



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA**

UNAN - MANAGUA

**Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada”
Departamento de Bioanálisis Clínico**

**Trabajo monográfico para optar al título de:
Licenciado en Microbiología**

Tema:

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO BLUE CARBA PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE
CARBAPENEMASAS TIPO METALOBETALACTAMASAS EN CEPAS DE BACILOS
GRAM NEGATIVOS PROCEDENTES DE LOS DIFERENTES HOSPITALES
PERTENECIENTES A LA RED NICARAGÜENSE PARA LA VIGILANCIA DE LA
RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.**

Autores:

- Br. Arias Peña Luis Miguel.
- Br. Bracamonte Nicaragua Álvaro Otoniel.

Tutora:

Lic. Julissa Ávila Acuña.
Licenciada en Bioanálisis Clínico. UNAN-Managua

Asesora:

Lic. Lissette Sandoval Lira.
Licenciada en Bioanálisis Clínico. UNAN-León

Managua, 9 de abril del 2019

¡A la libertad por la Universidad!

Agradecemos a:

Dios por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser sus hijos, son los mejores padres.

Al CNDR por abrirnos las puertas y darnos la oportunidad de realizar este estudio.

A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito, en especial a la Lic. Julissa Ávila, Lic. Lissette Sandoval y al Lic. Fransisco Caldera por compartir sus conocimientos.

Dedicado a:

Dios, por brindarme la vida, la sabiduría, la fuerza y la paciencia para llegar hasta este punto y culminar con éxito este objetivo.

Mi madre Ángela del Carmen Obando, por los consejos y valores inculcados a lo largo de mi vida, especialmente en estos últimos años y por confiar siempre en mí.

Mi abuela María Consuelo Obando, por su amor y cariño incondicional.

Mi sobrina Sofía Elizabeth Obando A., por ser ese rayito de luz que alumbra mi vida.

Mis compañeros de clases, esa familia universitaria, por haber compartido su tiempo, amistad y conocimiento a lo largo de la carrera.

Mis amigos, hermanos de otra madre, por apoyarme en los momentos de difíciles de manera incondicional.

Especialmente a esos amigos que no pudieron culminar la carrera con nosotros.

Y. J. Ú. T. B. N. R. S. G. A. G. G.

~Luis Miguel A. Peña.

Dedicado a:

Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Mis padres.

Ángela Nicaragua y Silvestre Bracamonte por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por los ejemplos de perseverancia, constancia que lo caracterizan, por el valor mostrado para salir adelante, pero más que nada por su cariño.

Mi tío.

Julio Nicaragua, por su apoyo incondicional a lo largo de mis años académicos y por demostrarme la fe que tiene en mí.

Amigos y compañeros de clases.

Por compartir tiempo, experiencias y por apoyarnos mutuamente en nuestra formación profesional, En especial a: M.A.C.N. G.A.G.G. B.N.R.S. y Y.J.U.T.

~Álvaro O. Bracamonte Nicaragua.

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue la validación de la prueba bioquímica-colorimétrica Blue Carba, para ello se recolectaron cepas remitidas por los laboratorios pertenecientes a La Red Nicaragüense para la Vigilancia de los Antimicrobianos al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR-MINSA), las que se lograron identificar mediante las distintas pruebas bioquímicas. Se trabajaron 100 cepas de las cuales 80 eran portadoras de Carbapenemasas y 20 no; 51 eran Enterobacterias y 49 No Fermentadores (*A. baumannii* $n=17$ y *P. aeruginosa* $n=32$), específicamente, las cuales fueron previamente procesadas y confirmadas mediante pruebas bioquímicas, pruebas de susceptibilidad por el método de Kirby Bauer, test de sinergismo con EDTA, Blue Carba y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por punto final.

De las cepas de *A. baumannii* el 100% presentó resistencia a los carbapenémicos y solo sensibilidad en un 78% a Minociclina (MNO) y en un 100% a Tigeciclina (TGC) y Colistina (COL). En *P. aeruginosa* el 84% presentó resistencia a los carbapenémicos y el 16% presentó sensibilidad a las cefalosporinas, de estas el 3 % resultó sensible a los carbapenémicos, esto debido a que el 13% restante presentaba Impermeabilidad pura. De las Enterobacterias solo el 70.5% presentaba resistencia a los carbapenémicos y de las 100 cepas estudiadas el 95% presentaron sensibilidad a COL, exceptuando las cepas de *S. marcescens* (4%) y *P. penneri* (1%).

Del total de cepas no portadoras de carbapenemasas, 14 al someterse a PCR presentaron Genes para BLEE, 2 para AMP-C+BLEE y 5 de Impermeabilidad pura, todas estas cepas dieron resultado negativo en la prueba blue Carba, el 78% presentaban genes del tipo Metalobetalactamasas específicamente para VIM, IMP y NDM y el 1% quedó indefinido, pero al someterse al Test colorimétrico el 79% dio positivo, que nos dio como resultado una sensibilidad y especificidad del 99.9% y 95% respectivamente.

Con los resultados obtenidos, podemos recomendar la aplicación de esta prueba, ya que es esencial en el diagnóstico del laboratorio.

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMC: Amoxicilina-Ácido clavulánico

AMK: Amikacina

AMP: Ampicilina

AMP-C: Cefalosporinas de clase C.

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido.

CAZ: Ceftazidima

CEC: Cefaclor

CHL: Cloranfenicol

CIM: Concentración Mínima Inhibidora

CIP: Ciprofloxacina

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

CNDR: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia

COL: Colistín

CPP: Cociente de Probabilidad Positivo

CPN: Cociente de Probabilidad Negativo

CRO: Ceftriaxona

CTX –M: Cefotaximasa

CXM: Cefuroxima

dNTPs: Desoxirribonucleótidos libres

E: Especificidad

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EE. UU: Estados Unidos de América

ERT: Ertapenem

FEP: Cefepime

FN: Falso Negativo

FP: Falso Positivo

FOX: Cefoxitina

GEN: Gentamicina

H₂S: Ácido sulfhídrico

HAC: Hospital Aldo Chavarría.

HALF: Hospital Antonio Lenin Fonseca

HAN: Hospital Alemán Nicaragüense

HEODRA: Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales.

HGGL: Hospital Gaspar García Laviana

HHA: Hospital Humberto Alvarado.

HIMJR: Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera, La Mascota.

HLFM: Hospital Luis Felipe Moncada.

HRAJ: Hospital Regional Asunción Juigalpa.

HRC: Hospital Roberto Calderón.

HSJD: Hospital San Juan de Dios.

HSOL: Hospital Solidaridad.

HVM: Hospital Victoria Mota.

I: Intermedio

IE: Índice de Exactitud

IAAS: Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria

IMP: Imipenem

IMP: Imipenemasa

ITU: Infecciones del tracto Urinario

IY: Índice de Youden

KES: *Klebsiella spp. Enterobacter spp. Serratia spp.*

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa

LVX: Levofloxacin

MBL: Metalobetalactamasas

MER: Meropenem

NAL: Ácido Nalidíxico

NDM: New Delhi Metalobetalactamasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OXA: Oxacilinas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

R: Resistente

S: Sensible/Sensibilidad

SAM: Ampicilina Sulbactam

SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol

TAE O TBE: Tris- borato-EDTA

TGC: Tigeciclina

TZP: Piperacilina- Tazobactam

UFC: Unidad formadora de colonias

VIM: Verona Imipenemasa

VP: Verdaderos Positivos

VPP: Valor Predictivo Positivo

VN: Verdaderos Negativos

VPN: Valor Predictivo Negativo

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	6
4. Planteamiento del problema	7
5. Objetivo General	8
6. Marco teórico	9
6.1. Bacilos Gram negativos	9
6.1.1. Pruebas bioquímicas	9
6.2. Enterobacterias	14
6.2.1. Características.	15
6.2.2. Epidemiología.	15
6.3. No fermentadores	16
6.3.1. Acinetobacter baumannii	16
6.3.2. Pseudomonas aeruginosa.	16
6.4. Antimicrobianos	17
6.4.1. Betalactámicos.	17
6.4.1.1. Penicilinas.....	18
6.4.1.2. Cefalosporinas.....	18
6.4.1.3. Monobactámicos.	18
6.4.1.4. Carbapenémicos.	19
6.4.1.5. Inhibidores de Betalactamasas.	19

6.4.2. Aminoglucósidos.....	20
6.4.3. Polipéptidos.....	21
6.4.4. Quinolonas.	22
6.4.5. Sulfonamidas.....	22
6.4.6. Trimetroprimas.....	23
6.4.7. Fenicoles.	23
6.4.8. Nitrofuranos.	24
6.4.9. Tetraciclinas.	24
6.5. Mecanismos de resistencia de las Enterobacterias.....	25
6.5.1. Betalactamasas.	26
6.5.1.1. Clasificación.....	26
6.6. Métodos de detección de carbapenemasas	32
6.6.1. <i>Teste de sinergismo con inhibidores</i>	32
6.6.1.1. Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA).	32
6.6.1.2. Ácido fenil Borónico (APB).	32
6.6.2. <i>Test de Hodge más Tritón</i>	32
6.6.3. <i>Blue Carba</i>	33
6.6.4. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	33
6.7. Parámetros para la validación del método cualitativo Blue Carba.....	35
6.7.1. Sensibilidad.....	35
6.7.2. Especificidad.....	35

6.7.3. Valor Predictivo Positivo (VPP).....	36
6.7.4. Valor Predictivo Negativo (VPN).....	36
6.7.5. Cociente de Probabilidad Positivo (CPP).....	36
6.7.6. Cociente de probabilidad Negativo (CPN).....	37
6.7.7. Índice de exactitud (IE).....	37
6.7.8. Índice de Youden (IY).....	37
7. Diseño metodológico.....	38
8. Operacionalización de variables.....	47
9. Análisis e interpretación de los resultados.	50
10. Conclusiones.....	60
11. Recomendaciones	62
12. Bibliografía.....	63
Anexos	

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas en los últimos tiempos han mantenido un lugar preferencial en el área médica, sobre todo por la aparición de microorganismos capaces de adaptarse y sobrevivir en muchas superficies hostiles para su crecimiento. Por otra parte, el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro ha incrementado la resistencia a los antimicrobianos y la circulación de cepas multi-resistentes en los ambientes hospitalarios, situación que dificulta el manejo de pacientes hospitalizados. Velazco, et al. (2011)

Dentro de los mecanismos de resistencias que han adquirido las bacterias gram negativas se encuentran las BLEE y las AMP-C, estas enzimas le confieren resistencia a un sinnúmero de fármacos betalactámicos, dejando como última opción terapéutica los carbapenémicos. Debido a la interacción entre diversas bacterias, surgieron nuevas enzimas capaces de hidrolizar a dichos fármacos.

Las carbapenemasas son las enzimas producidas por bacterias Gram negativas capaces de inactivar los antibióticos Betalactámicos como las Penicilinas, Cefalosporinas, Aztreonam y Carbapenémicos. Dichas enzimas suelen estar asociadas a bacterias responsables de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, entre las más comunes. Los carbapenémicos han sido la principal opción terapéutica frente a bacterias multi-resistentes y el incremento de estas enzimas pone en peligro la efectividad de estos antibióticos.

La obtención o implementación de un método que pueda detectar las enzimas carbapenemasas en un corto tiempo y con un alto grado de eficacia, será la clave correcta para la aplicación del tratamiento farmacológico adecuado, que permita ayudar a la pronta

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

recuperación de los pacientes y a reducir el riesgo de que estos microorganismos sigan creando más resistencia a los fármacos; en este caso, se propone una prueba modificada, Blue Carba, rápida, sencilla y de bajo costo, que puede ser validada para la detección de cepas productoras de carbapenemasas.

Dicha prueba consta de una alta especificidad y sensibilidad para detectar estas enzimas; además de su bajo costo, es un recurso valioso para el analista, ya que permite obtener resultados en poco tiempo y con un alto grado de confiabilidad. Pasterán, et al. (2015).

Para verificar el grado de confiabilidad de la prueba, se debe tomar como referencia una prueba de oro, en dicho caso se utiliza la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), en la que se debe someter a identificación cepas con genes que codifican para carbapenemasas MBL de tipo VIM, IMP y NDM, las cuales posteriormente deben dar un resultado positivo en la prueba a validar, además se deben incluir cepas como controles negativos que contengan mecanismos distintos a los evaluados.

2. Antecedentes

Ávila, J., Nicaragua, durante el 2012, realizó la caracterización fenotípica y genotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC en 8 hospitales de la Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los antimicrobianos, en el cual se estudiaron 47 aislados y se confirmó la presencia del gen blaKPC en 33 cepas de las cuales 27 (82%) fueron *Klebsiella pneumoniae* y 6 (18%) *Escherichia coli*. Al realizar la búsqueda de la clonalidad las 27 cepas de *Klebsiella pneumoniae* presentaron 13 clones, 7 (K), 3(B), 3(G) en esta se incluyen dos subtipos G1, 3(I) subgrupo (II), 2(M), 1(A, C, D, E, F, H, J y L). En las 6 cepas de *Escherichia coli* se encontró 4 clon (A) y 2 clon (B).

Duarte et al., Colombia, 2013, realizaron un estudio en el que describen la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos que provenían de siete departamentos del país, en el cual se recibieron 57 aislamientos de *P. aeruginosa* en el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud. Solo 43 aislamientos fueron confirmados como productores de carbapenemasas y estos presentaron perfil de multi-resistencia: 76,7 % fue positivo con el test modificado de Hodge y 79,1 % presentó sinergia con MBL. Treinta y tres aislamientos fueron positivos para blaVIM, nueve para blaKPC y un aislamiento fue productor tanto de carbapenemasas KPC como de VIM. Ningún aislamiento amplificó para blaIMP y blaNDM.

En Latinoamérica se aisló por primera vez NDM-1 en 2011, en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en Guatemala; (Morejón García, 2012b; OPS, 2014). Ese mismo año, la Red de Vigilancia de los Antimicrobianos en Nicaragua reportó por primera vez enzimas carbapenemasas confirmadas por el Instituto Malbrán como NDM-1, en aislamientos de *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. Cloacae* y *Escherichia coli*, (OPS, 2014)

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Pasterán et al (2015) presentó una investigación para el 25th Congreso Europeo de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas en el cual se comparó el Test Blue Carba con la Prueba Rápida Blue Carba (Rosco Tablets), sometiendo a estudio 17 cepas productoras de Carbapenemasas Clase A, 25 cepas Clase B, 13 cepas clase C y 20 cepas no productoras de Carbapenemasas, obteniendo el 100% de positividad para las de Clase A y Clase B, un 62% de positividad para las de Clase C y un 100% de negatividad para las cepas no productoras, dando como resultado una sensibilidad y especificidad del 91% y 100% respectivamente.

En el estudio Blue Carba para la detección de diversos productores de carbapenemasas directamente de cultivos bacterianos se sometieron a esta prueba 44 cepas de *Acinetobacter*, 44 *Enterobacteriaceae*, 14 *Pseudomonas* y 49 Cepas no productoras de Carbapenemasas (productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido). La producción de carbapenemasas se evaluó mediante pruebas fenotípicas estándar, PCR y secuenciación o ensayos espectrofotométricos. Las CIM para carbapenémicos se determinaron utilizando E-test; dicha prueba detectó en un 100% las cepas productoras de Carbapenemasas, con una variación en el tiempo de la reacción, donde las de tipo KPC y MBL reaccionaron en los primeros 30 minutos, mientras que las de tipo OXA lo hicieron entre los 90 y 120 minutos; mientras tanto el resultado de las cepas no productoras fue en 100% negativo; dando así un resultado de una sensibilidad y especificidad del 100%. (Pires, Novais, & Peixe, 2013).

Caldera y Robles, Nicaragua, durante 2016, realizaron un estudio donde caracterizaron fenotípicamente bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos procedentes de la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los antimicrobianos en el período de enero 2014 a diciembre 2016. De las 195 cepas que se estudiaron 68 eran *Acinetobacter*

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

baumannii, 62 *Pseudomonas aeruginosa* y 65 Enterobacterias. En el caso de las Enterobacterias el microorganismo que predominó fue *Klebsiella pneumoniae* del cual se aislaron 45 cepas. Las Enterobacterias presentaron una resistencia del 100% a casi todos los betalactámicos, con excepción de 6 cepas que presentaron sensibilidad a Aztreonam. De las cepas de *P. aeruginosa* 31 fueron resistentes a todos los betalactámicos, el resto resultaron sensible a Aztreonam y el 100% tenían sensibilidad a Colistín. De las 68 cepas estudiadas de *A. baumannii* el 100% resultaron resistente a todos los antibióticos a excepción de Minociclina, para la cual las 62 cepas resultaron sensibles. 140 cepas de las 195 en estudio, presentaron sinergismo con EDTA, indicando la producción de carbapenemasas tipo MBL, 9 presentaron sinergismo con APB, lo que sugirió la producción de enzimas tipo Serino y 46 no presentaron sinergismo con ninguno de los dos inhibidores, lo que indicó la posible producción de enzimas tipo OXA.

3. Justificación

El aislamiento de cepas productoras de enzimas capaces de hidrolizar los fármacos Carbapenémicos, ha incrementado drásticamente, esto es debido a la rápida diseminación y fácil transferencia de los genes por medio de plásmidos, transposones e integrones entre bacterias de distintos géneros; además de la diseminación de bacterias por medio del personal que labora en las diferentes áreas de las unidades de salud; la deficiencia en la aplicación de correctas medidas higiénico-sanitarias por parte del personal influye en la propagación de microorganismos productores de carbapenemasas por las distintas áreas.

En Nicaragua, hasta el momento, no se ha realizado un estudio en el que se evalúe la capacidad de esta prueba de detectar estas enzimas que confieren resistencia a tales fármacos, es por eso que nace el interés de esta investigación con el propósito de analizar un método rápido para la detección de Carbapenemasas, además es un método accesible, por su bajo costo y rapidez en su ejecución.

Esta investigación será de mucha utilidad a los laboratoristas para brindar un resultado rápido, al personal médico acerca de la resistencia a los carbapenémicos; al médico para descartar un tratamiento deficiente y buscar otra alternativa terapéutica efectiva que aumente las posibilidades de vida y una menor estancia intrahospitalaria de los pacientes afectados.

4. Planteamiento del problema

La necesidad de conseguir fármacos indicados para tratar las diferentes infecciones causadas por microorganismo resistentes a los carbapenémicos es uno de los problemas más relevante de la actualidad en el ámbito hospitalario, ya que debido a estas multi-resistencias ante los fármacos suministrados los microorganismos tienden a acortar la vida de los pacientes.

La obtención o implementación de un método que pueda detectar las enzimas carbapenemasas en un corto tiempo y con un alto grado de eficacia, será la clave correcta para la aplicación del tratamiento farmacológico, que ayude a reducir el riesgo de mortalidad en los pacientes, que se ven afectados con estos microorganismos; en este caso, nos planteamos:

¿Cómo validar el Test Blue Carba para la detección rápida y sencilla de cepas productoras de carbapenemasas directamente a partir de cultivos bacterianos?

Con esta prueba se pretende identificar microorganismos productores de carbapenemasas del tipo Metalobetalactamasas en un corto tiempo y a bajo costo. Los resultados obtenidos con dicha prueba serán comparados con la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para descartar errores y de igual manera cuantificar la sensibilidad y especificidad de Blue Carba.

5. Objetivo General

Validar el método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas en cepas de bacilos Gram negativos procedentes de la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos.

