

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**“DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS TIPO NDM-1 Y KPC-2  
EN ENTEROBACTERIAS BLEE+:  
EVALUACIÓN FENOTÍPICA CON CONFIRMACIÓN GENOTÍPICA”**

Estudio descriptivo transversal realizado con enterobacterias aisladas  
en cultivos obtenidos en el Laboratorio Nacional de Salud durante  
el año 2012 y de pacientes consultantes de un grupo hospitalario privado  
de la Ciudad Capital de Guatemala

mayo-agosto 2013

Tesis:

Presentada a la Honorable Junta Directiva  
de la Facultad de Ciencias Médicas de la  
Universidad de San Carlos de Guatemala

**Ana María Chinchilla Puente  
Brayan Esaú Tomas Barrios  
Robin Derek Morales Santizo**

Médico y Cirujano

Guatemala, septiembre de 2013



El infrascrito Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala hace constar que:

Los estudiantes:

Ana María Chinchilla Puente	200710151
Brayan Esaú Tomas Barrios	200710153
Robin Derek Morales Santizo	200710537

han cumplido con los requisitos solicitados por esta Facultad, previo a optar al Título de Médico y Cirujano, en el grado de Licenciatura y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

**“DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS TIPO NDM-1Y KPC-2  
EN ENTEROBACTERIAS BLEE+:  
EVALUACIÓN FENOTÍPICA CON CONFIRMACIÓN GENOTÍPICA”**

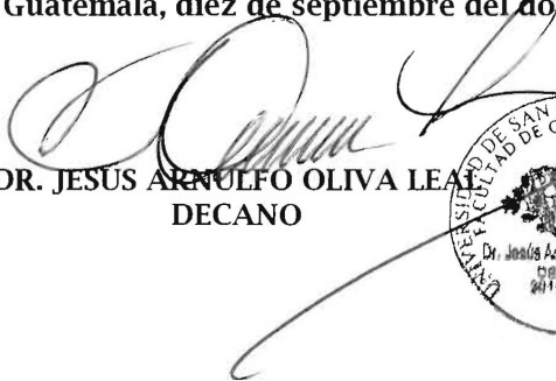
Estudio descriptivo transversal realizado con enterobacterias aisladas en cultivos obtenidos en el Laboratorio Nacional de Salud durante el año 2012 y de pacientes consultantes de un grupo hospitalario privado de la Ciudad Capital de Guatemala

mayo-agosto 2013

Trabajo asesorado por el Dr. Jorge Maximiliano Laynez Chay y revisado por la Dra. Carmen Irene Villagrán de Tercero quienes avalan y firman conformes. Por lo anterior, se emite, firma y sella la presente:

**ORDEN DE IMPRESIÓN**

En la Ciudad de Guatemala, diez de septiembre del dos mil trece

  
DR. JESÚS ARNULFO OLIVA LEAL  
DECANO





APROBACION 59/2013

El infrascrito Coordinador de la Unidad de Trabajos de Graduación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hace constar que los estudiantes:

Ana María Chinchilla Puente	200710151 ✓
Brayan Esaú Tomas Barrios	200710153 ✓
Robin Derek Morales Santizo	200710537 ✓

han presentado el trabajo de graduación titulado:

**“DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS TIPO NDM-1Y KPC-2  
EN ENTEROBACTERIAS BLEE+:  
EVALUACIÓN FENOTÍPICA CON CONFIRMACIÓN GENOTÍPICA”**

Estudio descriptivo transversal realizado con enterobacterias aisladas  
en cultivos obtenidos en el Laboratorio Nacional de Salud durante  
el año 2012 y de pacientes consultantes de un grupo hospitalario privado  
de la Ciudad Capital de Guatemala

mayo-agosto 2013

El cual ha sido revisado, corregido y aprobado por el Dr. César Oswaldo García García y al establecer que cumple con los requisitos exigidos por esta Unidad, se les autoriza a continuar con los trámites correspondientes para someterse al Examen General Público. Dado en la Ciudad de Guatemala, el diez de septiembre del dos mil trece.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Dr. Edgar Rodolfo de León Barillas  
Coordinador





Guatemala, 10 de septiembre del 2013

Doctor  
Edgar Rodolfo de León Barillas  
Unidad de Trabajos de Graduación  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente

Dr. de León:

Le informo que los estudiantes abajo firmantes:

Ana María Chinchilla Puente

Brayan Esaú Tomas Barrios

Robin Derek Morales Santizo

Presentaron el informe final del Trabajo de Graduación titulado:

**"DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS TIPO NDM-1Y KPC-2  
EN ENTEROBACTERIAS BLEE+;  
EVALUACIÓN FENOTÍPICA CON CONFIRMACIÓN GENOTÍPICA"**

Estudio descriptivo transversal realizado con enterobacterias aisladas  
en cultivos obtenidos en el Laboratorio Nacional de Salud durante  
el año 2012 y de pacientes consultantes de un grupo hospitalario privado  
de la Ciudad Capital de Guatemala

mayo-agosto 2013

Del cual como asesor y revisora nos responsabilizamos por la metodología,  
confiabilidad y validez de los datos, así como de los resultados obtenidos y de la  
pertinencia de las conclusiones y recomendaciones propuestas.

Atentamente,

Dr. Jorge Maximiliano Lainez Chay  
Asesor  
Firma y sello

Dra. Carmen Villagrán de Tercero  
Revisora  
Firma y sello

Reg. de personal 8800

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirnos alcanzar una de las metas más importantes en nuestras vidas, y abrirnos las puertas para la realización de ésta tesis.

A nuestros padres por su ayuda y apoyo incondicional, por ser los pilares de nuestras vidas y darnos todo lo necesario para poder alcanzar el día de hoy una de nuestras metas.

Al Laboratorio Nacional de Salud por permitirnos realizar el estudio fenotípico en sus instalaciones, así como por la ayuda recibida durante la realización de éste por parte de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica, especialmente por las licenciadas Claudia Valenzuela, Melissa Morales, Erika Pérez, Brenda González y Yeraldin Calderón.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas, del Centro Universitario Metropolitano, por su valiosa ayuda brindada en la estandarización del PCR principalmente por la Dra. Elisa Hernández de Rodas y Elder Alexander Lay de León quienes siempre nos brindaron sus conocimientos y experiencia en el campo de la genética.

Y a nuestra Tricentenaria casa de estudios: Universidad de San Carlos de Guatemala, a la cual debemos nuestros conocimientos y esperamos poner en alto con nuestro desempeño laboral.

## RESUMEN

**OBJETIVO:** Identificar la presencia de carbapenemasas tipo Nueva Delhi Metalobetalactamasa 1 (NDM-1) y *Klebsiellapneumoniae* Carbapenemasa 2 (KPC-2) en Enterobacterias Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE+). **POBLACIÓN Y MÉTODOS:** Estudio descriptivo transversal, en el que realizó detección fenotípica por Kirby Bauer y genotípica por Reacción de Cadena Polimerasa (PCR) de la producción de carbapenemasas tipo KPC y NDM en 118 enterobacterias BLEE+, 58 cepas aisladas en pacientes de los Hospitales Privados del Grupo MEDAX y 60 cepas almacenadas en el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala (LNS). El estudio se realizó en el periodo de junio-agosto del 2013. **RESULTADOS:** De 118 cepas el 58% (69) fueron *E.coli* y el resto *K. pneumoniae*, las cuales fueron aisladas en un 58% de urocultivos, 25% de cultivos de secreción y 8% de punta de catéter. Se encontró con el método genotípico el 19% (22/118) con gen NDM-1 positivas y 16% (19/118) KPC 2 positivas. Con el método fenotípico se encontró un 33% (39/119) MBL (metalobetalactamasa, posible NDM) positivas y KPC 2.5% (3/118) positivas. De las MBL positivas el 25.6% (10/39) fueron positivas para NDM-1 y el 23% (9/118) de NDM-1 positivas fueron negativas con el métodos fenotípico (MBL), para una sensibilidad (S) del 45%, especificidad (E) de 69%, valor predictivo positivo (VPP) de 26% y valor predictivo negativo (VPN) de 85% para el método fenotípico en la detección de NDM-1. De las KPC positivas por el método fenotípico un 67% (2/3) fueron positivas por el métodos genotípico, 17 cepas más fueron positivas para KPC-2 solo por el método genotípico, para una S de 10.5%, E 98.9%, VPP 66.7% y VPN 85% para el método fenotípico de detección de KPC. Un 33% de las cepas

BLEE positivas fueron positivas para una Carbapenemasa, en el grupo Hospitalario MEDAX, KPC-2 fue el gen más prevalente con un 25%, en el LNS el gen NDM-1 presentó una mayor prevalencia con un 23%. Se obtuvo una cepa genotípica positiva tanto para NDM-1 Y KPC-2.

**CONCLUSIONES:** Las Enterobacterias estudiadas, fueron en su mayoría *E. Coli* obtenidas de cultivo de secreción, MBL positivas con presencia de gen  $Bla_{NDM-1}$ , siendo BLEE+ no excluyente de Carbapenemasa, ni la presencia de Carbapenemasa excluyente de BLEE+ con cultivo de secreción.

**PALABRAS CLAVE:** Carbapenemasa, KPC, NDM, enterobacteria, BLEE.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
2.1 General	5
2.2 Específicos	5
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
3.1 Consideraciones generales de la terapia antibiótica	7
3.2 Familia de los Carbapenemicos	8
3.2.1 Estructura Química	9
3.2.2 Mecanismo de Acción	10
3.3 Regulación de la expresión genética	12
3.3.1 Regulación de la transcripción	13

3.3.2 Regulación postranscripción o regulación de la traducción	14
3.4 Mecanismos de resistencia bacteriana	14
3.4.1 $\beta$ -lactamasas	16
3.5 Mecanismos de resistencia a carbapenemicoss por enterobacterias	18
3.5.1. Disminución de la permeabilidad del antibiótico a través de la membrana externa	19
3.5.2 Aumento de la expulsión del antibiótico mediada por la activación de bombas de eflujo	19
3.5.3 Modificación del sitio blanco	20
3.4.4 $\beta$ -lactamasas involucradas en la resistencia a carbapenemicos	20
3.6 Carbapenemasas – Clasificación	21
3.6.1 Carbapenemasas clase A: Serincarbapenemasas	22
3.6.2 Carbapenemasas clase B: Metalo $\beta$ -lactamasas	25
3.5.3 Carbapenemasasclase D: Enzimas del tipo OXA	28
3.7 Detección de Carbapenemasas	29
3.7.1 Métodos fenotípicos	29
3.7.1.1 Pruebas de sensibilidad	29
3.7.1.2 Ensayo fenotípico	29
3.7.1.3 Protocolo detección fenotípica CarbapenemasasKirby Bauer	29
3.7.2 Método Genotípico	31
3.7.2.1 Reacción en Cadena de Polimerasa	33
3.7.2.2 Cebadores de KPC-2 y NDM-1 para PCR de punto final	39
3.8 Situación actual de Guatemala frente a las carbapenemasas	39
	41



	41
<b>4. POBLACIÓN Y MÉTODOS</b>	<b>43</b>
4.1 Tipo y diseño de la investigación	43
4.2 Unidad de análisis	43
4.2.1 Unidad primaria de muestreo	43
4.2.2 Unidad de análisis	43
4.2.3 Unidad de información	43
4.3 Población y muestra	43
4.3.1 Población o universo	43
4.3.2 Marco muestral	43
4.3.3 Muestra	44
4.4 Selección de los sujetos de estudio	44
4.4.1 Criterios de inclusión	44
4.4.2 Criterios de exclusión	44
4.5 Medición de variables	45
4.6 Técnicas, procesos e instrumentos utilizados en la recolección de datos	45
4.6.1 Técnicas de recolección de datos	45
4.6.2 Procesos	50
4.6.3 Instrumento de medición	51
4.7 Procesamiento y análisis de datos	51
4.7.1 Procesamiento	51
4.7.2 Análisis de datos	51

4.8 Límites de la investigación	52
4.8.1 Obstáculos (riesgos y dificultades)	52
4.8.2 Alcances	52
4.9 Aspectos éticos de la investigación	52
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>67</b>
<b>9. APORTES</b>	<b>69</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

Dentro de los mecanismos de resistencia bacteriana que más problemas ocasionan a nivel mundial se encuentra la producción de enzimas tipo Betalactamasas, las cuales son capaces de hidrolizar los antibióticos Betalactámicos. Dentro de estas enzimas están las llamadas carbapenemasas, responsables de hidrolizar carbapenémicos y cefalosporinas, dos de las principales opciones terapéuticas para tratamiento de infecciones intrahospitalarias.(1)(2)

La resistencia a carbapenémicos por enterobacterias se debe, ya sea a la producción de carbapenemasas o a un doble mecanismo de asociación que incluye, un defecto de permeabilidad en la membrana externa más la producción de betalactamasas tales como AmpC, Cefalosporinasas y Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE). El primer productor de Carbapenemasas en Enterobacterias (NmCA) se identificó en 1993. (1)(3)(4)(5) Según la clasificación de Ambler las carbapenemasas se encuentran en 3 de las 4 categorías que componen ésta clasificación: Clase A (Serincarbapenemasas [incluye KPC]), Clase B (Metalobetalactamasas [MBLs]) y Clase D (Oxacilinasas [OXAs]). Los genes de carbapenemasas se encuentran localizados en elementos altamente móviles del genoma bacteriano, lo que ha contribuido a su veloz esparcimiento y a la transferencia conjunta de factores de resistencia a otros antibióticos.(1)(6)(7)

*Klebsiellapneumoniae* es la principal productora de las serincarbapenemasas tipo KPC (clasificación A de Ambler), aunque también ésta enzima ha sido encontrada en otras enterobacterias.(8) Esta enzima incluye en la actualidad 10 miembros (variantes alélicas KPC-2 a KPC-11).(4)(9)(10). Las variantes más comúnmente reportadas en varios países del mundo son KPC-2 y KPC-3, ambas resultan microbiológica y clínicamente similares.(11)(12)

Entre las metalobetalactamasas (clasificación B de Ambler), encontradas en el mundo, las más frecuentes son IMP y tipo integrón Verona codificante para metalo  $\beta$ -lactamasas (VIM). Pero desde el año 2008, se realizó el primer aislamiento de la metalobetalactamasa tipo Nueva Deli metalobetalactamasa (NDM-1), en un paciente en Suecia que había viajado a India, desde entonces se ha ido documentando la diseminación de este mecanismo y su circulación en otros países.(13) En 2010 se aisló en dos pacientes pediátricos australianos cepas NDM-1 Y 3 en *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*, quienes hicieron viajes a la india dos meses atrás. Posteriormente, en nueva Zelanda se encontraron 4 pacientes portadores de *E. coli* y *K. pneumoniae*

productoras de NDM-1, la detección se realizó por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).(4)(14)

La presencia de KPC o MBL en Enterobacterias es un factor de mal pronóstico y está asociado en mayor proporción de fallas terapéuticas. Según diversos estudios, la letalidad por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas oscila entre el 47% al 68%. (1)(13)(15)(16)

Dos clases de antibióticos, polimixinas (colistina) y gliciclinas, han demostrado actividad in vitro contra bacterias portadoras de NDM-1. El perfil de seguridad de estos antibióticos es cuestionable. Hay una necesidad de la detección activa de NDM-1, y la investigación debe orientarse hacia el desarrollo de antibióticos seguros para el tratamiento de estas infecciones.(11)(14)

En el 2011, el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala (LNS) identificó 2 cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo NDM en Guatemala, siendo éste el primer hallazgo de metalobetalactamasas NDM en latinoamerica. Por lo anterior la Organización Panamericana de la Salud (OPS), generó una alerta en donde subraya la importancia de buscar dicho mecanismo de resistencia. En el 2011 se inició a través del LNS la búsqueda activa de este mecanismo de resistencia en todas las cepas de enterobacterias resistentes a por lo menos un carbapenémico, referidas de los hospitales de la red nacional. Éste proceso se lleva acabo identificando por medio de métodos fenotípicos (Kirby Bauer) el tipo de mecanismo por el cual existe resistencia al carbapenémico, para luego enviar una pequeña cantidad de éstas cepas positivas al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos Malbran en Argentina, donde se confirma el tipo de carbapenemasa por medio de PCR.(7)(17)(18)(19)

En la presente investigación se realizó la detección fenotípica y genotípica de carbapenemasas en enterobacterias BLEE+, provenientes de hospitales pertenecientes a un grupo hospitalario privado de la Ciudad Capital de Guatemala y cepas almacenadas por el LNS en el año 2012. Se evaluaron un total de 118 cepas de enterobacterias, únicamente *E. coli* y *K. pneumoniae*. 67 cepas provenian del grupo hospitalario privado y 51 provenian de cepas almacenadas en el LNS en el año 2012. De éstas el 58% fueron *E. coli* y 42% *K. pneumoniae*.

