En España se han descrito tanto enzimas del tipo IMP, en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, como del tipo VIM en diferentes enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, siendo relevantes algunos brotes epidémicos descritos que demostraron en el estudio de la estructura poblacional la implicación de diferentes clones de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*.(Cercenado, 2011)

El primer caso reportado por carbapenemasa de tipo New Delhi metalo- β -lactamase-1 (NDM-1), fue inicialmente encontrado en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el año 2008. Estas cepas provenían de un paciente sueco quien había sido repatriado de Suiza



a la India. Fue a partir de esta cepa que se descubrió la nueva codificación que daba origen a este nuevo gen el cual se esparció mundialmente con gran rapidez.(Nasr, Decré, & Compain, 2013)

En agosto de 2010, los sistemas de Vigilancia en Resistencia antimicrobiana reportaron la aparición de un mecanismo de resistencia en Enterobacterias, la cual se encontraba causando brotes en diferentes hospitales y se relacionaba con el aumento en la morbimortalidad intrahospitalaria en India, Pakistán e Inglaterra. Posteriormente este mecanismo también fue encontrado en Europa, Japón, Australia, Canadá y Estados Unidos. Debido a su origen geográfico este nuevo mecanismo fue denominado: Nueva Delhi Metallo- β -lactamasa (NDM). Este mecanismo no había sido reportado en Latinoamérica sólo hasta el año 2011. (Navarro, 2011)

En 2011 se reportó el hallazgo de carbapenemasas del tipo Nueva Delhi metalo- β -lactamasa (NDM) en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en Guatemala, la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS / OMS) enfatizó la importancia de la vigilancia y detección en la Región de este mecanismo de resistencia que aumenta la morbilidad y la mortalidad de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. (PAHO, 2011)



III. JUSTIFICACIÓN

El surgimiento de enzimas capaces de hidrolizar antibióticos, da como resultado complicaciones en el tratamiento e incrementa los índices de mortalidad. Es precisa la implementación de medidas de aislamiento y control en pacientes con riesgo de infección ya que estas cepas detectadas se encuentran distribuidas tanto en pacientes pediátricos como adultos. (Gordillo Mata, 2011)

Debido a que los genes codificantes de estas metalo enzimas se encuentran en forma de casetes genéticos que codifican diferentes mecanismos de resistencia y la tipificación de secuencias multilocus del gen NDM-1 demuestran gran variedad entre las cepas encontradas en los distintos países de donde han sido aisladas, evidencian así su diversidad genética, lo cual podría explicar a su vez la rapidez con que este gen se ha expandido mundialmente. Por lo demás mediante ensayos fenotípicos no se es capaz de medir la gravedad de la infección de acuerdo al gen precursor de la resistencia presente, ya que en comparación a los genes precursores de carbapenemasas (GIM, VIM, IMP, SIMP, SPM) NDM-1 ha demostrado un porcentaje de mortalidad mayor del 70%. (Ariza & León, 2013)

La propagación mundial de estas enzimas, su prevalencia en ascenso y su repercusión sobre los resultados terapéuticos obligan a los países a crear sistema de detección y vigilancia de las mismas, sin embargo, se dispone de datos limitados sobre la producción de estas en cepas clínicas de Nicaragua. Por lo cual, este estudio plantea determinar la frecuencia de los genes productores de carbapenemasas tipo metalo en muestras aisladas de pacientes del Hospital Alemán Nicaragüense y proveer así datos epidemiológicos ante el cuadro alarmante que es presentado en la salud pública. De esta manera demostrar el impacto y alcance que tienen estos genes en su propagación y promover con esto la concientización en las medidas de control y reducción que deben ser tomadas en los centros de atención medica ante este cuadro alarmante en la salud pública con respecto a la resistencia antimicrobiana.



IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias en su evolución han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia; tales como; producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, mutación de sitios de acción, bomba de expulsión, etc. Una preocupación actual es la existencia de genes que codifican enzimas productoras de resistencia a diferentes familias de antibióticos. Estos genes se encuentran incluidos en plásmidos conjugativos que les confieren a las bacterias un gran potencial de diseminación a otros patógenos nosocomiales.

Sin embargo, la producción de carbapenemasas, enzimas inactivadoras de carbapenémicos, es uno de los más recientes, pero quizás de los más preocupantes mecanismos de resistencia ya que inactivan prácticamente al último escalón terapéutico frente a microorganismos Gram negativos multirresistentes. (Morejon, 2012)

Actualmente cepas productoras de carbapenemasas han sido aisladas y reportadas en numerosos países, incluida la Argentina, Brasil, China, Costa Rica, México y los países siguen sumándose a lo que ha sido considerado una alarma epidemiológica de gran importancia a nivel de salud pública por la drástica reducción de opciones terapéuticas y su rápida propagación a nivel mundial.

Debido a que el hospital de atención general Alemán Nicaragüense, atiende a un área de afluencia poblacional aproximadamente de 400,000 habitantes y cuenta con diferentes servicios médicos de atención especializada donde se diagnostican y tratan múltiples infecciones por microorganismos de diferentes géneros y especies, esta investigación plantea responder:

¿Cuál es la frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense Enero-septiembre, 2017?



Preguntas Directrices:

¿La resistencia fenotípica a carbapenémicos de las cepas aisladas, está realmente presente?

¿Qué genes (IMP, VIM, SPM, SIM, NDM, GIM) codificadores de la producción de carbapenemasas de tipo metalo enzimas están presentes en las cepas recuperadas de los pacientes dentro del Hospital?

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

¿Cuál es la distribución por sala y tipo de muestra de los genes de resistencia codificadores de carbapenemasas tipo metalo encontrados?



V. OBJETIVOS:

General

Determinar la frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense Enero-septiembre, 2017.

Específicos:

1. Confirmar la resistencia fenotípica a carbapenémicos de las cepas aisladas, por método de Kirby Bauer.
2. Identificar los genes (NDM-1, IMP, VIM, SPM, SIM, GIM) codificadores de la producción de carbapenemasas de tipo metalo enzimas por medio de técnica molecular (PCR).
3. Conocer el perfil de resistencia antimicrobiano presentes en las cepas de estudio.
4. Indicar la distribución por sala y tipo de muestra de los genes de resistencia codificadores de carbapenemasas tipo metalo.



VI. MARCO TEÓRICO

1. Enterobacterias

1.1. Generalidades.

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. (Rodríguez & García, 2010)

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro. Como en otras bacterias Gram negativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas.

La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas, porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa. (Rodríguez & García, 2010)

Características típicas y distintivas de las enterobacterias

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



- viii. La mayoría son móviles (con flagelos peritricos).
- ix. No formadores de esporas.

Entre las Enterobacterias importantes desde el punto de vista clínico se encuentran: *Escherichia (coli, alberti, alvei)*; *Klebsiella(pneumoniae, oxytoca, granulomatis)*; *Salmonella (choleraesuis)*; *Enterobacter(aerogenes, cloacae, aglomerans, gergoviae, sakazakii)*; *Serratia (marcescens)*; *Hafnia (alves)*; *Citrobacter(freundii, amalonaticus, diversus)*; *Yersinia(pestis, enterocolitica, pseudotuberculosis)*; *Proteus(mirabilis, vulgaris)*; *Providencia(rettgeri, stuartii)*; *Morganella(morganii)*; *Shigella(dysenterii, flexneri, sonnei, boydei)*; *Plesiomonas(shigelloides)*; *Edwardsiella(tarda)*; *Ewingella(americana)*.

2. Carbapenémicos

Los carbapenémicos son los antibióticos betalactámicos dotados de mayor espectro, actividad y resistencia a las β -lactamasas. Poseen un amplio espectro de actividad y son altamente potentes contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Estas cualidades hacen que los carbapenémicos sean imprescindibles en el tratamiento empírico donde se sospecha de un patógeno multi resistente, en la monoterapia de numerosas infecciones nosocomiales graves (incluso algunas de origen comunitario) y en la terapia dirigida contra las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes o productoras de β -lactamasas de amplio espectro y espectro extendido.

Todos los carbapenémicos disponibles son similares en cuanto a espectro se refiere, aunque con diferencias significativas en su actividad antimicrobiana lo que determina las indicaciones clínicas de cada uno.(Karla, 2013)

Sus características principales son:

- i. Amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, tanto aerobias como anaerobias.
- ii. Rápida penetración a través de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas.
- iii. Gran estabilidad al hidrólisis por betalactamasas plasmídicas o cromosómicas porque poseen una cadena transhidroxietilo en la posición 6 del anillo estructural β -lactámico.
- iv. Buena unión a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP).



- v. Rápida acción bactericida frente a Gramnegativos y Gram positivos, con una concentración mínima bactericida (CMB) en torno a dos veces la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- vi. Efecto postantibiótico de hasta dos horas frente a Gram negativos y mayor para Gram positivos. (Gobernado & Acuña, 2007)

La estructura química y relación estructura/función de los carbapenémicos se basa en que el anillo carbapenem es un azobiciclo formado por la condensación de un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Posee en posición 1 un átomo de carbono (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Todos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo en configuración trans que protege al anillo β -lactámico de muchas serino- β -lactamasas y en posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al β -lactámico. Los distintos carbapenem son fruto de sustituciones en 1 y 2. En Imipenem los hidrógenos del C1 no están sustituidos, por lo que es sensible a la DHP-I renal y potencialmente nefrotóxico. (Fresnadillo, García, García, & García, 2010)

El mecanismo de acción de estos se describe en que inhiben la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación uniéndose a residuos de serina de peptidasas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática denominadas PBP (penicillinbindingprotein, proteínas que fijan penicilinas). La pared celular se debilita y la bacteria normalmente se lisa. Por ello, son habitualmente bactericidas. Imipenem es menos bactericida que Meropenem y Doripenem en *Pseudomona aeruginosa*. El poder bactericida es rápido y dependiente del tiempo. Frente a *Listeria monocytogenes* Meropenem y Ertapenem se comportan como bacteriostáticos, aunque la actividad intracelular de Meropenem es bactericida a las 24 horas.(Fresnadillo, García, García, & García, 2010)

Para ejercer su acción deben atravesar la pared celular para acceder a las PBP, lo que es fácil en Gram positivos, pero más complicado en Gramnegativos. Sus características estructurales les permiten acceder a las PBP de las bacterias Gram negativas a través de las porinas de la membrana externa. En general, el espectro de afinidad por las PBP es similar, aunque la preferencia por algunas de ellas (especialmente las PBP-2 y 3) determina los diferentes matices de actividad intrínseca y potencia antimicrobiana de cada carbapenem.



Los carbapenémicos son medicamentos que no se absorben por vía oral, por lo que deben ser administrados parenteralmente. Su unión a proteínas plasmáticas es débil en el caso del Imipenem y Meropenem y fuerte con el Doripenem y Ertapenem. Tienen buena distribución corporal, sobre todo a nivel del Sistema Nervioso Central, Peritoneo y Riñón. Se excretan principalmente por la orina y poco por la bilis y heces. El perfil de toxicidad es similar salvo en el Sistema Nervioso Central. Las reacciones adversas más habituales son náuseas, cefaleas, diarrea, vómitos, flebitis, exantema y prurito. La toxicidad neurológica, aunque rara, es más frecuente tras la administración de Imipenem/Cilastatina. Se han descrito alteraciones hematológicas como leucopenia, prueba de Coombs positiva, eosinofilia o trombocitosis y bioquímicas como incrementos moderados y transitorios de transaminasas o fosfatasa alcalina. (Moreno, 2013)

3. Resistencia bacteriana

La resistencia anti microbiana se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los (antibióticos, anti fúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos) Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.(Organización Mundial de la Salud, 2016)

Tipos de Resistencia:

Natural: Propia del microorganismo. En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico. Esta resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. (Centrón, 2012)

Adquirida: Es aquel tipo de resistencia que determinada especie ha adquirido a lo largo del tiempo. Constituye un problema en la clínica, se detectan pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias.



La transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos.(Fernández, Jorge, Laida, & Caridad, 2003)

La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías:

- i. Inactivación enzimática: el principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, como sucede con las betalactamasas y los betalactámicos, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolítico tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones que inactivan aminoglucósidos.
- ii. Modificaciones en el sitio blanco: existen diversas estrategias para alcanzar este objetivo. Destacaremos algunas como ser: modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico, como por ejemplo las alteraciones en las PBP de *Streptococcus pneumoniae* que confiere resistencia a Penicilina e incluso a Ceftriaxona; la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales, como PBP2' en *Staphylococcus* spp. Meticilinoresistentes o la dihidrofolatoreductasa alternativa en las cepas resistentes a Trimetoprim.
- iii. Alteraciones de la permeabilidad: se pueden incluir aquí tres tipos.
 - Alteraciones de las membranas bacterianas: se ve fundamentalmente en Gram negativos, donde la membrana externa de la envoltura celular rica en lípidos es impermeable a las sustancias hidrofílicas. De este modo dichas sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembrana con función de porinas. Existen algunas moléculas de antibiótico, como Penicilina y Vancomicina, que por su tamaño son incapaces de pasar a través de las porinas de bacilos Gram negativos. La disminución de la expresión de dichas porinas puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico. Se considera que en este caso los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico.



- Aumento de la salida de antibióticos: la resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. En Gram negativos estos sistemas en general se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Estos sistemas así constituidos exportan moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa. (Vignoli & Seija, 2008)

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética. Nuevos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos).

Basándose en datos de secuencia parcial del ADN de las betalactamasas, Ambler en 1980 propone clasificarlas en cuatro clases: A, B, C y D. Las enzimas de clase C, están generalmente codificadas en el cromosoma bacteriano y son típicamente inducibles por betalactámicos. Se trata de proteínas que presentan unos 100 aminoácidos más que la de los otros grupos, por lo que su peso molecular suele rondar los 40 kD o más. En algunas especies, la región reguladora del gen ha desaparecido, y en consecuencia la enzima se expresa constitutivamente. Las enzimas de clase B requieren zinc para su actividad y son consideradas por ello metalo betalactamasas. En general son plasmídicas, inhibibles por EDTA, incluyéndose aquí las enzimas que confieren resistencia a los carbapenem.

Las enzimas de clase D constituyen un grupo reducido de enzimas plasmídicas, con actividad incrementada sobre Oxacilina (OXA-1), inhibibles por iones cloruros y de forma variable por inhibidores del tipo Ácido clavulánico o Sulbactam. Estas enzimas, al igual que lo observado en las enzimas de clase A, han ampliado su espectro de acción mediado por mutaciones puntuales a partir de enzimas con actividad reducida a penicilinas como es el caso de las OXA derivadas. (Vignoli & Seija, 2008)

La resistencia en enterobacterias es el resultado de la adquisición de la capacidad de producir carbapenemasas de la clase B (IMP-1 en *S. marcescens*, *K. pneumoniae* y otras



enterobacterias, VIM en múltiples especies), A (SME-1 a 3 en *S. marcescens*, KPC en *K. pneumoniae* y otras especies, IMI-1 en *E. cloacae*) e incluso D (OXA-48 en *K. pneumoniae*), aunque en general necesita la asociación de alteraciones en la permeabilidad y/o en la acumulación.