Objetivos Específicos

1. Identificar género y especie de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas.
2. Caracterizar el perfil de susceptibilidad de las cepas en estudio.
3. Evaluar los resultados del Test Blue Carba en comparación con los de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

6. Marco teórico

6.1. Bacilos Gram negativos

Los bacilos Gram negativos constituyen un grupo muy grande de bacterias, estos son los microorganismos de mayor importancia médica, entre ellos se establecen cuatro grupos:

- ✓ Bacilos fermentadores: son de crecimiento rápido en medios de cultivos usuales y además fermentan la glucosa.
- ✓ Bacilos no fermentadores: no fermentan la glucosa y son de crecimiento rápido en medio usuales.
- ✓ Bacilos de crecimiento rápido o lento, que pueden o no fermentar la glucosa, pero que necesitan de condiciones y medios de cultivo especiales para su crecimiento.
- ✓ Bacilos Gram negativos anaerobios estrictos. (Zepeda).

6.1.1. Pruebas bioquímicas.

Triple azúcares y hierro (TSI): Este medio se utiliza para determinar la capacidad de los bacilos gramnegativos para fermentar lactosa, sacarosa y glucosa, así como para determinar su capacidad de producir H₂S (ácido sulfhídrico). El medio contiene dos cámaras de reacción, en la parte inclinada se fermenta la sacarosa y la lactosa y en la parte profunda se fermenta la glucosa. Se puede fermentar los 3 carbohidratos o uno de ellos, depende de la bacteria que se estudie. Si la bacteria tiene la enzima tiosulfatasa, reacciona con el tiosulfato de Na como una fuente de azufre para la producción del sulfuro de hidrógeno, el cual es incoloro, pero al reaccionar con sales de hierro, en este caso citrato férrico, se produce un precipitado de color negro. Para que esto ocurra debe haber un pH ácido, lo cual se consigue con la fermentación de la glucosa. El primer paso es la fermentación de la glucosa, uno de cuyos productos

terminales es el ácido fórmico. Si la bacteria tiene la enzima deshidrogenasa fórmica, el ácido fórmico es descompuesto en CO₂ y H₂. (Julissa, et al, 2004, pág. 314).

Lisina hierro agar (LIA): Es un medio para detectar enzimas que descarboxilan o desaminan la lisina en bacilos gramnegativos. Adicionalmente detecta enzimas que producen sulfuro de hidrógeno y gas proveniente de la glucosa. Si la bacteria posee la enzima descarboxilasa, la descarboxilación de la lisina produce cadaverina, un producto terminal alcalino que acentúa el color violeta del medio. Un requerimiento previo de la descarboxilación es un pH ácido, el cual se logra con la fermentación de la glucosa. Esta reacción se lleva a cabo en anaerobiosis, por lo que se observa en la parte profunda del medio. La lisina desaminasa actúa solo en ambiente de aerobiosis por lo que se verá en la parte inclinada. La desaminación de la lisina termina en productos ceto-ácidos que en combinación con el Fe⁺⁺⁺, (proveniente del citrato de amonio férrico) hacen que la molécula combinada se observe de color rojo intenso. El indicador de pH no interviene en este caso. Por esta razón, la lectura de esta reacción no se abrevia con los símbolos de ácido (A) sino como R (rojo). No existen Enterobacterias que posean las dos enzimas (descarboxilasa y desaminasa de la lisina) por lo que sólo se tiene que observar, o una de ambas reacciones o la ausencia de ambas. Cuando no hay desaminasa ni descarboxilasa, en la parte inclinada se observará una alcalinización del medio por crecimiento y muerte bacteriana, la cual hará que esta parte se observe de color violeta (K) y en la parte profunda, acidificación por los productos terminales de la fermentación de la glucosa. En este caso, la parte profunda se observará de color amarillo (A). La presencia de la enzima tiosulfatasa actuará sobre el tiosulfato de sodio y se producirá H₂S, que, en presencia del hierro proveniente del citrato de amonio férrico, formarán un precipitado de color negro. La presencia de la enzima deshidrogenasa fórmica

actuará sobre el ácido fórmico proveniente de la fermentación de la glucosa y, en consecuencia, habrá gas de CO₂ y H₂. (Julissa, et al, 2004, pág. 316).

Movilidad, Indol, Ornitina (MIO): Es un medio que se utiliza para determinar la presencia de flagelos, así como las enzimas descarboxilasa de ornitina y triptofanasa. Por lo tanto, sirve para determinar la movilidad, descarboxilación de la ornitina y producción de indol. Algunas bacterias poseen flagelos y otras carecen de ellos. Este medio ayuda a diferenciar las móviles de las no móviles. Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, el aminoácido triptófano será degradado en varios productos entre los cuales está el indol, el cual se hace visible al agregarle el reactivo de Kovac (pdimetilaminobenzaldehido) o Erlich con un color rosado intenso. Sin la presencia de la enzima y ausencia del indol, el reactivo se ve transparente. Detecta la presencia de la enzima descarboxilasa de la ornitina, que de estar presente desdobla la ornitina en putrescina, un producto con pH alcalino, lo que hace intensificar el color violeta del medio. (Julissa, et al, 2004, pág. 318).

Urea de Crhistensen: Detecta la presencia de la enzima ureasa. Cuando la bacteria tiene la enzima, la urea es desdoblada a amonio y CO₂. El amonio alcaliniza el medio haciendo virar el indicador al rosado intenso. (Julissa, et al, 2004, pág. 320).

Citrato de Simons: Determina la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato como única fuente de carbono. (Julissa, et al, 2004, pág. 320).

Acetato de sodio: Es un medio sintético en el que la única fuente de carbono y de energía es el acetato. Su utilización ocurre en aerobiosis, resultando en alcalinización del medio con el consiguiente viraje del indicador de pH de verde a azul. (Julissa, et al, 2004, pág. 321).

Malonato y fenilalanina deshidrogenasa (caldo Malonato fenilalanina): Evalúa la capacidad del microorganismo de utilizar el malonato como única fuente de carbono y la desaminación de la fenilalanina, en forma combinada. Las Enterobacterias no tienen la capacidad enzimática de realizar las dos reacciones simultáneamente, por lo que, o se observa la utilización del malonato o la desaminación de la lisina. Las bacterias que no utilizan el malonato no poseen la enzima fenilalanina desaminasa, por lo que es posible reacciones de malonato y fenilalanina desaminasa negativas. (Julissa, et al, 2004, pág. 322).

Rojo de Metilo (RM): Esta prueba permite diferenciar 2 vías metabólicas para la utilización de la glucosa: ácido mixta y butanodiólica. Las bacterias RM positivas producen grandes cantidades de ácidos, capaces de disminuir el pH < 4.4. Las bacterias RM negativas continúan metabolizando los ácidos hasta productos neutrales que causan una reversión del pH inicial hasta 6.0. Este comportamiento diferencial se pone en evidencia al agregar un indicador de pH (Rojo de Metilo) que vira de color al rojo si el pH del medio es menor de 4.4 o no varía de color si el pH está por encima de ese valor o es amarillo si el pH es > 6.2. (Julissa, et al, 2004, pág. 323).

Voges Proskauer (VP): Evalúa la utilización de la glucosa por una vía alterna a la del ácido pirúvico. El producto terminal es el acetil-metil-carbinol (acetoína, 3-hidroxi-2-butanona), un compuesto incoloro que es detectado en dos pasos: 1. alcalinización del medio con hidróxido de potasio (KOH al 40%). En presencia de oxígeno, el compuesto vira a lo cual provoca, en presencia del Oxígeno, la oxidación del Acetil-Metil-Carbinol a di-acetilo. 2. Al agregarle alfa-naftol, el di-acetilo vira a un color zapote intenso. (Julissa, et al, 2004, pág. 324).

Prueba de oxidasa: El tetrametil-parafenilendiamina dihidrocloruro al 1% se emplea para la determinación de la citocromo-oxidasa. Este reactivo sustituye al oxígeno como aceptor de electrones para la respiración bacteriana, proceso que se lleva a cabo en la membrana celular. En su estado reducido es incoloro, pero en presencia de la enzima citocromo-oxidasa se oxida formando el azul de indo-fenol, visible en los primeros 10 segundos de la prueba. (Julissa, et al, 2004, pág. 330).

Prueba de movilidad al fresco: Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y localización varían entre los diferentes géneros y especies. Las Pseudomonas poseen uno o más flagelos polares, pero la especie aeruginosa sólo posee 1 flagelo polar. La movilidad en fresco se realiza como procedimiento de primera elección para detectar la movilidad de especies bacterianas que no crecen bien en agar semisólido. (Julissa et al, 2004, pág. 331).

Glucosa OF (oxidación-fermentación): Los medios bioquímicos usados para las bacterias fermentativas no pueden ser aplicados a las bacterias oxidativas que producen ácidos débiles insuficientes para hacer virar el indicador de pH y debido a esto, Hugh y Leifson diseñaron un medio OF (oxidativo-fermentativo) que se adapta a las propiedades de los bacilos gramnegativos no fermentadores. Los bacilos gramnegativos fermentadores oxidativos utilizan vías alternativas a la vía de Embden Meyerhof a través de las cuales se oxida la glucosa. El término oxidación significa la forma en que el ácido pirúvico transfiere sus iones hidrógeno. Al carecer de la enzima deshidrogenasa, necesarias para oxidar el ácido pirúvico a ácido láctico y otros ácidos mixtos, las bacterias oxidativas transfieren los iones hidrógeno del ácido pirúvico al ciclo de Krebs, donde se une al oxígeno para formar agua. Este medio es útil para la diferenciación de microorganismos no fermentadores. La

consistencia semisólida del agar, el uso de azul bromotimol como indicador de pH y la inclusión de una pequeña cantidad de buffer de di-fosfato están destinados a aumentar la detección de ácidos. (Julissa et al, 2004, pág. 332).

Agar P: El agar P contiene digestivo pancreático de gelatina que proveen aminoácidos y magnesio, potasio y iones sulfato que realzan la producción de piocianina. La piocianina es un pigmento azul verde o azul turquesa no fluorescente que se difunde alrededor del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Algunas cepas pueden producir pequeñas cantidades de pioverdina o fluoresceína. (Julissa et al, 2004, pág. 333).

Agar F: El agar F contiene digestivo pancreático de gelatina que proveen aminoácidos y magnesio, potasio y iones sulfato que realzan la producción de pioverdina. El agar F realiza la elaboración de pioverdina o fluoresceína e inhibe la formación de piocianina, por acción de los fosfatos que estimulan la formación del pigmento pioverdina. (Julissa et al, 2004, pág. 333).

6.2. Enterobacterias

Las Enterobacterias son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). Algunos microorganismos entéricos, por ejemplo, *Escherichia coli*, son parte de la microflora normal y en forma incidental producen enfermedad, en tanto que otros, *Salmonella spp.* y las *Shigella spp.*, por lo regular son patógenos para el ser humano. (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

6.2.1. Características.

La familia Enterobacteriaceae está constituida por bacilos Gram (-); no esporulados, no móviles o móviles por flagelos peritricos, algunos géneros son encapsulados; crecen en medios de cultivo simples de peptona o extracto de carne sin agregado de suplementos como cloruro de sodio, vitaminas y factores de crecimiento. Crecen en Agar Mac-Conkey; son aerobios y anaerobios facultativos; fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas, son catalasa positivos y oxidasa negativos_ reducen nitrato a nitrito y tienen contenido de G+C del 39 - 59% (Damiáni, Esteves, & Torrico).

6.2.2. Epidemiología.

Durante la primera década del siglo XXI se produjo una diseminación rápida y extensa de *K. pneumoniae* productora de KPC en la zona noreste de EE. UU. Aunque el primer miembro de la familia KPC fue descubierto en *K. pneumoniae* en el Norte de Carolina en 1996, la variante KPC2 se extendió a lo largo de la costa este de EE. UU. y en el 2004, fue detectada en Nueva York. Simultáneamente surgió una variante de KPC-2, la KPC-3, causante de brotes en Nueva York entre 2000 y 2001. Ambas se llegaron a establecer en hospitales de los estados vecinos, aparentemente debido al tránsito de pacientes colonizados.

En el 2005, en Francia se detectó una cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC-2 aislada de un paciente que había estado en Nueva York. Con el tiempo se han ido aislado *K. pneumoniae* productora de KPC en diversos países como en América Latina, Israel, China y Grecia.

Las enzimas KPC han sido detectadas en un gran número de secuencia-tipos (ST) de *K. pneumoniae*. Sin embargo, la mayoría de los aislados con estas enzimas pertenecen al ST258.

Este ST258 difiere tan solo en una única mutación en un locus de ST11 y está fuertemente asociado con la producción de KPC y con aislados multi-resistentes.

6.3. No fermentadores

Son bacilos o cocobacilos Gram negativos, aerobios estrictos, que no fermentan los hidratos de carbono, y lo utilizan por vía oxidativa, sin formación de gas. Generalmente son oxidasa positiva, pueden ser inmóviles o móviles, presentar flagelos polares, bipolares, peritricos.

Alrededor del 15% de los bacilos Gram negativos aislados de muestras clínicas corresponde a bacilos no fermentadores y de este porcentaje, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, el complejo *A. baumannii calcoaceticus*, *A. iwoffii*, *S. maltophilia* y *B. cepacia* son las de mayor incidencia. El aislamiento de los otros géneros es menos frecuente, por lo cual presentaremos sólo a los géneros de mayor aislamiento. (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011).

6.3.1. *Acinetobacter baumannii*

Las especies del género *Acinetobacter* son bacterias Gram negativas aerobias que tienen una amplia distribución en el suelo y el agua y que a veces se cultivan de piel, mucosas, secreciones y del medio hospitalario. *Acinetobacter baumannii* es la especie que se aísla con más frecuencia. A veces se aísla *Acinetobacter iwoffii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter haemolyticus*, y otras especies.

6.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos en los hospitales. Puede colonizar al ser humano normal en quien es un saprófito. Causa enfermedades en personas con defensas anormales. Es móvil, tiene forma

de bastón, mide casi $0.6 \times 2 \mu\text{m}$. Es gramnegativo y muestra una disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas; es un aerobio obligado que se multiplica fácilmente en muchos tipos de medios de cultivo, produciendo en ocasiones un olor dulce o parecido al de las uvas o a la tortilla de maíz, forma colonias redondas y lisas con un color verdoso fluorescente. Suele producir el pigmento azulado no fluorescente piocianina, que se difunde hacia el agar. (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2011, pág. 227).

6.4. Antimicrobianos

6.4.1. Betalactámicos.

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo beta-lactámico. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen, además, un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del péptidoglicano. El péptidoglicano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetra péptidos que se unen entre sí para formar una malla, directamente (gramnegativos) o mediante un penta péptido (Gram positivos). De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular. (Duarte, 2015).

6.4.1.1. Penicilinas

Son un grupo de antibióticos que contienen un anillo beta-lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, inhiben selectivamente diferentes pasos de la síntesis del péptidoglicano (mureína). Su efectividad depende de la capacidad que tiene la molécula para unirse a las proteínas de unión de penicilinas (PBPs), tales como transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas, ubicadas en la membrana interna de la pared bacteriana, es entonces, debido al mecanismo de acción, que la penicilina sólo tiene el poder de combatir a aquellos microorganismos patógenos que se encuentran en crecimiento y multiplicación, y no a esos que aún se encuentran en estado latente. El espectro de actividad de la familia de las penicilinas es amplio. Son activas contra bacterias Gram positivas, negativas y anaerobias. Poseen mayor actividad contra las bacterias Gram positivas. (Flesia, 2011).

6.4.1.2. Cefalosporinas.

Las cefalosporinas son antibióticos semisintéticos que contienen en su núcleo el ácido 7-amino-cefalosporánico. Son bactericidas que inhiben la síntesis de la pared bacteriana de modo semejante como lo hacen las penicilinas y se han agrupado en cuatro diferentes grupos llamados generaciones, de acuerdo con su actividad antimicrobiana. Tienen una amplia actividad contra cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos y microorganismos anaerobios. (Freile, 2010).

6.4.1.3. Monobactámicos.

Los monobactámicos son antibióticos sintéticos obtenidos por ingeniería molecular derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Son fármacos bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular, debido a su alta afinidad por las PBP-3. El único

antibiótico de uso clínico de este grupo farmacológico es el Aztreonam debido a su estabilidad frente a las Betalactamasas y por su actividad contra los bacilos Gram negativos principalmente *E. Coli* y *P. Aeruginosa*. También cubre infecciones causadas por Enterobacteriaceae, *Aeromonas*, *Yersinias*, *H. influenzae*, y *Neisseria spp.* (Freile D. M., 2010).

6.4.1.4. Carbapenémicos.

Los carbapenémicos, son antibióticos betalactámicos bactericidas que inhiben la síntesis de la pared bacteriana. Los carbapenémicos se fijan a la mayor parte de las proteínas que ligan penicilinas (PBP). Estos antibióticos son altamente estables a la acción de la mayor parte de Betalactamasas como las penicilinasas y cefalosporinasas. Además, estos antibióticos tienen una estructura molecular pequeña que les permite ingresar fácilmente al espacio periplásmico de los bacilos Gram negativos, pasando a través de las porinas que si fuesen nutrientes esenciales. Esta capacidad de ingreso, añadida a la alta fijación a las PBP y la estabilidad frente a las Betalactamasas, les confiere su amplio espectro antimicrobiano. Tienen excelente actividad contra la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias Gram positivas y Gram negativas. Su espectro cubre a microorganismos Gramnegativos resistentes a la mayor parte de otros antibióticos. (Freile D. B., 2010).

6.4.1.5. Inhibidores de Betalactamasas.

Son compuestos farmacológicos con poca actividad antimicrobiana intrínseca, pero inhibidores de muchas Betalactamasas, por lo que combinados a los antibióticos betalactámicos restauran la propiedad antimicrobiana que estas han perdido debido a la presencia de las enzimas Betalactamasas. Estos son: el ácido clavulánico, sulbactam y el tazobactam. (Ortiz Machado & Rodríguez Orozco, 2015).

Los inhibidores de las Betalactamasas para ser eficaces deben atravesar los canales porínicos y alcanzar el espacio periplásmico en los bacilos gramnegativos a concentraciones adecuadas lográndose la inactivación de las Betalactamasas, hecho imprescindible para que el β -lactámico así protegido llegue a la PBP diana. Inicialmente los inhibidores de las Betalactamasas actúan por inhibición competitiva por analogía al sustrato de la enzima, que es seguida de una reacción química más lenta tras la unión al centro catalítico, que da lugar a una inactivación transitoria o permanente de la enzima llamada inhibición no competitiva. (Almaraz., 1996).

Mecanismo de acción de inhibidores de Betalactamasas.

Estos actúan por dos mecanismos:

- a. Ligándose de manera irreversible por su alta afinidad con el sitio catalítico de las Betalactamasas, previniendo de esta manera la hidrólisis de las penicilinas.
- b. Mediante la fijación directa a las PBP bacteriana, lo cual incrementa la actividad antibacteriana de la penicilina.

Es por tal razón que se les denominó en un principio antibióticos suicidas, ya que poseen inhibidores potentes de la mayor parte de Betalactamasas plasmídicas y algunas Betalactamasas cromosómicas. (Ortiz & Rodríguez, 2015).