Según los resultados obtenidos en la detección fenotípica se demostró que la prevalencia de MBL fue superior a la de KPC presentado un 33% contra un 2.5% respectivamente. Lo

cual es contrario al patrón presente a nivel mundial, ya que las carbapenemasas clasificación A de Ambler, entre ellas KPC, se encuentran presentes en más del 50% de los aislamientos de enterobacterias, lo que las convierte en las carbapenemasas más frecuentes en el mundo, y de éstas el gen más frecuentemente encontrado es  $Bla_{KPC}$ , que se disemina fácilmente a través de amplias áreas geográficas debido a la expansión clonal dominante mediada por plásmidos o transposones(7)(20)(21)(22).

Según evaluación fenotípica se observó mayor prevalencia de carbapenemasas MBL y KPC en *K. pneumoniae* (32%) que en *E. coli* (2%), sin embargo por métodos genotípicos *E. coli* (22.88%) presentó mayor prevalencia que *K. pneumoniae* (11.86%). Ésto nos indica que las bacterias *E. coli* tenían presente en su ácido desoxirribonucleico (ADN) el gen codificante para KPC y NDM pero no lo habían expresado aún, y se evidencia por los resultados negativos en la prueba fenotípica. Un importante mecanismo regulatorio desarrollado por las bacterias se basa en la activación o desactivación de la transcripción de grupos de genes con funciones relacionadas, así al ser activados son transcritos de manera coordinada, pero debido a un control positivo, no serán transcritos a menos de que exista el sustrato necesario(23)(24)(25). Con esto se evidenció que a pesar de que presentara pruebas genotípicas positivas para NDM o KPC, no se había presentado el estímulo necesario para que la bacteria sintetizara la carbapenemasa, lo que explica el resultado fenotípico negativo(23)(24)(25).

Existió, también, un pequeño porcentaje de cepas que presentaron un resultado genotípico positivo tanto para NDM-1 como para KPC-2, siendo el porcentaje de un 5.08% sobre el total de las cepas, con un valor neto de 6 cepas, y todas estas fueron bacterias *E. coli* provenientes del grupo hospitalario privado. La aparición de un doble mecanismo genético de resistencia bacteriana fue explicada por la capacidad genética bacteriana de activar o desactivar la transcripción de grupos de genes presentes ya sea en el ADN, plásmidos o transposones, según sean las condiciones de entorno en que se encuentra la bacteria(23)(24)(25).

Evaluando la concordancia entre los resultados fenotípico y genotípico en las cepas a estudio, se pudo observar que la evaluación fenotípica para carbapenemasas presenta una sensibilidad de 45.45% y una especificidad de 69.79%, un valor predictivo positivo de 25.64% y un valor predictivo negativo de 84.81% para la detección de NDM; y para KPC se obtuvo una sensibilidad de 10.52% y una especificidad de 98.98%, un valor predictivo positivo de 66.66% y un valor predictivo negativo de 85.21%. Lo que demuestra, en ambas

pruebas, que el estudio fenotípico fue más sensible que específico, lo que significa que la prueba fue efectiva para detectar negativos, pero su capacidad para detectar positivos fue menor. Por tal razón, es de gran importancia tener a disposición el estudio genotípico por proteína C reactiva (PCR) para la detección de carbapenemasas, y que éste se convierta en una prueba regular en la validación de los resultados obtenidos por medio del método fenotípico en Guatemala.

Finalmente no se logró evaluar la asociación entre la existencia de BLEE y la presencia de Carbapenemasas debido a que dentro de la muestra a estudio no existían negativos para BLEE, con lo cual únicamente se pudo observar que el 33% de las cepas con presencia de BLEE fueron positivas para una Carbapenemasa, lo que es apoyado si tomamos en cuenta que hace relativamente pocos años la resistencia a carbapenémicos en las enterobacterias era una verdadera rareza microbiológica, mediada principalmente por la presencia conjunta de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) e impermeabilidad en la membrana(26)(27). Por lo que inferimos en que la presencia de BLEE no excluye la presencia de carbapenemasas, ni viceversa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GENERAL

- Identificar la presencia de carbapenemasas tipo Nueva Delhi Metalobetalactamasa 1 (NDM-1) y *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemasa 2 (KPC-2) en Enterobacterias Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE+) en cepas almacenadas en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) en el año 2012 y cepas aisladas de cultivos realizados a pacientes consultantes de los hospitales de un grupo privado de la Ciudad Capital de Guatemala durante el periodo de mayo-agosto del 2013

### 2.2 ESPECÍFICOS

1. Evaluar fenotípicamente la prevalencia de Metalobetalactamasas (MBL) y *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemasa (KPC) por medio de Kirby Bauer en Enterobacterias Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE+).
2. Identificar la prevalencia del gen  $Bla_{NDM-1}$  en enterobacterias de las instituciones: LNS y de un grupo hospitalario privado de la Ciudad Capital de Guatemala.
3. Identificar la prevalencia del gen  $Bla_{KPC-2}$  en enterobacterias de las instituciones: LNS y de un grupo hospitalario privado de la Ciudad Capital de Guatemala.
4. Evaluar si la presencia de BLEE en enterobacterias influye en la expresión de carbapenemasas NDM-1 y KPC-2.
5. Definir la enterobacteria que posee mayor prevalencia en la expresión genética de carbapenemasas.
6. Definir el tipo de carbapenemasa (NDM-1 o KPC-2) más prevalente según institución.
7. Definir el tipo de cultivo que presenta mayor prevalencia de carbapenemasas (NDM-1 o KPC-2).





### **3 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 CONSIDERACIONES GENERALES DE LA TERAPIA ANTIBIÓTICA**

Las sustancias antimicrobianas son aquellas producidas por microorganismos (bacterias, hongos o actinomicetos) o sintetizadas químicamente (sulfamidas, quinolonas) que poseen la capacidad de destruir, impedir o retrasar la multiplicación de otros microorganismos. En la práctica médica ambos se denominan antibióticos. La terapia con antibióticos está destinada al tratamiento de pacientes con síntomas y signos clínicos de infección. El tratamiento con antibióticos puede utilizarse en forma empírica, cuando se desconoce el agente causal, o etiológica, cuando el agente ya se ha identificado. En ambas circunstancias el antibiótico seleccionado debe de ser eficaz y seguro. Aunque el aislamiento del agente etiológico es beneficioso, pues facilita la elección del tratamiento específico más adecuado, no siempre es posible realizarlo oportunamente. Sin embargo, debe ser de regla en los casos de infección hospitalaria y en los de infecciones comunitarias graves. (28)(29)(30)

El diagnóstico presuntivo de una infección se basa en datos clínicos y epidemiológicos. Si ambos justifican el tratamiento antibiótico, la selección del tratamiento dependerá tanto de la información con que cuenta el personal de salud, el estado general del huésped, el sitio de infección y los datos epidemiológicos, como de las características del fármaco que se use y del agente causal potencial. Cuando sea necesario administrar tratamiento empírico, se tratará el agente que tenga mayor probabilidad estadística de causar la infección en esa situación clínico-epidemiológica. (28)(29)(30)

El tratamiento empírico se justifica cuando no se dispone del diagnóstico del agente causal o la urgencia del caso lo requiera. Sin embargo, antes de iniciar el tratamiento se debe obtener la muestra para realizar el examen microscópico y facilitar la definición del tratamiento, y para que el laboratorio microbiológico intente aislar e identificar el agente etiológico y realice las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos pertinentes. Cuanto antes se inicie el tratamiento con el antimicrobiano adecuado, mayor será la posibilidad de beneficiar al paciente y a su comunidad. La evaluación de la acción terapéutica del antibiótico seleccionado se basa en los siguientes parámetros clínicos y de laboratorio: curva térmica, recuento leucocitario, signos y síntomas específicos dependientes de la enfermedad infecciosa y resultados del laboratorio microbiológico. (28)(29)(30)

Cuando el hallazgo de laboratorio indique que existe más de un antimicrobiano capaz de actuar contra el agente causal, se seleccionará aquel que: (30)

- Sea poco tóxico y tenga menos efectos colaterales en las condiciones clínicas del paciente.
- Posea una vía de administración y posología más adecuados
- Induzca menor resistencia, y
- Sea de menor costo.

El tratamiento simultáneo con más de un antibiótico sólo se justifica en aquellos casos de infecciones graves bajo tratamiento empírico o cuando se ha hecho el diagnóstico del agente causal y se trata de prevenir que surja resistencia (Por ejemplo, en los casos de infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium Tuberculosis*); infecciones mixtas (Por ejemplo, en caso de infección abdominal o pelviana) o cuando el paciente tiene dos enfermedades por agentes causales diferentes.(28)(29)(30)

### **3.2 FAMILIA DE LOS CARBAPENÉMICOS**

Los carbapenémicos son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos dotados con mayor espectro, actividad y resistencia a las  $\beta$ -lactamasas. Por sus cualidades son imprescindibles en el tratamiento empírico, en monoterapia, de numerosas infecciones nosocomiales graves — incluso algunas de origen comunitario— y en la terapéutica dirigida de las producidas por bacterias gramnegativas multirresistentes. Todos los carbapenémicos disponibles son similares en cuanto a espectro, aunque con diferencias significativas en la actividad antimicrobiana que, en último término, determinan las indicaciones clínicas de cada carbapenem. (31)

Ertapenem no incluye en su espectro a patógenos eminentemente nosocomiales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., por lo que está indicado en infecciones adquiridas en la comunidad que precisan ingreso hospitalario. Por el contrario, doripenem muestra más actividad intrínseca que otros carbapenémicos en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y AmpC, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y otros no fermentadores y anaerobios.(28)(29)(31)

La obtención de la tienamicina (*Streptomyces cattleya*) fue el momento clave en el desarrollo de los carbapenémicos. Sus propiedades antibacterianas le convertían en un antibiótico ideal pero era químicamente inestable, por lo que se desarrolló un derivado estable que conservaba las buenas características antibacterianas, la N-formimidooil tienamicina o imipenem. Pero este presentaba el inconveniente de ser inactivado por la dehidropeptidasa I renal (DHP-I), por lo que se asoció (1:1) a un inhibidor de esta enzima, la cilastatina. La asociación imipenem/cilastatina fue el primer carbapenem autorizado en terapéutica humana (EMA, European Medicines Agency [Agencia Europea del Medicamento] 1985, España 1987). Posteriormente, se introdujeron el meropenem (EMA 1994, España 1995), el ertapenem (EMA 2001, España 2002) y en julio de 2008 la EMA aprobó el doripenem que se ha introducido en España en mayo de 2009.(6)(28)(31)

### 3.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

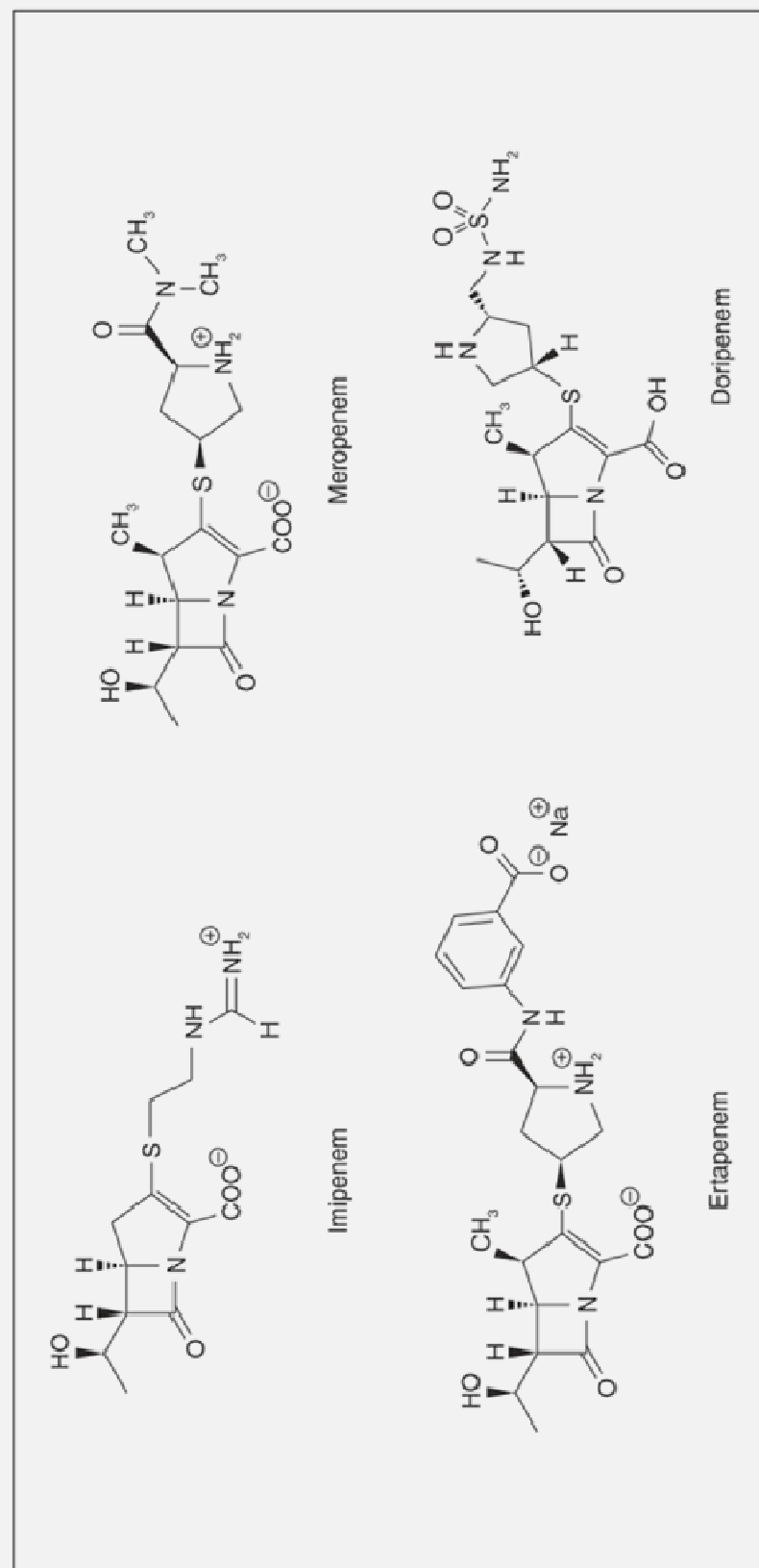
El anillo carbapenem es un azobiciclo formado por la condensación de un anillo  $\beta$ -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Posee en posición 1 un átomo de carbono (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Todos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo en configuración trans que protege al anillo  $\beta$ -lactámico de muchas serino- $\beta$ -lactamasas y en posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al  $\beta$ -lactámico (fig. 1).(29)(31)