Clasificación según grado de resistencia a los antimicrobianos:

- i. Multiresistente (MDR): Patógeno resistente a por lo menos 3 clases de antimicrobianos a la que se esperaría fuese susceptible.
- ii. Extensamente resistente (XDR): Sólo quedan 1 o 2 opciones de antimicrobianos frente a los cuáles el microorganismo es susceptible.
- iii. Panresistente (PDR): Patógeno resistente a todos los agentes antimicrobianos comercialmente disponibles. (Paterson, 2008)

También debe conocerse la epidemiología de los agentes infecciosos, ya que su frecuencia se modifica a través del tiempo. De esta manera, establecer las variaciones epidemiológicas en cada centro hospitalario permitirá abandonar los esquemas antibióticos empíricos para el tratamiento de un proceso infeccioso grave que sólo cuenta con un diagnóstico presuntivo, mientras se espera el resultado microbiológico definitivo. (Martínez, Esteves, Tenorio, & Arroyo, 2008)

En la actualidad, los microorganismos aislados en las salas de internamiento de hospitales de segundo nivel representan un problema de salud importante, pues son la principal causa de morbilidad y mortalidad en los mismos e implican disminución en la calidad de vida, estancia hospitalaria prolongada y costos de salud elevados. La tasa de infección depende de cada unidad, los pacientes que acoge, los procedimientos, los antibióticos prescritos y la microbiota hospitalaria. (Martínez, Esteves, Tenorio, & Arroyo, 2008)

Durante el período neonatal la infección permanece como una causa importante de morbilidad y mortalidad, a pesar de los grandes adelantos en el cuidado intensivo neonatal y el uso de antibióticos de amplio espectro. Diversos estudios muestran que existe subinformación en lo que se refiere a muertes neonatales y que la infección se subestima por la imprecisión en el diagnóstico. La Organización Mundial de la Salud plantea también que, del total de los recién nacidos vivos en los países en vías de desarrollo,



aproximadamente 20 % evoluciona con una infección y 1% fallece debido a una sepsis neonatal. (González, Duany, Labrada, Lavado, & Guilart, 2008)

Entre los recién nacidos de más de una semana de vida que necesitan cuidados intensivos neonatales, los factores de riesgo maternos son menos importantes. Se tornan relevantes según el grado de prematurez, la presencia de catéteres endovenosos o arteriales centrales, la mala integridad cutánea y la desnutrición. Los factores de riesgo que llevan a una sepsis neonatal tardía varían según se trate de un recién nacido que ya ha ido de alta, donde su fuente infectante serán los familiares, o de aquel recién nacido hospitalizado en una Unidad de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN), con riesgos de infección hospitalaria de acuerdo con los procedimientos invasivos a los que esté expuesto.

Las bacterias más frecuentes aisladas en este tipo de sepsis son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Enterococcus* y Gram negativos entéricos multi resistente. (González, Duany, Labrada, Lavado, & Guilart, 2008)

4. Carbapenemasas

4.1. Generalidades

La resistencia a carbapenem es un evento poco común, especialmente en miembros de la familia Enterobacteriaceae. Sin embargo, en los últimos años han aumentado los reportes de cepas de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos. (Suarez, Kattán, & Villegas, 2006)

Se ha producido una gran alarma y preocupación por la gran dispersión de los bacilos Gramnegativos resistentes a los carbapenémicos en los que el mecanismo implicado es la producción de β -lactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos transferibles. Estas enzimas se denominan genéricamente carbapenemasas y se agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler que se corresponden con diferentes grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010. (Calvo, Cantón, & Mirelis, 2010)

Las carbapenemasas incluyen enzimas de clase A, B y D de Ambler, pueden ser metalo- β -lactamasas, u oxacilinasas de espectro expandido o β -lactamasas inhibidas por ácido clavulánico. Las metalo β -lactamasas que pertenecen a la clase B de Ambler (VIM, IMP) se



han identificado como productoras de brotes nosocomiales. Las de clase D (oxacilinasas) se han identificado fundamentalmente en *Acinetobacterbaumani*. Las carbapenemasas de clase A (inhibidas por ácido clavulánico) se codifican algunas cromosómicamente como en *Serratiasppy* otras en plásmidos como son las variantes de tipo Guyana y las carbapenemasas de tipo KPC. (Paciel & Seija, 2011)

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de las β -lactamasas. Tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros β -lactámicos. Además, presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles. Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles. Se ha propuesto una clasificación en dos grupos: serin carbapenemasas que pertenecen a la clase molecular A o D de Ambler y metalo- β -lactamasas (MBLs) que corresponden a la clase B de Ambler, denominadas así por la dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento. Estos grupos difieren en su mecanismo de hidrólisis, el modo de transferencia y la acción de los inhibidores. (Moreno, 2013)

4.2. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos

4.2.1. OXA

Los genes que codifican por las enzimas SME, IMI, NCM, SHV-8 y SFC-1 se localizan principalmente en el cromosoma, pero existen reportes de aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* que poseen enzimas SME, IMI y NCM presentes en plásmidos. Los genes blaGES residen en cassetes genéticos principalmente dentro de integrones de clase 1, mientras que los genes blaKPC y blaIMI-2 están flanqueados por transposones ubicados dentro de plásmidos. Por otra parte, las carbapenemasas llamadas oxacilinasas se ubican dentro del grupo 2df de Bush (clase D de Ambler) descritas en 1980.

Se caracterizan por su capacidad de hidrolizar Cloxacilina y Oxacilina (de ahí su nombre “oxacillinhidrolizing”), carbapenémicos, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni Aztreonam (a excepción de OXA 27) y en general son inhibidas por el Ácido clavulánico (menos OXA 23 que es resistente). Para el año 2007 se habían identificado más de 100 variantes, de las cuales 9 eran clasificadas como BLEE y 37 como carbapenemasas.



Aunque se ha descrito que la hidrólisis a los carbapenémicos es débil, se incrementa si otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo, alteraciones en las porinas o modificaciones en el sitio blanco están presentes. Las betalactamasas tipo OXA se detectan principalmente en *A. baumannii*, habitualmente dentro de integrones situados en plásmidos o transposones, aunque ciertos casos se han asociado a secuencias de inserción. Sin embargo, también se han hallado más raramente en *K. pneumoniae*, *E coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y otras especies próximas como *Aeromonas* spp. En el caso de *P. mirabilis* las cepas aisladas en Francia describen la producción de OXA-23 a partir de un gen cromosómico. (Aguila, 2016)

El espectro de actividad entre todas las oxacilinasas es bastante similar, puesto que hidrolizan débilmente Imipenem y Meropenem, no hidrolizan ni cefalosporinas de espectro extendido ni Aztreonam, a excepción de OXA 27, y todas son predominantemente penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a Oxacilina.

Además, son inhibidas por el ácido clavulánico, a excepción de OXA23 que es resistente. A pesar de que hasta la fecha las oxacilinasas no han recibido tanta atención como las metalo- β -lactamasas, es importante considerarlas como potencialmente peligrosas, pues, aunque su actividad carbapenemasa es pobre, se incrementa si otros mecanismos de resistencia están presentes (como bombas de flujo o disminución en la permeabilidad ocasionada por cambios en las porinas o por modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas). (Suarez, Kattán, & Villegas, 2006)

4.2.2. Metalo

Este es quizá el grupo más relevante de carbapenemasas debido tanto a su diversificación estructural como a su diseminación prácticamente mundial y en diferentes especies bacterianas. Son enzimas que típicamente hidrolizan todos los β -lactámicos excepto monobactámicos y son inhibidas por quelantes de iones metálicos tales como EDTA, ácido dipicolínico o 1,10- σ -phenantrolina, pertenecen al grupo B de Ambler y 3a y 3b en la clasificación de Bush.

Los genes MBLs pueden ser transportados en cassettes dentro de integrones, transposones, plásmidos, elementos denominados regiones comunes (CRs) que pueden o no ser



transferibles, o estar insertos en el cromosoma, lo que les confiere a especies como *Stenotrophomonas maltophilia* resistencia intrínseca a los carbapenémicos.

Las adquisiciones de estos genes potencialmente pueden conferir resistencia a un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos y en algunas ocasiones pueden estar asociados con genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, por lo que se pueden identificar bacterias con un fenotipo de resistencia a β -lactámico y aminoglucósidos.(Aguila, 2016)

Dentro de las MBLs se distinguen ocho grupos: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM. Las más importantes incluyen las familias VIM, IMP y SPM-1 las cuales han sido detectadas en cepas de *P. aeruginosa*, miembros de la familia Enterobacteriaceae y *A. baumannii*.

Es importante recalcar que existen reportes que indican que el Doripenem es estable ante la hidrólisis de β -lactamasas de espectro extendido y que es de 5 a 150 veces menos hidrolizado que el Imipenem por las enzimas IMP-1 y VIM-2. En el caso de SPM-1, esta enzima hidroliza el Meropenem y Doripenem cuatro veces más que al Imipenem.(Aguila, 2016)

Habitualmente, estas enzimas están asociadas con otros genes de resistencia ubicados en los mismos genes casetes, lo cual les permite ser resistentes a múltiples antibióticos. Actualmente, ambas familias de metalo- β -lactamasas están ampliamente diseminadas en cuanto a variedad de especies.

Por lo anterior, las metalo- β -lactamasas median un mayor grado de resistencia comparadas con las carbapenemasas tipo serin y son objeto de una intensa búsqueda en el presente. En las enterobacterias de importancia clínica, todas las metalo- β -lactamasas aisladas hasta ahora han sido identificadas en plásmidos o haciendo parte de elementos móviles como los integrones.(Suarez, Kattán, & Villegas, 2006)



4.2.3. Serino

La serino-carbapenemasa del tipo GES-2 aparece por una sustitución sencilla de aminoácidos de la GES-1 que pertenece al grupo de b-lactamasas de espectro extendido no derivadas de TEM o SHV. Con esta sustitución, la GES-2 se convierte en una Carbapenemasa. (Suarez, Kattán, & Villegas, 2006)

Las carbapenemasas tipo Serino clase A hidrolizan penicilinas, cefalosporinas (en menor grado cefalosporinas de tercera y cuarta generación), monobactámicos y carbapenémicos. Su actividad hidrolítica depende del sustrato sobre el que actúan, por ejemplo, SME-3 y KPC-2 hidrolizan mejor el Imipenem que el Doripenem¹⁶ y son levemente inhibidas por el Ácido clavulánico y el Tazobactam. Las carbapenemasas clase A pueden dividirse fenotípicamente en seis diferentes grupos, de los cuales cuatro grupos están formados por miembros de las enzimas SME, IMI/NMC-A, KPC y GES/IBC, que se caracterizan por tener en común tres motivos altamente conservados esenciales para su actividad, mientras que SHV-38 y SFC-1 constituyen cada una un grupo diferente.

Estas enzimas usualmentese encuentran presentes en bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, sin embargo, han sido reportadas en aislamientos de *Pseudomonasputida*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobactercloacae*, *Serratiamarcenses* y *Klebsiellaspp.*, en casos aislados o causantes de pequeños brotes, procedentes de diferentes partes del mundo(Aguila, 2016).

5. Antibiograma

El antibiograma es una prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos de manera fenotípica.(Aguila, 2016)

La lectura interpretada del antibiograma es una práctica habitual en el laboratorio de microbiología como complemento de la interpretación o de la categorización clínica de los resultados de sensibilidad. Consiste en el reconocimiento fenotípico de los mecanismos de resistencia y permite, a partir de este, la inferencia de fenotipo inicial. Asimismo, condiciona la modificación de las categorías clínicas y la deducción de los valores de sensibilidad de antimicrobianos no incluidos en el antibiograma.



Es una herramienta imprescindible para establecer medidas epidemiológicas, adecuación de los tratamientos y aplicación de políticas de antimicrobianos. La lectura interpretada del antibiograma trasciende la vertiente clínica del microbiólogo y es útil en la toma de decisiones.(Cantón, 2010)

La lectura interpretada y puntos de corte, necesaria en la actividad clínica, cumple objetivos y trasciende la vertiente clínica del microbiólogo. Estas han quedado definidas en función de la probabilidad del éxito o del fracaso terapéutico:

- i. Sensible: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.
- ii. Intermedio: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.
- iii. Resistente: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico.

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales.(García, 2015)

En la lectura interpretada del antibiograma debe procesarse la información en función de los fenotipos obtenidos con el objetivo final de la detección del mecanismo de resistencia. El fenotipo de sensibilidad o de resistencia se define como el conjunto de datos obtenidos en el antibiograma para antibióticos de la misma familia o relacionados por mecanismos de actuación comunes o mecanismos de resistencia compartidos. Se clasifican en habituales, raros e imposibles. (Cantón, 2010)

La lectura interpretada del antibiograma requiere la aplicación de numerosos conocimientos que puede limitar su proceso. Estos conocimientos están fundamentalmente asociados a:

- i) La propia naturaleza de los mecanismos de resistencia, sus bases genéticas, expresión y epidemiología.



- ii) Los antimicrobianos y su farmacología, incluidas la Pk, la Pd y la relación Pk/Pd.
- iii) La relación entre la utilización clínica de los antimicrobianos y el posible éxito o fracaso terapéutico, sobre todo en las infecciones producidas por bacterias resistentes.

Una de las limitaciones más importantes de la lectura interpretada del antibiograma deriva de la propia complejidad de los mecanismos de resistencia, sobre todo en aquellas bacterias multiresistentes que presentan varios mecanismos de resistencia. También esta limitación está motivada por la existencia de un mayor número de mecanismos que son capaces de afectar a un mismo antimicrobiano o a varios de la misma familia. Este fenómeno de multi resistencia también se ha denominado capitalismo genético, que incide en el hecho de que una bacteria resistente tiene mayor probabilidad de acumular mayor número de mecanismos de resistencia. (Cantón, 2010)

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el “Clinical & Laboratory Standards Institute” (CLSI) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución; sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. (García, 2015)

Las técnicas de antibiogramas por difusión han sido normalizadas para microorganismo de crecimiento rápido, tales como *Staphylococcus* y *Enterobacteriaceae*, pero no son



confiables cuando se aplican a microorganismos de crecimiento lento, los cuales pueden mostrar zonas de inhibición mucho más grandes que aquéllos de crecimiento rápido. (Bernal & Guzman, 2010)

6. Detección de carbapenemasas

6.1. Fenotipificación

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local y la identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas.

En este último punto es esencial valorar la posible presencia de otros mecanismos de resistencia que puedan “enmascarar” el fenotipo que confieren las carbapenemasas, entre ellos la alteración de la permeabilidad, la presencia de bombas de expulsión, afectación de las PBPs o presencia simultánea de otras betalactamasas.

En este sentido, no es igual la expresión de una carbapenemasa en *P. aeruginosa* o en *A. baumannii* que en *E. coli*, *K. pneumoniae* o en una cepa de *E. cloacae*. Cada una de estas especies tiene sus peculiaridades fenotípicas naturales que deben ser contempladas. Asimismo, la expresión de las carbapenemasas no es siempre homogénea y se producen fenómenos de heteroresistencia.

Este hecho se ha demostrado claramente con las enterobacterias y las metalo β -lactamasas que hace que los valores de CMI no sean en ocasiones reproducibles y se sitúen en un amplio rango de concentraciones, incluso por debajo del punto de corte de sensibilidad. No obstante, estas CMI también pueden ser muy elevadas por la superposición con otros mecanismos de resistencia.

Desde un punto de vista práctico y una vez observado en el antibiograma la expresión de un fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa, generalmente ilustrado por la sensibilidad disminuida o resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y a alguno de los carbapenémicos, es importante verificar que existe un mecanismo de inactivación de los carbapenémicos. (Jiménez, 2016)



Se recomienda investigar este hecho en las cepas en las que los valores de CMI de los carbapenémicos se incrementan por encima de los correspondientes puntos de corte epidemiológicos (aquellos que separan las poblaciones salvajes de aquellas que presentan mecanismos de resistencia).