6.4.2. Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos permanecen como una clase de antimicrobianos de uso habitual y eficaz en la práctica clínica. Son antibióticos naturales o semisintético, de estructura heterocíclica, bactericidas de amplio espectro (con excepción de la espectinomicina). A pesar

de que existen diversos mecanismos de resistencia continúan siendo activos frente a gran parte de los bacilos gramnegativos aerobio entre ellos: *Enterobacteriaceae* y los bacilos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*

Su acción comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, luego son transportadas a través de la membrana interna y finalmente, alcanzando el sitio de unión subunidad 30S de los ribosomas (encargados de la lectura del código genético), que inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo. Los mecanismos defensivos que desarrollan los microorganismos frente a los aminoglucósidos son de tres tipos: modificación enzimática de la molécula, alteración de la difusión y mutación ribosómica que origina menor afinidad por la subunidad 30S (demostrada en estreptomicina). De todos ellos, la modificación enzimática es el mecanismo más frecuente. (Palomino & Pachón, 2003).

6.4.3. Polipéptidos.

Solamente dos drogas están en uso clínico:

Polimixinas: grupo de compuestos polipeptídicos de naturaleza básica, de origen natural. Producidos por bacilos aerobios productores de esporas. Se comportan como detergentes catiónicos de la membrana bacteriana. Bactericidas muy activos frente a gérmenes Gram negativos, como *Pseudomonas aeruginosa*. Por su toxicidad (nefrotoxicidad, neurotoxicidad) y mala absorción oral, hoy día se suelen administrar por vía tópica (colirios, cremas) en infecciones oculares o dermatológicas.

Bacitracina: antibióticos polipeptídicos producidos por cepas de *Bacillus subtilis*, que en los preparados comerciales constituyen una mezcla, si bien predomina la Bacitracina A.

Interfieren con la síntesis del péptidoglicano de la pared celular, actuando a nivel de la membrana bacteriana, interfiriendo con la regeneración del bactoprenol, lípido transportador de la unidad estructural de mureína. Bactericidas con actividad preferente sobre Gram positivas. (Mazarro).

6.4.4. Quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el súper enrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Dentro de la célula bacteriana: la ADN girasa y la topoisomerasa IV, la primera es más sensible a la acción de las quinolonas en caso de gérmenes Gram negativos, mientras en Gram positivos la más sensible es la topoisomerasa IV. Las quinolonas inhiben la síntesis de ADN y a concentraciones altas también la de ARN.

En resumen, puede decirse que las quinolonas son quimio-terápicos activos, contra microorganismos Gram positivas, Gram negativas, *Mycoplasma*, en cambio, no son efectivas contra agentes anaerobios. (Malgor - Valsecia).

6.4.5. Sulfonamidas.

Debido a la aparición de resistencia bacteriana y al descubrimiento de fármacos más activos y menos tóxicos, las sulfas fueron dejadas de lado por mucho tiempo. Sin embargo, actualmente, con la recuperación de la sensibilidad de algunas bacterias y la aparición de la trimetoprima que se puede combinar con las sulfas y actuar sinérgicamente con ellas, las sulfas han reconquistado algunas indicaciones importantes en quimioterapia antimicrobiana.

Las sulfonamidas impiden la incorporación del ácido para-amino benzoico (PABA) a la molécula de ácido fólico, dificultando su biosíntesis, que es esencial para el crecimiento y

multiplicación bacteriana. Los microorganismos sensibles son aquellos que deben sintetizar su propio ácido fólico, o son impermeables al ácido fólico de los líquidos circundantes.

Por su mecanismo de acción, las sulfas son bacteriostáticas, y no bactericidas. Inhiben tanto a gérmenes Gram positivos como Gram negativos. También inhiben *Nocardia*, *Chlamydia trachomatis*, algunos protozoarios, y algunas bacterias entéricas. (Malgor - Valsecia).

6.4.6. Trimetroprimas.

Antibiótico con acción bactericida, del grupo de las diaminopirimidinas. Actúa inhibiendo la síntesis de tetrahidrofolato (forma activa del ácido fólico), inhibe el crecimiento bacteriano al interferir en la síntesis de ácidos nucleicos.

Presenta un espectro antibacteriano moderadamente amplio, actuando sobre cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos aeróbicos, en especial sobre Enterobacterias. Es inactivo frente a *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Chlamydia* y *Pneumocystis*, así como sobre bacterias anaeróbicas estrictas. (Pediámecum, 2016).

6.4.7. Fenicoles.

En la actualidad se reserva dentro del campo de medicina humana para el tratamiento de infecciones graves como antibiótico de segunda elección, es un fármaco de amplio espectro y el más utilizado en el área clínica es el cloranfenicol que tiene actividad frente a aerobios Gram negativos y positivos.

Su mecanismo de acción interfiere en el crecimiento bacteriano inhibiendo la síntesis proteica mediante una acción a nivel de la subunidad 50S. Se unen al sitio de fijación del ácido ribonucleico (ARN) de transferencia, interrumpiendo la elongación de la cadena

proteica durante la síntesis. Esta acción tiene un efecto bacteriostático sobre la mayoría de gérmenes sensibles y se ha constatado un efecto bactericida con determinados patógenos. (UDCA, 2016).

6.4.8. Nitrofuranos.

Los Nitrofuranos, son drogas sintéticas de estructura heterocíclica, con propiedades antibacterianas (bacteriostáticos y bactericidas). Actúan interfiriendo con la acción de sistemas enzimáticos reguladores de los mecanismos oxidativos y glucolíticos esenciales para el crecimiento bacteriano. Son inhibidores enzimáticos bacterianos. La actividad de los nitrofuranos depende en cierto modo de la magnitud de la población microbiana. Con muy elevadas concentraciones de bacterias, la actividad de la nitrofurantoína disminuye. Dicha actividad es favorecida en cambio cuando el pH es de 5.5 o menor. La nitrofurantoína es el principal antiséptico en casos de infecciones urinarias, los nitrofuranos tiene actividad contra bacterias Gram negativas, como para positivas. (Malgor-Valsecia).

6.4.9. Tetraciclinas.

Las tetraciclinas son un conjunto de antibióticos naturales (tetraciclina) o semisintéticos (doxiciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces*. Son agentes bacteriostáticos, con actividad sobre una gran variedad de microorganismos, tienen un amplio espectro que incluyen bacilos Gram positivos y gramnegativos aerobios y anaerobios por lo que se han convertido en antibióticos de uso habitual en los seres humanos, animales y en algunas áreas de la agricultura.

Mecanismo de acción

Son bacteriostáticas, aunque pueden llegar a ser bactericidas a altas concentraciones. Actúan inhibiendo la biosíntesis proteica a nivel de los ribosomas 70 y 80s, inhibiendo la transcripción del mensaje genético al impedir la penetración del ARN mensajero al interior de la célula de la subunidad 30s del ribosoma. La tetraciclina accede al interior de la célula por un mecanismo doble de difusión pasiva y transporte activo. (Saldaña, et al, 2004)

6.5. Mecanismos de resistencia de las Enterobacterias

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los Betalactámicos básicamente mediante 3 mecanismos diferentes que, en ocasiones, pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de la resistencia a otras familias de antibióticos:

- Destrucción del antibiótico mediante Betalactamasas. Es lo más frecuente. Estas enzimas reaccionan de forma covalente con el anillo β -lactámico, lo hidrolizan con rapidez e inactivan al fármaco.
- Incapacidad para penetrar en el lugar de acción debido a las porinas o a las bombas de expulsión. La ausencia o delección de porinas evitan que el antibiótico atraviese la membrana externa de los microorganismos gramnegativos para alcanzar la PBP mientras que las bombas lo expulsan a través de la misma.
- Modificación de la diana en las PBPs. Diferentes alteraciones (mutaciones, hiperexpresión, modificación de la afinidad) pueden dificultar la unión del betalactámico a la proteína, lo que disminuye su actividad.

6.5.1. Betalactamasas.

La producción de Betalactamasas es el mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos más importante por su frecuencia y eficacia. Se cree que las Betalactamasas son fruto de una evolución de las PBP, ya que comparten un alto grado de homología con ellas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos.

6.5.1.1. Clasificación.

La producción de Betalactamasas es el mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos más importante por su frecuencia y eficacia. Se cree que las Betalactamasas son fruto de una evolución de las PBP, ya que comparten un alto grado de homología con ellas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos.

6.5.1.1.1. *Betalactamasas tipo AMP-C*

Estas enzimas según la clasificación estructural de Ambler están dentro de las serino-betalactamasas y de acuerdo con la clasificación funcional de Bush pertenecen al Grupo 1 (Ambler 1980; Bush, 2010).

Estas Betalactamasas se caracterizan en su mayoría por:

- Son resistentes a inhibidores (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam).
- Son activas sobre aztreonam, cefamicinas (como cefoxitina) y cefalosporinas de primera, segunda generación y en menor medida a cefalosporinas de tercera. Las cefalosporinas de cuarta generación son las más estables.
- Son inhibidas por aztreonam, cloxacilina, oxacilina y ácido borónico.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

La producción de Amp-C puede ser constitutiva o inducible, siendo los niveles de producción dependientes del grado de expresión del gen blaAmp-C. Cuando el gen blaAmp-C se expresa de forma constitutiva puede hacerlo a niveles basales, confiriendo un fenotipo de resistencia natural o salvaje característico de la especie bacteriana, o puede hacerlo a unos niveles muy superiores al basal, produciendo cantidades elevadas de Amp-C (hiperproducción de Amp-C).

Algunos organismos de importancia clínica que contienen Amp-C cromosómica son: *Enterobacter spp*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp*, *Morganella morganii* y *Providencia*, por lo que muestran resistencia natural a algunos antibióticos betalactámicos como cefalosporinas de primera generación (C1G) y aminopenicilinas. En estos organismos son enzimas inducibles y pueden ser expresadas en altos niveles (derrepresión).

La sobreexpresión de Amp-C puede causar resistencia a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona), carboxipenicilinas y acilureido penicilinas, determinando además disminución de la sensibilidad a cefalosporinas de cuarta generación (C4G). Un grupo de Betalactamasas de tipo Amp-C están codificadas por genes blaAmp-C asociados a integrones, como los de clase 1, o transposones localizados en plásmidos conjugativos (Amp-C plasmídicas).

Las Amp-C plasmídicas se han descrito principalmente en algunas especies de Enterobacterias (*Klebsiella spp.*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Shigella spp.* y *Salmonella spp.*, entre otras) con relevancia clínica y epidemiológica. Desde el punto de vista epidemiológico, las Amp-C plasmídicas tienen mucha mayor relevancia o trascendencia que las Amp-C cromosómicas, debido a su capacidad para movilizarse, y se pueden transferir tanto en el

ambiente nosocomial, donde tienen un claro potencial epidémico, como en la comunidad. En la actualidad se conocen varios fenotipos de enzimas tipo Amp-C: inducible, basal, hiper-inducible, semi-derreprimido, derreprimido, inducible + Betalactamasas de espectro extendido y derreprimido + Betalactamasa de espectro extendido.

6.5.1.1.2. *Betalactamasa de espectro extendido (BLEE).*

En los años 80 se describió por primera vez la Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas se encuentran dentro del grupo 2 que contiene las Serino Betalactamasas, según la actual clasificación funcional de Bush, pueden ser inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam (Philippon 1994; Bush 2010).

La detección en el laboratorio de enzimas tipo BLEE es de suma importancia en el laboratorio, debido a que la presencia de esta enzima involucra un cambio de interpretación de algunos de los antibióticos betalactámicos, sin importar el halo de inhibición o la concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida. De esta forma, toda cepa BLEE positiva debe ser reportada como resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. En el caso de cefoxitina, carbapenémicos y combinaciones de betalactámicos con inhibidores de Betalactamasas se deben reportar acorde al resultado del antibiograma.

6.5.1.1.3. *Clasificación según Ambler.*

Grupo 1. Las Betalactamasas de este grupo se corresponden con la clase molecular C de Ambler. Pertenecen a este grupo cefalosporinasas que no son inhibidas por el ácido clavulánico. La mayoría de ellas son cromosómicas y se encuentran en *P. aeruginosa* y en algunas especies de Enterobacterias. También pertenecen a este grupo enzimas codificadas en plásmidos, cuyo perfil de resistencia es indistinguible de las otras.

Grupo 2. En este grupo se incluye un gran número de enzimas que son sensibles a la acción de los inhibidores de Betalactamasas y que se relaciona con las clases A y D de Ambler. En su mayoría son plasmídicas. Existen 12 subgrupos en función de los sustratos que hidrolizan.

Grupo 3. Incluye enzimas de la clase molecular B de Ambler. Son MBL que requieren para actuar de la unión de Zn^{+2} a su centro activo y que se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero que no se inhiben por el ácido clavulánico o por tazobactam. Son capaces de hidrolizar diferentes tipos de sustratos. En su mayoría son cromosómicas.

Grupo 4 (incluido en la clasificación inicial, no aparece en la actualización del año 2010). Este grupo engloba las penicilinasas que no se inhiben por el ácido clavulánico. Todas ellas están codificadas en el cromosoma y sin clasificación, según los criterios de Ambler. Estas enzimas podrían ser clasificadas en los grupos anteriores, pero hasta el momento no están completamente caracterizadas. (Pena, 2016).

6.5.1.1.4. Clasificación según Bush-Jacoby.

Clase A. Las carbapenemasas de la clase A, que pertenecen al grupo 2f de Bush-Jacoby, se pueden dividir en 5 grupos en base a su filogenética: GES, KPC, SME, IMI y NMC-A. Las enzimas SME, NMC e IMI están codificadas en cromosomas mientras que las enzimas GES y KPC se encuentran codificadas en plásmidos. El gen *bla_{KPC}* está asociado al transposon Tn4401. Clínicamente, el grupo que más interés tiene es el de las enzimas KPC. Existen 11 tipos descritos.

El mecanismo hidrolítico de estas enzimas requiere en su sitio activo una serina en la posición 70. Todas tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de betalactámicos

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

(penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos) y todas son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Las oximino-cefalosporinas son débiles sustratos, por lo que las carbapenemasas de la clase A no confieren resistencia a las mismas.

Clase B o MBL. Las MBL son las carbapenemasas con más diversidad a nivel molecular y con más impacto en la clínica. Pertenecen al grupo 3 de Bush-Jacoby. Las primeras MBL detectadas y estudiadas fueron enzimas cromosómicas presentes en las bacterias ambientales y oportunistas *B. cereus*, *Aeromonas spp.* y *S. maltophilia*. En contraste a las MBL cromosómicas, cuya presencia está directamente relacionada con la prevalencia de las especies que la producen, ha surgido un incremento en la detección y expansión de las MBL adquiridas y transferibles.

Existen al menos 9 tipos de MBL adquiridas, aunque las más comunes se incluyen en las familias VIM (con 25 tipos descritos), IMP, GIM, SIM y NDM. Tanto si los genes que codifican las MBL están localizados en el cromosoma como en plásmidos, estos se encuentran formando parte de genes cassette en integrones de la clase 1 o son movilizados mediante elementos de inserción ISCR. Recientemente se ha descubierto que ciertos genes *bl_{VIM}* se encuentran localizados en transposones.

El sitio activo de estas enzimas contiene un ion (o iones) de Zn^{+2} , en lugar de serina como en las enzimas de la clase A y D, esencial para el ataque nucleofílico del anillo β -lactámico. Las MBL pueden hidrolizar todos los betalactámicos excepto el aztreonam. Esto es debido principalmente al hecho de que las MBL se unen a los monobactámicos con una afinidad muy baja. Además, experimentos de acoplamiento indican que la posición de este antibiótico en el sitio activo no favorece su hidrólisis. No son inhibidas por el ácido clavulánico ni por el tazobactam, pero sí por agentes quelantes como el EDTA. Al igual que las cepas

productoras de KPC, las cepas con MBL también producen otras Betalactamasas. Por ello, aunque las MBL no son capaces de hidrolizar el aztreonam, a menudo se identifican enzimas BLEE que si son capaces de hidrolizarlo.

Clase D u OXACILINASAS. Las carbapenemasas de la clase D pertenecen al grupo 2df de Bush-Jacoby. Se pueden dividir en varios grupos según la homología de la secuencia: OXA-23 (que incluye a OXA-27 y OXA-49), OXA-24 (que incluye OXA-25, OXA-26 y OXA-40), OXA48 (que incluye OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232), OXA-58, OXA72 y OXA-143. Los genes de las enzimas OXA pueden estar codificadas en el cromosoma o en plásmidos. Los plásmidos que contienen los genes *bla*_{OXA-48} están relacionados con las secuencias de inserción IS1999, una IS4 responsable en la movilización y expresión de los genes de resistencia a betalactámicos.

El nivel de actividad hidrolítica exhibida por las carbapenemasas OXA es bastante débil comparada con la de las MBL; las cepas que albergan estas enzimas pueden requerir mecanismos adicionales de resistencia para que las CIM de imipenem y meropenem estén por encima de los puntos de corte. Esto, junto al hecho de que a menudo son susceptibles a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos, hace que las cepas productoras de estas enzimas sean difíciles de identificar cuando se utilizan los sistemas automatizados.

La enzima OXA-48 (aislada en Enterobacterias, sobre todo *K. pneumoniae*) tiene una mayor actividad carbapenemasas que el resto de las OXA, con las cuales comparte menos de un 50% de homología en su secuencia de aminoácidos. Su eficacia para hidrolizar el imipenem es 10 veces mayor que las enzimas OXA de los *Acinetobacter spp.* OXA-48

también hidroliza las penicilinas y las primeras cefalosporinas, pero su actividad contra las oximino-cefalosporinas es débil.

6.6. Métodos de detección de carbapenemasas

6.6.1. Teste de sinergismo con inhibidores

6.6.1.1. Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA).

Se utilizan para la detección de MBL. El Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) es un compuesto que se une al centro activo de las enzimas de clase B de Ambler que contiene iones de Zn^{+2}

6.6.1.2. Ácido fenil Borónico (APB).

Se utilizan para la detección de carbapenemasas de la clase A. Tienen algunas limitaciones en las especies de Enterobacterias productoras de Amp-C (*Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *M. morgani*, *Providencia spp*, *Serratia spp*), porque el ácido borónico también les afecta. La inhibición de la actividad de las cefalosporinas se consigue mediante el uso de cloxacilina. Combinando el ácido borónico y la cloxacilina se consigue diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas clase A de las cepas productoras de Amp-C.

6.6.2. Test de Hodge más Tritón.

Este test consiste en demostrar el crecimiento de una bacteria susceptible a carbapenémicos alrededor de otra sospechosa de producir carbapenemasas por la difusión de ésta al medio de cultivo en el cual se ha colocado un disco con una concentración estandarizada de alguno de los carbapenémicos. Si bien la sensibilidad de este test es buena, presenta falsos positivos en casos de altas prevalencias de enzimas tipo BLEE o Amp-C con hiper-producción (De la Lastra, Ulloa, Pinto, Vidal, & Silva, 2010).

Si se observa una invaginación del halo de inhibición alrededor de la cepa probada, la cepa sospechosa será productora de carbapenemasas. Si se encuentra un halo completo, la prueba puede ser considerada negativa.

6.6.3. Blue Carba.

El método Carba NP se basa en la detección en un extracto bacteriano de hidrólisis del anillo betalactámico del carbapenémico mediante la acidificación de una solución de rojo de fenol utilizada como indicador de color. En la variante de prueba Blue-Carba, se seleccionó azul de bromotimol como indicador, ya que incluye el rango de pH óptimo (6,0 a 7,6) para la mayoría de las Betalactamasas (pH = 6,8), factor clave para un abordaje directo de colonias. Se utiliza un Imipenen comercialmente y ampliamente disponible como sustrato para las carbapenemasas.