Los distintos carbapenémicos son fruto de sustituciones en 1 y 2. En imipenem los hidrógenos del C1 no están sustituidos, por lo que es sensible a la dehidropeptidasa I renal (DHP-I renal) y potencialmente nefrotóxico. En meropenem, ertapenem y doripenem el H en posición  $\beta$  está sustituido por un metilo que les confiere estabilidad frente a esta enzima (1- $\beta$ -metil-carbapenémicos). En 2, hay una cadena lateral tioacídica de carácter básico que diferencia a los distintos carbapenémicos determinando actividad antimicrobiana, potencial neurotóxico, atrapamiento por algunas bombas de expulsión, farmacocinética, etc. y colabora en la estabilidad frente a la DHP-I. En meropenem ésta cadena está sustituida por un grupo hidrofóbico dimetil-carbomoil-pirrolidin-tio que incrementa la actividad frente a gramnegativos y es responsable de la ligera disminución de actividad frente a grampositivos, y puede, además, explicar la reducción del efecto proconvulsivo observado en imipenem/cilastatina.(28)(31)

En ertapenem esta cadena es un grupo carboxifenil amino-carbomoilpirrolidin-tio, similar al de meropenem, al que se une un grupo benzoato (carboxifenil). Este último aumenta el peso molecular (497,50) y la lipofilia de la molécula. El radical carboxílico, ionizado a pH fisiológico, proporciona una carga negativa y determina una mayor fijación proteica que es responsable de un aumento de la semivida de eliminación y permite una sola administración diaria. Su falta de actividad efectiva sobre *Pseudomonas aeruginosa* puede deberse al carácter aniónico, la lipofilia y el elevado peso molecular que dificultarían su penetración a través de las porinas OprD no alcanzando unas concentraciones adecuadas en el espacio periplásmico. Además, el peso molecular facilitaría su eliminación por las bombas de eflujo. En doripenem es una cadena lateral sulfamoil-aminometil-pirrolidin-tio que lo dota de la buena actividad de meropenem frente a gramnegativos y de la de imipenem frente a grampositivos. Su menor alcalinidad, en comparación con otros carbapenémicos, determina un aumento de la actividad de la molécula frente a *P. aeruginosa*. Imipenem, meropenem y doripenem tienen un menor peso molecular (317,26, 437,51 y 420,51, respectivamente), son hidrofílicos y de estructura compacta y zwitteriónica, lo que permite una penetración rápida a través de las porinas de los gramnegativos.(23)(28)(29)(31)

### 3.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN

Los carbapenémicos inhiben la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación uniéndose a residuos de serina de peptidasas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática denominadas PBP (penicillin binding protein, proteínas que fijan penicilinas). La pared celular se debilita y la bacteria normalmente se lisa. Por ello, son habitualmente bactericidas. Imipenem es menos bactericida que meropenem o doripenem en *P. aeruginosa*. El poder bactericida es rápido y dependiente del tiempo. Frente a *Listeria monocytogenes* meropenem y ertapenem se comportan como bacteriostáticos, aunque la actividad intracelular de meropenem es bactericida a las 24 h.(31)



**Figura 1.** Estructura Química de los carbapenems disponibles. (Tomado de Fresnadillo M, García M, García E, García J: Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [ELSEVIER] 2010; 28 [sup2])

Para ejercer su acción, deben atravesar la pared celular para acceder a las PBP, lo que es fácil en grampositivos pero más complicado en gramnegativos. Sus características estructurales les permiten acceder a las PBP de las bacterias gramnegativas a través de las porinas de la membrana externa. La mayor afinidad por las PBP-1a y 1b de *E. coli* y *P. aeruginosa*, en comparación con otros  $\beta$ -lactámicos, determina un mayor y más rápido efecto bactericida. En general, el espectro de afinidad por las PBP es similar aunque la preferencia por algunas de ellas (especialmente las PBP-2 y 3) determina los diferentes matices de actividad intrínseca y potencia antimicrobiana de cada carbapenem. La inhibición de las PBP-2 y 3 es responsable de la aparición de cambios morfológicos que conducen a la formación de células esféricas (PBP-2) o de formas filamentosas (PBP-3) en las bacterias. Meropenem y doripenem muestran una afinidad por la PBP-2 de *P. aeruginosa* superior a la de imipenem. Ertapenem, en *E. coli*, se fija también a las PBP-3, 4 y 5. Además de la unión preferente a la PBP-2, doripenem exhibe una elevada afinidad por las PBP-3 (intermedia entre la de imipenem y la de meropenem) y PBP-4 de *P. aeruginosa*, y por la PBP-4 de *E. coli* hecho que avala su excelente actividad frente a gramnegativos.(23)(28)(31).

### 3.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para adaptarse de forma rápida y eficiente a los cambios de concentración de los nutrientes ambientales. Las bacterias ponen en marcha un conjunto completo de enzimas en caso necesario, mientras que en ausencia de sustrato evitan la producción de la enzima o enzimas específicas de una ruta metabólica. (23)(24)(25)

Las variaciones bacterianas por adaptación al medio son cambios moleculares y fenotípicos que ocurren sin modificación del material hereditario (sin variación del genotipo), siendo debidos a diversos mecanismos de regulación de la expresión de los genes. Dentro de los cambios genotípicos podemos incluir a las variaciones hereditarias no asociadas, con transferencia de material genético; principalmente se trata de los diversos tipos de mutaciones. Y las variaciones hereditarias asociadas con transferencia de material genético entre una bacteria donante y otra receptora.(23)(24)(25)

### 3.3.1 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

El inicio de la transcripción puede estar sometido a unos mecanismos de control positivo o negativo. Los genes sometidos a un control negativo se expresan a menos que una proteína represora los desconecte. Esta proteína impide la expresión del gen al unirse a una secuencia específica del ADN, el denominado operón, el cual se define como grupos de uno o más genes estructurales que se expresan a partir de un promotor específico y finalizan en el denominado terminador de la transcripción. Por el contrario, los genes cuya expresión se encuentra sometida a un control positivo tan sólo se transcriben en presencia de una proteína reguladora activa denominada apoinductor. El apoinductor se une a una secuencia específica del ADN y colabora con la polimerasa del ARN en los pasos iniciales mediante un mecanismo desconocido.(23)(24)(25)

Desde el punto de vista de la expresión genética, los operones bacterianos se pueden dividir en dos grandes tipos:

- Operones de expresión Constitutiva: Es decir aquellos que se transcriben permanentemente, independiente de las condiciones ambientales como por ejemplo los operones para proteínas de las cadenas transportadoras de electrones.(23)(24)(25)
- Operones cuya expresión está regulada: Estos se encuentran regulados en función de las condiciones ambientales. Dentro de esta categoría, se distinguen a su vez operones de expresión inducible y de expresión reprimible. En principio por su modo de regulación pueden ser de 2 tipos:
  - Inducción: Síntesis de ciertas enzimas, debida a la presencia de sustratos metabolizables adecuados, o en términos más generales por la existencia de ciertos estímulos ambientales.(23)(24)(25)
  - Represión: Desconexión rápida de la ruta biosintética de un determinado compuesto, cuando éste aparece aportado en el medio de la bacteria. La represión no siempre tiene que ver con estímulos nutricionales, se pueden desconectar genes para evitar que su expresión interfiera con otros procesos que ya están en curso.(23)(24)(25)

### 3.3.2 REGULACIÓN POSTRANScripción O REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN

La velocidad y la eficiencia de la síntesis de proteínas pueden estar controladas por otros factores, como la estructura del ARNm o las concentraciones celulares del ARN de transferencia y de ciertos aminoácidos. En los ARNm policistronicos, el control de la traducción puede ocasionar la aparición de diferencias en la cantidad de proteína expresada apartir de cada gen.(23)(24)(25)

### 3.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antibiótico. Constituye un problema de salud pública creciente en todo el mundo. La resistencia se produce por selección natural, como producto de mutaciones ocurridas al azar, o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población. En la práctica, una bacteria es sensible a un antibiótico cuando este es eficaz frente a ella y se puede esperar la curación de la infección. Por el contrario las bacterias son resistentes cuando su crecimiento sólo puede inhibirse con concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el sitio de la infección. Es importante recordar que los antibióticos no son mutagénicos ya que sólo crean presión de selección.La resistencia bacteriana puede ser intrínseca o adquirida y debe analizarse desde el punto de vista poblacional, molecular, farmacodinámico y clínico.(28)(30)(32)

La resistencia Intrínseca de una bacteria es un fenómeno que se desarrolla en forma natural, en ausencia de mecanismo de selección antimicrobiana; se caracteriza por ser inherente a una especie en particular. Estos microorganismos pueden perder los sitios blancos o tener barreras naturales que evitan que el agente antimicrobiano actúe al no poder alcanzar su objetivo. Es una propiedad innata de las bacterias en la que puede estar involucrado uno o varios mecanismos de resistencia. El conocimiento de la resistencia intrínseca ayuda al microbiólogo y al médico tratante, a no utilizar un antibiótico para una bacteria que presente resistencia intrínseca a él, como el caso de la nitrofurantoina para *Proteus vulgaris*.(30)(27)

La resistencia adquirida es un verdadero cambio en la composición genética de la bacteria, de tal manera que si un antibacteriano alguna vez tuvo actividad contra esa bacteria, al adquirir resistencia el fármaco en cuestión deja de ser eficaz. El análisis genético ha permitido establecer que la resistencia adquirida puede ser un fenómeno



temporal cuando está condicionado por factores de su medio. Por ejemplo, las cepas de *E. coli* son resistentes a los aminoglucósidos cuando crecen en condiciones anaeróbicas o *Pseudomonas aeruginosa* son resistentes a poliximina y aminoglucosidos cuando en el medio hay déficit de iones magnesio. La resistencia adquirida también puede ser de carácter permanente en el caso de existir mutaciones o cuando se debe a la adquisición de material genético externo a través de plásmidos, transposones, integrones, u otros.(23)(24)(25)

Existe el fenómeno de “tolerancia”, y debe considerarse como un tipo de resistencia adquirida, aun cuando el microorganismo siga siendo sensible al medicamento.(30) Los mecanismos por los que las bacterias pueden adquirir material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan otras bacterias para su desarrollo y reproducción) son:

- Transformación: Consiste en la incorporación a una bacteria de ADN libre presente en el medio procedente de la lisis de otras bacterias.
- Transducción: Transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra utilizando como vehículo un bacteriófago.
- Conjugación: Intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptora) mediante contacto físico entre ambas. En bacterias gram negativas esta unión se logra mediante los pili conjugativos del donante. Los pili conjugativos son estructuras en forma de tubo hueco que unen al donante con el receptor y a través de las cuales pasa el material genético (plásmido) entre las bacterias. Estos mecanismos de diseminación de genes de resistencia se dan fundamentalmente dentro de las mismas especies bacterianas, pero pueden darse incluso entre especies bacterianas distintas. (23)(30)

Muchas bacterias utilizan su ADN de forma promiscua, como mecanismo de resistencia. El ADN transferido puede entregarse en el cromosoma del receptor o bien mantenerse de manera estable en forma de elemento extracromosómico o como un virus bacteriano y se transmite a las bacterias hijas como unidad dotada de capacidad autónoma de replicación. Básicamente podemos hablar de 3 formas de intercambio genético:

- Plásmidos: Son pequeños elementos genéticos cuya replicación es independiente del cromosoma bacteriano, los cuales pueden adoptar una forma lineal y pueden replicarse de forma autónoma por lo que reciben el nombre de replicones. Algunos

plásmidos son episomas lo que indica que se pueden integrar en el cromosoma del anfitrión.(23)(24)(25)

- Bacteriófagos: Son virus bacterianos. Estos elementos genéticos extracromosómicos pueden sobrevivir fuera de la célula del anfitrión ya que su genoma está protegido por una capa de proteínas. Los bacteriófagos infectan las células bacterianas y se replican hasta un número elevado que ocasiona la lisis de la célula (infección lítica) o en algunos casos, se integran en el genoma del anfitrión sin producir su muerte (estado lisogénico).(23)(24)(25)
- Transposones: Son unos elementos genéticos móviles que se pueden transferir ADN de una posición a otra del genoma o entre distintas moléculas de ADN dentro de una misma célula. Los genes de actividad pueden agruparse en un islote de virulencia rodeado por unos elementos móviles semejantes a los transposones que les permiten moverse tanto en el interior del cromosoma como hacia otras bacterias.(23)(24)(25)

### 3.4.1 $\beta$ -LACTMASAS

Después del descubrimiento en 1940 de las penicilinasas, realizado por dos grandes investigadores de la universidad de Oxford; Edward Penley Abraham y Ernst Boris Chain, basado en estudio de cultivos de *E. coli*, vino la confirmación de Kirby en 1944 de que la resistencia de ciertas cepas de *Staphylococcus aureus* ante las penicilinas, era provocada por la misma causa. De igual forma fueron sumándose posteriormente, a través de todos estos años, nuevos informes de resistencia de gérmenes, tanto grampositivos como gramnegativos, ante los antimicrobianos betalactámicos provocado por la producción de dichas enzimas, que posteriormente fueron llamadas betalactamasas, ya que no solo hidrolizan las penicilinas sino también las cefalosporinas, así como los monobactámicos y más recientemente los carbapenémicos.(33)(34)(22)

Desde la clasificación de Sawai y col en 1968, pasando por la conocida de Richmond y Sykes en 1973, hasta la más moderna creada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros (ver Cuadro 1 en pág. 22), se ha puesto en evidencia el creciente ascenso de estas enzimas, que en la actualidad suman más de 190 tipos diferentes, llegando a convertirse en un verdadero problema a nivel mundial. (33)(34)(22)

A pesar de que han sido descritas tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas su mayor peso a caído sobre estas últimas, de ahí que las clasificaciones mencionadas anteriormente se refieran a las mismas, por otra parte, la mayor prevalencia en las grampositivas se reportan en *Staphylococcus aureus*. (33)(34)(22)

Una mutación en las betalactamasas de amplio espectro tipo SHV-1 provocó la aparición en 1983 de la SHV-2, primera betalactamasa de espectro extendido (BLEE), capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, ésta fue aislada en Alemania, de una cepa de *K. pneumoniae*. Años después, en Francia, fueron aisladas cepas del mismo germen produciendo otro tipo de BLEE, las TEM-3, producto de mutaciones de la TEM-1, también pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush y col. A partir de aquí este fenómeno se fue extendiendo y hoy se han descrito más de 100 BLEE derivadas de la TEM-1 y TEM-2 y más de 50 BLEE derivadas de la SHV-1, pertenecientes al grupo 2be de Bush y col. (Cuadro 1). (33)(34)(22)

Las enterobacterias han llevado la delantera en este tipo de resistencia, destacándose llamativamente cepas de *K pneumoniae* y *E.coli*, reportándose una prevalencia en América Latina del 45% y 8% de las cepas aisladas respectivamente. También han sido encontradas en cepas de enterobacter, acinetobacter, salmonella, pseudomonas y otras.(33)(34)(22)

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) poseen resistencia a los antibióticos betalactámicos, especialmente a las cefalosporinas de 3ra generación y monobactámicos. Presentan como característica principal la capacidad de hidrolizar las oximiinocefalosporinas (Ceftriaxona, Cefotaxime, Ceftazidima) y el Aztreonam, quedando sensible frente a las cefamicinas (Cefoxitin, Cefotetam) y los carbapenémicos (Imipenem, Meropenem, Ertapenem). Muchas cepas productoras de BLEE tienen la característica de ser multirresistentes, ya que son portadoras de otros genes que provocan resistencia a las quinolonas, aminoglucósidos, cotrimoxazol, etc.Las betalactamasas de espectro extremo (BLEEx) son aquellas que su actividad abarca a todas las penicilinas, cefalosporinas de 1, 2, 3 y 4 generación, monobactames (AZT), cefamicinas (Cefoxitina «FOX») y carbapenemes(33)(34)(22).