El método de referencia, no siempre al alcance de todos los laboratorios de microbiología, sería el ensayo espectrofotométrico, por lo que se han propuesto métodos biológicos (bioensayos) sencillos que permiten su detección.

El Test de Hodge Modificado es una prueba que se realiza a las bacterias pertenecientes a Enterobacteriaceae cuando se observa en una prueba de tamizaje:

Resistencia a una o más cefalosporinas de tercera generación (Cefoperazone, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftizoxime y Ceftriaxone) y alguno de los siguientes resultados en carbapenémicos.

El procedimiento de tamizaje se realiza de acuerdo a las recomendaciones generales para las pruebas de difusión en disco o la microdilución, se incuba a 35°C durante 16-18 horas. Pasado el tiempo de incubación deben leerse las zonas de inhibición del lado del agar usando luz reflejada.

En caso de presentarse los diámetros de inhibición mencionados anteriormente debe realizarse la prueba confirmatoria.

La prueba confirmatoria se realiza de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI para Test de Hodge con la siguiente interpretación:

Positivo: Un resultado positivo se evidencia por el crecimiento de la cepa ATCC de *E. coli* en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa problema formando una hendidura en la parte proximal al disco. Esto indica la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que son liberadas al medio y permiten el crecimiento de *E. coli*.

Negativo: No se presenta crecimiento de *E. coli* ATCC en el punto de intersección de la estría de la cepa problema y el halo de inhibición generado por el carbapenem. (Moreno, 2013)

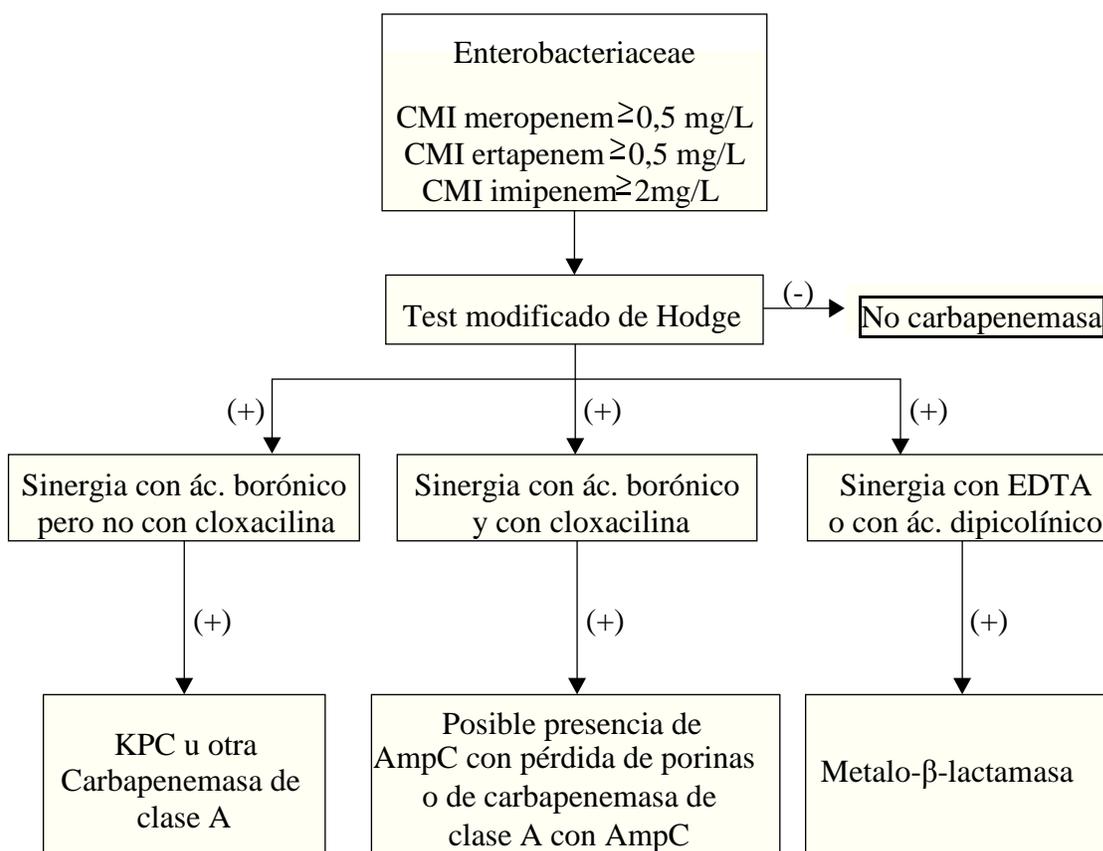


Reporte

En caso de presentarse un resultado positivo debe indicarse el resultado obtenido para todos los carbapenémicos, conservando la interpretación de los puntos de corte vigentes y la siguiente nota: “Organismo productor de carbapenemasas. Se sugiere aislamiento de contacto y consulta con el servicio de control de infecciones”

Cuando el test de Hodge es negativo el reporte se realiza de acuerdo a los resultados de la prueba de tamizaje conservando la interpretación de acuerdo a los puntos de corte vigentes. (Gutiérrez, 2016)

Flujograma de trabajo para Fenotipificación de carbapenemasas





6.1.1. Sinergia con EDTA

En el caso de las metalo- β -lactamasas, la sensibilidad al Aztreonam nos orienta hacia este tipo de enzimas que puede confirmarse por la sinergia entre los carbapenémicos y EDTA o entre Ceftazidima y EDTA. El uso de los discos de EDTA constituye un método fenotípico, rápido, práctico y simple, para poder detectarlas. Característicamente, las metalo- β -lactamasas pueden ser inhibidas por agentes quelantes de Zinc como ser el EDTA y el mercaptoacetato de sodio. (Britania Lab, 2015)

En el método de aproximación de discos es importante «acertar» con la distancia entre los discos del carbapenémico y el inhibidor, sobre todo en las cepas con baja expresión de la carbapenemasa en las que los halos de inhibición son amplios. Por este motivo, existen métodos que incluyen directamente el inhibidor en el mismo disco que el carbapenémico y se compara el halo de inhibición resultante con el que se produce con el carbapenémico solo. Este mismo principio se utiliza con las tiras de E-test que en un extremo contienen Imipenem y en el otro Imipenem con EDTA. Por diferencia entre los valores de CMI de Imipenem sin y con inhibidor se puede inferir la presencia de las carbapenemasas. Asimismo, los sistemas expertos de determinados sistemas automáticos son también útiles para la detección de la metalo- β -lactamasas, incluida la NDM-1. (Navarro, 2011)

6.1.2. Sinergia con Ácido Fenil Borónico

Las KPC confieren resistencia al Aztreonam y no se inhiben por el EDTA, pero sí por el ácido borónico y discretamente por el Ácido clavulánico. No se recomienda utilizar Ácido clavulánico por su baja sensibilidad. La utilización del ácido borónico tiene como inconveniente el ser también un buen inhibidor de Amp-C, circunstancia que dificulta la detección de las KPC cuando está presente esta enzima (por ejemplo, en *E. cloacae*).

Se ha propuesto utilizar simultáneamente una prueba de discos combinados con Cloxacilina para demostrar la presencia de estas β -lactamasas tipo Amp-C. La sinergia con ácido borónico en las cepas productoras de KPC se puede demostrar con los carbapenémicos y también con cefalosporinas de amplio espectro preferentemente con Cefepima.



6.1.3. Sin sinergia

Para las carbapenemasas de tipo OXA no es posible utilizar un método fenotípico como el propuesto con las carbapenemasas de clase A o B ya que no existen inhibidores específicos de enzimas de clase D.

Las Enterobacterias con sensibilidad reducida a carbapenémicos y un resultado negativo en las pruebas de sinergia (Meropenem/Imipenem-ácido borónico o EDTA) son considerados como sospechosas de la producción de OXA y remitidas a laboratorios, donde la presencia de blaOXA-48 y sus variantes alélicas, se evaluarán por PCR y secuenciación de ADN. La identificación puede ser por métodos manuales así como por método automatizados, por ejemplo, la utilización de Vitek. (Guerriero, 2015)

6.2. Genotipificación de carbapenemasas tipo metalo

Las enzimas carbapenemasas han sido detectadas tanto en plásmidos como en cromosomas. Estas carbapenemasas se pueden difundir rápidamente debido a su localización en el plásmido, lo cual hace que el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos sea extremadamente difícil debido a su multiresistencia.

La transferencia horizontal parece tener un papel crucial en la adaptación bacteriana a nichos ecológicos específicos, en la diseminación y persistencia de la resistencia a antibióticos entre miembros de la familia Enterobacteriaceae. La transferencia horizontal está más favorecida por la proximidad entre microorganismos que comparten características genéticas como el tamaño del genoma o su contenido.

- i. Plásmidos: Se componen de una región constante que posee los genes responsables de funciones esenciales como la replicación, el mantenimiento y la transferencia, y una región variable donde se localizan los genes responsables de funciones adaptativas (resistencia a antibióticos, factores de virulencia, o producción de bacteriocinas).
- ii. Transposones: Son secuencias de ADN que llevan información para una transposase y en los extremos secuencias repetidas, conocidas como de inserción, en medio de esta secuencia puede encontrarse la inserción de genes de virulencia, como toxinas



o genes de resistencia a antibióticos. Éstos se pueden integrar en el cromosoma de las bacterias o insertarse en fagos.

- iii. Integrones: Elementos de ADN móviles que pueden capturar genes de resistencia o virulencia, los cuales están en casetes y como acarrear una integrasa, pueden introducirse en el cromosoma, es por esta razón que los transposones y los plásmidos de bacterias; de esta manera, pueden replicarse y expresar la información que llevan. (A, Marlú, & José, 2015)

6.2.1. Genes

Incluyen el mayor número de miembros clínicamente relevantes como Imipenemasa (IMP), Metalo- β -lactamasa codificada por integro de Verona (VIM), Metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM), Metalo- β -lactamasa de São Paulo (SPM), Alemán Imipenemasa (GIM), Imipenemasade Seúl (SIM), Metalo- β -lactamasa de la ciencia de la salud Kyorin (KHM), Imipenemasa Australiana (AIM), Imipenemasa Holandesa (DIM) e Imipenemasa de Florencia (FIM) y BcII codificado cromosómicamente (*Bacillus cereus*), CcrA (*Bacteroides fragilis*), Bla₂ (*Bacillus anthracis*), IND (*Chryseobacterium indologenes*), (*Shewanella frigidimarina*) y SLB (*Shewanella livingstonensis*). (Vargas, Reyes, Gutierrez, & Villegas, 2016)

La mayoría de los genes de resistencia en Enterobacteriaceae están situados en los Integrones de clase 1, lo cual sucede también en algunas Carbapenemasas como la VIM-1 o la VIM-4. Los integrones son estructuras genéticas que han despertado gran interés, debido a que algunos de ellos vehiculizan genes de resistencia a los antimicrobianos. Están formados por un fragmento que codifica una integrasa (*intI*) y, a continuación, una secuencia *attI* a la que se unen los genes en casetes que codifican diferentes mecanismos de resistencia. La mayoría de los genes móviles de las Metalo- β -lactamasas se encuentra en forma de casetes genéticos incluyendo *blaIMP*, *blaVIM*, *blaGIM*, *blaSIM* y *blaKMH*, pero no en el caso del gen *blaNDM-1*, lo cual sugiere que su origen es distinto al de las enzimas IMP y VIM.

Las enzimas clase B son las Carbapenemasas clínicamente más importantes y son las llamadas Metalo- β -lactamasas (MBL), la mayoría pertenecen a la serie IMP y VIM. Estas



enzimas han sido reportadas mundialmente y son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos con la excepción del Aztreonam. Finalmente, la clase D de las Carbapenemasas son penicilinasas que pueden hidrolizar Oxacilina y Cloxacilina, esta clase es pobremente inhibida por Ácido clavulánico o EDTA, comprometen la eficacia de Imipenem y Meropenem y su reporte ha ido en aumento sobre todo en *Acinetobacter baumannii*.

Las enzimas Metalo β -lactamasas tipo Nueva Delhi (NDM-1) son las últimas Carbapenemasas en ser reconocidas y desde el 2008 han sido reportadas en varias partes del mundo principalmente en aquellos pacientes que han tenido vínculos epidemiológicos con el subcontinente indio donde este mecanismo se encuentra ampliamente distribuido en los centros hospitalarios. (Ayala, 2013)

Para el análisis de la cepa aislada del paciente se realizaron varias pruebas diagnósticas. Los resultados de las pruebas para la detección de MBL fueron positivas para la prueba de sinergia de doble disco con Imipenem + EDTA ya que se observó una reducción de la concentración mínima inhibitoria en más de 3 diluciones cuando la muestra estaba en contacto con el inhibidor, igualmente la actividad Carbapenemasas de dicha cepa fue confirmada por espectrometría. Los estudios moleculares no fueron concluyentes ya que no se pudo detectar ninguno de los genes de las MBL antes descritos (VIM, IMP, SPM-1, GIM-1, SIM-1, AIM-1).

Las pruebas moleculares realizadas por Yong y colaboradores demostraron que la NDM-1 no era solo un nuevo tipo de Carbapenemasas clase B sino que además poseía nuevos aminoácidos cerca del sitio activo sugiriendo el descubrimiento de una nueva estructura.

El origen del gen NDM-1 aún sigue siendo desconocido, sin embargo, se ha postulado que este fue capturado desde su locación cromosómica original por DNA móvil de algún microorganismo inocuo del medio ambiente. El gen NDM-1 esta codificado dentro de una sección de ADN de 1350 pb con un contenido de Guanina - Citocina (GC) menor (57%) que el ADN circulante que posee entre 62 y 65% de GC. Corriente arriba el gen posee 250 nucleótidos de ADN que contiene secuencias similares a las secuencias promotoras convencionales, demostrando la probabilidad de que el promotor del gen NDM-1 fuera adquirido junto con el gen.



El marco abierto de lectura del gen NDM-1 codifica para una proteína putativa de 269 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 27.5 kDa. Este gen comparte muy pocas características con otras MBL, y con el que se relaciona más estrechamente, la VIM-1/ VIM-2, solo posee un 32.4% de identidad.

Gen localizado en un elemento genético (blaNDM-1 gen) muy móvil, patrón de difusión más complejo y más impredecible que KPC. Asociado a numerosos determinantes de resistencia, sólo sensible a Colistina y Tigeciclina. Identificada en Enterobacterias (*K. pneumoniae*, *E.coli* y *E. cloacae*) y *Acinetobacterspp.*

La tipificación de secuencias multilocus del gen NDM-1 demuestra gran variedad entre las cepas encontradas en los distintos países donde ha sido aislada, evidenciando así su diversidad genética, lo cual podría explicar a su vez la rapidez con que este gen se ha expandido por todo el mundo. Se han encontrado diversidad de tipos de secuencia (ST) alrededor del mundo, en Francia se han reportado del tipo ST131 y ST10 , en Alemania tipo ST101, en Suiza se han reportado tipo ST410, ST147 y ST25. El subtipo más encontrado en India, país originario de la NDM-1, es el ST101 probable clon con el que se inició la transferencia genética a otras cepas.

7. Método de detección de genes productores de carbapenemasas

7.1.PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida y económica utilizada para "amplificar" (copiar) pequeños segmentos de ADN. Debido a que se necesitan considerables cantidades de una muestra de ADN para análisis moleculares y genéticos, los estudios de segmentos aislados de ADN son casi imposibles sin la amplificación por PCR. (NHI, 2015).