6.6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La PCR se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. Actualmente, el proceso de la PCR se realiza mediante un equipo llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.

Los tres pasos básicos de la PCR son:

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: apareamiento de los cebadores o “primers” a las regiones flanqueantes de la secuencia de ADN a amplificar, en el rango de 55-65°C (Estrada, 2013). 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. (Machado, et al, 2015)

6.7. Parámetros para la validación del método cualitativo Blue Carba

6.7.1. Sensibilidad.

Es la probabilidad de la prueba pueda clasificar correctamente una cepa productora de carbapenemasas, es decir, la probabilidad que para una cepa se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enzima.

Cuando los datos obtenidos se clasifican en una tabla, es fácil estimar a partir de ella la sensibilidad como la proporción de cepas productoras de carbapenemasas que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica. Es decir:

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

De ahí que también la sensibilidad se conozca como “fracción de verdaderos positivos (FVP) (Segura Egea, 2002).

6.7.2. Especificidad.

Es la probabilidad de la prueba para clasificar correctamente a una cepa no productora de carbapenemasas, es decir, la probabilidad que para esta cepa se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar las cepas no productoras. A partir de una tabla, la especificidad se estimaría como:

$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

De ahí que también sea denominada fracción de verdaderos negativos (FVN). (Segura Egea, 2002).

6.7.3. Valor Predictivo Positivo (VPP).

Según Segura (2002), es la probabilidad de que la cepa sea productora de carbapenemasas si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de cepas con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

6.7.4. Valor Predictivo Negativo (VPN).

Es la probabilidad de que una cepa no productora de carbapenemasas en la prueba esté realmente negativa. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

6.7.5. Cociente de Probabilidad Positivo (CPP).

Este se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en las cepas entre la probabilidad de un resultado positivo entre las no productoras de carbapenemasas. Es, en definitiva, el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad):

$$CPP = \frac{S}{1 - E}$$

6.7.6. Cociente de probabilidad Negativo (CPN).

Se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de carbapenemasas entre la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Se calcula, por lo tanto, como el cociente entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad):

$$CPN = \frac{1 - S}{E}$$

6.7.7. Índice de exactitud (IE).

Es la probabilidad de que se obtenga un resultado correcto. Se calcula dividiendo la suma de los verdaderos positivos y los verdaderos negativos entre el total de la muestra multiplicada por cien. $Exactitud = ((a + d) / N) \times 100$. Por ejemplo, una fiabilidad del 90% indicará que de cada 100 veces que se aplique la prueba diagnóstica cabe esperar que en 90 el resultado sea correcto. (Segura Egea, 2002)

$$IE = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \times 100$$

6.7.8. Índice de Youden (IY).

Simplemente refleja la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de falsos positivos. Un buen test debe tener alta esta diferencia. Teóricamente es igual a 1 sólo cuando la prueba diagnóstica es perfecta, o sea, cuando $S + E = 2$, de modo que también puede decirse que cuánto más cercano a 1, mejor es la prueba diagnóstica que se está evaluando. (Segura Egea, 2002)

$$IY = S + E - 1$$

7. Diseño metodológico

7.1. Área de estudio:

Este estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Bacteriología en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), ubicado en Managua, al cual son remitidas las cepas con diversos mecanismos de resistencia.

7.2. Tipo de estudio:

Descriptivo de Prueba diagnóstica

7.3. Universo:

500 cepas de bacilos Gram negativos remitidas de 23 laboratorios Pertencientes de la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, con resistencia a los carbapenémicos.

7.4. Muestra:

Panel de 100 cepas de las cuales 80 eran resistentes a carbapenémicos y 20 no presentaban carbapenemasas, remitidas al CNDR por los siguientes laboratorios:

- Hospital Antonio Lenin Fonseca.
- Hospital Solidaridad.
- Hospital Roberto Calderón.
- Hospital Victoria Mota.
- Hospital Alemán Nicaragüense.
- Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales.

- Hospital Aldo Chavarría.
- Hospital San Juan de Dios.
- Hospital Humberto Alvarado.
- Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera, La Mascota.
- Hospital Luis Felipe Moncada.
- Hospital Regional Asunción Juigalpa.
- Hospital Gaspar García Laviana.

7.5. Muestreo:

No probabilístico, por conveniencia.

7.6. Criterios de inclusión:

- Cepas de Enterobacterias y No fermentadores (*A. baumannii* y *P. aeruginosa*), remitidas al CNDR con resistencia adquirida a los carbapenémicos.
- Cepas procedentes de los laboratorios de la Red.

7.7. Criterios de exclusión:

- Cepas que no sean Bacilos Gram Negativos.
- Cepas con resistencia natural a los carbapenémicos.

7.8. Métodos, Técnicas e Instrumentos de recolección de datos.

La identificación de cepas fue realizada por medio de pruebas bioquímicas, antibiogramas, sinergismo, Blue carba y PCR.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Los datos se almacenaron en una base creada en Microsoft Office Excel 2016, considerados los más importantes para el estudio. El informe se redactó en Microsoft Office Word 2016 y la presentación en Microsoft Office Power Point 2016.

7.8.1. Recuperación del microorganismo:

- Tomar tres asadas del caldo leche que contienen las cepas en estudio y las cepas controles.
- Sembrar la muestra por agotamiento de estrías, en Agar Mac Conkey.
- Incubar de 16 - 24 horas a 37°C.
- Tomar una unidad formadora de colonias (UFC) y realizar una estría en Agar Nutritivo o Müeller Hinton.
- Incubar de 16 - 24 horas a 37°C.

7.8.2. Identificación bacteriana:

Se realizaron las pruebas bioquímicas para la identificación, según el Manual de Procedimientos de Bacteriología del MINSA 2004. (Ver anexos 8, 9 y 10).

Control de Calidad: (Ver Anexo 5).

7.8.3. Perfil de susceptibilidad (Kirby-Bauer).

- Preparar una suspensión con solución salina (0.85%) estéril con una densidad óptica de 0.5 McFarland del inóculo en tubos de ensayo, utilizando un densitómetro.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

- Sumergir un hisopo estéril en la suspensión preparada y escurrirlo en las paredes internas del tubo para retirar el excedente de suspensión.
- Sembrar por el método del rayado tri-direccional en agar Müller-Hinton (MH).
- Colocar los sensidiscos de manera estratégica para la detección de los mecanismos de resistencia.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Realizar la lectura de los halos con un caliper, según las normas CLSI 2017. (Ver Anexo 18)

Control de Calidad: (Ver Anexo 5).

7.8.4. Clasificación de carbapenemasas mediante el uso de inhibidores:

- Inocular una placa de agar Muller-Hinton, por el método de Kirby Bauer.
- Colocar los discos de la siguiente manera: IMI – EDTA – MEM para la identificación de Metalobetalactamasas; con una distancia de 15mm entre cada centro de los discos. ➤ Incubar a 37° C, por 24 horas.
- Testar CAZ – EDTA, en los casos de las cepas de *P. aeruginosa* con sinergia negativa sospechosa de metalo Betalactamasas.

Lectura e interpretación:

- Se observará sinergia entre los discos de IMP-EDTA, EDTA-MEM (Ver Anexo 13).
- En caso de *P. aeruginosa* se verá sinergia entre CAZ-EDTA. (Ver Anexo14).

Control de Calidad: (Ver Anexo 5).

7.8.5. Blue carba

Preparación:

Solución A (csp 100 ml):

- Disolver 40 miligramos de azul de bromotimol en 100 ml H₂O (concentración final 0.04%).
- Disolver en la SN anterior 1,6 miligramos de SO₄Zn (concentración final 0.1 mmol/L).
- Medir pH de la SN y ajustar a pH a 7.0.
- Filtrar con Millipore (opcional).

Procedimiento:

- Por cada cepa a ensayar, utilice 2 pocillos de una poli cubeta de 96 pocillos o dos tubos eppendorf. En cada uno de ellos, agregue:
 - a. 100 micro litros de Solución A (pocillo/tubo control)
 - b. 100 micro litros Solución A + imipenem 3 mg/ml (pocillo/tubo de reacción).
- Agregar en cada pocillo o tubo, un ansa de 5 micro litros completa con colonias crecidas en placa de MH, TSA o Agar Mac Conkey y resuspenderlas en el líquido de reacción. Si sólo dispone de ansa de 10 micro litros, resuspenda solo la mitad de la misma en cada tubo o pocillo.
- Tapar la poli cubeta o los tubos eppendorf.
- Incubar a 35-37°C por un máximo de 2 horas en agitación (si no cuenta con un agitador continuo, agite manualmente cada 15 minutos).

➤ Lectura e interpretación:

A ojo desnudo del color de cada pocillo/tubo. (Ver tabla Anexo 7).

Control de Calidad: (Ver Anexo 5).

7.8.6. PCR multiplex para MBL

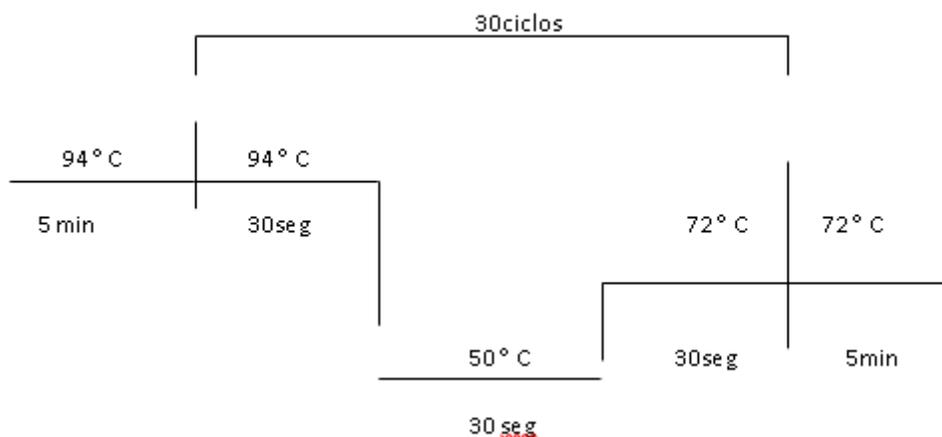
Mezcla de PCR para MBL tipo IMP, VIM y NDM

Reactivo	Volumen	[Final]
Buffer 10X	3 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl	1.5mM
dNTP's (10 mM)	0,7 µl	0.2mM
Taq DNA pol (5U/ul)	0,3 µl	0.04U
Primer vim-F (10 µM)	0,7 µl	0,2 µM
Primer vim-R (10 µM)	0,7 µl	0,2 µM
Primer ndm-F(10 µM)	0,7 µl	0,2 µM
Primer ndm-R(10 µM)	0,7 µl	0,2 µM
Primer imp-F(10 µM)	1.3	0.4 µM
Primer imp-R(10 µM)	1.3	0.4 µM
H ₂ O	13,8 µl	
ADN	2.3	
Vol. Final	27 µl	

Condiciones de reacción para la PCR

La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa para

MBL:



Los productos de PCR se revelaron utilizando gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red.

Resultados: (Ver anexo 17)

Control de Calidad: (Ver anexo 5).

7.8.7. Parámetros para la validación del Blue Carba.

La validación secundaria no es más que la demostración por experimento que un método establecido funciona de acuerdo con las especificaciones en las manos del usuario.

Los distintos parámetros para evaluar la prueba de Blue Carba se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

Sensibilidad:

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

Especificidad:

$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

Valor Predictivo Positivo

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

Valor Predictivo Negativo

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

Cociente de Probabilidad Positivo:

$$CPP = \frac{S}{1 - E}$$

Cociente de Probabilidad Negativa:

$$CPN = \frac{1 - S}{E}$$

Índice de exactitud:

$$IE = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \times 100$$

Índice de Youden:

$$IY = S + E - 1$$

Limitaciones del estudio:

Debido a factores económicos esta prueba no pudo ser validada para otras enzimas de carbapenemasas como KPC y OXA, ya que no contábamos con los reactivos suficientes ni con los respectivos iniciadores.

Debido al poco tiempo, no se pudo estandarizar en todos los laboratorios de La Red.

Criterios de aceptabilidad

Nuestros criterios de aceptabilidad se basan en los resultados obtenidos en el estudio de Pasterán, et al, (2015), “Evaluación de la prueba Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas en bacilos Gram negativos” en el que se obtuvo una sensibilidad del 96%, especificidad 95%, Valores Predictivos Positivos y Negativos de 99% y 96% respectivamente, cabe recalcar que se toman como referencia, ya que este es el único estudio realizado para esta prueba en toda Latinoamérica.

8. Operacionalización de variables

Variable	Sub-variable	Indicador	Valores	Criterios
Agente etiológico	Identificación Bacteriana	Reacciones obtenidas por pruebas Bioquímicas para Gram Negativos y que clasifican género y especie mediante flujogramas	Enterobacterias: <i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>E. cloacae</i> <i>S. marcescens</i> <i>E. gergoviae</i> <i>P. penneri</i> <i>E. fergusonii</i>	Características generales de las Enterobacterias: -Glucosasa positiva -Oxidasa negativa -Reducción de Nitratos a Nitritos -Anaerobios facultativos
			<i>A. baumannii</i>	-Oxidasa Negativa -Movilidad Negativa
			<i>P. aeruginosa</i>	-Oxidasa positiva -Movilidad positiva
Perfil de susceptibilidad a antimicrobianos	Antibiograma para Enterobacterias Y no fermentadores (<i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>).	Interpretación de la lectura de los halos de inhibición según las normas CLSI		Puntos de corte establecidos por CLSI
				Enterobacterias sospechosas de Carbapenemasas IMP ≤ 21 mm
				Tribu Proteae IMP ≤ 22 mm MEM ≤ 22 mm
			Sensible	Sospechosa de BLEE (Grupo KES) CAZ ≤ 22 CRO ≤ 25
			Intermedio	
			Resistente	Sospechosa de BLEE (<i>Proteus mirabilis</i>) CAZ ≤ 22 CTX ≤ 27
	<i>P. aeruginosa</i> Sospechosas de Carbapenemasas. MEM ≤ 23 CAZ ≤ 22			
	<i>A. baumannii</i> sospechosas de carbapenemasas. IMP ≤ 21 MEM ≤ 18			

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

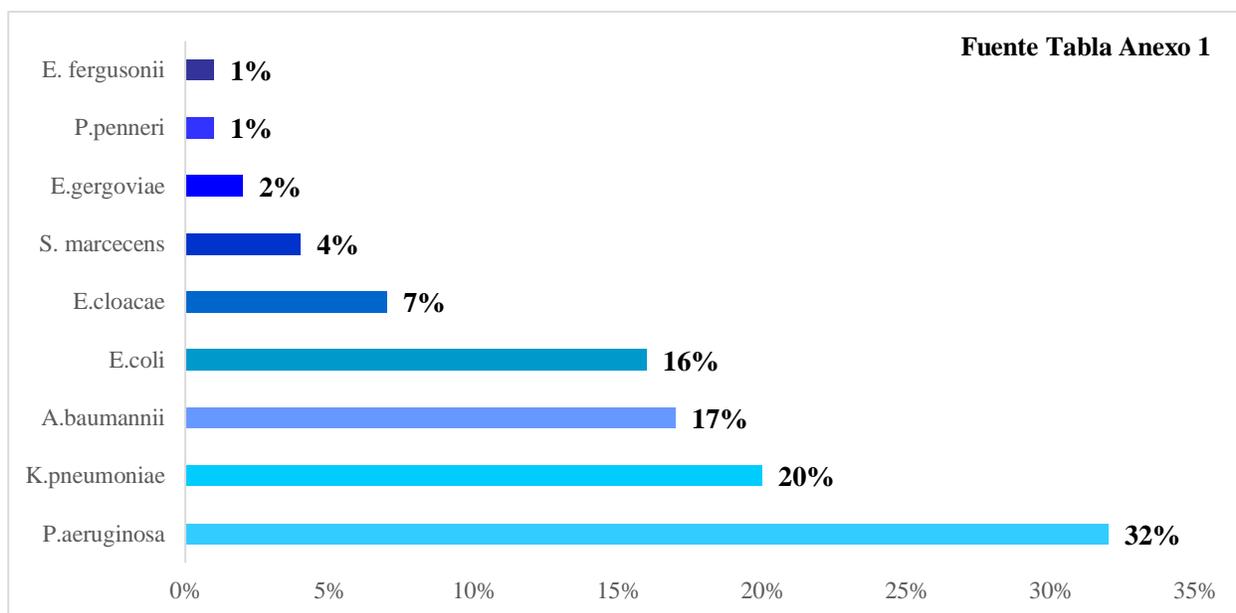
Variable	Sub-variable	Indicador	Valores	Criterios
Fenotipo de Metalobetalactamas	Test de sinergismo con EDTA	Presencia de sinergismo o fenómeno de huevo entre el inhibidor EDTA y el carbapenem.	Presencia de sinergia	Positiva
			Ausencia de sinergia	Negativa
Prueba rápida para carbapenemasas	Test de Blue Carba	Viraje de color por la acidificación que se produce por la hidrólisis del carbapenémico.	Azul/Amarillo	Positivo
			Azul/Verde	Positivo
			Verde/Amarillo	Positivo
			Azul/Azul	Negativo
			Verde/Verde	Negativo
Confirmación genotípica por PCR	PCR para MBL tipo IMP, VIM y NDM	Obtención del tamaño del producto específico para los genes <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{NDM}</i> amplificados por PCR y visualizados por electroforesis.	<i>bla_{VIM}</i>	Presencia a los 261 pb.
				Ausencia a los 261 pb.
			<i>bla_{IMP}</i>	Presencia a los 404 pb.
				Ausencia a los 404 pb.
			<i>bla_{NDM}</i>	Presencia a los 512 pb.
				Ausencia a los 512 pb.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Variable	Sub-variable	Indicador	Valores	Criterios
Validación secundaria de método cualitativo	Parámetros para la Validación del Blue Carba	Sensibilidad	$VP / (VP+FN)$	99%*
		Especificidad	$VN / (VN+FP)$	95%*
		Valor Predictivo Positivo	$VP / (VP+FP)$	99%*
		Valor Predictivo Negativo	$VN / (VN+FN)$	96%*
		Cociente de Probabilidad Positivo	$S / (1-E)$	
		Cociente de Probabilidad Negativo	$(1-S) / E$	
		Índice de Exactitud	$(VP+VN) / (VP+VN+FP+FN)$	
		Índice de Youden	$S+E-1$	
S=Sensible		I=Intermedio	R=Resistente	
*Pasterán, et al, 2015.				

9. Análisis e interpretación de los resultados.

Gráfico No. 1. Distribución porcentual de las Enterobacterias y No Fermentadores (*A. baumannii* y *P. aeruginosa*), remitidas al CNDR con resistencia adquirida a los carbapenémicos. n=100



En este Gráfico se observa que los microorganismos referidos más frecuentes en este estudio son: *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* con 32% y 20% respectivamente y las menos frecuentes son las de *E. fergusonii* y *P. penneri* con apenas 1% aislamientos cada especie.