A pesar de la sensibilidad in vitro frente a las cefamicinas, estas no son recomendadas para enfrentar las sepsis graves, ya que muchas cepas pueden desarrollar resistencia durante el tratamiento. Algo parecido sucede con las cefalosporinas de 4ta generación (Cefepime, Cefpiroma) las cuales en muchos reportes presentan buena actividad frente al 95-100% de las cepas productoras de BLEE, sin embargo son muy sensibles al efecto inoculo, el cual es dependiente de la dosis, por lo que se recomienda, de usarse en sepsis graves, utilizarlas en altas dosis.(33)(34)(22)(35)

La combinación de betalactámicos/inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) es algo controversial ya que se reporta que entre un 30–60% de las cepas productoras de BLEE son resistente a los mismos, quedando reservado para pacientes que no presenten sepsis severas. Por todos los motivos expuestos anteriormente quedan los carbapenémicos como los antimicrobianos de elección en las sepsis graves provocadas por gérmenes productores de BLEE.(33)(34)(22)(35)

### 3.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS POR ENTEROBACTERIAS

Las enterobacterias son una [familia](#) de [bacterias Gram negativas](#) que contienen más de 30 [géneros](#) y más de 100 [especies](#) que pueden tener morfología de [bacilos](#) o [cocos](#). Son habitantes de la flora intestinal y se encuentran entre los patógenos humanos más comunes. Estas enterobacterias pueden ser adquiridas en la comunidad o de forma intrahospitalaria, ya que tienen la propensión a propagarse fácilmente entre los seres humanos, sea por contacto mano-mano, contaminación de comida y agua, contacto ano-boca o fómites.Éstas bacterias tiene la facilidad de poder adquirir material genético a través de la transferencia horizontal de genes, mediada principalmente por plásmidos y transposones.(23)(36)(37)(38)

Desde el año 2000, se ha reportado la propagación mundial de aislados de enterobacterias adquirida en la comunidad (*E. coli*) que producen  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) capaces de hidrolizar todas las cefalosporinas, excepto carbapenémicos, los cuales se han convertido en los fármacos antimicrobianos de última línea. Estos agentes son cruciales para la prevención y el tratamiento de infecciones nosocomiales que ponen en peligro la vida.(1)Sin embargo en esta última década, el incremento de las infecciones causadas por microorganismos multiresistentes se ha

convertido en un grave problema de salud pública a nivel mundial, no solo debido a las escasas opciones terapéuticas para poder tratarlas sino porque pueden llegar a incrementar 2 a 3 veces la mortalidad asociada a la infección, y elevar el costo entre 20 y 200% reflejado en un aumento en la estancia hospitalaria y uso de servicios médico-quirúrgicos.(39)(40)(38)Usualmente, la resistencia a los carbapenem en bacterias gramnegativas ocurre por la combinación de dos o más mecanismos de resistencia y rara vez por la acción de un mecanismo único. (20)(38)(26)

### **3.5.1 DISMINUCIÓN DE LA PERMEABILIDAD DEL ANTIBIÓTICO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA EXTERNA**

Las porinas son canales proteicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que participan en el transporte de moléculas hidrofílicas desde el medio externo al espacio periplasmático. Los carbapenem llegan al espacio periplasmático pasando a través de porinas. Los genes que codifican las porinas pueden sufrir mutaciones y producir proteínas alteradas no funcionales o pueden disminuir su expresión. Ambos procesos dan origen a bacterias mutantes deficientes en porinas, las cuales presentan una baja permeabilidad al paso de moléculas hidrofílicas como los carbapenem. De esta manera, la velocidad de acumulación de los carbapenem en el espacio periplasmático disminuye notablemente. Normalmente, la pérdida de porinas no confiere una resistencia franca y sólo eleva los valores de la concentración inhibidora mínima (CIM) para carbapenem sin superar los puntos de corte que determinan resistencia.(20)(41)(42)

### **3.5.2 AUMENTO DE LA EXPULSIÓN DEL ANTIBIÓTICO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE BOMBAS DE EFLUJO**

Las bombas de eflujo son estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos. La expresión de estas bombas puede ser permanente (expresión constitutiva) o intermitente (expresión que puede inducirse). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna bomba de eflujo capaz de expulsar al imipenem. En *P. aeruginosa*, el sistema de eflujo MexABOprM es capaz de transportar meropenem y su expresión exagerada conduce a la elevación de la CIM del antibiótico. (20)(41)(42)

### 3.5.3 MODIFICACIÓN DEL SITIO BLANCO

El sitio blanco de los carbapenem, y de todos los  $\beta$ -lactámicos, son las proteínas que fijan penicilinas (PBP), macromoléculas que son parte de la membrana citoplasmática y participan en la síntesis de la pared bacteriana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones moleculares que disminuyen su afinidad por los  $\beta$ -lactámicos, pero que no afectan su actividad funcional. Aunque la producción de proteínas unidoras de penicilinas con baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos no es un mecanismo de resistencia común entre los Gram negativos, el número de reportes se ha incrementado en los últimos años. (20)(41)(42)

### 3.5.4 $\beta$ -LACTAMASAS INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS

Las dos betalactamasas que con mayor frecuencia pueden llevar a resistencia a los carbapenem son las del grupo AmpC y las carbapenemasas. (20)(43)

**$\beta$ -lactamasas tipo AmpC:** También llamadas cefalosporinasas, median la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefemicinas (cefoxotín y cefotetán) e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Algunas bacterias Gram negativas, como *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, poseen el gen *ampC* en los cromosomas, mientras otras bacterias, como *K. pneumoniae* y *Salmonella* spp., han adquirido el gen a través de plásmidos. Las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC presentan baja afinidad a los carbapenem; sin embargo, cuando la enzima se produce en exceso y la bacteria cierra porinas, la baja cantidad del antibiótico presente en el espacio periplasmático permite que la enzima hidrolice al antibiótico y se registre resistencia a los carbapenem. (20)

Las bacterias que poseen el gen *ampC* en los cromosomas presentan un sofisticado sistema molecular que regula la expresión del gen, de tal modo que sólo se sintetiza la  $\beta$ -lactamasas cuando es necesaria. A grandes rasgos, el sistema funciona así: la expresión del gen *ampC* es inducida por la proteína AmpR, la cual adquiere funcionalidad en presencia de los productos de degradación de la pared bacteriana. De esta manera, cuando la degradación de la pared bacteriana es alta, la AmpR se activa e induce la producción de  $\beta$ -lactamasas. Usualmente, las bacterias que portan genes *ampC* en plásmidos producen la enzima de forma constitutiva

(permanentemente) y en gran cantidad. En estas bacterias, la alta concentración de la enzima, asociada con la pérdida de porinas o la expresión exagerada de bombas de eflujo, es suficiente para desarrollar resistencia a los carbapenémicos. ACT-1, CMY-4 y, recientemente, ACC-1 son algunas de las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC presentes en plásmidos que se han identificado en Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos.(20)

**$\beta$ -lactamasas tipo carbapenemasas:**Se han descrito dos tipos de carbapenemasas con base en estudios moleculares. Las primeras son enzimas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, razón por la cual se han denominado carbapenemasas tipo serina. El segundo grupo son enzimas que en su sitio activo requieren de cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática; éstas últimas son las denominadas metalobetalactamasas. Es común pensar que la producción de una carbapenemasa es suficiente para que la bacteria presente resistencia a los carbapenémicos. Sin embargo, en enterobacterias se ha demostrado que, además de la carbapenemasa, se requiere de la disminución de la permeabilidad de la membrana externa mediante la pérdida de porinas. (20)(21)(22)(38)

### 3.6 CARBAPENEMASAS - CLASIFICACIÓN

El primer productor de Carbapenemasas en enterobacterias (NmCA) se identificó en 1993. Desde entonces, una gran variedad de carbapenemasas han sido identificadas en enterobacterias. En 1980, Ambler propuso una clasificación para  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases (A, B, C y D) basándose en secuencias parciales del ADN. Las enzimas de clase A (presente en más del 50% de los aislamientos de enterobacterias) están codificadas en plásmidos y amplían su espectro de acción por mutaciones puntuales; en este grupo se destaca las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) SME -1 a -2 y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas (KPC)-1 a 3. El gen más frecuentemente encontrado es Bla<sub>KPC</sub>, el que se disemina a través de amplias áreas geográficas debido a la expansión clonal dominante de la cepa ST258, mediada por plásmidos, en el transposón Tn4401. La clase B son enzimas que confieren resistencia a carbapenemes, requieren zinc para su actividad y por ello se les considera metalobetalactamasas (MBL); en general son enzimas inhibibles por Ácido Etilendiaminotetraacético(EDTA). Las enzimas de la clase C son proteínas codificadas en el cromosoma bacteriano y son inducibles por

betalactámicos (AmpC). Las enzimas de la clase D son enzimas de plásmidos con actividad sobre oxacilina (OXA); los plásmidos son inhibibles por cloruros y, de forma variable, por inhibidores del tipo ácido clavulánico o sulbactam.(1)(7)(20)(21)(22)

En 1995 Bush, Jacob y Medeiros proponen una clasificación funcional para las betalactamasas que se correlaciona con la clasificación de Ambler, denominándose: 1, 2, 3 y 4. El grupo 1, presente en bacilos gramnegativos del tipo AmpC (Clase C de Ambler), son enzimas con acción cefalosporinasa no inhibibles por ácido clavulánico, ni por EDTA. Las del grupo 2 están constituidas por penicilinasas y cefalosporinasas inhibibles por ácido clavulánico o tazobactam y coinciden con el tipo A de Ambler. Las del grupo 3 son inhibibles por EDTA pero no por ácido clavulánico (corresponden al tipo de B de Ambler, metaltobetalamasas). Las del grupo 4 incluyen penicilinasas no inhibibles por el ácido clavulánico.(1)(7)(20)(21)(22)

Actualmente, se han descrito tres tipos de carbapenemasas en enterobacterias: clase A ó grupo 2 (KPC), B ó grupo 3 (MBL) y D ó grupo 2d (OXA). (1)(7)(20)(21)(22)(Cuadro 1)(Figura 2)

### **3.6.1 CARBAPENEMASAS CLASE A: SERINCARBAPENEMASAS**

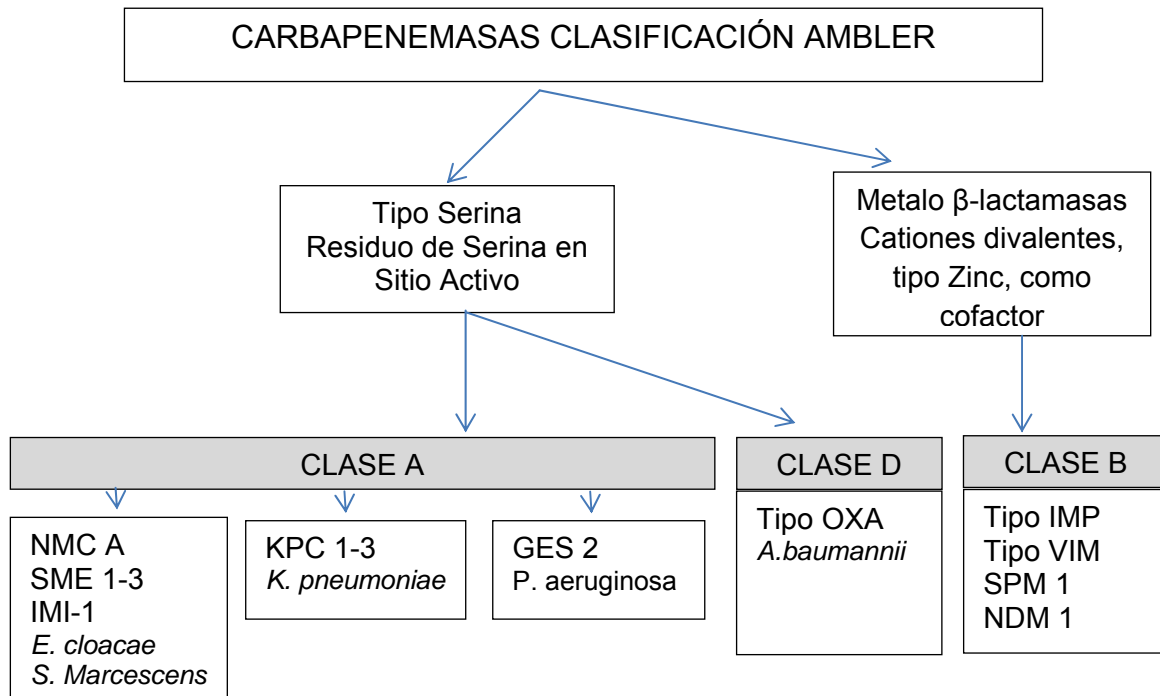
Se ha descrito una variedad de carbapenemasas clase A; algunos son codificados por los cromosomas (Nmca, Sme, IMI-1, SFC-1), y otros están codificados por plásmidos (Carbapenemasas *Klebsiellapneumoniae* [KPC], IMI-2, derivados de GES), pero todos efectivamente hidrolizan carbapenémicos y son parcialmente inhibidos por el ácido clavulánico.(5) KPC es la enzima, clínicamente, más común de este grupo. El primer productor de KPC (KPC-2 en *K. pneumoniae*) fue identificado en 1996 en el este de Estados Unidos. En unos pocos años, los productores de KPC se habían extendido a nivel mundial y se han descrito en los estados contiguos de Estados Unidos y, en particular, en Puerto Rico, Colombia, Grecia, Israel y República Popular de China (Figura 3). También, se han reportado brotes de productores de KPC en muchos países europeos y en América del Sur.(1)(22)(21)(44)(Figura 3)



**CUADRO 1**  
**Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas Bush, Jacoby y Madeiros 1995**

GRUPO	CLASE MOLECULAR	SUSTRATO DE PREFERENCIA	INHIBICIÓN POR AC. CLAVULANICO	INHIBICIÓN POR EDTA	ENZIMAS REPRESENTATIVAS
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC de Gram-negativos MRI-1
2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas	+	-	Penicilinasas de Gram-positivos
2b	A	Penicilinas y Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas y Cefalosporinas de espectro extendido, monobactams	+	-	<b>TEM-3 a TEM-26 y SHV-2 a SVH-6 (BLEE) K1</b>
2br	A	Penicilinas	+/-	-	TEM30 a TEM-36 TRC-1
2c	A	Penicilinas, Carbenicilinas	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas, Cloxacilinas	+/-	-	<b>OXA-1 a OXA-11, PSE-2</b>
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinasas inducibles de <i>P. Vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas y Carbapenémicos	+	-	NMC-A de <i>E. cloacae</i> Sme-1 de <i>Serratia Marcescens</i> <b>KPC 1-3</b>
3	B	La mayoría de $\beta$ -lactámicos incluyendo carbapenémicos	-	+	L-1 de <i>S. maltophilia</i> <b>MBL</b>
4	No Determinado	Penicilinasas	-	?	Penicilinasas de <i>B. cepacia</i>