El PCR es un método libre de células, rápido y sensitivo de clonación de fragmentos de ADN. El PCR estándar es un procedimiento in vitro para la amplificación de una secuencia específica de ADN, es capaz de utilizar material genético en cantidades muy pequeñas y de igual forma de muestras provenientes de origen antiguo. La amplificación específica requiere alguna información primordial sobre las secuencias del ADN objetivo.



El principio fundamental del PCR se basa en la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante la multiplicación exponencial de ciclos sucesivos hasta obtener suficiente producto para ser visualizado. De esta manera, una molécula simple de ADN puede ser amplificada más de 1000 millones de veces, en 30 ciclos de reacción.

Etapas de cada ciclo de PCR

Desnaturalización 90-95°C: La doble hebra de ADN templado o molde se abre por efecto del calor, esto sucede porque la energía térmica rompe los puentes de hidrógeno que mantienen las dos hebras de DNA juntas a temperaturas más bajas. Se prefiere la desnaturalización térmica de DNA a la desnaturalización química porque es fácilmente reversible por enfriamiento.

Hibridación: Annealing o apareamiento de los cebadores o “primers” a las regiones flanqueantes de la secuencia de ADN a amplificar, en el rango de 55-65°C. La hibridación del cebador, inicia cuando la mezcla de reacción se enfría y los cebadores oligonucleótidos que se encuentran a los lados de la zona por amplificar, se hibridan con las hebras simples de la molécula de DNA molde.

Extensión: Durante esta etapa la ADN polimerasa termo resistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la “Taq polimerasa” alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica y después de 20 ciclos ya tenemos aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas molde iniciales ADN. (NHI, 2015)

Existen algunos inhibidores de la PCR y se trata de sustancias que interfieren con los ADN polimerasas termoestables ya sea mediante el bloqueo directo total o parcial de su actividad catalítica o mediante la unión directa al ADN de doble cadena. Por ejemplo, algunas sustancias interaccionan con los iones Mg²⁺.



Otra importante fuente de inhibición son los propios reactivos que se usan en el proceso de extracción de ADN, por ejemplo, el exceso de KCl, NaCl y otras sales, detergentes iónicos, etanol e isopropanol, fenol y otros. Los inhibidores pueden eliminarse mediante purificación química del extracto o física mediante columnas de sílica.

7.2.Extracción de ácido nucleico

Muchos estudios de Biología Molecular comienzan con la extracción de ácidos nucleicos. La lisis celular libera las moléculas en una fase acuosa que es separada de los restos celulares por centrifugación. Las proteínas son removidas de la fase acuosa con solventes orgánicos (fenol, cloroformo). El ADN, que permanece en la fase acuosa, precipita junto al etanol y posteriormente es purificado y re suspendido en un buffer adecuado. La existencia de kits comerciales ha modificado la rutina de muchos laboratorios. En los kits, los solventes orgánicos son sustituidos por filtros que retienen el ADN, en condiciones de alta concentración salina. La elución del ADN retenido en el filtro ocurre en baja concentración salina.(Malajovich)

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

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



Recuperación. El sedimento se puede resuspender en agua o tampón Tris tras ser secado completamente.

7.3.Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN según su tamaño. Las muestras de ADN se cargan en pozos (ranuras) en un extremo de un gel y se aplica una corriente eléctrica para arrastrarlas a través del gel. Los fragmentos tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el electrodo positivo. Puesto que todos los fragmentos de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa, los fragmentos pequeños atraviesan el gel más rápido que los grandes. Cuando un gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN, los fragmentos de ADN pueden verse como bandas, las cuales representan un grupo de fragmentos de ADN del mismo tamaño.

Todas las moléculas de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa. Debido a esto, la electroforesis en gel separa los fragmentos de ADN únicamente por su tamaño. La electroforesis nos permite ver cuántos fragmentos diferentes de ADN están presentes en una muestra y cuán grandes son unos con respecto a otros. También podemos determinar el tamaño absoluto de un fragmento de ADN examinándolo junto a una "escala" estándar de fragmentos de tamaño conocido.

La separación de moléculas en la electroforesis se basa en la carga (sobre lo que se aplica la fuerza) y la sección transversal efectiva de la molécula en el estado que se encuentre: plegada, desnaturalizada, ligada a otras moléculas, etc.

Un conjunto de fragmentos de ADN, se separan por tamaño porque todos pertenecen al mismo tipo de molécula. En general, la única diferencia importante entre los distintos fragmentos debería ser su longitud. (Organización Mundial de la Salud, 2016)

Sin embargo, hay algunas excepciones a esta regla. Por ejemplo, algunas moléculas de ADN son circulares (como los plásmidos bacterianos), mientras que otras son lineales. Las moléculas de ADN circular pueden correr por el gel de forma diferente a las moléculas lineales. Tal es el caso de los plásmidos que pueden existir en una forma llamada "súper enrollada", con la que en realidad se mueven por el gel más rápido de lo que deberían según su tamaño, debido a que se han enredado en una forma más delgada que puede moverse más fácilmente a través del gel.



Los geles para separar ADN suelen estar hechos de un polisacárido llamado agarosa, que se consigue como hojuelas secas pulverizadas. Cuando la agarosa se calienta en una solución amortiguadora (agua mezclada con algunas sales) y deja enfriar, se forma un gel sólido ligeramente blando. A nivel molecular, el gel es una matriz de moléculas de agarosa que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y que forman pequeños poros. En un extremo, el gel tiene muescas en forma de ranuras llamadas pozos, que son donde se colocarán las muestras de ADN.

Antes de agregar las muestras de ADN, el gel debe colocarse en una cámara. Uno de los extremos de la cámara se conecta a un electrodo positivo y el otro extremo se conecta a un electrodo negativo. El cuerpo principal de la cámara, donde se coloca el gel, se llena con solución amortiguadora con sales que puede conducir la corriente. Aunque tal vez no puedas verlo en la imagen superior (gracias a mis fabulosas habilidades artísticas), la solución amortiguadora llena la cámara hasta un nivel en el que apenas cubre el gel. El extremo del gel que tiene los pozos se coloca hacia el electrodo negativo. El extremo sin pozos (hacia donde migrarán los fragmentos de ADN) se coloca hacia el electrodo positivo.(Jiménez, 2016)



VII. DISEÑO METODOLÓGICO

1. Tipo de estudio

La presente investigación es de tipo descriptiva prospectiva de corte transversal, donde se determinó genótipicamente los genes productores de metalo enzimas detectados en cepas provenientes del Hospital Alemán Nicaragüense.

2. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Hospital Alemán Nicaragüense de atención general, en las diferentes áreas clínicas de las cuales fueron provistas las muestras a analizar.

3. Universo

El universo estuvo conformado por 548 cepas aisladas e identificadas dentro de la familia de las Enterobacteriaceae de las diferentes salas del hospital Alemán Nicaragüense que se capturaron dentro del periodo de enero a septiembre del año 2017.

3.1. Muestra

La muestra estuvo comprendida por 21 cepas que mostraron resistencia a carbapenémicos con halo menor o igual a 21mm según lineamientos de la CLSI, de tipo metalo enzimas detectados fenotípicamente con EDTA.

Criterios de inclusión:

- ✓ Aislados de pacientes provenientes de las diferentes salas del Hospital Alemán Nicaragüense.
- ✓ Aislados de pacientes dentro del periodo de estudio comprendido de enero a septiembre 2017.
- ✓ Cepas aisladas e identificadas dentro del género Enterobacteriaceae, que presenten el fenotipo de sinergia a EDTA, de aislamiento puro.

Criterios de exclusión:

- ✓ Cepas asiladas que presenten un halo menor o igual a 21mm en carbapenémicos y no presenten sinergia con EDTA.
- ✓ Cepas provenientes de otros hospitales.
- ✓ Cepas que no tengan registro de sensibilidad antimicrobiana.



- ✓ Cepas que no llenen los datos necesarios para la ficha de recolección de datos.

4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de la información

Para la realización de este estudio fue necesario el consentimiento por parte del Hospital Alemán Nicaragüense, ya que se realizó una visita al centro para poder recolectar los datos y obtener las muestras necesarias para el estudio.

Una vez obtenido el permiso se procedió a trabajar las cepas en estudio por medio de las siguientes técnicas y/o métodos: recuperación de cepas en agar MacConkey, detección fenotípica de cepas por sinergia a EDTA con doble disco, extracción de ADN, cuantificación de ADN extraído, PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa.

Para la recolección de información se utilizó una serie de fichas que se llenaron a partir de los expedientes de pacientes y libros de registros del laboratorio que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio y los datos arrojados por las técnicas anteriores. Ver ficha en anexos.

5. Procedimientos para la recolección de datos e información

5.1. Aprobación de estudio y consentimiento.

Una vez aprobado el protocolo por parte de la UNAN-Managua, se envió una copia de este junto con una carta detallando el tema de la investigación y los procedimientos a realizar en el Hospital Alemán Nicaragüense al SILAIS-Managua.

Posterior a esto, el SILAIS emitió una carta de autorización del estudio permitiendo la entrada al hospital para la realización de este en un periodo comprendido de dos meses (septiembre y octubre).



5.2. Recuperación de cepas:

Una vez identificadas las cepas en estudio a partir de los criterios de inclusión se procedió a llenar los datos del paciente en la ficha de recolección de datos y su inoculación en Agar MaConkey.

Procedimientos:

- i. Atemperar placas de agar MaConkey y rotular respectivamente.
- ii. Con un hisopo estéril se toma una muestra de la cepa y se inocula en la placa de agar MaConkey, dejar que el inóculo sea absorbido por el agar.
- iii. Realizar la siembra haciendo rayado por agotamiento para obtener colonias características y bien aisladas.
- iv. Los platos inoculados se incuban en posición invertida con temperaturas de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.
- v. Luego de las 24 horas observar colonias características y crecimientos sin contaminaciones por otros microorganismos.
- vi. Si se observaba crecimiento de colonias atípicas o características de contaminación se realizaba un segundo aislamiento a partir de colonias de interés.
- vii. Sellar las placas con papel parafilm, después se colocará en bolsas de seguridad y guardar en termos para su transporte hacia el laboratorio de la UNAN-Managua.

Control de calidad.

Escherichia coli ATCC 25922: Resultando UFCs fermentadoras de la lactosa con colonias que se observan de color rosado.

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

Staphylococcus aureus ATCC 25923: Sin crecimiento.



5.3. Detección Fenotípica (Sinergia con EDTA al 1.0 molar)

Preparación del inóculo:

- i. Con un asa recta tomar una UFC del medio con crecimiento bacteriano.
- ii. Hacer una suspensión homogénea en un tubo de ensayo conteniendo 3 ml de solución salina estéril al 0.85%. (Utilizar un agitador de tubos si lo considera necesario).
- iii. Ajustar la turbidez del inóculo a la del estándar 0.5 de McFarland comparándolo visualmente. Para ello, se debe colocar la cepa problema en una gradilla y a la par el estándar de McFarland. Esta gradilla debe tener en la parte posterior una tira de papel blanco con una o dos líneas negras de 0.5 a 1 cm de ancho, la cual actúa como contraste para comparar la turbidez de los tubos. Si la turbidez del inóculo es menor, se agrega más inóculo. Si la turbidez es mayor, se debe diluir con solución salina.

Inoculación en Müeller Hinton y colocación de discos antimicrobianos:

- i. Introducir un hisopo estéril en la suspensión, luego presionarlo contra las paredes del tubo, con el fin de escurrir el exceso de inóculo.
- ii. Estriar en tres direcciones, de tal manera que se cubra de manera uniforme toda la superficie del medio.
- iii. Dejar secar la placa por un período de 3 a 5 minutos. Nunca dejar secar la placa por más de 15 minutos antes de aplicar los discos de sensibilidad.
- iv. Colocar el disco impregnado con EDTA al 1.0 molar en el centro del plato utilizando una pinza sin dientes o aguja estéril. Inmediatamente ejerza una ligera presión sobre el centro del disco.
- v. Colocar a ambos lados del primer disco impregnado con EDTA discos de Imipenem y Meropenem de 10 μ g a una distancia de 20 mm de centro a centro de cada disco.



- vi. Incubar las placas en forma invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.
- vii. Las condiciones y tiempos de incubación están en dependencia del microorganismo evaluado, para enterobacterias será de 18-24 horas a 37°C.

El resultado positivo se evidenció por la sinergia o deformación de los halos (efecto huevo), en cualquiera de los dos antibióticos hacia el EDTA, indicando la presencia de Metallo-β-lactamasas y un resultado negativo no presenta sinergia o deformación de los halos.

Control de calidad Müller Hinton					
P h	Profundidad del medio	Concentraciones de iones de Ca y Mg		Concentraciones de timina/timidina	
		Cepa	Disco y medida	Cepa	Disco y medida
7.2-7.4	4 mm	<i>Pseudomonaaeruginos</i> aATCC-27853	Gentamicina 16-22 mm	<i>Enterococcusfaecalis</i> sATCC- 29212	Trimetropinsulfam etoxasol >20 mm

5.4.Extracción de ADN

Una vez obtenido un cultivo puro a partir de la recuperación de la cepa y confirmado el fenotipo por la sinergia con doble disco se procedió a realizar la extracción de ácidos nucleicos con el método de extracción por calor, en el Laboratorio de Biología Molecular del IPS ubicado en la UNAN-Managua.

Procedimientos:

- i. En un tubo eppendorf medir 100 µl de agua libre de nucleasas.
- ii. De un cultivo fresco (24 horas) realizar un pool de célula/ufc (4 – 5 colonias) e inocular en el tubo eppendorf con agua libre de nucleasas.
- iii. Dar vortex para mezclar bien y homogeneizar la muestra.



- iv. Colocar el tubo en baño maría en ebullición o termo bloque a 100°C por 10 minutos.
- v. Retirar la muestra y enfriar en hielo por 5 minutos.
- vi. Luego centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos.
- vii. Extraer 80µl del sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf asegurando la tapa y rotulando según el código de la cepa extraída.

Una vez extraídos los ADN se procedió a verificar la pureza y cuantificar el producto en NanoDrop (Ver cuantificación en anexos). Luego se procedió a guardar las extracciones en refrigeración (-70 °C). Consideraciones: Extracción de ADN a partir de cepas con crecimiento no mayor a 24 horas para evitar contaminación de las mismas.

5.5.PCR

Para la PCR se necesitó un protocolo de trabajo y reactivos necesarios para amplificación de los genes de interés junto con los tipos de Primers utilizados.

Primers	Secuencia	Tamaño del producto amplificado (pb)
IMP-F	5`GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC 3`	188 pb
IMP-R	5`CCAAACYACTASGTTATCT 3`	
VIM-F	5`GATGGTGTGTTGGTCGCATA 3`	390 pb
VIM-R	5`CGAATGCGCAGCACCAG 3`	
GIM-F	5`TCGACACACCTTGGTCTGAA 3`	477 pb
GIM-R	5`AACTTCCAACCTTGCCATGC 3`	
SIM-F	5`TACAAGGGATTTCGGCATCG 3`	570 pb
SIM-R	5`TAATGGCCTGTCCCATGTG 3`	
SPM-F	5`AAAATCTGGGTACGCAAACG 3`	271 pb
SPM-R	5`ACATTATCCGCTGAAACAGG 3`	
NDM-F	5`AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC 3`	512 pb
NMD-R	5`GGC GTA GTG CTC AGT GTC 3`	



Protocolo de trabajo para amplificación de genes IMP, VIM, GIM, SIM Y SPM por PCR.
Protocolo brindado por laboratorio de Biología Molecular.