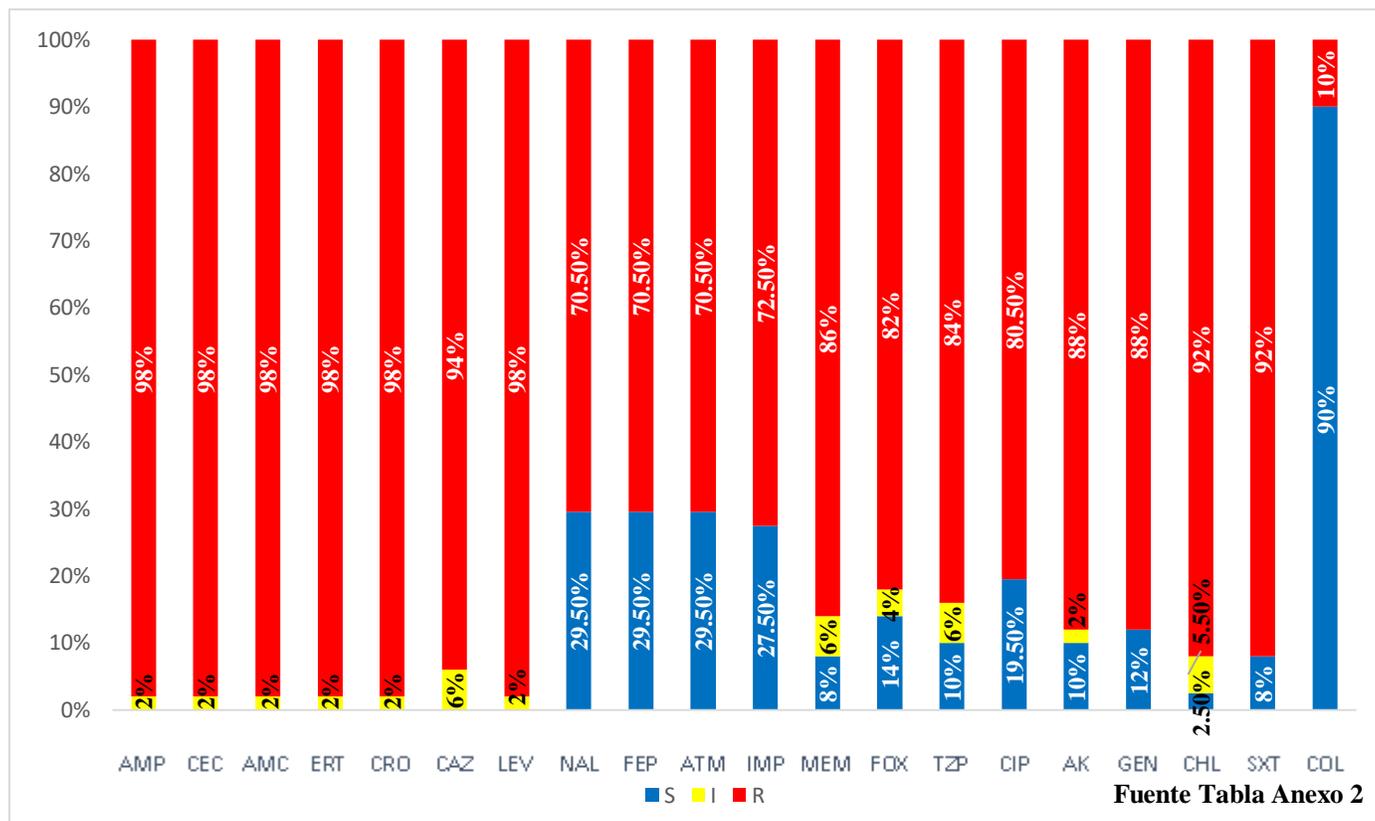
Este estudio concuerda con el de Ávila, J. (2012), en el que realizó la Caracterización fenotípica y genotípica de Enterobacterias productoras de carbapenemasas; este indica que, de los 47 aislamientos realizados 27 (82%), pertenecían a *K. pneumoniae*. Otro estudio más reciente, de Caldera y Robles (2016), en el cual se caracterizó fenotípicamente bacilos Gram negativos resistentes a los carbapenémicos nos afirma que una de las cepas predominantes era *P. aeruginosa* con 62 (31%), aislamientos y *K. pneumoniae* con 45 (23%), del total de cepas estudiadas. El estudio de Cerda, Martínez y Pérez (2016), en el que se identificaron Genes productores de carbapenemasas en Enterobacterias aisladas de pacientes del Hospital

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Alemán Nicaragüense también concuerda con nuestros resultados, ya que del total de las cepas 29 (64%), eran pertenecientes a aislamientos de *K. Pneumoniae*.

En datos recientes la Organización Mundial de la Salud emitió un boletín en el que se incluía a *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* como parte de los microorganismos de máxima o crítica prioridad, esto se debe a que *K. pneumoniae* es uno de los patógenos que está asociado con mayor frecuencia a las infecciones nosocomiales a nivel hospitalario, debido a su rápida diseminación y adaptación al ambiente hospitalario conferido por su cápsula, que le permite sobrevivir a diversos medios como manos del personal, instrumentos médicos, desinfectantes y mayormente a la desecación, caso similar a la diseminación de *P. aeruginosa*, que se transmite debido a que se adapta a las distintas superficies hospitalarias como los dispositivos médicos y a la transmisión de las manos infectadas del personal de salud hacia los pacientes.

Gráfico No. 2. Perfil de susceptibilidad de las Enterobacterias referidas por los laboratorios de la Red Nicaragüense para Vigilancia de los Antimicrobianos. n=51



AMP: Ampicilina, CEC: Cefaclor, AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico ERT: Ertapenem, CRO: Ceftriaxona
 CAZ: Ceftazidima, LEV: Levofloxacina, NAL: Ácido Nalidíxico, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, IMP: Imipenem,
 MEM: Meropenem, FOX: Cefoxitina, TZP: Piperacilina/Tazobactam, CIP: Ciprofloxacina, AK: Amikacina, GEN:
 Gentamicina, CHL: Cloranfenicol, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol, COL: Colistín.

Este grafico nos muestra el comportamiento de la resistencia en las cepas pertenecientes al grupo de las Enterobacterias donde de 51 cepas sometidas al evaluar los betalactámicos 50 (98%), cepas presentaron una resistencia a AMP, CEC, AMC, CRO y el 2%, presentó sensibilidad intermedia, para CAZ, 94% presentaron resistencia y solo 6% sensibilidad intermedia. El 29.5% presentaron sensibilidad a IMP, FEP y 70.5% fueron resistentes. Ese 29.5% de cepas sensibles también presentaron resistencia a las cefalosporinas conferidas por las BLEE. El 8% de cepas fueron sensibles a MEM, 6% presentó una sensibilidad intermedia y 66% fueron resistentes. Respecto a las fluoroquinolonas 29.5% presentaron sensibilidad a NAL, 19.5% a CIP y solo un 2% presentó sensibilidad intermedia a LEV. De los

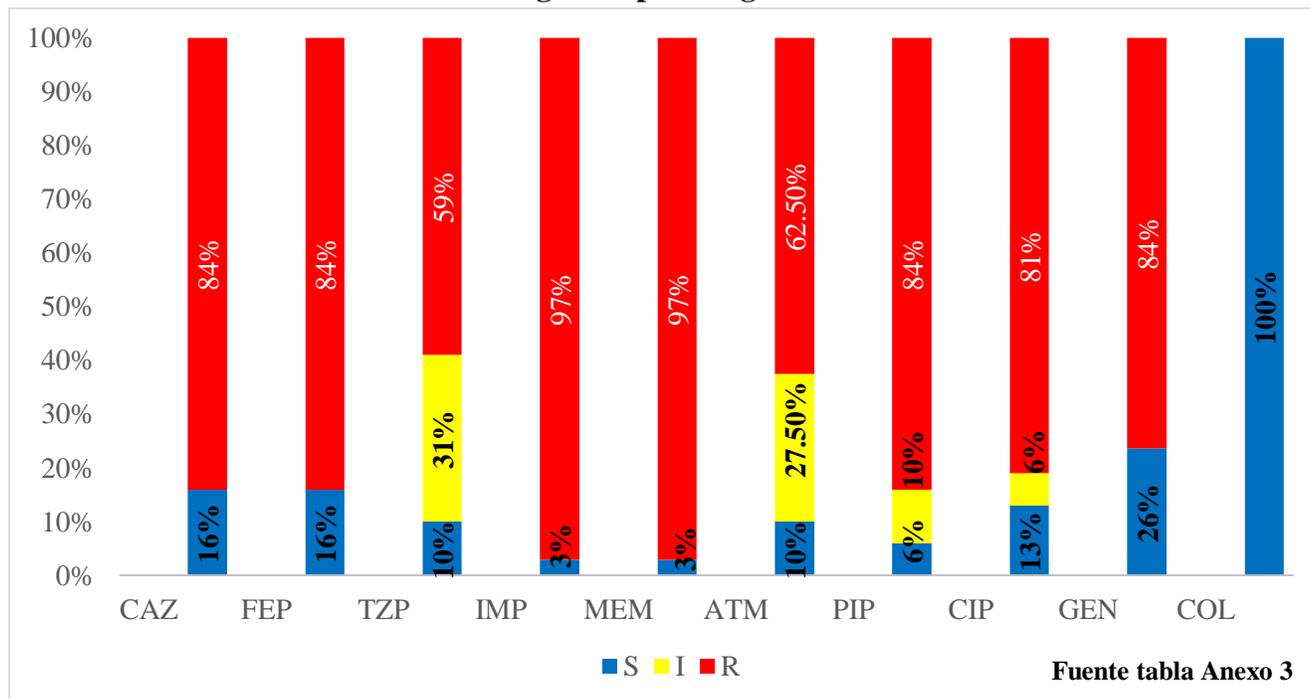
Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Aminoglucósidos solo 12% fueron sensibles a GEN. Del total, el 90% de cepas fueron sensibles a Colistín y 10% resultaron resistentes, esto debido a que eran cepas de *Serratia marcescens*, cuya resistencia es Natural a dicho antibiótico.

Este estudio concuerda con el de Ortiz, Rodríguez y Urbina (2014), en el que caracterizaron fenotípicamente Enterobacterias productoras de carbapenemasas aisladas de pacientes del Hospital Antonio Lenin Fonseca en los meses de Abril a Julio del 2014, en el cual casi su totalidad de aislamientos eran cepas resistentes a los betalactámicos.

La aparición de cepas multi-resistentes constituye uno de los mayores problemas en todo el mundo ya que dificultan el tratamiento de las enfermedades infecciosas y deterioran la calidad de vida de los pacientes. La alta frecuencia de resistencia a los betalactámicos significa la presencia de uno o varios mecanismos de resistencia en las cepas aisladas, como la presencia de las betalactamasa cromosómica tipo Amp-C y la Presencia de BLEE.

Gráfico No. 3. Perfil de Susceptibilidad de aislamientos de *P. aeruginosa* referidas por los laboratorios de la Red Nicaragüense para Vigilancia de los Antimicrobianos. n=32



CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, TZP: Piperacilina/Tazobactam, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, ATM: Aztreonam, PIP: Piperacilina, CIP: Ciprofloxacina, GEN: Gentamicina, COL: Colistín.

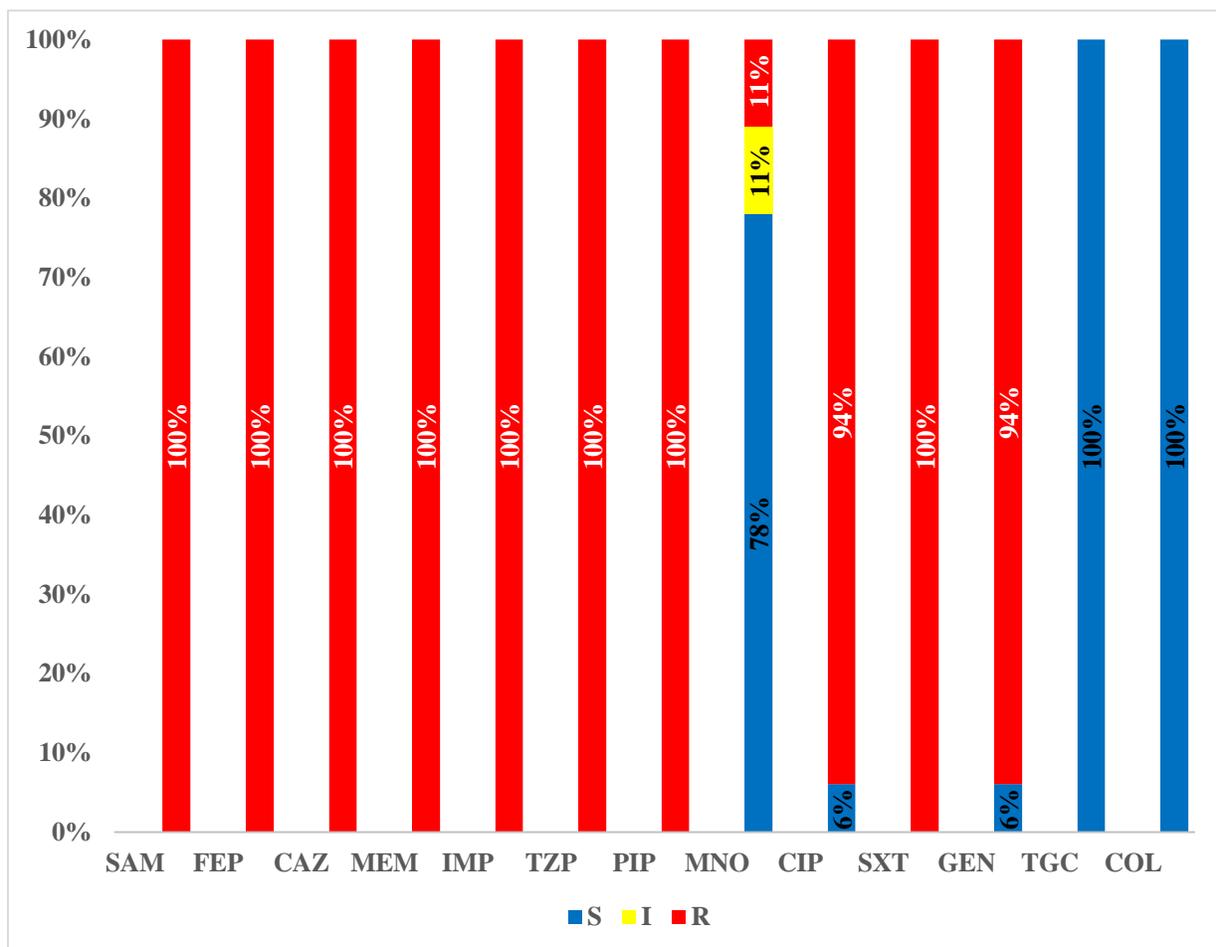
De un total de 32 cepas estudiadas, el 84% presentaron resistencia a CAZ, FEP y PIP, y 97% con resistencia a IMP y MEM de cual el 13% presentaban impermeabilidad y solo el 3% presentó sensibilidad a estos antibióticos las cuales poseían una BLEE que les confiere resistencia a las cefalosporinas. El 26% de las cepas presentaron sensibilidad a GEN de la familia de los Aminoglucósidos y un 13% eran sensibles a las Fluroquinolonas. El único antibiótico al que todas las cepas presentaron sensibilidad fue COL.

Un resultado muy similar con el estudio de Duarte et al. (2013), en el que describieron la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *P. aeruginosa* que provenían de 7 departamentos de Colombia, donde el 76% de las cepas de *P. aeruginosa* presentaron resistencia a estos antibióticos.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

El uso excesivo de antibióticos es una de las principales causas para la adquisición de diferentes mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* así como la presencia de uno o más tipos de Betalactamasas y la pérdida de porinas en la membrana de dicha bacteria, cabe destacar que su rápida diseminación por el personal de salud y la contaminación de equipos médicos son factores que predisponen a una mayor probabilidad de adquirir la infección.

Gráfico No. 4. Perfil de Susceptibilidad de las cepas de *A. baumannii* referidas por los laboratorios de la Red Nicaragüense para Vigilancia de los Antimicrobianos. n=17



SAM: Ampicilina/Sulbactam, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidima, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem, TZP: Piperacilina/Tazobactam, PIP: Piperacilina, MNO: Minociclina, CIP: Ciprofloxacina, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol, GEN: Gentamicina, TGC: Tigeciclina, COL: Colistín.

Este gráfico nos muestra que las 17 de cepas estudiadas de *A. baumannii* 17 presentan resistencia a SAM, FEP, CAZ, MEM, IMP, TZP, PIP y SXT, con sensibilidad a TGC y COL. Para los Aminoglucósidos y Fluroquinolonas solo 1 cepa presentó sensibilidad a GEN y CIP respectivamente. Para MNO un total de 13 cepas presentaron sensibilidad, 2 una sensibilidad intermedia y las 2 restante eran resistentes.

Oliva, J. (2015), llevó a cabo la caracterización de la resistencia bacteriana de *Acinetobacter baumannii* en las unidades de UCIN y neonatología del Hospital Nacional del Niño Benjamín Bloom y el Hospital Nacional de San Miguel, El Salvador y concuerda con nuestro estudio, ya que sus 25 (100%), cepas estudiadas presentaron resistencia total a los betalactámicos al igual que Caldera y Robles (2016), donde 65 (96%), cepas de un total de 67 (100%), presentaron resistencia a dicha familia de antibióticos.

Este estudio presenta un alto porcentaje de multi-resistencia en las cepas de *A. baumannii* que incluye a antibióticos de las familias de los betalactámicos en su totalidad, Aminoglucósidos y fluroquinolonas.

Acinetobacter baumannii es calificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como uno de los patógenos más problemáticos, responsable de infecciones asociadas a la atención sanitaria en el ámbito global. Toda esta problemática causada por dicho agente se debe a su viabilidad prolongada en el medioambiente inanimado, así como a su extraordinaria capacidad y rapidez de desarrollar resistencia a los antimicrobianos.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Sensibilidad: se obtuvo una sensibilidad del 99.9% lo que indica que la prueba es capaz de detectar el total de cepas productoras de carbapenemasas de tipo MBL específicamente VIM, IMP y NDM. (Ver Tabla Anexo 6).

Especificidad: de un total de 22 cepas negativas, 21 fueron detectadas como negativas, esto es equivalente a una especificidad del 95%. Lo que indica que nuestra prueba es capaz de discriminar casi el 100% de las cepas no productoras de carbapenemasas. (Ver Tabla Anexo 6).

Valor predictivo positivo: se determinó un valor predictivo positivo del 99%, esto nos indica el porcentaje de verdaderos positivos detectado dentro de los positivos identificados por la prueba evaluada. (Ver Tabla Anexo 6).

Valor predictivo negativo: con un porcentaje del 99.9% la prueba nos revela que es capaz de dar un resultado negativo dentro de aquellas cepas que realmente son identificadas como negativas o no productoras de enzimas carbapenemasas. (Ver Tabla Anexo 6).

Cociente de probabilidad positivo: con los resultados obtenidos podemos decir que la prueba tiene el 90% de probabilidad de diferenciar y/o detectar una cepa productora de carbapenemasas de una cepa no productora. (Ver Tabla Anexo 6).

Cociente de probabilidad negativo: para este parámetro se obtuvo un resultado 1.05%, lo que nos indica que nuestra prueba tiene el 1.05% de probabilidad de dar un resultado positivo para una cepa que realmente está negativa. (Ver Tabla Anexo 6).

Índice de exactitud: con un índice de exactitud del 99%, nuestra prueba es capaz de dar resultados muy confiables, es decir, detecta casi en su totalidad a todas aquellas cepas que

producen la enzima Carbapenemasa, que le confiere resistencia a los carbapenémicos. (Ver Tabla Anexo 6).