**Fuente:** Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-33.



**Figura 2.** Carbapenemasas Clasificación AMBLER (Tomado de Suarez CJ, Kattan JN, Gúzman AM, Villegas MV. Mecanismos de Resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. Colombia: 2006)

Las serin-carbapenemasas clase A del tipo Sme, IMI-1 y NMC-A comparten las siguientes características: 1) poseen una mayor capacidad hidrolítica contra imipenem que meropenem; 2) a diferencia de las metallo-β-lactamasas, confieren resistencia a aztreonam, pero no a las cefalosporinas de tercera generación; 3) son inhibidas por el ácido clavulánico, y 4) se encuentran en los cromosomas, se pueden inducir y se sólo se han encontrado en unas pocas cepas de enterobacterias. (1)(22)(20)(21)

La serin-carbapenemasa del tipo GES-2 aparece por una sustitución sencilla de aminoácidos de la GES-1 que pertenece al grupo de β-lactamasas de espectro extendido no derivadas de TEM o SHV. Con esta sustitución, la GES-2 se convierte en una carbapenemasa y ha sido reportada en una cepa de *P. aeruginosa* en Sudáfrica. (20)(22)(44)

En las serin-carbapenemasas del tipo KPC, todos sus genes codificadores se han encontrado en plásmidos. Todas las KPC presentan gran actividad hidrolítica contra aminopenicilinas, ureidopenicilinas, aztreonam y los carbapenémicos, y baja actividad hidrolítica contra las cefalosporinas de tercera generación. Un solo clon de *K. pneumoniae* (tipo de secuencia [ST]-258) se identificó ampliamente en todo el mundo, lo que indica que puede haber contribuido a la propagación de los genes bla<sub>KPC</sub>. Aunque existen distintos tipos de clones de KPC, que se diferencian por su tipo de secuencia multilocus, contenido adicional de β-lactamasas, y por el tamaño, número y estructura de los plásmidos, los genes bla<sub>KPC</sub> están asociados con un solo elemento genético (transposón Tn4401).(45)(37) El nivel de resistencia a los carbapenémicos por los productores de KPC puede variar notablemente; ertapenem es el carbapenem que tiene la menor actividad. (Cuadro 2).(1)(36)

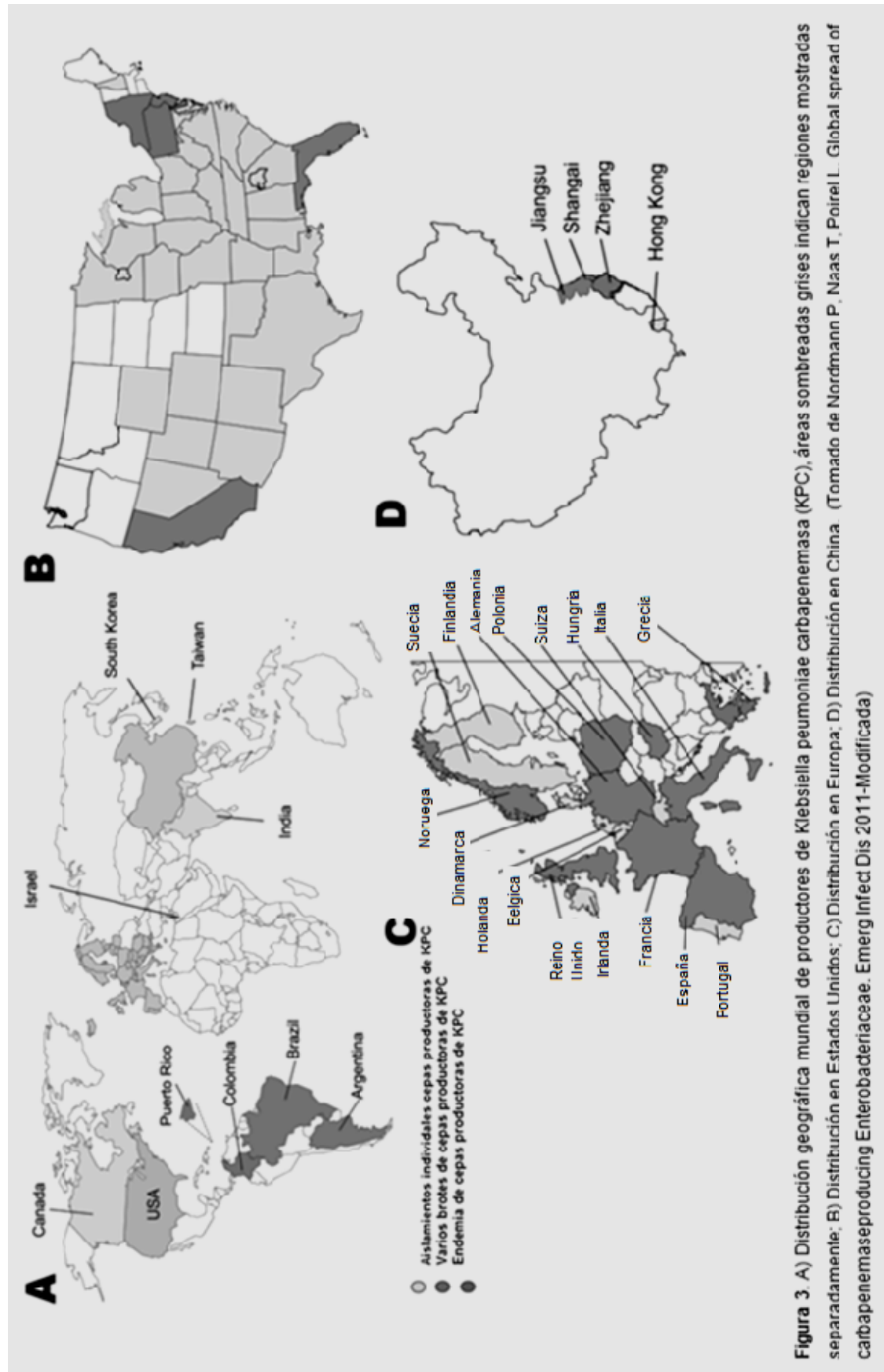
Las tasas de mortalidad atribuidas a las infecciones producidas por KPC son altas (>50).(1) Según diversos estudios, la letalidad por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas oscila entre el 47 al 68%. (16)

**CUADRO 2**  
**Concentración Inhibitoria Mínima de Carbapenémicos para**  
**Enterobacterias productoras de Múltiples tipos de**  
**Carbapenemasas**

Carbapenemasa	CIM, mg/L		
	Imipenem	Meropenem	Ertapenem
KPC	0.5- >64	1- >64	0.5- >64
Metallo β-lactamasa*	0.5- >64	0.25- >64	0.5- >64
OXA tipo 48	1- >64	0.5- >64	0.25- >64

**Fuente:** Emerging Infectious Diseases 2011. Global spread of carbapenemase producing enterobacteriaceae.

\*Incluyendo NDM-1



**Figura 3.** A) Distribución geográfica mundial de productores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC), áreas sombreadas grises indican regiones mostradas separadamente; B) Distribución en Estados Unidos; C) Distribución en Europa; D) Distribución en China. (Tomado de Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 2011-Modificada)

### 3.6.2 CLASE B: METALO $\beta$ -LACTAMASAS

Las metalo $\beta$ -lactamasas (MBLs) son, en su mayoría, del tipo integrón Verona codificante para metalo  $\beta$ -lactamasas (VIM), y del tipo IMP. Su actividad se inhibe por Ácido Etilendiaminotetraacético(EDTA), pero no por el ácido clavulánico. Los niveles de resistencia a los carbapenémicos pueden variar (Cuadro 2). Tasas de mortalidad asociadas a los productores de MBL se promedian del 18% al 67%.(1)(5)(22)

El primer reporte de metalo- $\beta$ -lactamasas en una enterobacteria provino de Japón, en 1991, y se nombró IMP-1. Para 1996, estaba diseminada entre bacilos Gram negativos en todo el país. Actualmente, ambas familias de metalo- $\beta$ -lactamasas están ampliamente diseminadas en cuanto a variedad de especies, aunque se hallan más comúnmente en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. También se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial y han sido detectadas en cerca de 28 países y 5 continentes.(1)(20)

Las MBLs son transferibles puesto que su gran mayoría se encuentran en genes casetes localizados principalmente en integrones tipo 1 y, en algunas ocasiones, se encuentran en plásmidos o transposones. Habitualmente, estas enzimas están asociadas con otros genes de resistencia ubicados en los mismos genes casetes, lo cual les permite ser resistentes múltiples antibióticos.(8)(20) Las metalo- $\beta$ -lactamasas se caracterizan por generar resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (oxiiminocefalosporinas, cefamicinas, carbapenem), aminoglucósidos y quinolonas, y presentan sensibilidad variable al aztreonam.(20)

La metalobetalactamasa NDM-1 fue descubierta en Suecia en el 2008, en un paciente indio, hospitalizado previamente en Nueva Delhi, esta MBL es ahora el centro de atención en todo el mundo. En comparación con otras carbapenemasas, NDM-1 tiene varias características desconcertantes para la salud pública mundial. Estas características son: 1) la presencia del gen bla<sub>NDM-1</sub> no en una sola especie, sino en muchas especies no relacionadas y su propagación en el medio ambiente, 2) una frecuente adquisición por *K. pneumoniae*, un patógeno nosocomial típico, pero también por *E. coli* que es el principal patógeno adquirido en la comunidad, en consecuencia los productores de NDM-1 han sido recientemente identificados en el agua. (1)(17)(19)(46)

Dos clases de antibióticos, polimixinas (colistina) y gliciclinas, han demostrado actividad in vitro contra bacterias portadoras de NDM-1. El perfil de seguridad de estos antibióticos es cuestionable. Hay una necesidad de la detección activa de NDM-1 y la investigación debe orientarse hacia el desarrollo de antibióticos seguros para el tratamiento de estas infecciones.(11)(14)(46)

### 3.6.3 CLASE D: ENZIMAS DEL TIPO OXA

Las carbapenemasas tipo serina de la clase D (oxacilinasas) se han caracterizado principalmente en *A. baumannii*. El espectro de actividad entre todas las oxacilinasas es bastante similar, puesto que hidrolizan débilmente imipenem y meropenem, no hidrolizan ni cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam, a excepción de OXA 27, y todas son predominantemente penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a oxacilina. Además, pueden o no ser inhibidas por el ácido clavulánico, a excepción de OXA 23 que es resistente. (20)(22)

A pesar de que hasta la fecha las oxacilinasas no han recibido tanta atención como las metalo- $\beta$ -lactamasas, es importante considerarlas como potencialmente peligrosas, pues aunque su actividad carbapenemasa es pobre, se incrementa si otros mecanismos de resistencia están presentes (como bombas de eflujo o disminución en la permeabilidad ocasionada por cambios en las porinas o por modificaciones en las proteínas de unión a las penicilinas).(20)(43)

El primer productor de OXA-48 identificado fue una cepa aislada de *K. pneumoniae* en Turquía 2003. Su distribución en todo el mundo ahora incluye países de Europa, en la parte sur y este del Mar Mediterráneo y África. OXA-48 es peculiarmente conocido por su débil potencial para hidrolizar carbapenémicos y cefalosporinas de amplio espectro, como ceftazidina y aztreonam. La actividad de estas no es inhibida por EDTA y tienen una inhibición intermedia por Ácido Clavulánico. Los productores de OXA-48 son principalmente aislados en *K. pneumoniae* y *E. coli*, su nivel de resistencia a carbapenémicos es mayor cuando son BLEE positivos. (1)(22)

### 3.7 DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS

Para la detección de carbapenemasas en cepas bacterianas, se pueden utilizar métodos tanto fenotípicos como genotípicos. Si bien las técnicas moleculares son consideradas los métodos de referencia para confirmar la presencia de los genes de las diferentes carbapenemasas, estas técnicas no suelen estar disponibles en el contexto de la práctica clínica habitual. Por tal motivo se han propuesto diversos ensayos fenotípicos para detectar presuntivamente la presencia de carbapenemasas en aislamientos clínicos.(5)(21)

No se recomiendan los métodos microbiológicos para confirmación de actividad enzimática (carbapenemasa) en enterobacterias debido a que tienen baja especificidad (falsos positivos debidos a otras enzimas no verdaderas carbapenemasas).(9) A continuación se mencionan diversos tipos fenotípicos y genotípicos de detección de carbapenemasas haciendo énfasis en los más usados.

#### 3.7.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS

Podemos dividirlos en pruebas de sensibilidad y ensayos fenotípicos propiamente dichos:

##### 3.7.1.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

- **Concentración Inhibitoria mínima:**

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Se determina la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Utilizando los criterios de interpretación del NCCLS los resultados son interpretados como susceptible, intermedios o resistentes. Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medio de cultivo la microdilución en caldo o agar, siendo en caldo el método más utilizado en los laboratorios clínicos.(14)(21)

En el método de dilución en agar se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar, teniendo en cuenta que la mayoría de los replicadores permiten inocular entre 32 y 36 organismos.(14)(47)

El caldo Mueller-Hinton (MH) es preparado de una base deshidratada, el pH debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. No deben añadirse cationes suplementarios. Puede ser suplementado con 5% de sangre de cordero desfibrinada o sangre de caballo lisada en el caso de *Streptococcus pneumoniae*. Las ventajas de las pruebas de dilución en agar incluyen la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de organismos no fastidiosos, sin embargo, sus desventajas incluyen el trabajo requerido para preparar las placas de dilución en agar y su relativamente corto tiempo de almacenamiento. Generalmente las pruebas de dilución en agar no se realizan en laboratorios clínicos de rutina pero pueden ser ideales para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que deben analizar un gran número de cepa.(14)

- **Método de Difusión por discos:**

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa). El antibiograma por difusión de disco basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.(14)(34)



Indicaciones: el antibiograma está indicado en las siguientes situaciones:(14)

- Se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales.
- En estudios epidemiológicos, aunque hasta el momento no se halla descrito mecanismos de resistencia para dicho organismo.
- Cuando a pesar de conocerse la sensibilidad del germen a drogas altamente efectivas, el paciente no puede recibir dicha medicación (sensibilidad de *S. pyogenes* a eritromicina en pacientes alérgicos a la penicilina).
- En el estudio de nuevos antibióticos.