Reactivo	Volumen	Total de la mezcla en base a N muestras(μ l)
Reaction Buffer 10x	5 μ l	50 μ l
Enhancersolution P. 5x	10 μ l	100 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1 μ l	10 μ l
IMPF (10 uM)	1 μ l	10 μ l
IMPR (10 uM)	1 μ l	10 μ l
VIMP (10 uM)	1 μ l	10 μ l
VIMR (10 uM)	1 μ l	10 μ l
GIMF (10 uM)	1 μ l	10 μ l
GIMR (10 uM)	1 μ l	10 μ l
SIMF (10 uM)	1 μ l	10 μ l
SIMR (10 uM)	1 μ l	10 μ l
SMPF (10 uM)	1 μ l	10 μ l
SMPR (10 uM)	1 μ l	10 μ l
ADN molde	2 μ l	2 μ l
Agua libre de nucleasas	21 μ l	210 μ l
Taq – Polimerasa	1 μ l	10 μ l
N=10		



Protocolo de trabajo para amplificación de genNDM por PCR.

Reactivos	Volumen (μ l)	Total de la mezcla en base a 10 muestras(μ l)
ADN molde	2,5	2,5
Buffer 10X	2,5	25
MgCl ₂ (50mM)	0,75	7,5
d NTP's (10mM)	0,5	5
Taq polimerasa (5U/ μ l)	0,15	1,5
Primer Forward (nM)	0,5	5
Primer Reverse (nM)	0,5	5
H ₂ O	17,6	176

Desnaturalización inicial a 94°C por 5min;
Ciclado de 30-35 ciclos de:94°C 30seg -- 50° 30seg -- 72°C 60seg;
Extensión final = 72°C por 10min

Al concluir los ciclos de amplificación, se tomó el producto amplificado para su lectura a través de gel de agarosa previamente preparado.

5.6.Electroforesis en gel de agarosa.

Preparación del Gel de Agarosa para la corrida (1.5 %)

- Pesar en balanza analítica 1.5 gr de agarosa liofilizada.
- Colocar en un beaker y diluir en 100 ml de TBE con concentración de 1X.
- Colocar en el calentador hasta disolver completamente presentando aspecto transparente.
- Colocar 2 μ l de Bromuro de etidio y mezclar.
- Verter el gel en la cámara con peine para su gelificación. Una vez gelificado retirar el peine y colocar TBE 1X en los lados de la cámara.
- Mezclar 2 μ l de loading de carga con 8 μ l de producto amplificado y colocar en los pozos del gel.
- Colocar controles positivos y negativos además de la escalera.

Escalera: LADDER PROMEGA (3 μ l de ladder más 1 μ l de Loading)

Control Positivo NDM: Código 1-1-8 (Provisto por el laboratorio de Biología Molecular)



Control Positivo Genes Metalo (VIM, GIM, SIM): Código 17010 (Provisto por el laboratorio de Biología Molecular)

Control Negativo: Agua libre de nucleasas.

Una vez colocadas las muestras en el gel, cerrar la cámara y conectar a una fuente de poder con el tiempo estimado para la corrida y número de muestras, 1 hora 30 minutos con 120 voltios para NDM y 1 hora 20 minutos con 120 voltios para los demás genes metalo.

Al finalizar el tiempo estipulado para la corrida se sacará el gel y se colocará en una cámara de fluorescencia para su lectura evidenciando las bandas fluorescentes en el gel y analizando el peso molecular. Se llenó la ficha de recolección de datos a partir de la información obtenida de la técnica molecular.

Financiamiento

Este estudio, se realizó con fondos para proyectos de investigación (FPI), de la UNAN-Managua, otorgado al tutor MsC. Oscar Arbizú Medina y ejecutado por la Dirección Vice-Rectorado de investigación y posgrado.

Limitaciones del estudio

Falta de presupuesto para la compra de reactivos de PCR (Taq polimerasa).

6. Plan de tabulación y análisis

Para la elaboración y edición del documento se utilizó Microsoft Word y Foxit Reader. La tabulación de los resultados obtenidos luego de llenar las fichas individualmente por paciente se utilizó Microsoft Excel y SPSS programas estadísticos los cuales están resumidos en las tablas que se describen en anexos; para la presentación de los datos obtenidos se realizó una presentación con diapositivas de PowerPoint.



VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

Variable	Indicador	Valor	Criterio
Detección Fenotípica	Ácido FenilBorónico	Sinergia	No aplica
	EDTA	Sinergia	Positivo
		Sin sinergia	Negativo
Detección Genotípica	IMP	188pb	Presencia Ausencia
	VIM	390pb	
	GIM	477pb	
	SIM	570pb	
	SPM	271pb	
	NDM	512pb	
Resistencia Antibiótica	Ampicilina	≤13 mm	Sensible Intermedio Resistente
	Piperacilinatazobactam	≤17 mm	
	Cefixime	≤15 mm	
	Cefuroxime	≤14 mm	
	Cefipime	≤18 mm	
	Aztreonan	≤15 mm	
	Meropenem	≤19 mm	
	Imipenem	≤19 mm	
	Ertapenem	≤18 mm	
	Levofloxacina	≤13 mm	
	Ofloxacina	≤12 mm	
	Minociclina	≤14 mm	
	Tetraciclina	≤14 mm	
	Ticarciclina	≤14 mm	
	Cloranfenicol	≤12 mm	
	Colistina	≤8 mm	
Trimetropinsulfametoxazol	≤17 mm		
Amoxicilina/ácido clavulánico	≤13 mm		



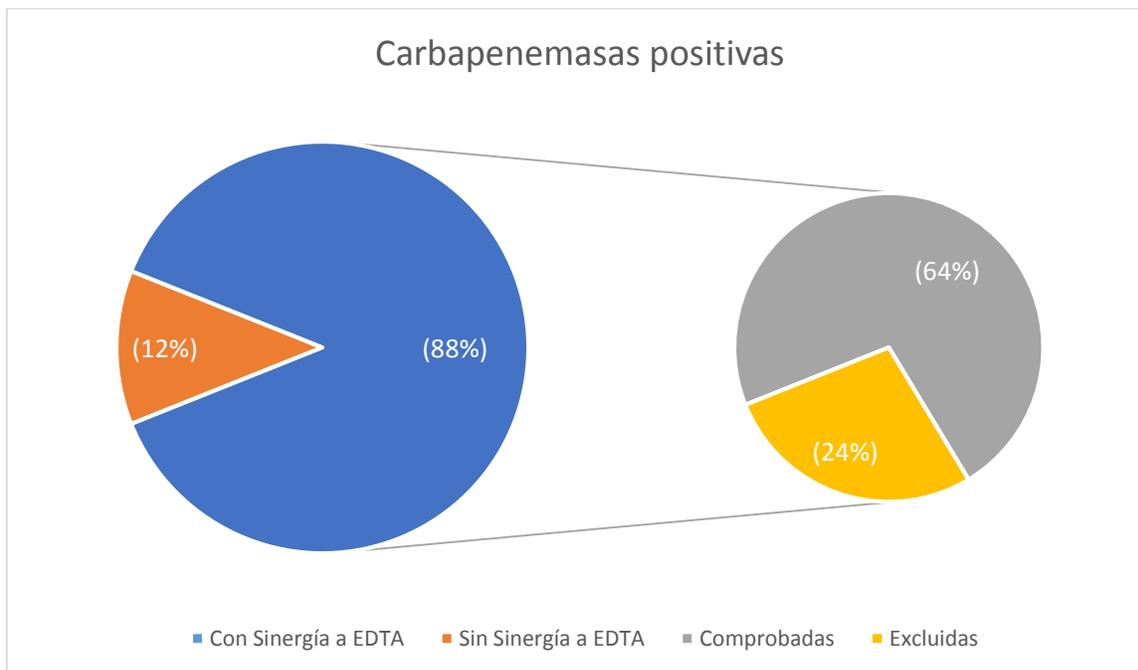
	Cefaloquina	≤19 mm	
	Cefotetan	≤12 mm	
	Cefoxitin	≤14 mm	
	Cefotaxime	≤15 mm	
	Ceftriaxone	≤19 mm	
	Ceftacidime	≤17 mm	
	Amikacina	≤14 mm	
	Gentamicina	≤12 mm	
	Ácido nadilixico	≤13 mm	
	Ciprofloxacina	≤15 mm	
	Norfloxacin	≤12 mm	
	Tigeciclina	≤14 mm	
	Nitrofurantoina	≤14 mm	
	Cefaclor	≤14 mm	
Tipo de muestra		-Hemocultivo -Urocultivo -Líquidos (Especificar) -Heridas y Abscesos	Aplica No Aplica
Sala	Orden Médica	-Emergencia, Consulta Externa -UCI, UCIP -Cirugía -Ginecología -Pediatría -Neonatos	Aplica No Aplica



IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gráfico 1

Comprobación fenotípica de cepas aisladas e identificadas dentro la familia de las enterobacterias en el periodo de estudio enero-septiembre 2017.



Fuente: Tabla 10

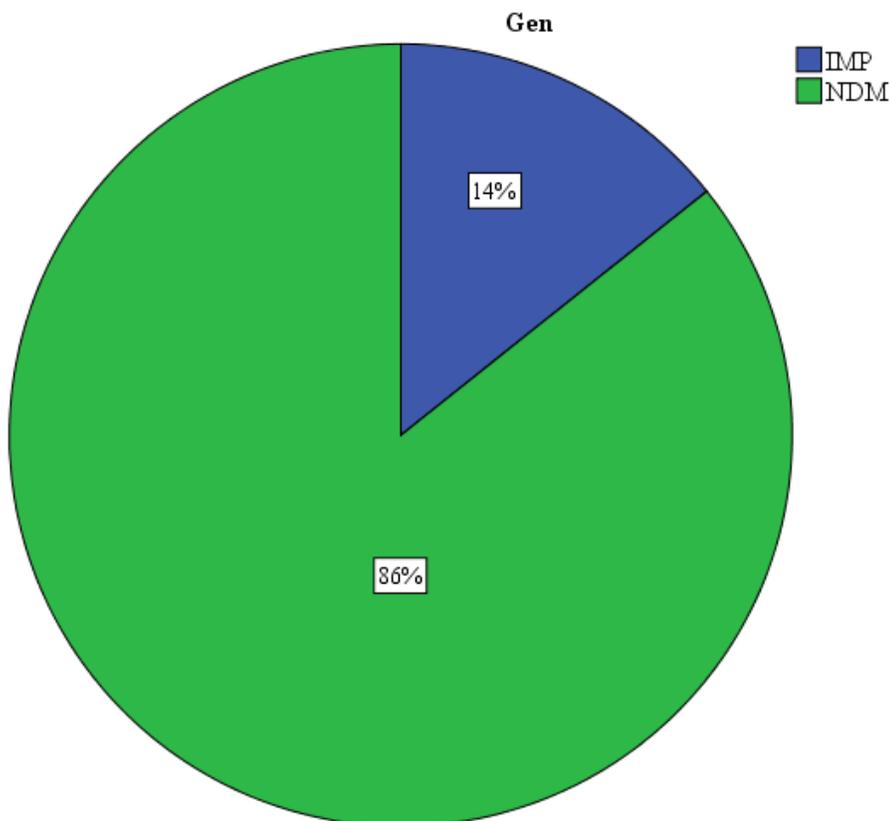
Dentro del periodo de estudio comprendido se capturaron 33 cepas pertenecientes a la familia de las enterobacterias que presentaron resistencia a los carbapenémicos Imipenem y Meropenem según los lineamientos del CLSI 2016, a los cuales se les realizó la Fenotipificación en el Hospital Alemán Nicaragüense con la técnica de sinergia a EDTA, siendo este el único inhibidor utilizado.

Según los datos del Hospital Alemán Nicaragüense 29 cepas presentaron sinergia a EDTA siendo 88% del total, por lo que se procedió a comprobar dichas cepas en el laboratorio de Bioanálisis clínico y microbiología de la UNAN-Managua. Por diferentes razones se excluyeron 8 cepas y los 21 restantes cumplieron con los criterios de inclusión del estudio por lo que formaron parte de la muestra a la cual se le realizaron los diferentes análisis descritos en el diseño metodológico.



Gráfico 2

Distribución de genes encontrados en las cepas productoras de carbapenemasas tipo metalo enzimas.



Fuente: Tabla 2.

Se analizaron 21 cepas productoras de carbapenemasas tipo metalo enzimas con la técnica de PCR convencional, previamente confirmadas fenotípicamente por la sinergia producida a EDTA, donde 18 de ellas presentaron el gen NDM-1 representando el 86% del total; 3 de ellas presentaron el gen IMP siendo este el 14% restante; no se encontraron otros genes aparte de los mencionados que codifiquen para resistencia metalo- β -lactamasas buscados en este estudio (VIM, GIM, SPM SIM).

NDM-1 es el último gen reconocido en producir enzimas tipo metalo- β -lactamasas y que desde 2008 han sido reportadas en varias partes del mundo. NDM-1 está localizado en un elemento genético muy móvil además de tener un patrón de difusión más complejo e



impredecible que otro tipo de genes, lo que demuestra por qué está distribuido ampliamente.

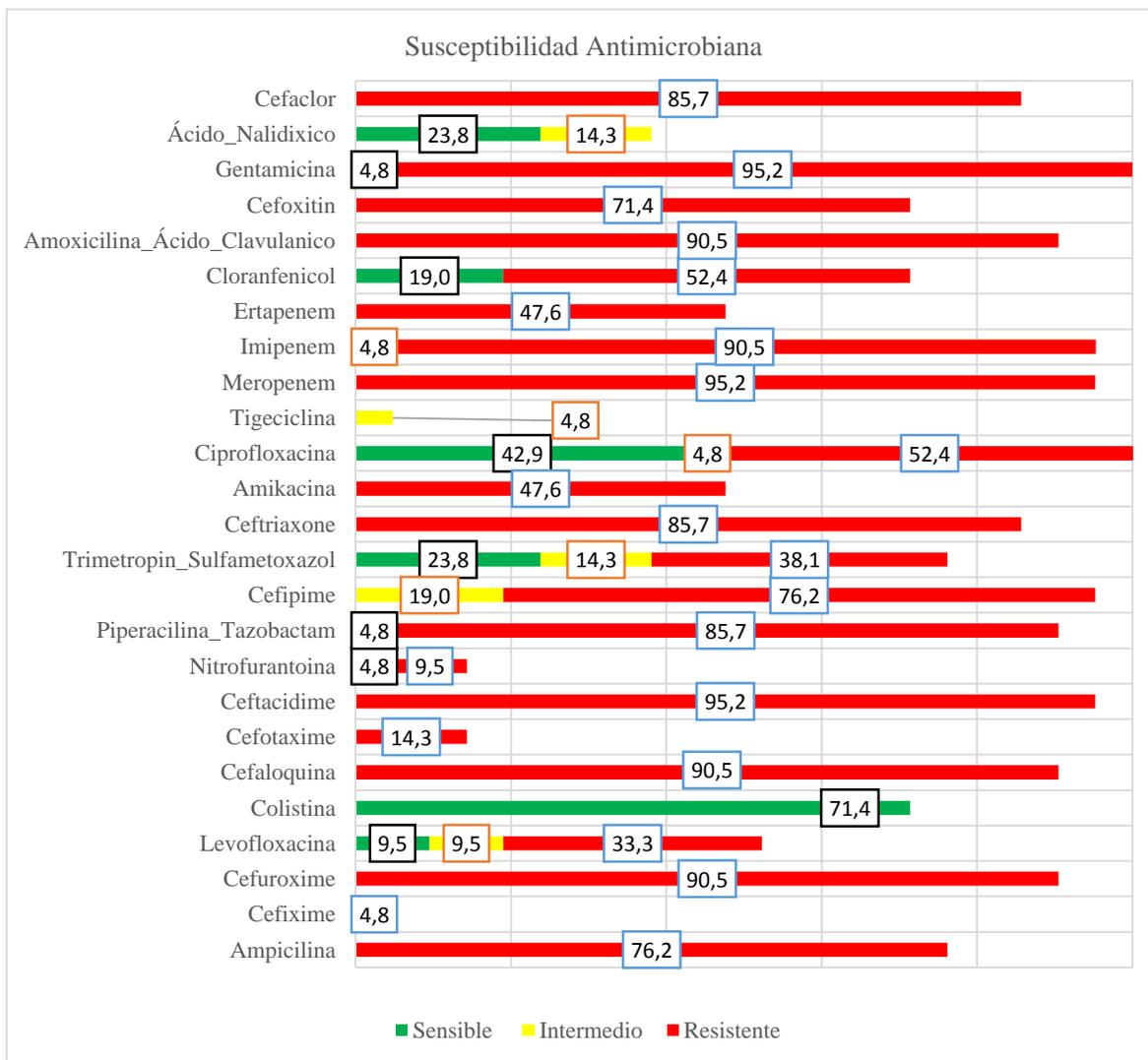
El gen IMP que igualmente fue detectado en cepas productoras de carbapenemasas tipo metalo captadas en el estudio, para las enzimas de clase B carbapenemasas clínicamente importantes la mayoría pertenecen a la serie IMP y VIM, donde en esta investigación se vieron desplazadas por NDM-1 por las características que posee.