Índice de Youden: al obtener un valor muy próximo a 1 (99%), podemos asegurar que este método es muy confiable y que a través de él podemos dar un diagnóstico certero que nos indique si el paciente que padece una infección bacteriana tiene como opción terapéutica la línea de los carbapenémicos. (Ver Tabla Anexo 6).

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Pasterán et al (2015), en su estudio “Evaluación del Blue Carba para la detección rápida de Carbapenemasas en bacilos Gram negativos” en el cual se obtuvo una sensibilidad del 97%, una especificidad del 100% y para los valores predictivos positivo y negativo un resultado de 100% y 96% respectivamente. En otro estudio en el cual se evalúa el Blue Carba para la detección de diversos productores de Carbapenemasas directamente de cultivos bacterianos realizado por Pires, Novais & Peixe se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son satisfactorios y demuestran que la prueba es eficaz para la identificación fenotípica de Carbapenemasa de tipo Metalobetalactamasas de los genes especificados anteriormente y que puede ser empleada a nivel intrahospitalario para contribuir con una terapia rápida y eficaz.

Este estudio abre pautas para que en futuros trabajos se pueda validar la prueba Blue Carba en la detección de enzimas de tipo Serino y OXA, además de una posible estandarización en los diversos hospitales del país.

10. Conclusiones

1. De del total de cepas utilizadas e identificadas en este trabajo, el 49 % fueron cepas de No Fermentadores 17% *A. baumannii* y 32% *P. aeruginosa* y 51% de Enterobacterias, de las cuales 20% eran *K. pneumoniae*, 16% *E. coli*, 7% *e. cloacae*, 4% *S. marcescens*, 2% *E. gergoviae* y 1% para *E. fergusonii* y *P. penneri*.
2. Al evaluar el perfil de Susceptibilidad el 98% de las cepas de las Enterobacterias presentó una resistencia a AMP, CEC, AMC, ERT, CRO Y LEV, mientras que un 70.5% presentó una resistencia a NAL, FEP, ATM, IMP. El antibiótico que presentaba sensibilidad en el 90% de las cepas fue COL. De las cepas de *P. aeruginosa* el mayor porcentaje de resistencia lo obtuvieron IMP y MEM con 97%, mientras que el otro 3% presentaba sensibilidad a estos, pero con resistencia a las cefalosporinas proporcionada por las BLEE. Solo un 16% presentó sensibilidad a CAZ y FEP y el 100% a COL. En las cepas de *A. baumannii* el mayor porcentaje de sensibilidad lo obtuvieron COL y TGC con 100%, seguidos de MNO con 78%, mientras que, para SAM, FEP, CAZ, MEM, IMP, TZP, PIP y SXT el 100% de las cepas presentaron resistencia en su totalidad. Del 100% de cepas estudiadas, el 79% eran productoras de carbapenemasas tipo VIM, IMP y NDM, el resto 14% eran cepas productoras de BLEE que solo les conferían resistencia a las cefalosporinas, el 5% presentaban impermeabilidad pura, que les confiere resistencia a los carbapenémicos, pero son sensibles a las cefalosporinas y el 2% presentaba AMP-C+BLEE.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

3. Al ser evaluados los resultados mediante los distintos parámetros para la validación de métodos cualitativos, obtuvimos una sensibilidad y especificidad del 99.9% y 95% respectivamente, lo que nos indica que el Test Blue Carba es capaz de detectar entre cepas productoras de carbapenemasas del tipo MBL y cepas no productoras de estas enzimas.

11. Recomendaciones

Al personal médico:

1. Hacer uso adecuado de los antibióticos, para disminuir los brotes de multi-resistencia en las unidades hospitalarias.
2. Poner en práctica normas que eviten la diseminación de estas bacterias y brindar charlas a los pacientes sobre el uso inadecuado de los antibióticos y sus consecuencias.

Al personal de laboratorio:

1. Mantener en alerta al Cuerpo médico sobre los brotes que puedan ocasionarse a nivel intrahospitalario.
2. Implementar la prueba Blue Carba como parte de su rutina y así contribuir con una terapia eficaz.

A la Universidad:

1. Concientizar a los estudiantes de las carreras afines a la salud mediante charlas sobre el uso inadecuado de los antibióticos.
2. Motivar a los estudiantes a realizar investigaciones que aporten de manera significativa al área de la salud.

A los estudiantes:

1. Seguir realizando investigaciones para fortalecer los conocimientos sobre la importancia de la fármaco-resistencia y tratar de evitar brotes de esta índole.
2. Realizar estudios en un futuro donde puedan validar la prueba para las otras carbapenemasas (Serino y OXA).

12. Bibliografía

- Almaraz., G. (1996). valoración de los inhibidores de betalactamasa. *Servicio de Microbiología. Hospital La Fe. Avda. del Campanar, 21. 46009.*
- Ávila, J., López, S., Calderón, V., Matute, J. C., Videá, T., Baltodano, A., & Mejía, J. (2004). *Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica*. Managua: Litografía Nicaragüense.
- Cerda, H., Martínez, W., & Pérez, A. (2016). *Genes productores de Enzimas carbapenemasas tipi MBL, KPC y OXA mediante PCR en enterobacterias aisadas de pacientes del hospital Alemán Nicaragüense Agosto2015-Octubre2016*. Managua: UNAN-Managua.
- Duarte, L. (viernes de abril de 2015). <http://farmcologiabetalactamicos.blogspot.com/>.
Obtenido de <http://farmcologiabetalactamicos.blogspot.com/>
- Flesia, M. M. (2011). Penicilina. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad de Belgrano*, pp 2 - 4.
- Freile, D. M. (2010). <https://es.scribd.com/document/48370876/cefalosporinas>. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/48370876/cefalosporinas>
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2011). *Microbiología Médica*. México, D.F.: McGraw-Hill.
- Malgor-Valsecia. (s.f.). http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v14_n3/Pdf/a03.pdf. Obtenido de http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v14_n3/Pdf/a03.pdf
- Mazarro, D. (s.f.). http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a55tetraciclinas,_cloranfenicol_y_antibioticos_polipeptocos.pdf. Obtenido de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a55tetraciclinas,_cloranfenicol_y_antibioticos_polipeptocos.pdf

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a55tetraciclinas,_cloranfenicol_y_antibioticos_polipeptocos.pdf

Oliva, J. (2015). *Caracterización de la resistencia bacteriana de Acinetobacter baumannii en las unidades de UCIN y neonatología del Hospital Nacional del Niño Benjamín Bloom y el Hospital Nacional de San Miguel El Salvador en los meses de Enero a Mayo del 2015*. Managua: UNAN-Managua.

OPS/OMS. (2014). Actualización Epidemiológica. Carbapenemasas tipo New Delhi Metalobetalactamasas (NDM)

Ortiz, D., Rodríguez, M., & Urbina, J. (2014). *Identificación fenotípica de enterobacterias productoras de Carbapenemasas y genes de Betalactamasas aisladas de pacientes del Hospital Antonio Lenin Fonseca Abril-Julio 2014*. Managua: UNAN. Managua.

Ortiz Machado, D. A., & Rodríguez Orozco, M. I. (2015).

<http://repositorio.unan.edu.ni/1001/>. Obtenido de

<http://repositorio.unan.edu.ni/1001/>

Palomino, J., & Pachón, J. (22 de 2 de 2003).

<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a6aminoglucosidos.pdf>. Obtenido de <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a6aminoglucosidos.pdf>

Pasteram, F., Rapoport, M., Lucero, C., & Corso, A. (25-28 de abril de 2015). Comparison of the in-house Blue-Carba Test (BCT), with the Rapid CARB Blue Kit for the detection of Carbapenemase-Producing Gram Negative Bacilli. Copenhagen, Dinamarca

Pediamécum. (mayo de 2016). Trimetoprim. España.

Pires, J., Novais, A., & Peixe, L. (diciembre de 2013). Blue-Carba, an Easy Biochemical Test

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures.

Estados Unidos de América. doi:10.1128 / JCM.01634-13

Saldaña.et.al. (2004).

http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v14_n3/Pdf/a03.pdf.

Obtenido de

http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v14_n3/Pdf/a03.pdf

Segura Egea, J. J. (octubre de 2002). *Sensibilidad y especificidad de los métodos*

diagnósticos convencionales. Obtenido de Scielo:

[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138123X2002000600004
&lng=es&nrm=iso.](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138123X2002000600004&lng=es&nrm=iso)

UDCA. (26 de septiembre de 2016). <https://es.wordpress.com/>. Obtenido de

<https://fenicolesveterinaria.wordpress.com/2016/09/26/estructura-quimica/>

Velazco, J., Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramirez, A., . . . Velazco, E.

(2011). *Manual práctico de Bacteriología Clínica*. Mérida: Editorial Venezolana C.

A.

Zepeda, J. (s.f.). Bacilos gram-negativo. Anotaciones de interés clínico. *Revista Médica*

Hondureña, 105-113.

Anexos

Anexo 1: Cepas remitidas al CNDR por la Red Nicaragüense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos.

Enterobacterias y No fermentadores	Frecuencia	Porcentaje
<i>P. aeruginosa</i>	32	32%
<i>K. pneumoniae</i>	20	20%
<i>A. baumannii</i>	17	17%
<i>E. coli</i>	16	16%
<i>E. cloacae</i>	7	7%
<i>S. marcescens</i>	4	4%
<i>E. gergoviae</i>	2	2%
<i>P. penneri</i>	1	1%
<i>E. fergusonii</i>	1	1%
Total	100	100%

Fuente: Ficha de recolección de Datos.

Anexo 2: Perfil de susceptibilidad de la Enterobacterias.

	S	I	R
AMP	0	1	50
	0%	2%	98%
CEC	S	I	R
	0	1	50
	0%	2%	98%
CAZ	S	I	R
	0	1	50
	0%	2%	98%
AMC	S	I	R
	0	1	50
	0%	2%	98%
CRO	S	I	R
	0	1	50
	0%	2%	98%
FEP	S	I	R
	0	3	48
	0%	6%	94%
ATM	S	I	R
	0	1	50
	0%	2%	98%

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

IMP	S	I	R
	15	0	36
	29.50%	0%	70.50%
MEM	S	I	R
	15	0	36
	29.50%	0%	70.50%
ERT	S	I	R
	15	0	36
	29.50%	0%	70.50%
FOX	S	I	R
	14	0	37
	27.50%	0%	72.50%
TZP	S	I	R
	4	3	44
	8%	6%	86%
CHL	S	I	R
	7	2	42
	14%	4%	82%
CIP	S	I	R
	5	3	43
	10%	6%	84%
LEV	S	I	R
	7	0	29
	19.50%	0%	80.50%
NAL	S	I	R
	5	1	45
	10%	2%	88%
GEN	S	I	R
	6	0	45
	12%	0%	88%
AK	S	I	R
	1	2	33
	2.50%	5.50%	92%
SXT	S	I	R
	4	0	47
	8%	0%	92%
COL	S	I	R
	46	0	5
	90%	0%	10%

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Anexo 3: Perfil de susceptibilidad de *P. aeruginosa*.

CAZ	S	I	R
	5	0	27
	16%	0%	84%
FEP	S	I	R
	5	0	27
	16%	0%	84%
TZP	S	I	R
	3	10	19
	10%	31%	59%
IMP	S	I	R
	1	0	31
	3%	0%	97%
MEM	S	I	R
	1	0	31
	3%	0%	97%
ATM	S	I	R
	3	9	20
	10%	27.50%	62.50%
PIP	S	I	R
	2	3	27
	6%	10%	84%
CIP	S	I	R
	4	2	26
	13%	6%	81%
GEN	S	I	R
	5	0	27
	26%	0%	84%
COL	S	I	R
	32	0	0
	100%	0%	0%
Fuente: Ficha de recolección de datos			

Anexo 4: Perfil de susceptibilidad de *A. baumannii*.

SAM	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
FEP	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
CAZ	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
MEM	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
IMP	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
TZP	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
PIP	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
MNO	S	I	R
	13	2	2
	78%	11%	11%
CIP	S	I	R
	1	0	16
	6%	0%	94%
SXT	S	I	R
	0	0	17
	0%	0%	100%
GEN	S	I	R
	1	0	16
	6%	0%	94%
TGC	S	I	R
	17	0	0
	100%	0%	0%

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

COL	S	I	R
	17	0	0
	100%	0%	0%

Fuente: ficha de recolección de datos.

Anexo 5: Cepas utilizadas en el control de calidad de las distintas pruebas.

Cepas control	Agares y Pruebas Bioquímicas	Kirby Bauer	Sinergismo		Blue carba	PCR
			BLEE	MBL		
<i>E. coli</i> 25922	✓	✓			✓	
<i>E.coli</i> 35218		✓				
<i>P. aeruginosa</i> 27853	✓	✓				
<i>E. faecalis</i> 29212	✓					
<i>P. mirabilis</i> 7002	✓					
<i>S. aureus</i> 25923		✓				
<i>K. pneumoniae</i> 700603			✓			
<i>K. pneumoniae</i> 13883	✓					
SMA 158			✓		✓	✓
<i>E:coli</i> J5B			✓		✓	✓
ETBRC 1-37-37				✓	✓	✓
MRPA 195				✓	✓	✓
MRAB 1-16-16				✓	✓	✓
MRPA 4-6-6					✓	✓

Anexo 5: Ficha de recolección de Datos.

Ministerio de Salud
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
CNDR
Dirección de Microbiología
Departamento de bacteriología

Ficha de recolección de datos

I. Datos generales

Cód. Mx: _____ Cód. Almacenamiento: _____
Procedencia: _____ Tipo de Mx: _____

II. Identificación

Género y especie: _____

III. Perfil de susceptibilidad: (se reporta en mm).

FOX__	CAZ__	CRO__	AMC__	IMP__	MEM__
EDTA__	APB__	CIP__	CN__	CEC__	ETP__
FEP__	COL__	CXM__	MNO__	LVX__	ANK__
CEF__	DOR__	CHL__	ATM__	CTX__	TET__
NAL__	STX__	PIP__	TIG__	NIT__	AMP__
TZP__	AMP__	PB__	SAM__		

IV. Sinergia

IMP – EDTA – MEM _____ EDTA – CAZ _____

V. Método a validar.

Blue Carba

Positivo__ Negativo_____

VI. Prueba de oro (PCR).

BLEE__ Impermeabilidad__ Amp-C__

Metalobetalactamasas (MBL).

VIM__ IMP__ NDM__

Anexo 6: Parámetros para la validación de métodos Cualitativos.

		PCR	
		Positivo	Negativo
Blue Carba	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

$$S = VP / (VP + FN)$$

$$E = VN / (VN + FP)$$

$$VPP = VP / (VP + FP)$$

$$VPN = VN / (VN + FN)$$

$$CPP = S / (1 - E)$$

$$CPN = (1 - S) / E$$

$$IE = (VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)$$

$$IY = S + E - 1$$

S = sensibilidad; E = especificidad; VPP = valor predictivo positivo; VPN = valor predictivo negativo; CPP = cociente de probabilidad positivo; CPN = cociente de probabilidad negativo; IE = índice de exactitud; IY = índice de Youden.

Anexo 7: Tabla de contingencia sobre la evaluación de los parámetros para la validación del método cualitativo Blue Carba.

Tabla de contingencia 2x2				
		PCR		
		Positivos	Negativos	Total
Blue Carba	Positivos	78	1	79
	Negativos	0	21	21
	Total	78	22	100
Criterios de aceptabilidad				
Sensibilidad		99.9%	97%*	
Especificidad		95%	95%*	
VPP		99.9%	99%*	
VPN		99.9%	96%*	
CPP		90%		
CPN		1.05%		
IE		99%		
IY		0.99		
*Pasterán, et al. 2015				

Anexo 8: Interpretación de los resultados de la prueba Blue Carba

Color pocillo/tubo control	Color pocillo/tubo reacción	Interpretación
(sin Imipenem)	(con Imipenem)	
Azul	Amarillo	Carbapenemasa positivo
Azul	Verde	Carbapenemasa positivo
Verde	Amarillo	Carbapenemasa positivo
Azul	Azul	Carbapenemasa negativo
Verde	Verde	Carbapenemasa negativo
Amarillo	Azul/Verde/Amarillo	Test inválido

Anexo 9: Flujoigramas para la identificación de Enterobacterias.