**Fundamento:** El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.(14)(34)

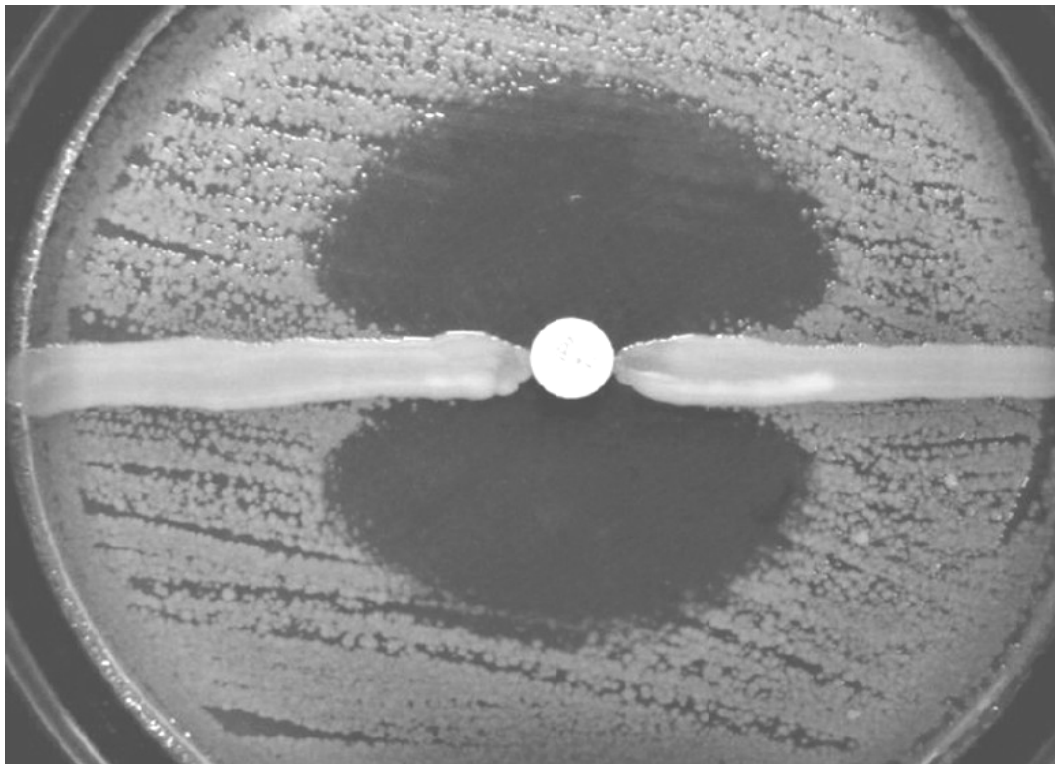
### 3.7.1.2 ENSAYO FENOTÍPICO

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local y la identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas.(11)

- **Método de Hodge modificado:**

Para aplicar este método a continuación se describe de forma breve los pasos.

1. Hisopar una placa de agar M-H de 4mm de espesor con un inóculo de 0,5 McFarland (MF) de la cepa a estudio.
2. Colocar una azada bien cargada del microorganismo problema desde ambos bordes de la placa hasta el centro de la misma en línea recta.
3. Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente
4. Colocar el disco de meropenem en el centro de la placa.
5. Incubar en estufa a 35 °C hasta el día siguiente.
6. Una deformación del halo de inhibición se interpreta como un ensayo positivo (el microorganismo produce la enzima que degrada el antibiótico, permitiendo que la cepa pueda desarrollar).(23)(14)(48)



**Figura 4.** Método de Hodge modificado. (Tomado de Indian Journal of Medical sciences.Disponible en:

<http://www.google.com.gt/url?sa=i&rct=j&q=prueba+hodge&source=images&cd=&cad=rja&docid=UsqZov2NY4NUZM&tbnid=DYo7RYjB0kptRM:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.indianjmedsci.org%2FshowBackIssue.asp%3Fissn%3D0019-5359%3Byear%3D2011%3Bvolume%3D65%3Bissue%3D1%3Bmonth%3DJanuary&ei=jIA9Uc6lCojQ8QS52oGACg&psig=AFQjCNFKUuFnur6NNfg1L41OR3V3u780Rw&ust=1363071215768229>)

- **Método de Kirby-Bauer**

El método Kirby-Bauer (método de [difusión](#) en [agar](#)) es empleado para determinar la sensibilidad de un [agente microbiano](#) frente a un [antibiótico](#) o [quimioterápico](#). Este método comprende lo que se denomina un [antibiograma](#) o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas, en donde únicamente se colocan los antibióticos o drogas necesarios para evaluar el mecanismo a estudio.(14)(48)

Sobre la superficie de una placa de [agar](#) Müller-Hinton ([medio de cultivo](#) rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de [sensibilidad](#)) se inocula una cantidad estandarizada de [bacterias](#), sembrándolas de forma pareja para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de [papel de filtro](#) impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes [antibióticos](#). La elección de los antibióticos a probar depende del mecanismo de resistencia a estudio. El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar de forma radial. Se incuba la placa durante 18-24 horas a 37 °C (respetar este parámetro, porque [temperaturas](#) menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento del germen y la difusión del antibiótico, dando halos irregulares difíciles de medir), y luego se miden los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose de acuerdo a tablas confeccionadas previamente. Los resultados se expresan como: *Sensible* (S), *Intermedio* o *Moderadamente sensible* (I) y *Resistente*(R).(14)(48)

### **3.7.1.3 PROTOCOLO DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS POR KIRBY BAUER**

En 1996, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) organizó la Red Latinoamericana de vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) con el fin de obtener datos microbiológicos fidedignos, oportunos y reproducibles para mejorar la atención del paciente y de fortalecer la vigilancia mediante programas de garantía de calidad sostenibles. (49)(50)(51)

Para asegurar y mantener la calidad de los resultados, en el año 2000 se inició el Programa Latinoamericano de Control de Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS), en el cual actualmente participan 17 laboratorios de 16 países de la Región, en el cual se incluye el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala, y es coordinado por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina. (49)(51)(35)

Frente a la aparición de aislamientos de enterobacterias productoras de *Klebsiellapneumoniae* carbapenemasa (KPC) y metalobetalactamasas (MBL) en América Latina, ReLAVRA propone un algoritmo basado en un tamizaje inicial que utiliza las zonas de inhibición de imipenem y el efecto inhibitorio del ácido 3-aminofenilborónico (APB) sobre las serinocarbapenemasas del grupo A (KPC) y de agentes quelantes de zinc sobre las MBL. (49)(52) (figura 5)

- **PROTOCOLO DETECCIÓN FENOTÍPICA CARBAPENEMASAS:**

Para la detección de carbapenemasas KPC y MBL por Kirby-Bauer, el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala propone el siguiente protocolo (Figura 5):

**PRIMER PASO:** primero se debe observar el halo de IMIPENEM (IMI): Si es  $\leq 22$  mm se sospecha la presencia de carbapenemasas. Para *Salmonella spp*el punto de corte de sospecha de carbapenemasa es  $\leq 24$ mm.(9)(47)

Si el halo de IMI es  $\geq 23$ mm, entonces NO HAY SOSPECHA DE CARBAPENEMASAS.El informe clínico de los carbapenemes en el caso de descartar carbapenemasas (por puntos de corte, en este caso) será según el fenotipo, es decir como da en el antibiograma (S, I, R).(9)

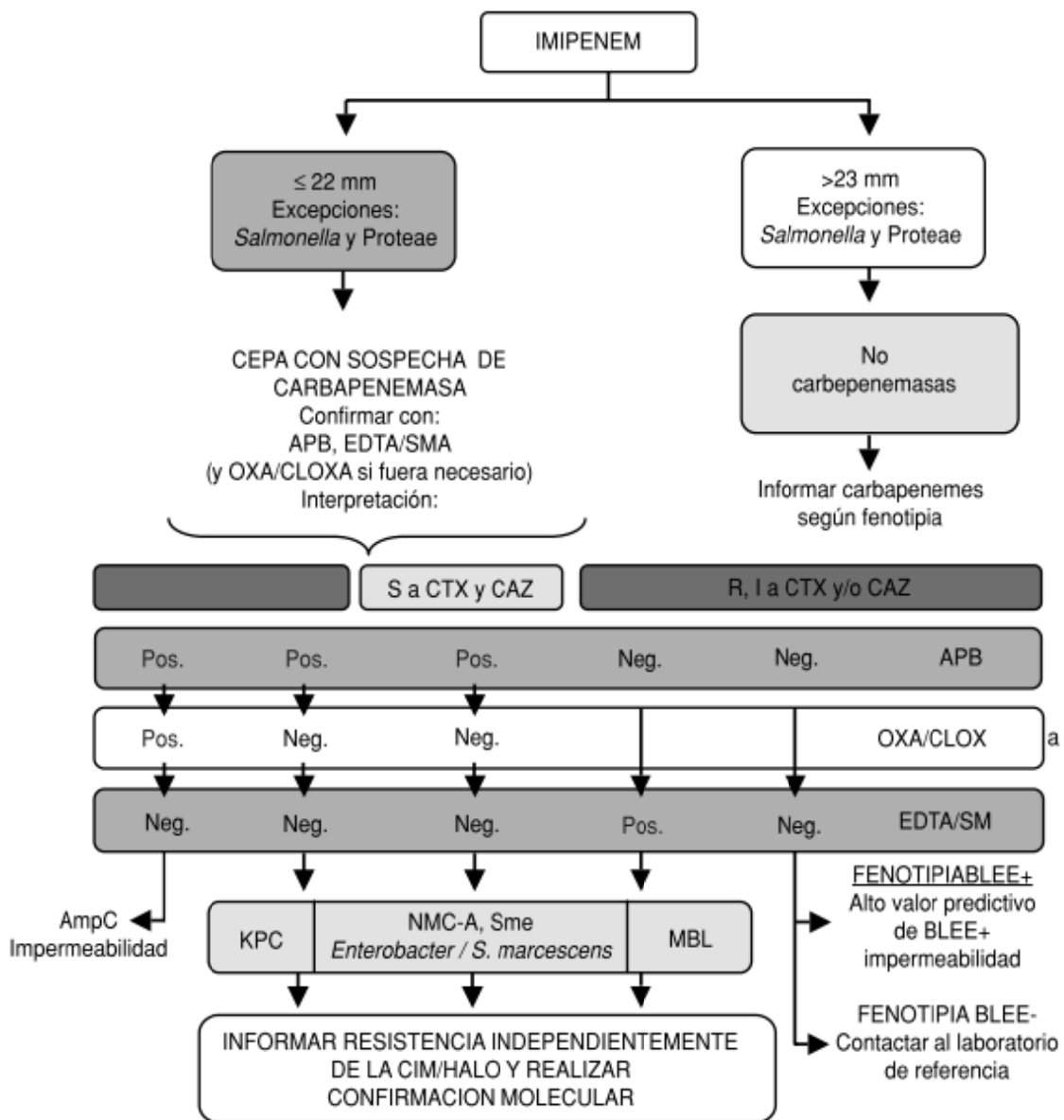
**SEGUNDO PASO:** Si en el antibiograma primario se sospecha la presencia de carbapenemasas según los puntos de corte, se debe realizar una placa complementaria para la observación de las sinergias con ácido borónico (APB) y con Ácido Etilendiaminotraacético(EDTA)/mercaptoacetato de sodio(SMA).(9)

La distancia de colocación de los discos MER – APB – IMI se calcula en base a los diámetros de inhibición obtenidos en el antibiograma primario, según la siguiente fórmula: radio del antibiótico 1 (ATB1) + radio del inhibidor (INHI) + 5 mm Ej: *E. coli* con halos IMI= 18 mm y MER= 18 mm. Al ser iguales ambos diámetros realizamos un solo calculo, que según la fórmula sería: radio ATB1 + radio INHI (radio del inhibidor\*) + 5 mm= 9 + 3 + 5= 17 mm. (Figura 6). Se debe colocar el disco de APB a 17 mm de centro a centro de cada disco de carbapenem (IMI y MER).(9)

\*El diámetro del inhibidor (APB o EDTA) se considera 6 mm ya que no presenta halo de inhibición.

La distancia entre los discos IMI-EDTA/SMA-C3G+CLAV será ajustada utilizando la misma fórmula. Nota: las Cefalosporina de tercera generación (C3G) constituyen mejores sustratos que los carbapenemes para las MBL, por ello se utilizan en la prueba de sinergia.(9)

La Cefalosporina de tercera generación (C3G) combinada con ácido clavulánico (CLAV) (ej: CTX/CLAV) sería más adecuada para la detección de la MBL debido a que se eliminaría un posible efecto de ocultación de la MBL mediado por la presencia de BLEEs. Recordemos que la mayoría de las BLEEs epidemiológicamente importantes en nuestro país son inhibibles por CLAV. Al utilizar dicha combinación se inhibiría la BLEE y quedaría expuesta la actividad de la MBL.(9) (Figura 6)



**Figura 5.** Esquema actualizado propuesto para la búsqueda de carbapenemasa grupo A y MBL en Enterobacterias. Tomado de referencia (49). Esquema basado en las referencias (16) y (53).

APB: ácido 3 aminofenilborónico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; SMA: mercaptoacetato de sodio; OXA: oxacilina; CLOXA: cloxacilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftacidima; KPC: *Klebsiellapneumoniae* carbapenemasa; MBL: metalobetalactamasas; BLEE: betalactamasa de espectro extendido.

<sup>a</sup>Método de Hodge “doble modificado” para detectar carbapenemasas en aislamientos productores de AMP-C (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia* spp. , *Providencia* spp . y *Morganella* spp).

**TERCER PASO:** Análisis del resultado de las sinergias (S) y de la resistencia (R) a cefalosporinas de 3a generación (C3G): Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ). En base a esto podremos sospechar la presencia de los distintos tipos de carbapenemasas:

**1) C3G: CTX, CAZ R, I (alguna de ellas) Carbapenemasas 2f tipo KPC:**

Es considerada una “ $\beta$ -lactamasa de espectro extremo” (BLEEx) porque su actividad abarca a todas las penicilinas, cefalosporinas de 1, 2, 3 y 4 generación, monobactams (AZT), cefamicinas (Cefoxitina <<FOX>>) y carbapenems. (9)

Las carbapenemasas 2f son inhibibles por ácido clavulánico y por ácido borónico. Fenotípicamente observaremos:

- Sinergia MER – APB - IMI: POSITIVA (Figura 6)
- Sinergia IMI - EDTA/SMA – C3G/CLAV: NEGATIVA
- Sinergia C3G y C4G con CLAV: positiva (BLEE+) (halos de CTX similares a los de CAZ)(9)