Esto debe alertar al sistema de salud pública, ya que la presencia de estos genes implica un incremento en el porcentaje de mortalidad en los casos con estas infecciones debido la falta de opciones terapéuticas que se pueden implementar en el tratamiento y recuperación del paciente.



Gráfico 3

Perfil de resistencia encontrada por fármaco en cepas productoras de carbapenemasas tipo metalo enzimas aisladas en pacientes internados en el Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo enero-septiembre 2017.



Fuente: Libro de registro del Hospital Alemán Nicaragüense.

Para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de pacientes se utilizó el método de difusión por disco; encontrando resistencia en la mayoría de antibióticos utilizados de las diferentes familias.

Se muestra una amplia resistencia en fármacos como Amikacina, PiperacilinaTazobactam y Gentamicina, como en carbapenémicos que son totalmente ineficaces.

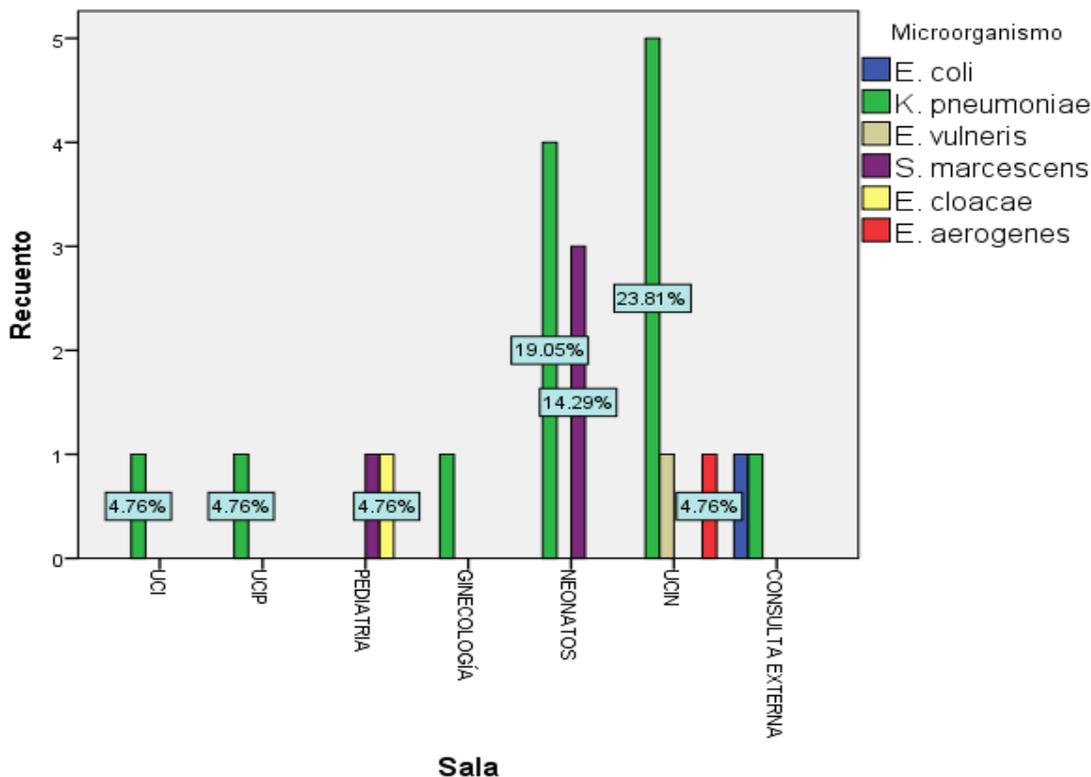


Klebsiella pneumoniae muestra el más amplio perfil de resistencia con respecto a las bacterias encontradas en estudio. No se encontró resistencia relevante a Colistina ya que bacterias correspondientes al género *Serratia spp* y *Enterobacter spp* presentan resistencia natural al fármaco.



Gráfica 4

Relación de microorganismos aislados e identificados con respecto a las salas de atención del hospital Alemán Nicaragüense en el periodo enero-septiembre 2017.



Fuente: Tabla 4

Klebsiella pneumoniae fue el microorganismo de mayor distribución aislado en 6 de las 7 salas. Con mayor incidencia en las salas de atención neonatal/pediátrica de donde provinieron las muestras. *K. pneumoniae* fue encontrado en 13 de las 21 muestras representando el 61.9%. *Serratia marcescens* le sigue en distribución (2 de 7 salas) y en cantidad con 4 de 21 siendo el 19%. En menor distribución y cantidad el resto de la familia Enterobacteriaceae encontradas (*E. coli*, *E. vulneris*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*).

Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por el departamento de pediatría y microbiología en Puducherry, India que estudió el riesgo de sepsis neonatal en 2016, demostró que en áreas de atención interna especialmente en las salas neonatales *K. pneumoniae* es el agente mayormente aislado y el riesgo de infección en neonatos ha aumentado debido a que este patógeno es capaz de sobrevivir en el ambiente intrahospitalario y esparcirse rápidamente, resultando en brotes de infección entre salas.



Gráfica 4.1

Relación de genes encontrados codificando la producción de carbapenemasas tipo metalo con los diferentes microorganismos captados en estudio en el periodo enero-septiembre 2017.

Recuento		Gen		Total
		IMP	NDM	
Microorganismo	<i>E. coli</i>	0	1	1
	<i>K. pneumoniae</i>	0	13	13
	<i>E. vulneris</i>	0	1	1
	<i>S. marcescens</i>	3	1	4
	<i>E. cloacae</i>	0	1	1
	<i>E. aerogenes</i>	0	1	1
Total		3	18	21

Fuente: Tabla 4.1

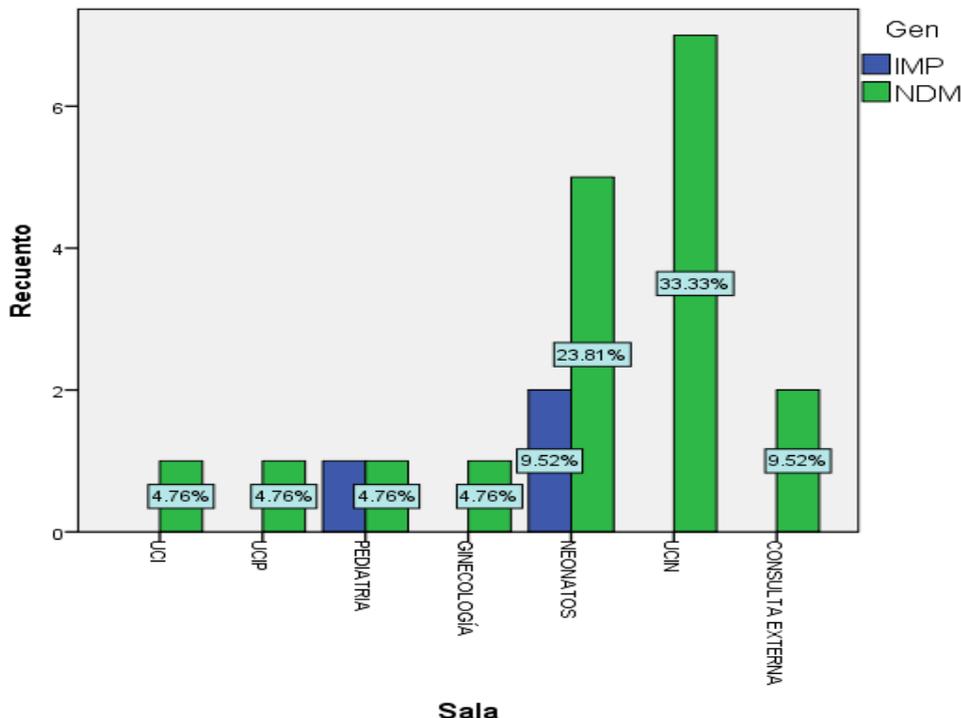
NDM-1 fue el gen codificante de resistencia con mayor frecuencia en las enterobacterias dentro del estudio con 18 muestras totales positivas para NDM de las 21 analizadas (86%). Dentro de los otros genes codificantes de resistencia a Carbapenem solo se presentó IMP en (3/21[14%]) y fue aislado únicamente de *Serratia marcescens*. De las enterobacterias NDM se presentó con mayor incidencia en *Klebsiella pneumoniae*. Esto puede deberse a que además de ser el microorganismo mayormente aislado de las salas del hospital, esta es una bacteria bastante caracterizada por su rápida diseminación en crecimiento y en mecanismos de resistencia. Estos datos son apoyados según los resultados en otras investigaciones con el mismo enfoque.

De acuerdo a la investigación llevada a cabo en Kuwait en 2016 donde se buscaba determinar la alta prevalencia de New Delhi Metallo- β -Lactamase-1 (NDM-1) entre las entero bacterias carbapenem resistentes *Klebsiella pneumoniae* fue encontrado en un 66.6% del total de sus muestras todas ellas con presencia de NDM-1.



Gráfica 4.2

Distribución de salas de las cuales provinieron las muestras con cepas productoras de carbapenemasas y su relación con los genes hallados en el periodo enero-septiembre 2017.



Fuente: Tabla 4.2

El gen IMP se encuentra distribuido en menor cantidad de salas (2/7) y menor porcentaje de frecuencia (14.28%) en comparación a NDM-1 quien está ampliamente distribuido en las siete salas de las que provinieron las muestras del estudio, con una frecuencia mayor en las salas de atención interna como lo son Neonatos y UCIN de 23.81% y 33.33% respectivamente. NDM-1 ha sido caracterizado hasta ahora como un gen de mayor frecuencia en el ambiente intrahospitalario.

El hallazgo de este gen dentro de las salas de atención pediátrica genera gran preocupación, ya que durante la edad neonatal la infección permanece como una causa importante de morbilidad y mortalidad, a pesar de los grandes adelantos en el cuidado intensivo neonatal y el uso de antibióticos de amplio espectro como Colistin se vuelve ineficaz ante este gen, del cual ha sido reportada una resistencia emergente en Corea del Sur y Grecia.



X. CONCLUSIONES

1. Se analizaron cepas resistentes a carbapenémicos aisladas e identificadas dentro de la familia de las enterobacterias de las cuales se estudiaron un total de 21 cepas productoras de carbapenemasas tipo B confirmadas fenotípicamente por método de difusión por triple disco.
2. La frecuencia de los genes encontrados precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo de enero-septiembre, 2017 fue de 86% para NDM-1 y de 14% para IMP teniendo un impacto en el sistema de salud pública por el incremento en el porcentaje de mortalidad atribuido a estos genes.
3. Las cepas estudiadas presentan un amplio perfil de resistencia que incluyen los betalactámicos que se probaron por método difusión en disco. Dichas cepas también presentan resistencia a familias como Aminoglucósidos, Nitrofuranos, Fluoroquinolonas. Se muestra una amplia resistencia en fármacos como Amikacina, Piperacilina Tazobactam y Gentamicina, como en carbapenémicos que son totalmente ineficaces. Esto deja muy en claro las limitadas opciones terapéuticas que dejan este tipo de microorganismo productores de carbapenemasas.
4. El gen IMP se encuentra distribuido con una frecuencia del (14%) en las salas de atención, mientras que NDM-1 está distribuido con mayor amplitud en las siete salas de las que provinieron las muestras del estudio, con una frecuencia mayor en las salas de atención interna como lo son Neonatos y UCIN de 24% y 33% respectivamente. La mayoría de las muestras provinieron de hemocultivos de pacientes en cuidados intensivos y en ellos principalmente fue detectado NDM-1 lo que se relaciona al hecho de que este ha sido caracterizado hasta ahora como un gen de mayor frecuencia en el ambiente intrahospitalario debido a que focos de contaminación y dispersión son más propicios.



XI.RECOMENDACIONES

Referente a Hospital Alemán Nicaragüense:

Prevención de infección y Medidas de control

Las medidas de prevención y control en contra de infecciones nosocomiales están guiadas a los pacientes que tienen y se encuentran infectados con patógenos que poseen genes de resistencia a carbapenémicos.

Además de las precauciones estándar, previsiones dirigidas al contacto deben ser aplicadas.

1. Lavado correcto de manos usando agentes detergentes como jabón, alcohol glicerado.
2. Usar guantes (no rehusados) y bata cuando se tenga contacto cercano/directo con los pacientes entre sala y sala, de igual forma con los líquidos y secreciones obtenidos de estos pacientes.
3. Aislamiento de los pacientes con estos tipos de mecanismos en una sala individual.
4. Limpiar las superficies y alrededores como cloro dilución (1:10). No utilizar los mismos instrumentos de limpieza entre sala y sala y procurar que estos estén limpios siempre que se realice la limpieza de rutina.
5. Respetar las normas de bioseguridad dirigidas a la atención de pacientes, y comportamiento dentro de las salas hospitalarias.
6. Concientizar al personal médico de la gravedad de estos brotes y su relación estrecha con los índices de morbi/ mortalidad.

Referente MINSA:

Métodos de vigilancia y búsqueda epidemiológica

1. Aumentar la participación de laboratorios en sistemas de vigilancia para detecciones tempranas de brotes, con el propósito una guía temprana de medidas de control.
2. Dar a conocer la información y recomendaciones para alertar a los trabajadores de la salud y aquellos a cargo en todos los niveles.
3. Apoyar los temas de investigación universitaria como base para conocer acerca del estado de salud pública, mediante permisos necesarios y facilitar la publicación de estos datos.



XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- A, O. D., Marlú, R., & José, U. (2015). *UNAN EDU*. Recuperado de UNAN EDU: <http://repositorio.unan.edu.ni/1001/1/61019.pdf>
- Aguila, A. (1 de Agosto de 2016). *FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE PANAMÁ*. Recuperado de <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2016/11/Antibiograma.pdf>
- Ariza, B., & León, A. (2013). CARBAPENEMASA NUEVA DELHI TIPO 1 (NDM): DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA, EPIDEMIOLOGIA Y TRATAMIENTO. *Laboratori Actual*, 1-8.
- Ayala, B. E. (2013). Carbapenemas Nueva Delhi tipo 1. *Laboratorio Actual*, 24-25.
- Bernal, M., & Guzman, M. (2010). *EL ANTIBIOGRAMA DE DISCOS. NORMALIZACION DE LA TECNICA DE KIRBY-BAUER*. Recuperado de <file:///C:/Users/RRHH/Downloads/1891-7206-1-SM.pdf>
- Britania Lab. (2015). *Britania Lab*. Obtenido de Britania Lab: http://www.britanialab.com/productos/207_hoja_tecnica_es.pdf
- Calvo, J., Cantón, R., & Mirelis, B. (2010). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recuperado de Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades : <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
- Cantón, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *ELSEVIER DOYMA*, 375-383.
- Centrón, D. (2012). *Facultad de Medicina, Buenos Aires*. Recuperado de <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/teo213.pdf>
- Cercenado, E. (2011). *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España.
- Cifarrelli, M. (25 de Agosto de 2016). *Microbiología a tu alcance*. Recuperado el 2017, de <http://bacterioyalgomas.com.ar/deteccion-fenotipica-de-carbapenemasas-en-enterobacterias/>
- Fernández, F., Jorge, L., Laida, P., & Caridad, M. (2003). *Resistencia Bacteriana*. La Habana: Revista Cubana Médico Militar.
- Fresnadillo, M., García, M., García, E., & García, J. (2010). Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *ELSEVIER DOYMA*, 53-64.
- García, J. (2015). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recuperado de Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>



- Gobernado, M., & Acuña, C. (2007). ERTAPENEM. *Revista Española Quimioterapia*, 277-299.
- Gordillo Mata, M. (2011). *Alerta para detección fenotípica de carbapenemasas en Microbiología*. Hospital Roosevelt.
- Gordillo Mata, M. (2011). *Alerta para detección fenotípica de carbapenemasas en Microbiología*. Hospital Roosevelt.
- Guerriero, L. (2015). *Antimicrobianos* .Recuperado de Antimicrobianos : <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/09/CARBAPENEMASA-TIPO-OXACILINASAS.pdf>
- Gutiérrez, L. F. (30 de Abril de 2016). *Aprende en Línea*. Recuperado de Aprende en Línea: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100920>
- Jiménez, J. N. (07 de Septiembre de 2016). *Research Gate*. Recuperado de Research Gate: https://www.researchgate.net/publication/307882268_Variaciones_al_Test_de_Hodge_modificado_para_la_deteccion_de_carbapenemasas_en_Pseudomonas_aeruginosa_Variations_in_the_modified_Hodge_test_to_detect_carbapenemase_production_in_Pseudomonas_aeruginosa
- Jorge, C., Rafael, C., Felipe, F., Beatriz, M., & Ferran, N. (2011). *SEIMC.ORG*. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
- Lamas, L. M. (s.f.). *Microbiología y Salud*. Recuperado de Microbiología y Salud: http://www.microbiologiaysalud.org/wp-content/uploads/2014/07/g_Pon8_Deteccion_de_carbapenemasas_resumen_AMYS.pdf
- M. TERESA DOSSI C.1, M. E. (2002). *Serratia marcescens*: Descripción de un brote de infección intrahospitalaria. *Revista chilena de infectología*.
- Malajovich, M. A. (s.f.). *bteduc*. Recuperado de bteduc: [https://bteduc.com/guias_es/68_Extraccion_de_ADN_\(experimento_ambiguo\).pdf](https://bteduc.com/guias_es/68_Extraccion_de_ADN_(experimento_ambiguo).pdf)
- Monge, K. M. (2013). CARBAPENÉMICOS: TIPOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANOS. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXX* , 1-7.
- Morejon, M. (2012). *Carbapenemasas, una amenaza actual*. La Habana, Cuba.: Hospital Clínico Quirúrgico Dr. Manuel Fajardo.
- Moreno, K. (2013). Carbapenemico: Tipos y mecanismos de resistencia . *Revista Medica de Costa Rica y Centroamérica*, 2-7.



- Nasr, A., Decré, D., & Compain, F. (2013). Emergence of NDM-1 in Association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4089-4090.
- Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gram negativos. *Elsevier Doyma*, 11.
- NHI. (21 de octubre de 2015). *National Human Genome*. V de National Human Genome: <https://www.genome.gov/27562618/reaccin-en-cadena-de-la-polimerasa-rcp/>
- Organización Mundial de la Salud. (Septiembre de 2016). Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Paciel, D., & Seija, V. (2011). infectologia.edu.uy. *Revista Tendencias*, 1-9.
- PAHO. (2011). *Organización Panamericana de la Salud*. Recuperado de Organización Panamericana de la Salud: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6309%3A2011-22-november-2011-first-finding-carbapenemases-type-new-delhi-metallo-lactamase-ndm&catid=2103%3ARecent-epidemiological-alerts-updates&Itemid=42346&lang=es
- Paterson. (2008). Clinical Infectious Disease. *Sociedad Española de Quimioterapia*, 46.
- Paterson DL, D. (2008). Quimioterap: Clinical Infectious Diseases. *Sociedad Española de Quimioterapia*, 46.
- Rodríguez, M., & García, A. (2010). *facmed.unam.mx*. Recuperado de *facmed.unam.mx*: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf
- Suarez, C., Kattán, J., & Villegas, M. (2006). *Mecanismos de resistencia a carbapenems en P. aeruginosa, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control*. Cali: Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas.
- Vargas, E., Reyes, Gutierrez, & Villegas. (26 de septiembre de 2016). *Tandfonline.com*. Obtenido de *Tandfonline.com*: http://www.tandfonline.com/eprint/bD9FbkkSBaAzKrdRIwQn/full#_i10
- Vignoli, R., & Seija, V. (2008). Principales Mecanismos de Resistencia Antibiótica. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (págs. 649-662). Uruguay: Oficina del Libro FEFMUR.



ANEXOS



FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA UNAN-MANAGUA IPS		
Ficha de recolección de datos para estudio de frecuencia de genes tipo metalo en Enterobacterias asiladas de pacientes del Hospital Alemán Nicaragüense		
Datos del paciente		N°
N° de Expediente clínico:		
Sala:		
Datos de muestra		
Código asignado por laboratorio de Biología Molecular		
Microorganismo identificado (género y especie)		
Tipo de muestra	Hemocultivo	
	Urocultivo	
	Coprocultivo	
	Heridas y Abscesos	
	Líquidos	
Fenotipo	Serino ____ Metalo ____ OXA ____	
Gen	IMP ____	SIM ____
	VIM ____	GIM ____
	SPM ____	NDM ____
Antibióticos utilizados	Ampicilina	
	Piperacilina Tazobactam	
	Cefixime	
	Cefuroxime	
	Cefipime	
	Aztreonan	
	Meropenem	
	Imipenem	
Ertapenem		



	Levofloxacin	
	Ofloxacin	
	Minocycline	
	Tetracycline	
	Ticarcycline	
	Cloranfenicol	
	Colistin	
	Trimetropin/sulfametoxazol	
	Amoxicilina/ácido clavulánico	
	Cefaloquina	
	Cefotetan	
	Cefoxitin	
	Cefotaxime	
	Ceftriaxone	
	Ceftacidime	
	Amikacina	
	Gentamicina	
	Ácido nadilixico	
	Ciprofloxacin	
	Norfloxacin	
	Tigeciclina	
	Nitrofurantoina	
	Cefaclor	



TABLAS

Tabla 1: Comprobación fenotípica de la muestra analizada en el periodo enero-septiembre 2017.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Carbapenemasa tipo metalo (sinergia con EDTA)	21	63.6	63.6
Carbapenemasa sin identificar	4	12.1	12.1
Muestra Fuera del Hospital	2	6.1	6.1
Muestra perdida	5	15.2	15.2
Muestra contaminada	1	3	3
Total	33	100%	100%

Fuente: Registros del HAN y resultados de laboratorio.

Tabla 2: Frecuencia de genes productores de carbapenemasas tipo metalo enzimas encontrados en muestras analizadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el periodo enero-septiembre 2017.

Genes	Frecuencia	Porcentaje (%)
IMP	3	14.3
NDM	18	85.7
GIM	0	0.0
VIM	0	0.0
SPM	0	0.0
SIM	0	0.0
Total	21	100.0

Fuente: Resultados de laboratorio de Biología Molecular

Tabla 3: Susceptibilidad Antimicrobiana de las cepas tomadas como muestra para el estudio, tomadas del libro de registros del Hospital Alemán Nicaragüense en el periodo enero-septiembre 2017.

Susceptibilidad Antimicrobiana	Sensible		Resistente		No aplica		Total
	Frec.	(%)	Frec.	(%)	Frec.	(%)	
Ampicilina	0	0	16	76.2	5	23.8	21
Cefixime	0	0	1	4.8	20	95.2	21
Cefuroxime	0	0	19	90.5	2	9.5	21
Levofloxacin	2	9.5	9	42.9	10	47.6	21
Ticarciclina	0	0	0	0	21	100	21
Colistina	14	71.4	4	19	3	9.5	21
Cefaloquina	0	0	2	9.5	19	90.5	21



Frecuencia de los genes precursores de carbapenemas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense. Enero-septiembre, 2017

Cefotaxime	0	0	3	14.3	18	85.7	21
Ceftacídime	0	0	20	95.2	1	4.8	21
Norfloxacina	0	0	0	0	21	100	21
Nitrofurantoina	1	4.8	2	9.5	18	85.7	21
PiperacilinaTazobactam	1	4.8	18	85.7	2	9.5	21
Cefipime	0	0	19	90.5	2	9.5	21
Aztreonan	0	0	0	0	21	100	21
Ofloxacina	0	0	0	0	21	100	21
Tetraciclina	0	0	0	0	21	100	21
TrimetropinSulfametoxazol	5	23.8	11	52.4	5	23.8	21
Cefotetan	0	0	0	0	21	100	21
Ceftriaxona	0	0	18	85.7	3	14.3	21
Amikacina	0	0	10	47.6	11	52.4	21
Ciprofloxacina	9	42.9	12	57.1	0	0	21
Tigeciclina	0	0	1	4.8	20	95.2	21
Meropenem	0	0	20	95.2	1	4.8	21
Imipenem	0	0	20	95.2	1	4.8	21
Ertapenem	0	0	10	47.6	11	52.4	21
Minociclina	0	0	0	0	21	100	21
Cloranfenicol	4	19	11	52.4	6	28.6	21
Amoxicilina Ácido Clavulánico	0	0	19	90.5	2	9.5	21
Cefoxitin	0	0	15	71.4	6	28.6	21
Gentamicina	1	4.8	20	95.2	0	0	21
Ácido Nalidixico	5	23.8	15	71.4	1	4.8	21
Cefaclor	0	0	18	85.7	3	14.3	21

Fuente: Libro de registros Hospital Alemán Nicaragüense

Tabla 4: Relación de microorganismos aislados e identificados con respecto a las salas de atención donde fueron encontrados en el periodo enero-septiembre 2017.

Microorganismos	Sala							Total
	UCI	UCIP	PEDIATRIA	GINECOLOGÍA	NEONATOS	UCIN	CONSULTA EXTERNA	
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	0	1	4	5	1	13
<i>E. vulneris</i>	0	0	0	0	0	1	0	4
<i>S. marcescens</i>	0	0	1	0	3	0	0	1



Frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense. Enero-septiembre, 2017

<i>E. cloacae</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>E. aerogenes</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Total</i>	1	1	2	1	7	7	2	21

Fuente: Ficha de recolección de datos (Registros HAN)

Tabla 4.1: Microorganismo vs Gen

Recuento		Gen		Total
		IMP	NDM	
Microorganismo	<i>E. coli</i>	0	1	1
	<i>K. pneumoniae</i>	0	13	13
	<i>E. vulneris</i>	0	1	1
	<i>S. marcescens</i>	3	1	4
	<i>E. cloacae</i>	0	1	1
	<i>E. aerogenes</i>	0	1	1
Total		3	18	21

Fuente: Resultados de laboratorio de Biología Molecular

Tabla 4.2: Sala vs Gen

Recuento		Gen		Total
		IMP	NDM	
Sala	UCI	0	1	1
	UCIP	0	1	1
	PEDIATRIA	1	1	2
	GINECOLOGÍA	0	1	1
	NEONATOS	2	5	7
	UCIN	0	7	7
	CONSULTA EXTERNA	0	2	2
Total		3	18	21

Fuente: Resultados de laboratorio de Biología Molecular



Tabla 5: Frecuencia de salas donde se encontraban las muestras tomadas para el estudio.

Sala	Frecuencia	Porcentaje
UCI	1	4.8%
UCIP	1	4.8%
PEDIATRIA	2	9.5%
GINECOLOGÍA	1	4.8%
NEONATOS	7	33.3%
UCIN	7	33.3%
CONSULTA EXTERNA	2	9.5%
Total	21	100.0%

Fuente: Ficha de recolección de datos (Registros HAN)

Tabla 6: Frecuencia de microorganismos captados en el estudio que cumplieron con los criterios de inclusión.

Microorganismo Aislado	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	1	4.8%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	61.9%
<i>Enterobacter vulneris</i>	1	4.8%
<i>Serratia marcescens</i>	4	19.0%
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	4.8%
<i>Enterobacteraerogenes</i>	1	4.8%
Total	21	100.0%

Fuente: Ficha de recolección de datos (Registros HAN)

Tabla 7: Tipo de muestra vs Gen

Recuento				
		Gen		Total
		IMP	NDM	
Tipo de muestra	Hemocultivo	2	12	14
	Urocultivo	0	3	3
	Líquidos y Secreciones	1	3	4
Total		3	18	21

Fuente: Resultados de laboratorio de Biología Molecular



Tabla 8: Control de cepas que no entraron en estudio.

Código Cepa Laboratorio HAN	Código Libro de registro HAN	Tipo de muestra	Bacteria	Sala	Criterio de exclusión
1-1-64	408-2017	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	UCIN	Perdida
1-1-65	409-10-2017	Hemocultivo	<i>E. cloacae</i>	Hospital Roberto Calderón	Carbapenemasa (+) tipo metalo/ muestra fuera del hospital alemán
1-1-71	611-2017	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	Neonato	Perdida
1-1-73	1155-2017	Hemocultivo	<i>E. cloacae</i>	Neonato	Perdida
1-1-76	1309-2017	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	Neonato	Carbapenemasa (+) sin sinergia con EDTA
1-1-77	1332-2017	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	Neonato	Carbapenemasa (+) sin sinergia con EDTA
1-1-78	1445-1446-2017	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	Hospital Roberto Calderón	Carbapenemasa (+) tipo metalo/ muestra fuera del hospital alemán
1-1-81	857-2017	Urocultivo	<i>E. fergusonii</i>	UCI	Carbapenemasa (+) sin sinergia con EDTA
1-2-2	1937-2017	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	Pediatría	Carbapenemasa (+) sin sinergia con EDTA
1-2-10	2514-2017	Hemocultivo	<i>E. coli</i>	Neonato	Contaminada
1-2-12	3073-2017	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	UCIP	Perdida
1-2-14	834-2017	Heridas y abscesos	<i>E. coli</i>	Ginecología	Perdida

Fuente: Ficha de recolección de datos (Registros HAN)



Tabla 9: Cuantificación de producto ADN extraído de muestras analizadas en el periodo enero-septiembre 2017.