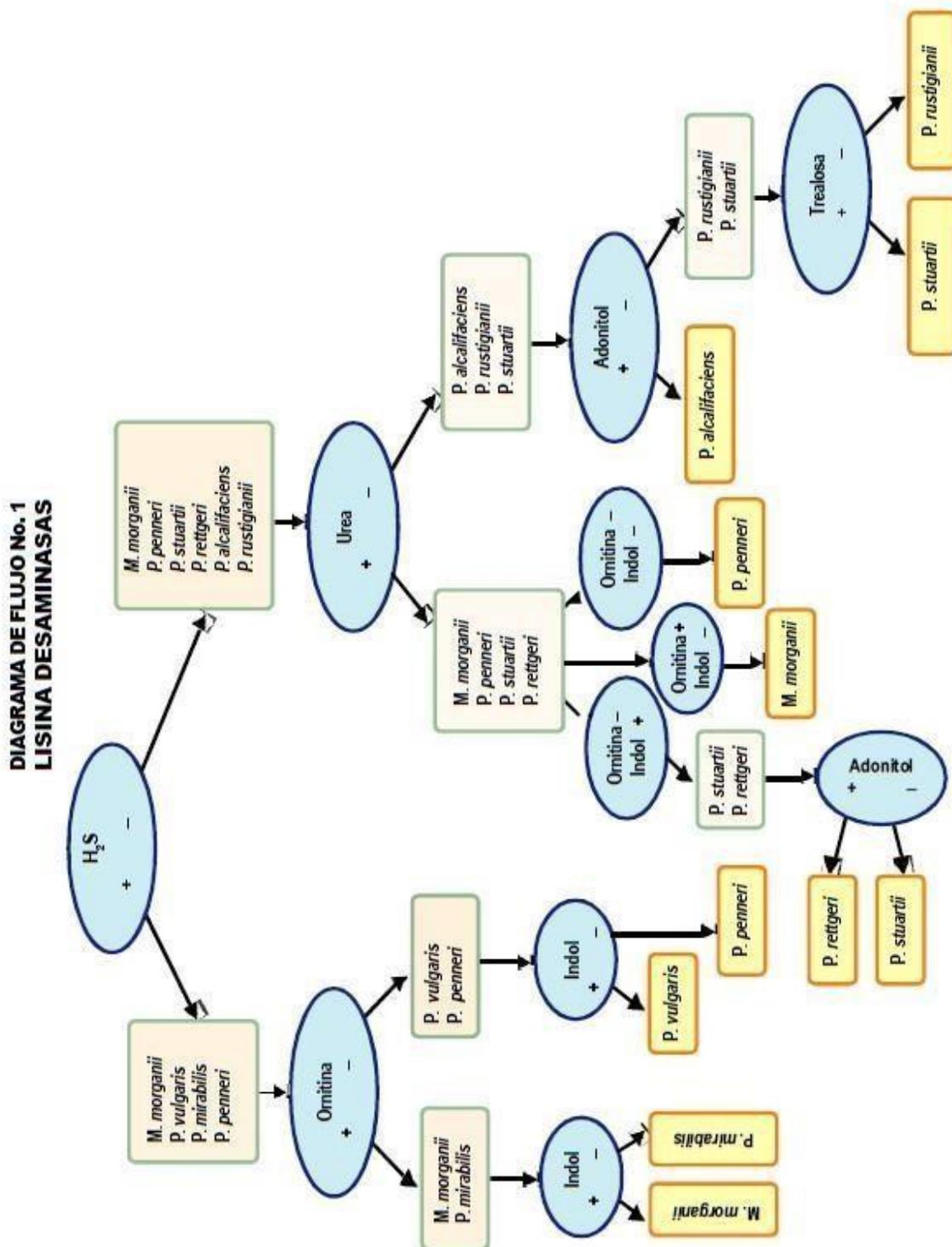
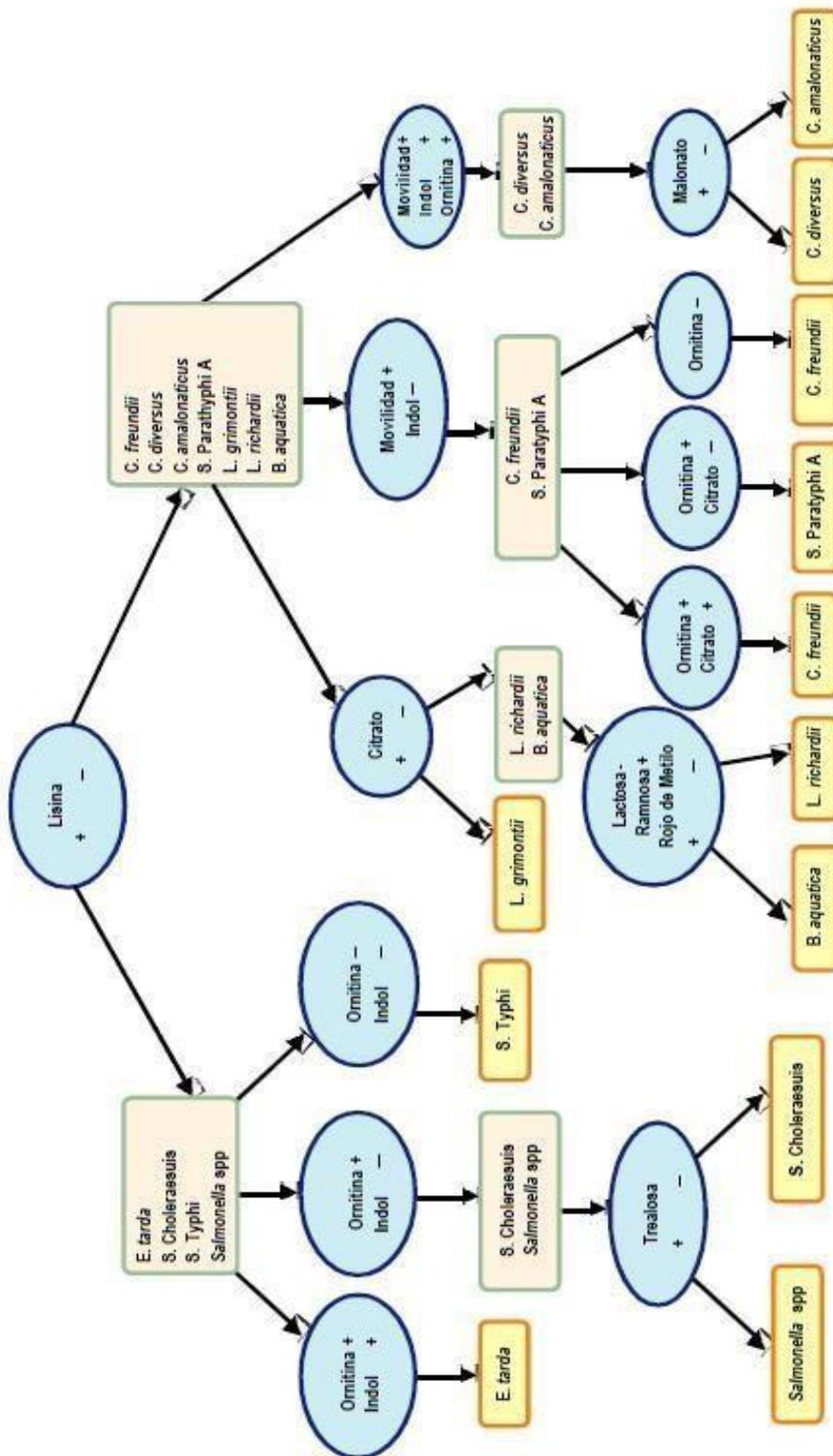
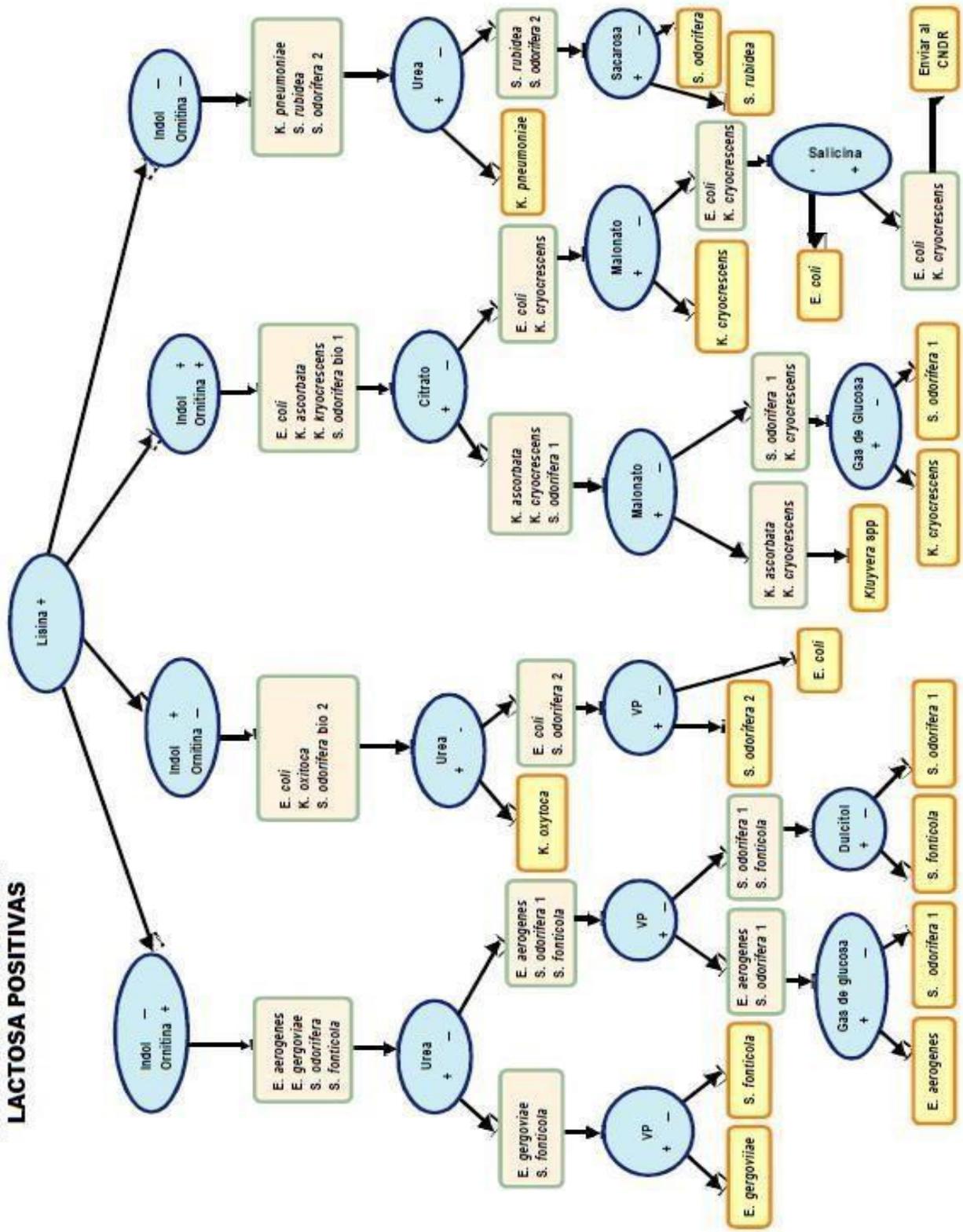


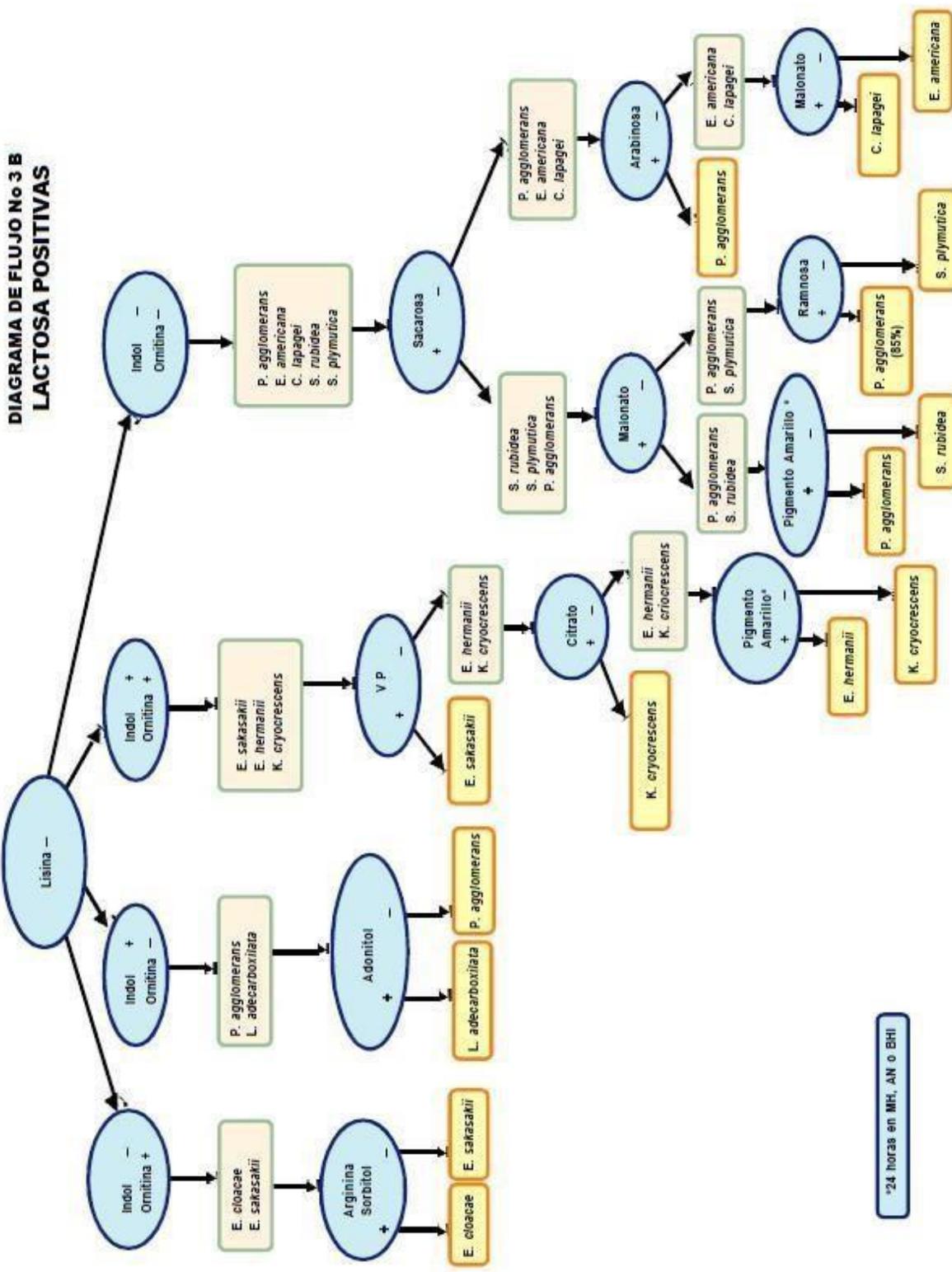
DIAGRAMA DE FLUJO No. 2
PRODUCTORAS DE H₂S



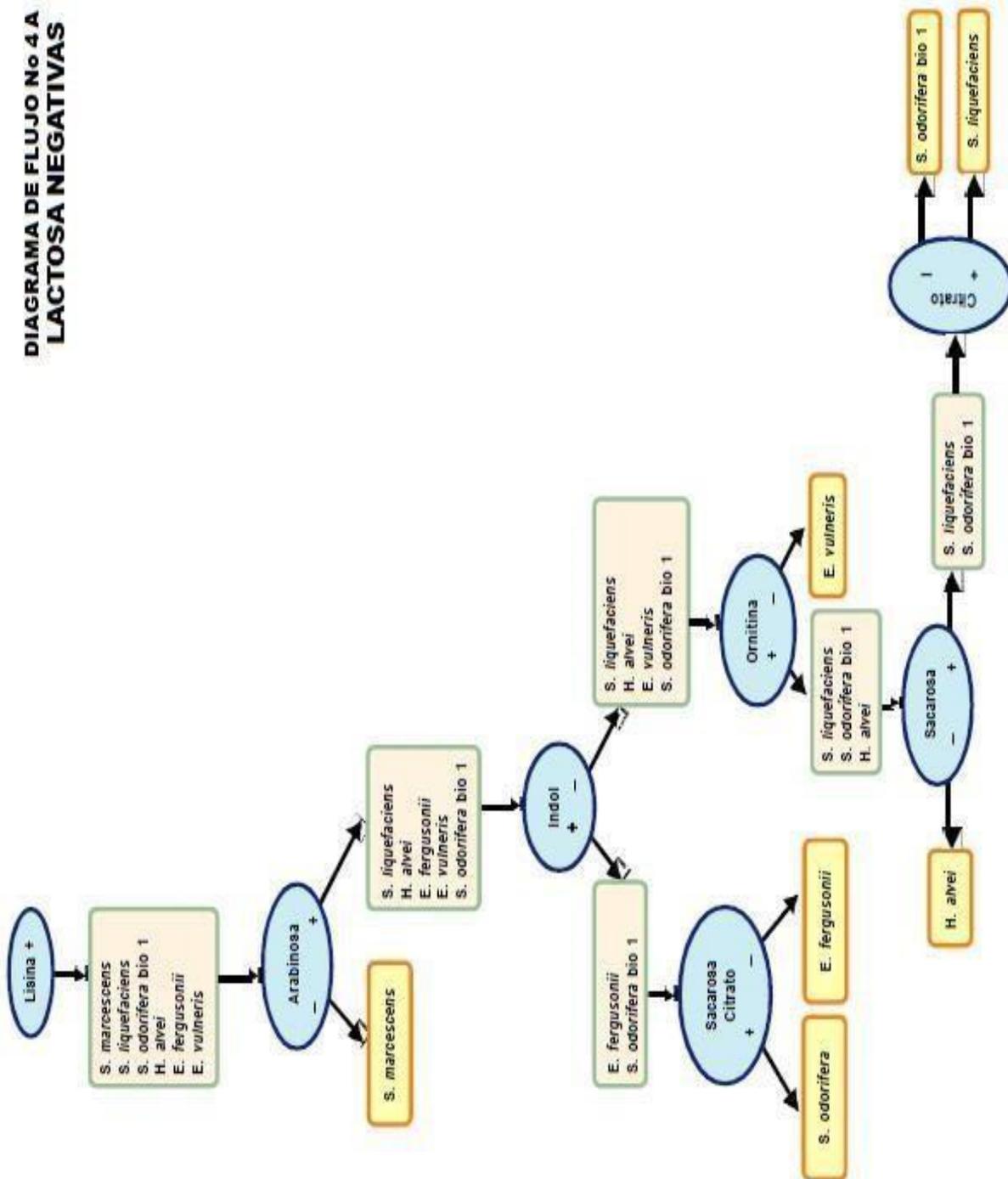
Fuente: Manual de Procedimientos Bacteriológicos, 2004.

DIAGRAMA DE FLUJO No. 3 A
LACTOSA POSITIVAS





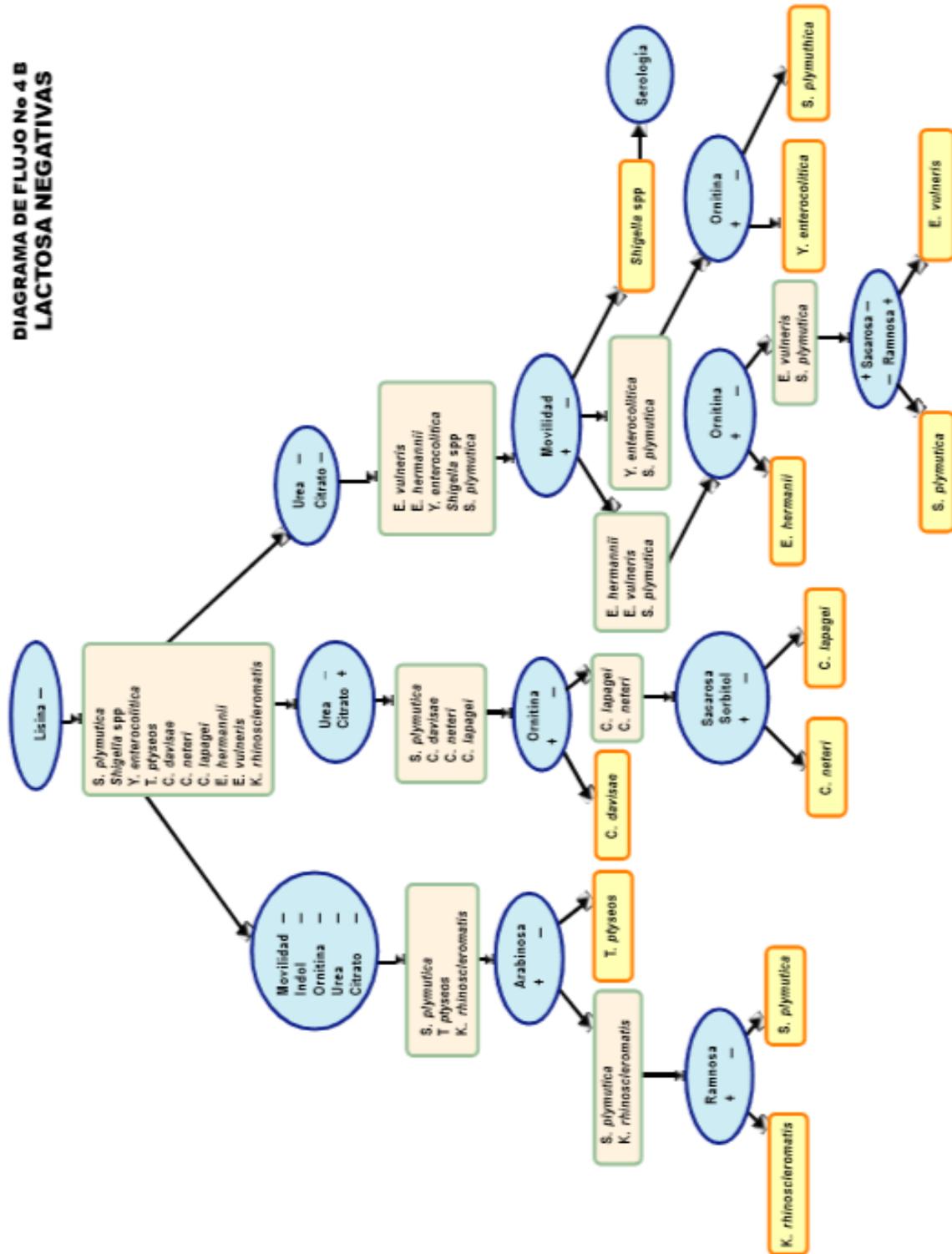
**DIAGRAMA DE FLUJO No 4 A
LACTOSA NEGATIVAS**