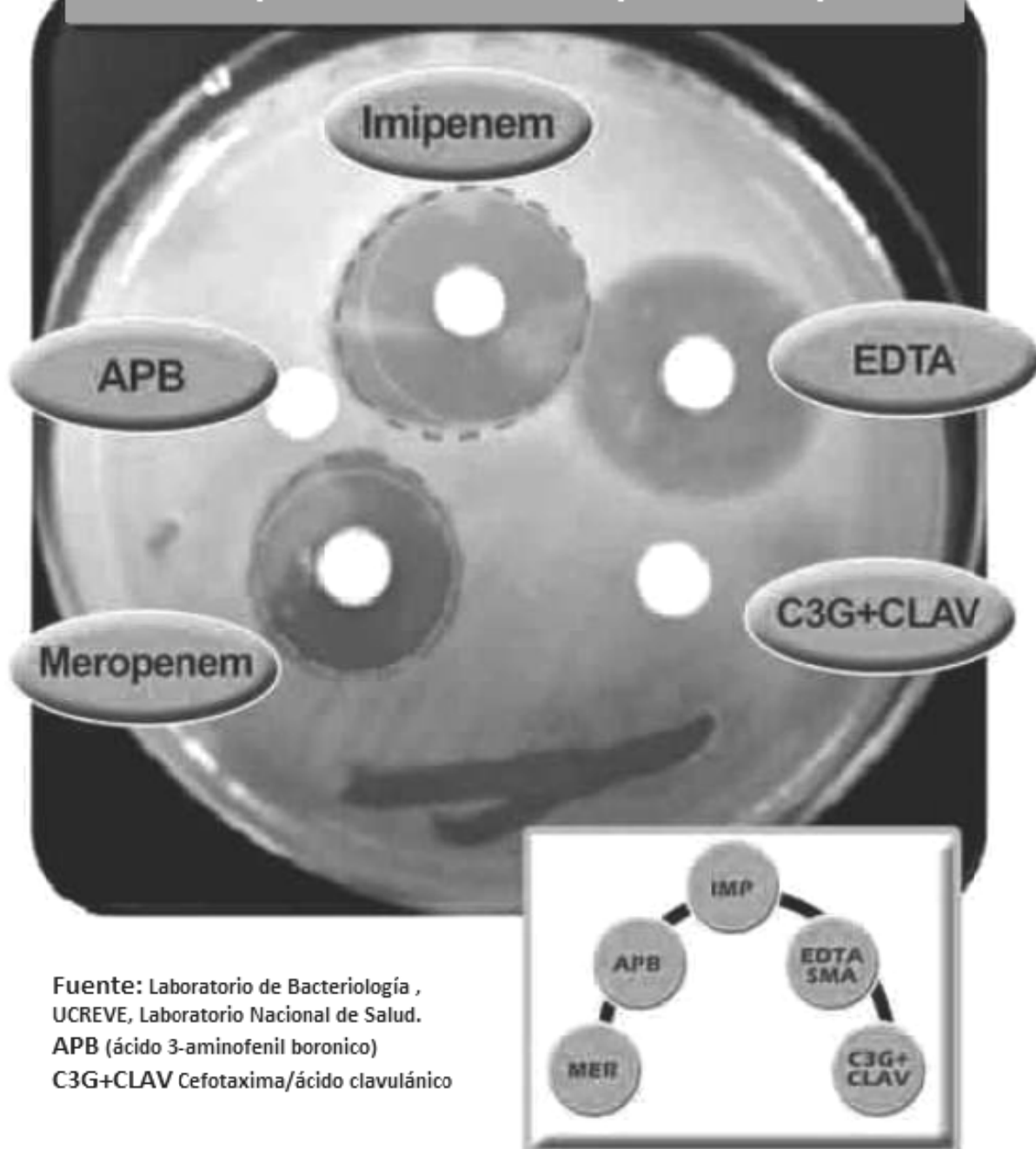
**3) Carbapenemasas Metallo  $\beta$ -lactamasa (MBL):**

Hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de primera (C1G), segunda (C2G) y tercera (C3G) generación, cefamicinas (FOX) y carbapenems. Las C4G son generalmente resistentes, pero también pueden aparecer dentro de la categoría de intermedio y en mucho menor medida como sensibles. Este tipo de enzimas no tienen actividad sobre los monobactams como el aztreonam. Este fenotipo de múltiple resistencia a  $\beta$ -lactámicos y sensibilidad a aztreonam puede ser útil en la identificación de estas cepas en el laboratorio. Sin embargo puede ocurrir que el aislamiento sea resistente a aztreonam debido a mecanismos adicionales de resistencia (eflujo, otras-lactamasas, etc). Las MBL son inhibibles por agentes quelantes tales como EDTA, Mercaptoacético de sodio (SMA) o tioglicolato de sodio. (9)

Fenotípicamente observaremos:

- Sinergia MER - APB - IMI: NEGATIVA
- Sinergia IMI - EDTA/SMA - C3G/CLAV: POSITIVA

## Klebsiella pneumoniae con carbapenemasa tipo KPC



**Figura 6.** *K. pneumoniae* con carbapenemasa tipo KPC. Laboratorio de Bacteriología UCREVE, LNS de Guatemala (Tomado de Morales M, Arbizú E, Barrios J, Valenzuela C, Díaz S. Resistencia a los carbapenémicos en *K. pneumoniae*: primeros aislamientos clínicos en Guatemala. Rev Col Me Gua 2011; 6(3): 45-50).



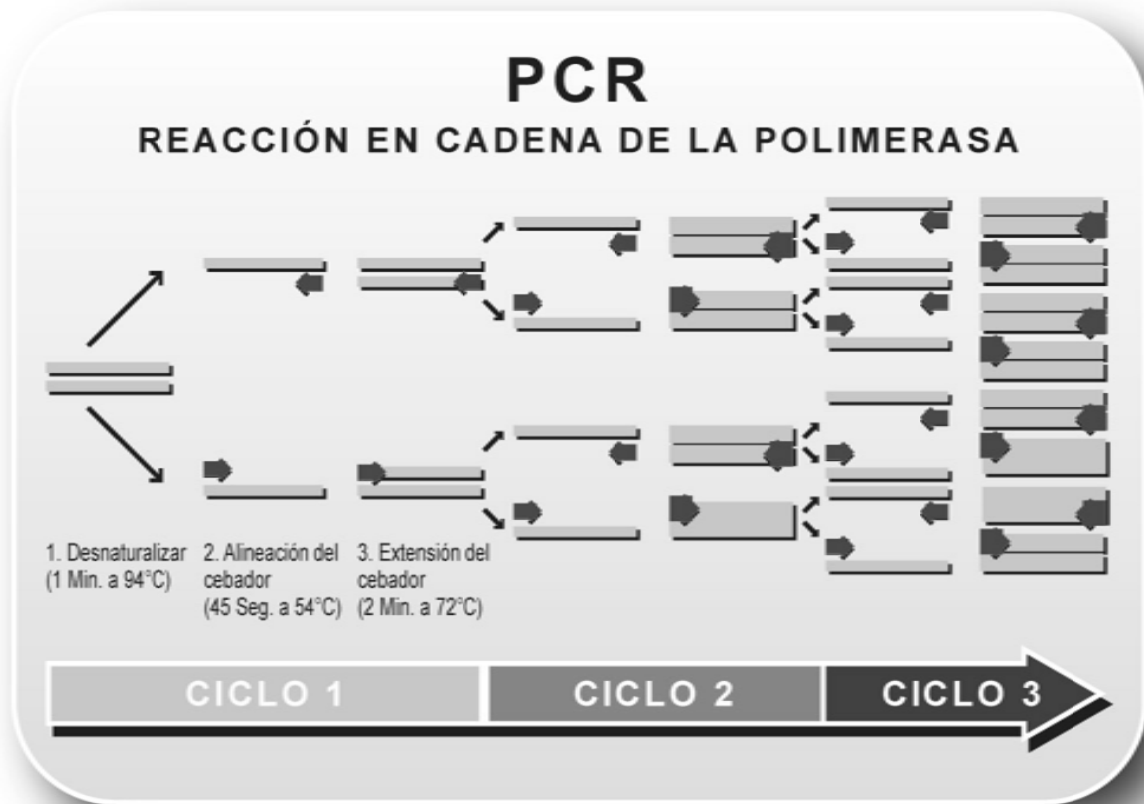
### 3.7.2 MÉTODO GENOTÍPICO

#### 3.7.2.1 REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA

La PCR es un método in vitro de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN.(10)(15)(54)

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante una fórmula, pero generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde.(55)(56)(57)(58)

Estos son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G+C entre 40-75%. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR este en el intervalo de 0.1-0.5  $\mu$ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN.(55)(53)(54)



**Figura 7.** Reacción en Cadena de Polimerasa. (Tomado de Anchaluiza, B. PCR para Cistitis.

Disponible en: <http://www.fitolab.com.mx/fitolabSiteRecs/esquemaPCR.jpg>)

Los cebadores ideales deben carecer lo más posible de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí. La complementariedad en el extremo 3' induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores entre sí, para que la polimerasa los extienda y genere así pequeñas ampliaciones referidos como dímeros de cebadores. Estos dímeros son productos cortos que se amplifican muy eficientemente, reduciendo la cantidad de cebadores disponibles en la reacción, y provocando un menor rendimiento de la ampliación de interés.(55)(56)(59)

### 3.7.2.2 CEBADORES DE KPC-2 Y NDM-1 PARA PCR DE PUNTO FINAL

La secuencia de cebadores para detección de NDM y KPC se obtuvo de los protocolos de detección publicados por el Instituto “Dr. Carlos Malbrán” en Argentina. Estos protocolos se basan en un estudio realizado por dicho instituto en el cual se utilizó un grupo de cepas NDM-1-positivas y KPC-positivas, así como aislados de cepas que contenían otros mecanismos de resistencia (es decir AmpC, CTX-M, OXA, SME, VIM, IMP, GIM, SIM, SPM). Este ensayo demostró una sensibilidad de 100% y especificidad para la detección de NDM-1. (Cuadro 3) (60)(61)(62)(63)(64)

**CUADRO 3**  
**Cebadores de KPC-2 y NDM-1 para PCR de Punto Final**

Oligonucleotido	Secuencia de Nucleótidos, 5´-3´
KPC-F Primer	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG
KPC-R Primer	AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA
NDM-F Primer	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC
NDM-R Primer	GGC GTA GTG CTC AGT GTC

Primer (Cebador); F, Forward (de avance); R, Reverse (reverso).  
Fuente: Anexo 1, Anexo 2 (63)(64)

### 3.8 SITUACIÓN ACTUAL DE GUATEMALA FRENTE A LAS CARBAPENEMASAS

En Guatemala, los estudios realizados en 2002 y publicados en el libro “Costo de la infección nosocomial en nueve países de América Latina”, noviembre de 2003, mostraron que las infecciones nosocomiales más comunes, como las neumonías nosocomiales en salas de cuidados intensivos y las bacteriemias, aumentan sustancialmente los costos de la atención. En esos estudios el promedio del exceso de costo del tratamiento de los casos con respecto a los controles fue de \$1.700 entre los adultos y de \$450 a \$900 entre los niños. En el Hospital Roosevelt de la Ciudad de Guatemala, Guatemala, más de 50% de las cepas de *S. aureus* son resistentes a meticilina, por lo que requieren tratamiento con vancomicina. Asimismo, la resistencia de los aislamientos de *K. pneumoniae*, representada por cepas productoras de BLEE, sobrepasa el 40%, y la resistencia de los aislamientos de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* a quinolonas, carbapenemes, ceftazidima y cefepima es de más de 30%. (18) Esto ha generado una situación muy difícil desde el

punto de vista terapéutico, al limitar significativamente las opciones de tratamiento; asimismo, el costo del tratamiento es mucho más alto que en el estudio previo de infección nosocomial ya mencionado.(18)(61)(62)(63)(64)(65)

En el 2011, el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala (LNS) identificó 2 cepas de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos, una de tipo MBL y otra del tipo KPC. Para la detección de carbapenemasas se utilizó el algoritmo establecido por el instituto nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos Malbran de Argentina. Por lo anterior la Organización Panamericana de la Salud (OPS), generó una alerta en donde subraya la importancia de buscar este mecanismo de resistencia. Según este informe se estima que *K. pneumoniae* es el agente etiológico causante del 20-30% de neumonías nosocomiales en la región y es el agente que con mayor frecuencia se aísla en bacteremias intrahospitalarias. (7)(19)

En el 2011 se inició a través del LNS la búsqueda de este mecanismo de resistencia en todas las cepas de enterobacterias referidas por los laboratorios de red nacional al área de Bacteriología de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE) del LNS. Las dos cepas aisladas productoras de carbapenemasas, mencionadas anteriormente, fueron referidas por hospitales, el primero por el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación (HIIR) y el segundo por el Hospital Nacional de Cuilapa (HNC). Los resultados de sinergia confirmaron que la cepa 83/2011 (HIIR) es una *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos por mecanismo de MBL y la 172/2011 (HNC), *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos por mecanismo KPC. (7)(19)

La OPS/OMS recomienda que las cepas sospechosas de carbapenemasas sean enviadas al laboratorio nacional de referencia para su confirmación siendo para Guatemala, el Laboratorio Nacional de Salud.(7)(19) Posterior a estos hallazgos realizados en 2011, en Guatemala no se ha realizado ningún otro estudio referente a carbapenemasas en el país.

## **4 POBLACIÓN Y MÉTODOS**

### **4.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Estudio descriptivo transversal

### **4.2 UNIDAD DE ANÁLISIS**

#### **4.2.1 UNIDAD PRIMARIA DE MUESTREO:**

Cepas de enterobacterias *E. coli* y/o *K. pneumoniae* BLEE+ aisladas de cultivos realizados a pacientes consultantes a los hospitales pertenecientes a un grupo privado de la Ciudad Capital de Guatemala y cepas almacenadas en LNS.

#### **4.2.2 UNIDAD DE ANÁLISIS:**

Características fenotípicas y genotípicas de enterobacterias *E. coli* y/o *K. pneumoniae* BLEE+.

#### **4.2.3 UNIDAD DE INFORMACIÓN:**

Enterobacterias BLEE+ aisladas de cultivos realizados a pacientes consultantes al grupo hospitalario privado de la Ciudad Capital de Guatemala y cepas almacenadas en el LNS.

### **4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **4.3.1 POBLACIÓN**

Enterobacterias *E. Coli* y/o *K. Pneumoniae* BLEE+ aisladas de cultivos realizados durante los meses de mayo a agosto, obtenidas en los hospitales del grupo hospitalario privado y enterobacterias BLEE+ almacenadas durante el año 2012 por el LNS.

#### **4.3.2 MARCO MUESTRAL**

Laboratorio Microbiológico de grupo hospitalario privado y Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala.

#### **4.3.3 MUESTRA**

67 cepas de enterobacterias *E. Coli* y/o *K. pneumoniae* BLEE+ aisladas en cultivos realizados en el laboratorio microbiológico del Grupo hospitalario privado y 51 cepas de enterobacterias BLEE+ almacenadas por el LNS.

- MÉTODOS Y TÉCNICA DE MUESTREO: No probabilístico de conveniencia

#### **4.4 SELECCIÓN DE LOS SUJETOS A ESTUDIO**

##### **4.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se incluyeron todas las cepas de enterobacterias *Escherichia Coli* y *Klebsiella Pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido procedentes del Laboratorio Microbiológico del grupo hospitalario privado durante los meses de mayo a agosto de 2013.

Se incluyeron cepas de enterobacterias *E.Coli* y *K. pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido almacenadas en el LNS durante el año 2012.

##### **4.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Se excluyeron todas las cepas contaminadas a las que no se logró aislar la cepa pura.