Código de cepa	Concentración de ADN (ng/ μ l)	Absorbancia (1.8-2.0)
17089	106.0	1.74
17090	132.8	1.91
17091	218.5	1.87
17092	441.3	1.57
17093	162.7	1.95
17094	158.8	1.78
17095	198.0	1.66
17096	141.4	1.56
17097	138.0	1.35
17098	172.8	1.56
17099	194.9	1.45
17100	253.6	1.89
17101	118.6	1.56
17102	413.1	1.51
17103	254.1	1.92
17104	284.3	1.57
17105	383.2	1.58
17106	417.8	1.61
17107	141.9	1.85
17108	174.1	1.73
17109	468.7	1.79

Fuente: Resultados de laboratorio de Biología Molecular



IMÁGENES

Materiales e Instrumentos Utilizados



Hisopos esteriles



Mechero de Bunsen



Agar MCK



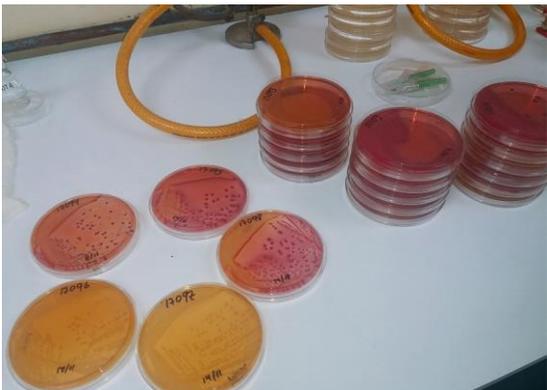
Platos con agar Muller Hinton



Sensidiscos IMP, MER



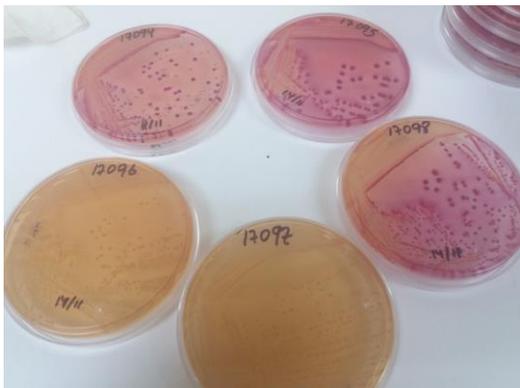
Recuperación de Cepas (Agar MCK)



*Agar MCK inoculado con las cepas
En estudio*

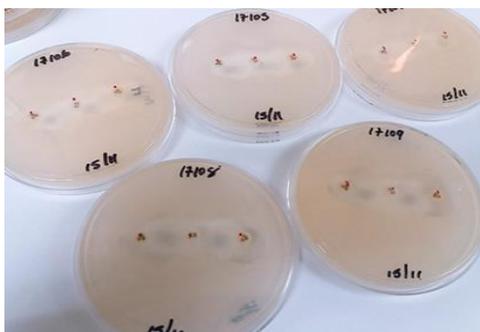


*Agar MCK inoculado con las cepas
En estudio*





Sinergia con EDTA (Detección Fenotípica de Carbapenemasa tipo Metal)



Sinergia positiva

(Efecto huevo entre dos carbapenémicos e inhibidor EDTA)



Sinergia positiva

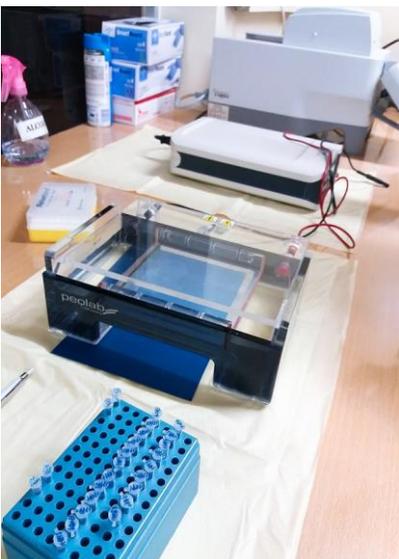
Sinergia positiva



Sinergia positiva



Amplificación de ADN bacteriano



Instalacion previa de caja para realizar corrida de electroforesis



Termociclador Eppendorf

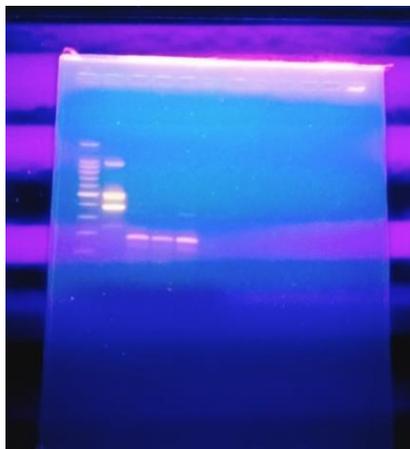


Lectura de resultados.

Electroforesis en gel de agarosa.



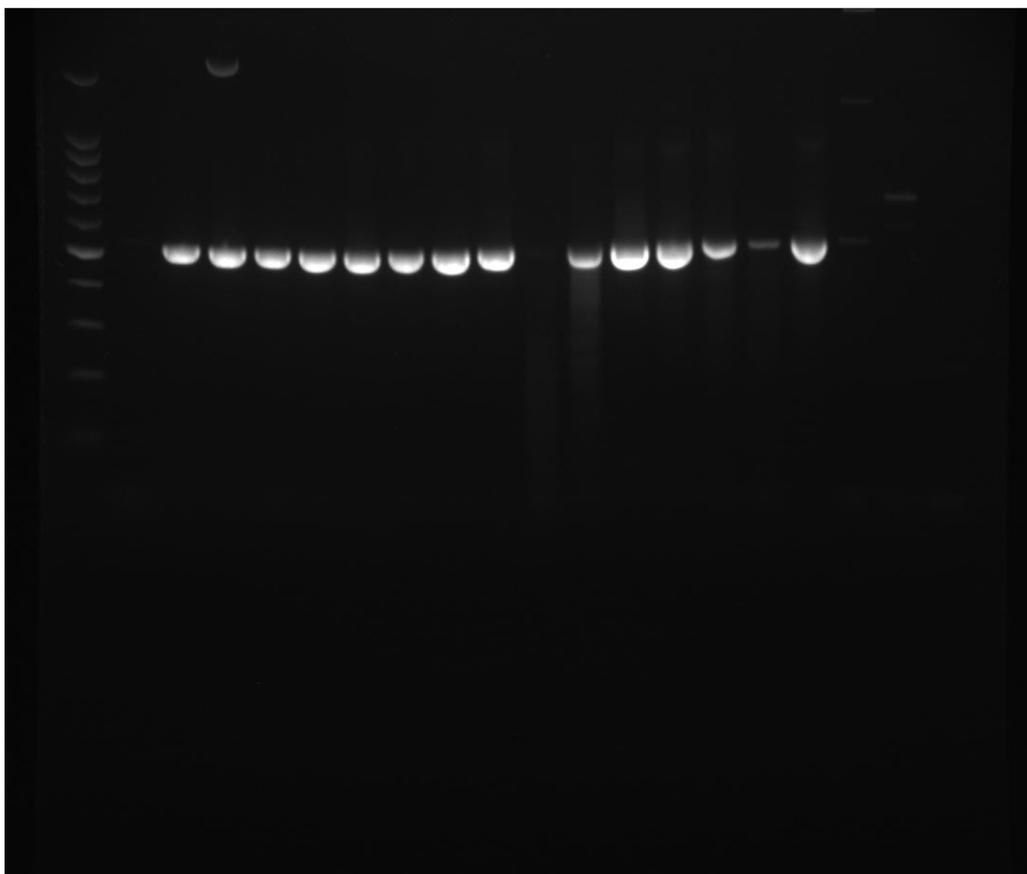
(Gen NDM Muestras 17089 – 17103)



*(Muestras: 17096, 17104, 17107;
Positivas para IMP)*



(Muestras: 17096, 17104, 17107; Negativas para NDM)



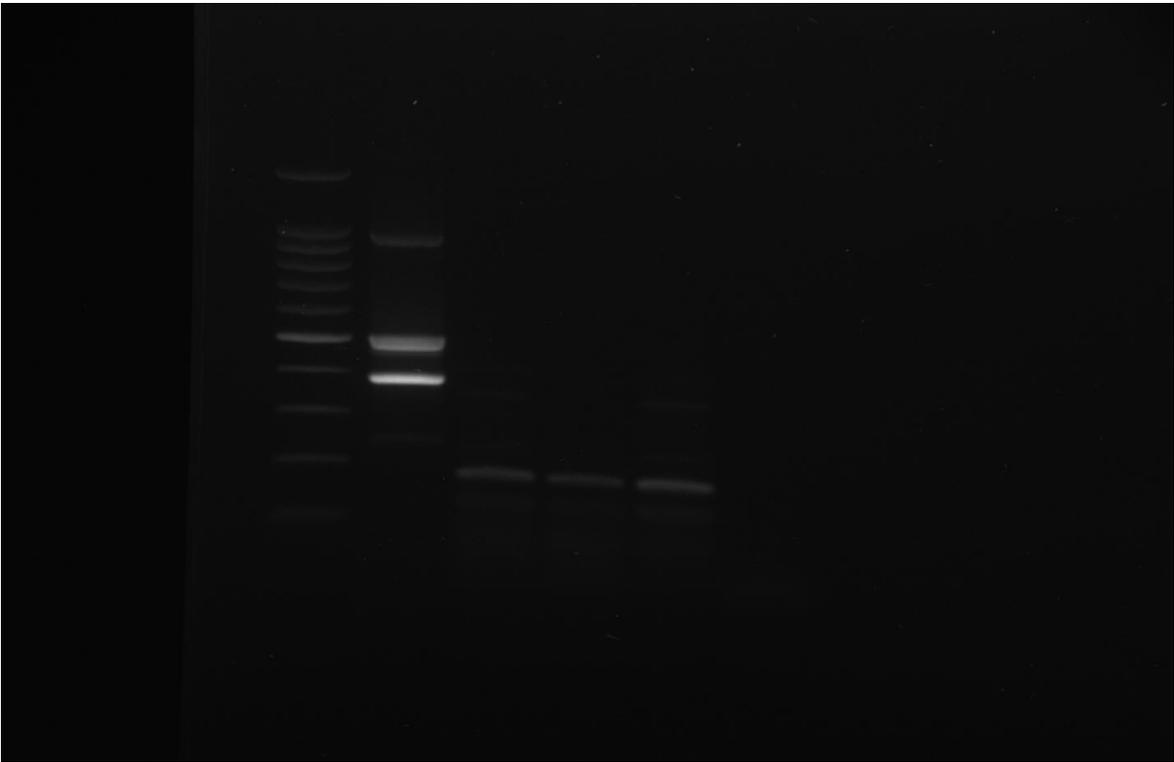
Lectura de Resultados para NDM de izquierda a derecha (Escalera, Control Positivo NDM 1-1-8, Muestras 17089-17103, Control Negativo H₂O)*



Lectura de Resultados para NDM de izquierda a derecha (Escalera, Control Positivo NDM 1-1-8, Muestras 17096, 17103 – 17109, Control Negativo H₂O)*



Lectura de Resultados para NDM de izquierda a derecha (Escalera, Control Positivo NDM 1-1-8, Muestras 17096, 17104, 17107, Control Negativo H₂O)*



Lectura de Resultados para Genes Metalo de izquierda a derecha (Escalera, Control Positivo GIM, VIM 17010, Muestras 17096, 17104, 17107, Control Negativo H2O)*



GLOSARIO

Amp-C: Enzimas pertenecientes de forma natural en algunas enterobacterias y bacilos Gram negativos, son capaces de resistir la inhibición por ácido clavulánico.

Bacteriostático: Antibióticos que inhiben la reproducción bacteriana sin llegar a destruirlos.

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido, son enzimas que hidrolizan o inactivan a las cefalosporinas y monobactames.

Carbapenemasa: Enzimas pertenecientes a la familia Betalactamasa que inactivan los carbapenémicos, ocasionando una resistencia a todo este grupo de antimicrobianos.

Cassette: Secuencia de ADN que contiene uno o más genes con funciones en común.

EDTA: Ácidoetilendiaminotetraacético.

Gen: Es un segmento corto de ADN, que informa a un microorganismo cuando producir una proteína específica.

GIM: German Imipenemasa

Hidrólisis: Destrucción, descomposición o alteración de sustancias químicas por efecto del agua.

IMP: Imipenemasa.

MBL: Metalo β -lactamasa, enzimas con iones de zinc en su sitio activo, caracterizadas por hidrolizar carbapenémicos e inhibidores de β -lactámicos como ácido clavulánico y tazobactam, pero susceptibles a la inhibición por agentes quelantes como EDTA.

NDM: Nueva Delhi Metalo β -lactamasa.

PBP's: Proteínas unidoras de penicilina.

Plásmidos: Son moléculas de ADN extra cromosómico, circular o lineal que pueden replicarse de forma independiente en una bacteria.

SIM: SeullImipenemasa



SPM: Sao Pablo Metalo β -lactamasa.

Transposones: Secuencia de ADN, que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula.

UCI: Unidad de cuidados intensivos.

UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales.

UCIP: Unidad de cuidados intensivos pediátricos.

VIM: Verona Integron Metalo β -lactamasa.



VALORACIÓN DEL TUTOR

A pesar de que la resistencia bacteriana es un fenómeno evolutivo natural, la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos en los últimos 70 años ha acelerado su ritmo mucho más que lo ocurrido en millones de años anteriores. Múltiples mecanismos de resistencia han desarrollado las bacterias en su evolución; producción de enzimas inactivadoras, mutación de sitios de acción, bomba de expulsión, etc. La producción de carbapenemasas, enzimas inactivadoras de carbapenémicos, es uno de los más recientes, pero quizás de los más preocupantes, ya que inactivan prácticamente al último escalón terapéutico frente a microorganismos Gram negativos multirresistentes.

Considero que el trabajo monográfico, frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense. Enero-septiembre, 2017, este tema es de gran importancia por la situación de nuestros hospitales, por tantas violaciones a las normativas de higiene y seguridad, el aumento de la resistencia es un problema de salud global.

Este trabajo monográfico está listo para ser dictaminada por los especialistas, reúne todo los requerimientos científicos y metodológicos, solo esperando los aportes, para ser retomados.

Tutor.

Msc. Oscar Arbizú Medina.
Profesor BAC y Microbiología
IPS UNAN- MANAGUA.



VALORACIÓN DEL ASESOR

La resistencia presentada en los microorganismos de importancia clínica pertenecientes a distintas familias y especies ha aumentado de manera constante. La producción de carbapenemasas, enzimas inactivadoras de carbapenémicos, es uno de los más recientes, pero quizás de los más preocupantes mecanismos de resistencia ya que inactivan prácticamente al último escalón terapéutico frente a microorganismos Gram negativos multirresistentes. Actualmente cepas productoras de carbapenemasas han sido aisladas y reportadas en numerosos países lo que obliga a crear sistema de detección y vigilancia de las mismas, sin embargo, se dispone de datos limitados sobre la producción de estas en cepas clínicas de Nicaragua. Por lo cual, es necesario la realización de estudios como el presente.

Considero que el trabajo monográfico, frecuencia de los genes precursores de carbapenemasas tipo metalo enzimas en Enterobacterias aisladas de muestras clínicas del Hospital Alemán Nicaragüense. Enero-septiembre, 2017, es tema de gran importancia por la situación presentada en los hospitales del país, debido a las constantes violaciones a las normativas de higiene y seguridad.

Este trabajo monográfico está listo para ser dictaminada por los especialistas, reúne todo los requerimientos científicos y metodológicos, solo esperando los aportes, para ser retomados.

Tutor.

Msc. Francisco Romero.

Microbiología Médica