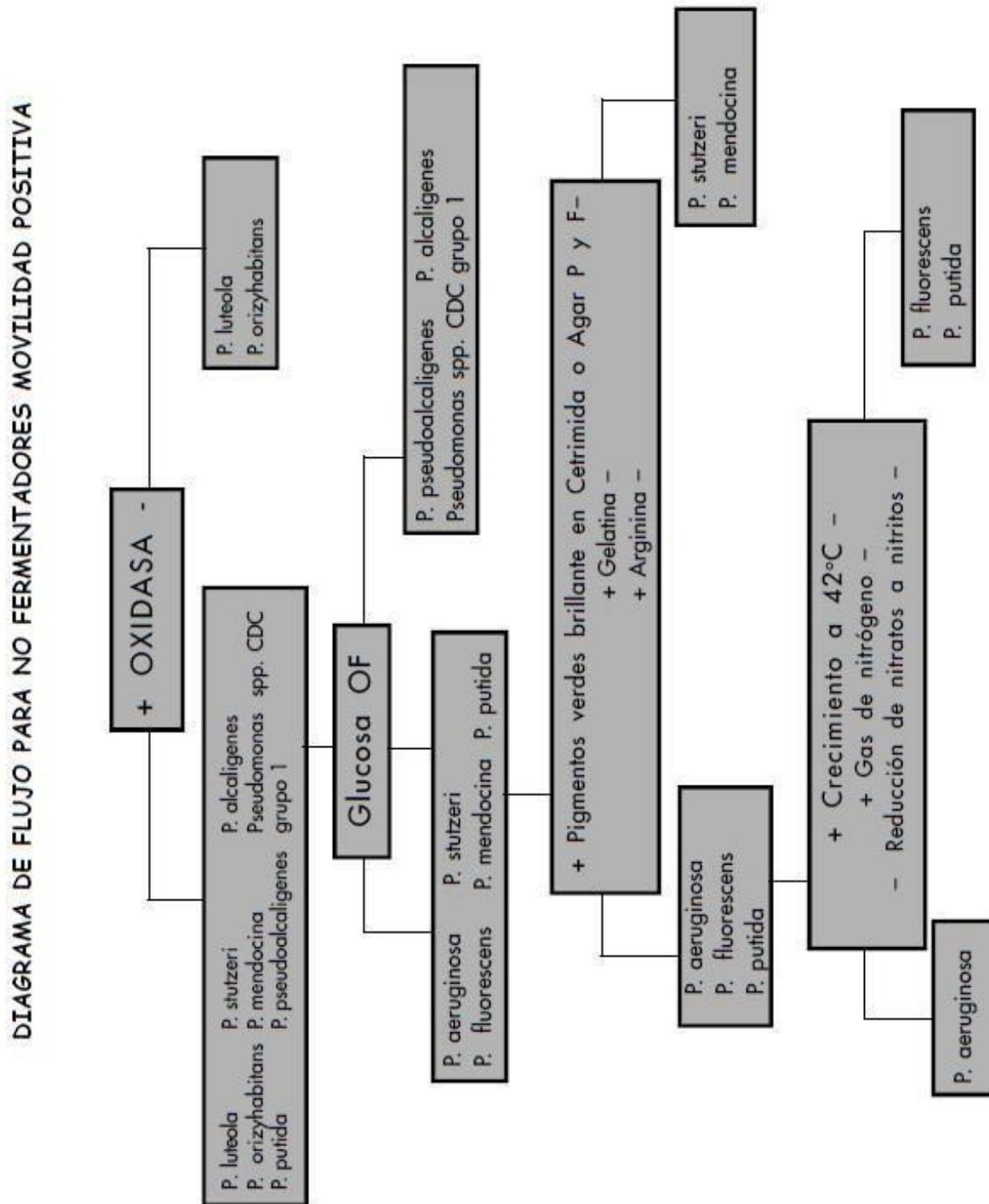
Fuente: Manual de Procedimientos Bacteriológicos, 2004.

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

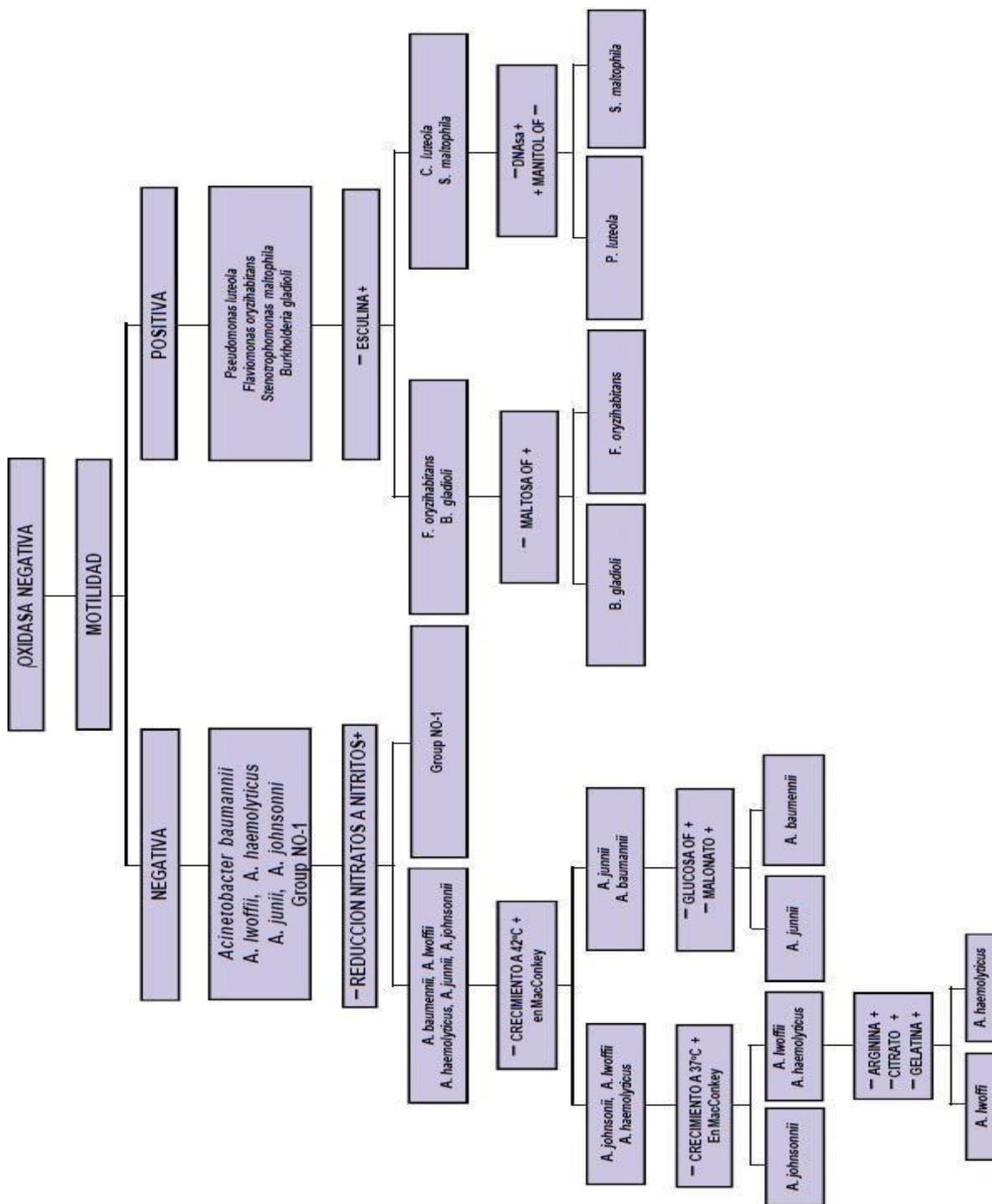
**DIAGRAMA DE FLUJO No 4 B
LACTOSA NEGATIVAS**



Anexo 10: Flujograma para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

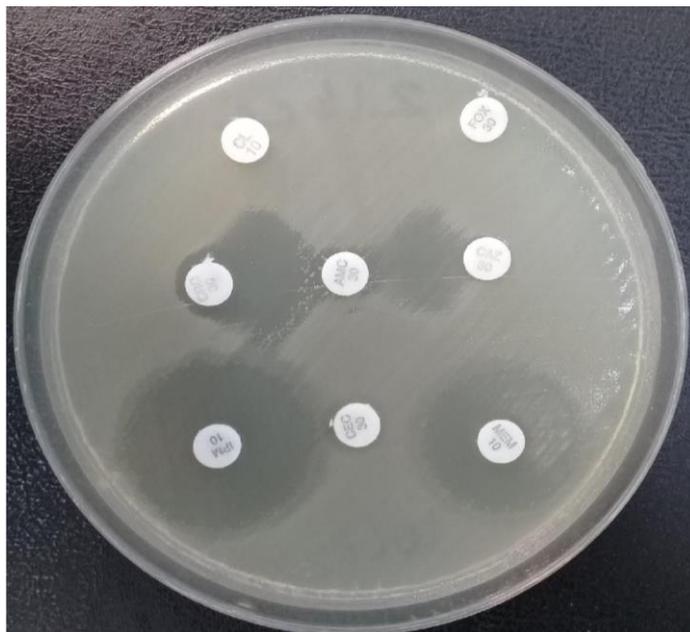


Anexo11: Flujograma para la identificación de *Acinetobacter baumannii*.



Fuente: Manual de Procedimientos Bacteriológicos, 2004.

Anexo 12: Sinergia con CAZ-AMC-CRO



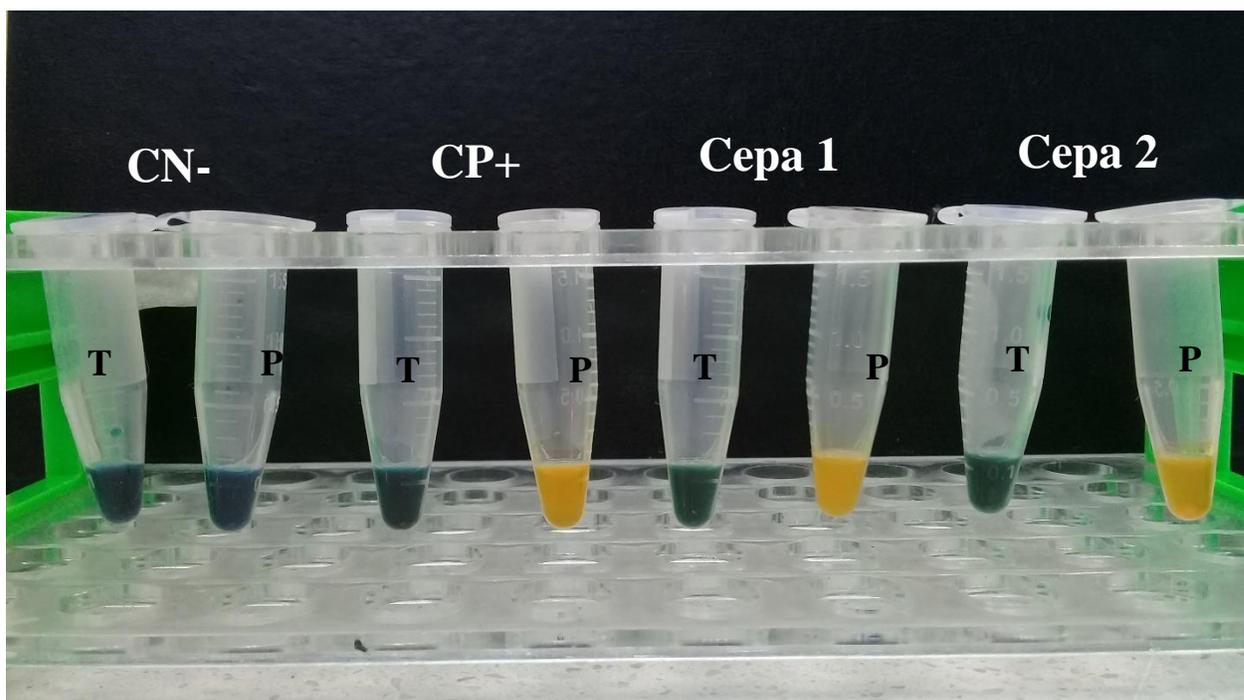
Anexo 13: Sinergia con IMP-EDTA-MEM



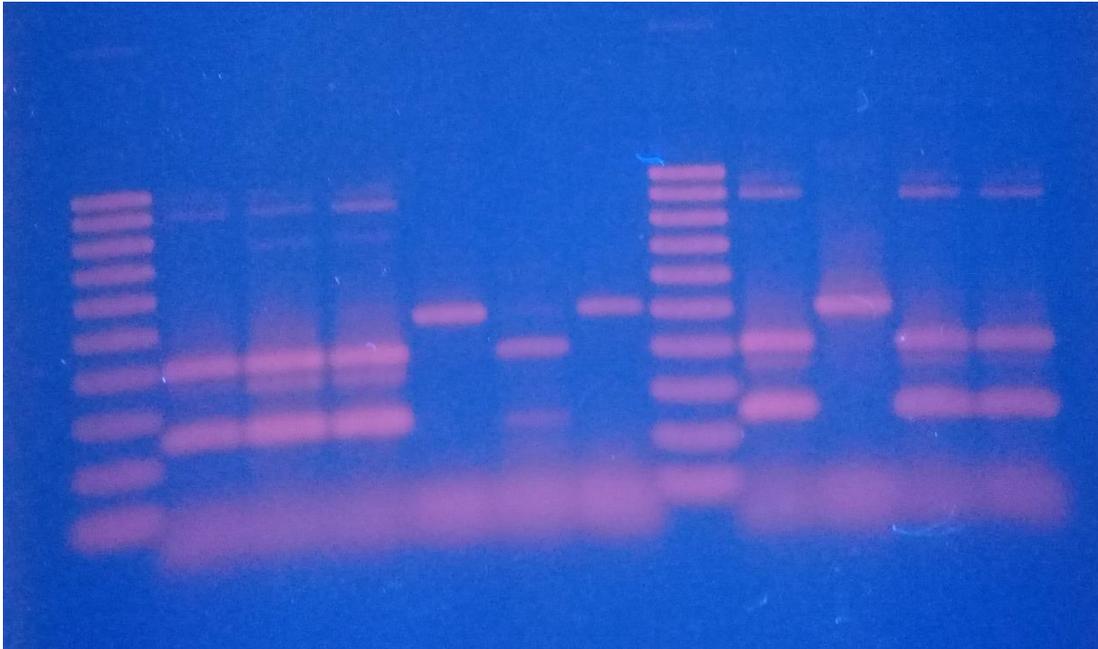
Anexo 14: Sinergia con CAZ-EDTA



Anexo 15: Prueba Blue Carba



Anexo 16: PCR para VIM, IMP y NDM



Anexo 17: Resultados de Blue Carba y PCR por género y especie.

Cepa	BLUE CARBA (+)	BLUE CARBA (-)	PCR/Gen						PCR (-)	Total
			VIM	IMP	NDM	Amp-C + BLEE	Impermeabilidad	BLEE		
<i>P.aeruginosa</i> (32)	26	6	23	-	2	-	5	1	1	32
<i>K.pneumoniae</i> (20)	18	2	-	-	18	-	-	2	-	20
<i>A.baumannii</i> (17)	17	-	-	-	17	-	-	-	-	17
<i>E.coli</i> (16)	9	7	-	-	9	-	-	7	-	16
<i>E.cloacae</i> (7)	4	1	-	-	4	2	-	1	-	7
<i>S.marcesens</i> (4)	2	2	-	-	2	-	-	2	-	4
<i>E.ergovioiae</i> (2)	2	-	1	1	-	-	-	-	-	2
<i>P.penneri</i> (1)	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>E.fergusonii</i> (1)	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1
TOTAL	79	20	24	1	53	2	5	14	1	100

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Anexo 18: Valores de corte de la CLSI 2017.

Microorganismo	Antibiótico(carga)	Difusión en disco(mm)		
		S	I	R
<i>Enterobacterias</i>	Aztreonam(30µg)	≥21	0	≤17
	Ciprofloxacino(5µg)	≥21	16-20	≤15
	Piperatazo(110µg)	≥21	18-20	≤17
	Cefepime(30µg)	≥25	≤19-24	≤18
	*Colistin(10µg)	-	-	-
	Ceftazidima(30µg)	≥21	18-20	≤17
	Gentamicina(10µg)	≥15	13-14	≤12
	Imipenem(10µg)	≥17	15-18	≤19
	Meropenem(10µg)	≥19	16-18	≤15
	Amikacina(30µg)	≥17	15-16	≤14
	Ciprofloxacino(5µg)	≥21	16-20	≤15
	Cefepime(30µg)	≥25	19-24	≤18
	Ceftazidima(30µg)	≥21	18-20	≤17
	Ampicilina(10 ug)	≥17	14-16	≤13
	Gentamicina(10µg)	≥15	13-14	≤12
	Imipenem(10µg)	≥23	20-22	≤19
	Meropenem(10µg)	≥18	15-17	≤14
	Amikacina(30µg)	≥17	15-16	≤14
	Piperacilina(100µg)	≥21	18-20	≤17
	Piperatazo(110µg)	≥21	18-20	≤17
Cloranfenicol(30ug)	≥18	13-17	≤12	
Trimetoprim sulfa (1.25 /23.75 µg)	≥16	11-15	≤10	

Validación del método Blue Carba para la detección rápida de carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas en cepas de Bacilos Gram Negativos. Nicaragua, 2019

Microorganismo	Antibiótico (carga)	Difusión en disco(mm)		
		S	I	R
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	Aztreonam(30µg)	≥22	16-21	≤15
	Ciprofloxacino(5µg)	≥21	16-20	≤15
	Piperatazo(110µg)	≥21	15-20	≤14
	Cefepime(30µg)	≥18	15-17	≤14
	*Colistin(10µg)	-	-	-
	Ceftazidima(30µg)	≥18	15-17	≤14
	Gentamicina(10µg)	≥15	13-14	≤12
	Imipenem(10µg)	≥17	15-18	≤19
	Meropenem(10µg)	≥19	16-18	≤15
	Amikacina(30µg)	≥17	15-17	≤14
	Piperacilina(100µg)	≥21	15-20	≤14
<i>Acinetobacter spp.</i>	Ampicilina sulbactam(20µg)	≥15	12--14	≤11
	Ciprofloxacino(5µg)	≥21	16-20	≤15
	Cefepime(30µg)	≥18	15-17	≤14
	Minociclina(30µg)	≥16	13-15	≤12
	Ceftazidima(30µg)	≥18	15-17	≤14
	Gentamicina(10µg)	≥15	13-14	≤12
	Imipenem(10µg)	≥22	16-21	≤18
	Meropenem(10µg)	≥18	15-17	≤14
	Amikacina(30µg)	≥17	15-16	≤14
	Piperacilina(100µg)	≥21	18-20	≤17
	Piperatazo(110µg)	≥21	18-20	≤17
Trimetoprim sulfa (1.25 /23.75 µg)	≥16	11--15	≤10	