#### 4.5 MEDICIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN
Betalactamasa de Expectro Extendido	Enzima que hidroliza a los Betalctámicos clasificación A de Ambler.	Presencia de la enzima identificada mediante antibiograma.	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Positivo o Negativo
Enterobacteria	Familia de bacterias, bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa negativos.	Familia de bacterias seleccionada para estudio	Cualitativa	Nominal	<i>K. pneumoniae</i> o <i>E. coli</i>
Carbapenemasa tipo KPC	Enzima que hidroliza a los Betalctámicos clasificación A de Ambler	Enzima identificada mediante método Fenotípico y Genotípico	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Positivo o Negativo
Carbapenemasa tipo MBL	Enzima que hidroliza a los Betalctámicos clasificación b de Ambler.	Enzima identificada mediante método Fenotípico y Genotípico	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Positivo o Negativo
Tipo de cultivo	Propagación artificial de microorganismos, células o tejidos.	Medio físico en que se hacen crecer las bacterias obtenidas de secreción, excreción o tejido.	Cualitativa	Nominal Politómica	Urocultivo Hemocultivo Secreción LCR Coprocultivo Punta de Catéter
Institución	Entidad pública o privada que se ocupa de funciones de interés general.	Entidad pública o privada de donde se obtendrán las muestras para el estudio fenotípico y genotípico.	Cualitativa	Nominal Politómica	Hospital No.1* Hospital No. 2* Hospital No. 3* Hospital No. 4* Hospital No. 5* LNS
Gen Bla <sub>NDM-1</sub>	Secuencia de nucleótidos que codifican la enzima Metalobetalactamasa New Delhi 1	Gen evaluado mediante la técnica de PCR de tiempo real	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Presente o Ausente
Gen Bla <sub>KPC-2</sub>	Secuencia de nucleótidos que codifican la enzima de <i>K. pneumoniae</i> carbapenemasa 2	Gen evaluado mediante la técnica de PCR de tiempo real	Cualitativa	Nominal Dicotómica	Presente o Ausente

\*Ver anexo 8

## 4.6 TÉCNICAS, PROCESOS E INSTRUMENTOS A UTILIZADOS EN LA RECOLECCIÓN DE DATOS

### 4.6.1 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### 1. Detección fenotípica de *KlebsiellaPneumoniae* Carbapenemasa (KPC) yMetalobetalactamasas (MBL):

El estudio fenotípico fue realizado por estudiantes de 7mo año de la Facultad de Ciencia Médicas, autores de éste estudio de tesis, en la Unidad de referencias para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE), área de bacteriología, Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala (LNS). Las cepas obtenidas del laboratorio del grupo hospitalario privado, se trasladaron a las instalaciones del LNS en medio de transporte Cary Blair.

En el LNS las cepas se cultivaron en agar Sangre de Carnero y agar MacConkey para poder realizar la identificación de la cepa y, las que se encontraron contaminadas, se reaislaron hasta obtener la cepa pura.

Al obtener la cepa pura se realizó un Kirby Bauer evaluando la sensibilidad de la cepa al imipenem, ya que según los protocolos del Instituto "Dr. Carlos Malbran" en Argentina, un halo de IMIPENEM (IMI)  $\leq 22$  mm es sospechoso de presencia de carbapenemasas.

Posterior a esto, se realizó otro Kirby Bauer específico para detección de carbapenemasas, que consta de los siguientes pasos:

- Se realizó una solución al 0.5 de McFarland con solución salina y la cepa a estudio.
- Se inoculó esta solución en un medio Mueller Hinton, con un hisopo estéril, realizando un estriado en toda la superficie del medio, éste estriado se repitió 3 veces en diferentes direcciones para que la superficie entera quedara inoculada.
- Se colocaron los siguientes discos de sensibilidad: ácido borónico (APB), Etilendiaminotetraacético/mercaptoacetato de sodio (EDTA/SM), ceftriaxona/ácido clavulánico (C3G/CLAV) y meropenem (MER).



- La distancia de colocación de los discos MER – APB – IMI se calculó en base a los diámetros de inhibición obtenidos en el antibiograma primario, según la siguiente fórmula: radio del antibiótico 1 (ATB1) + radio del inhibidor (INH1) + 5 mm. La distancia entre los discos IMI-EDTA/SMA-C3G+CLAV se ajustó utilizando la misma fórmula.
- Análisis de Resultados:  
Se evaluó la presencia de sinergia específica para KPC y MBL, siendo los resultados esperados para cada tipo de carbapenemasa los siguientes:
  - KPC:  
Sinergia MER – APB - IMI: POSITIVA  
Sinergia IMI - EDTA/SMA – C3G/CLAV: NEGATIVA
  - MBL:  
Sinergia MER - APB - IMI: NEGATIVA  
Sinergia IMI - EDTA/SMA - C3G/CLAV: POSITIVA

## 2. Detección Genotípica de KPC-2 y NDM-1:

La detección genotípica se realizó por los estudiantes de 7mo año de la Facultad de Ciencias Médicas, autores de éste estudio de tesis, bajo la supervisión del personal técnico que labora en el Centro de Investigaciones Biomédicas, USAC. La detección se llevó a cabo con PCR de punto final y constó del siguiente procedimiento:

1. Extracción de ADN de cepas a estudio, para lo cual se utilizó el kit de extracción de ADN marca Promega de la siguiente manera:
  - Se añadió 1 ml del cultivo de la bacteria a estudio a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contenga una solución de 10% buffer fosfato alcalinizado (PBS) + 90% alcohol al 70%.
  - Se centrifugó a 16,000×g durante 2 minutos para sedimentar las células. Se quito el sobrenadante.
  - Se agregó 800µl de PBS y vortexear.
  - Se centrifugó a 16,000×g durante 2 minutos para sedimentar las células. Se quitó el sobrenadante.
  - Se agregó 600µl de solución de Lisis de Núcleos, 200µl de solución lisado de nucleos y 150µl de solución precipitadora de proteínas.

Suavemente se pipeteó la solución hasta que las células sean resuspendidas.

- Se mezcló (con vortex) vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteínas con el lisado celular.
  - Se incubó la muestra en hielo durante 20 minutos.
  - Se centrifugó a 16,000× g por 4 minutos
  - Se transfirió el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio que contenía 800µl de isopropanol a temperatura ambiente.
  - Se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN tomaron forma de hilo y se creó una masa visible.
  - Se centrifugó a 16,000× g durante 2 minutos.
  - Se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se escurrió el tubo en papel absorbente limpio. Se agregó 800µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y mezcló suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
  - Se centrifugó a 16,000× g durante 2 minutos y se aspiró con cuidado el etanol.
  - Se escurrió el tubo sobre papel absorbente limpio y permitió que el sedimento se secase al aire por 10-15 minutos.
  - Se añadió 100µl de solución de rehidratación de ADN al tubo y rehidrató el ADN mediante incubación a 65 ° C durante 1 hora. Periódicamente se mezcló la solución golpeando suavemente el tubo.
  - Se almacenó el ADN de 2-8 ° C por 24 horas.
2. Se preparó el GoTaq® Green Master Mix marca Promega, que contenía la polimerasa TaqDNA, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y buffers de reacción a concentraciones óptimas para la amplificación eficiente de plantillas de ADN por PCR. También contenía colorantes (azul y amarillo) que permitían el seguimiento de los progresos realizados durante la electroforesis.
- Se descongeló el GoTaq® Green Master Mix Verde a temperatura ambiente. Se agitó con vortex, y se colocó brevemente en la microcentrífuga para recolectar el material en la parte inferior del tubo.

3. En un tubo de Eppendorf de 1.5ml se mezclaron los siguientes reactivos, se calculó la cantidad de cada uno de los reactivos según las siguientes fórmulas:

GoTaq = #microtubos a utilizar \* 12.5

Agua = #microtubos a utilizar \* 7

Primer F = #microtubos a utilizar \* 0.5

Primer R = #microtubos a utilizar \* 0.5

Como control positivo externo para NDM-1 se utilizó la cepa 162/2011 y para KPC-2 se utilizó INOS 08/2012, ambas cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio Nacional de Salud.

4. Se colocó a cada uno de los microtubos de 0,2 ml a utilizar 20µl de la mezcla que se preparó con anterioridad. Y se agregó 5µl del ADN extraído de la cepa a estudio a cada uno de los microtubos, rotulados con el respectivo número de cepa.
5. Se colocaron los tubos con la mezcla en el termociclador y se programó para realizar 35 ciclos, con una desnaturalización inicial de 5 minutos y una extensión final de 7 min.

- KPC: Tamaño de ampliación 916pb

Desnaturalización inicial = 94°C por 5min;

Ciclado= 35 ciclos: 94°C 30seg -- 56° 30seg -- 72°C 60seg;

Extensión final = 72°C por 7min.

- MBL: Tamaño de ampliación 512pb

Desnaturalización inicial = 94°C por 5min;

Ciclado= 35 ciclos: 94°C 30seg -- 60° 30seg -- 72°C 60seg;

Extension final = 72°C por 7min.

6. Al finalizar el termociclador, las muestras se colocaron en la máquina de electroforesis. Dicha máquina contiene gel agarosa suspendido en PBS, el gel agarosa se utiliza como filtro, ya que éste ordena por cargas los fragmentos obtenidos, y contiene bromuro de etidio como tinción. El gel contiene pocillos o rendijas en la parte superior, en estos pocillos se colocó primero la escalera, seguido por el control negativo, el control positivo y una muestra en cada uno de los pocillos restantes, hasta haber finalizado de llenar todos los pocillos que contenía el gel.
7. Se programó la electroforesis para funcionar por 45 minutos a 110 voltajes y 256 miliamperios.
8. Al finalizar la electroforesis se colocó el gel contra luz ultravioleta para poder visualizar los resultados, éstos fueron leídos como positivos o negativos.

#### **4.6.2 PROCESOS**

1. Se solicitó permiso al grupo hospitalario privado para recolectar cepas *E. coli* y *K. pneumoniae* BLEE+ de cultivos realizados por el Laboratorio de Microbiología de dicho lugar.
2. Se solicitó permiso para recolectar y evaluar genotípicamente cepas almacenadas en Laboratorio Nacional de Salud (LNS) durante el año 2012.
3. Se recolectaron cepas de enterobacterias BLEE+, dos muestras por cada cepa, obtenidas de cultivos realizados en el laboratorio del grupo hospitalario privado. Éstas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5ml con tioglicolato como medio de almacenaje, y se almacenaron a -70°C en el congelador ubicado en el Centro de Investigaciones Biomédicas, Centro Universitario Metropolitano.
4. Se revivieron las bacterias en medio de Tripticasa Soja y se transportaron al LNS en medio de transporte Cary Blair, en donde se les realizó el estudio fenotípico.
5. Al haber finalizado el estudio fenotípico y haber obtenido la cepa pura, estas se trasladaron al Centro de Investigaciones Biomédicas, Centro Universitario Metropolitano, al mismo tiempo se trasladaron las 51 cepas que el LNS nos proporcionó para el estudio.

6. Se les realizó extracción de ADN. A las 24 horas se realizó el estudio genotípico por PCR.
7. Se realizó la recolección y análisis de resultados junto con nuestro asesor y revisora.

#### **4.6.3 INSTRUMENTO DE MEDICIÓN**

Para el estudio se utilizó una boleta de recolección de datos con la que se obtuvo información sobre la cepa a estudio y sus resultados en cada una de las pruebas (Ver Anexo 3). Ésta boleta constó de cuatro secciones:

- **Primera:** identificación de la muestra.
- **Segunda:** datos generales de la muestra.
- **Tercera:** resultados del estudio fenotípico.
- **Cuarta:** resultados del estudio genotípico.

#### **4.7 PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS**

##### **4.7.1 PROCESAMIENTO**

Al ser obtenidos los datos mediante el uso de boletas de recolección, los mismos fueron ingresados al paquete estadístico EPI INFO 7, con lo que se generó una base de datos digital en Microsoft Access 2013, los datos fueron trasladados a Microsoft Excel 2013 examinando la información necesaria y precisa para cumplir con los objetivos del estudio.

##### **4.7.2 ANÁLISIS DE DATOS**

Con la información obtenida se realizaron cuadros. A los resultados se les realizó un análisis estadístico, obteniendo frecuencias, prevalencias, porcentajes, valores predictivos positivos, valores predictivos negativos, especificidad y sensibilidad.

## **4.8 LÍMITES DE LA INVESTIGACIÓN**

### **4.8.1 OBSTÁCULOS (RIESGOS Y DIFICULTADES)**

La mayor dificultad que se presentó durante el estudio fue la obtención de recursos económicos, ya que el patrocinio por parte la casa farmacéutica fue difícil de conseguir.

Todo el material utilizado en la realización de la prueba genotípica se importó a Guatemala por una distribuidora autorizada. El trabajo de campo se extendió más tiempo de lo esperado debido a múltiples retrasos en la solicitud y envío de equipo antes mencionado.

### **4.8.2 ALCANCES**

Se realizó con éxito la estandarización de PCR para detección de *Bla<sub>KPC-2</sub>* y *Bla<sub>NDM-1</sub>* en Guatemala, que puede ser repetida y utilizada en estudios posteriores, y también puede llegar a protocolizarse para su realización regular en la detección de carbapenemasas por parte del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social o entidades privadas.

El estudio aportó información sobre la existencia de mecanismos de resistencia antibiótica no estudiados previamente en instituciones privadas.

Para las instituciones públicas se aportó información y resultados sobre detección genotípica de carbapenemasas ya que en Guatemala por falta de insumos no se realizan y que deben ser enviados al extranjero para su realización.

## **4.9 ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Debido a que en el presente trabajo de tesis la población a estudio fueron enterobacterias aisladas de cultivos realizados en el grupo hospitalario privado y Laboratorio Nacional de Salud, los aspectos éticos se basaron principalmente en garantizar la confidencialidad de la información que se encontró en los antibiogramas y registros de identificación. De esta manera los investigadores se comprometieron a no publicar ni proporcionar información a terceros de ningún dato que identifique la persona a quien se le realizó el cultivo.

## 5 RESULTADOS

A continuación se presentan los datos obtenidos de las de 67 enterobacterias provenientes de cultivos realizados a pacientes consultantes del Grupo MEDAX y 51 enterobacterias almacenadas por el Laboratorio Nacional de Salud durante el año 2012:

**TABLA 1**

**Distribución según institución, enterobacteria aislada, tipo de cultivo realizado, y característica propia de la muestra, de las cepas de Enterobacterias obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

	Institución						
	Hospital 1*	Hospital 2*	Hospital 3*	Hospital 4*	Hospital 5*	LNS**	Total
Enterobacteria							
E. coli	14	7	9	24	10	5	69
K. pneumoniae	2	0	0	1	0	46	49
Tipo de cultivo							
Hemocultivo	0	0	0	1	0	7	8
Urocultivo	14	7	8	18	10	12	69
Coprocultivo	0	0	0	0	0	0	0
LCR	0	0	0	0	0	1	1
Secreción***	2	0	1	0	6	21	30
Punta de catéter	0	0	0	0	0	10	10
Características propias de la muestra							
BLEE	16	7	9	25	10	51	118
Resistencia a:							
Imipenem	0	0	0	1	0	41	42
Meropenem	0	0	0	1	0	41	42

Fuente: Anexo 3.

\*Ver Anexo 8.

\*\* Laboratorio Nacional de Salud.

\*\*\* Secreciones varias.

**TABLA 2**

**Caracterización fenotípica de carbapenemasas MBL y KPC por método de Kirby-Bauer en las cepas obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Carbapenemasa	Estudio fenotípico				Total
	Sinergia +	%	Sinergia -	%	
MBL*	39	33.05	79	66.95	118
KPC**	3	2.54	115	97.46	118

Fuente: Anexo 3.

\*MBL: metalo-betalactamasa

\*\*KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

**TABLA 3**

**Caracterización fenotípica carbapenemasas según enterobacterias obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Enterobacteria	MBL* sinergia positiva		KPC** sinergia positiva	
	f	%	f	%
<i>E. coli</i>	3	8	1	2
<i>K. pneumoniae</i>	36	92	2	98
Total	39	100	3	100

Fuente: Anexo 3.

\*MBL: metalo-betalactamasa

\*\*KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa



**TABLA 4**

**Distribución según enterobacteria de las enzimas NDM-1\* y KPC-2\*\* en enterobacterias obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Enterobacteria	Enzima				Total
	NDM-1		KPC-2		
	f	%	f	%	
<i>E. coli</i>	10	37	17	63	27
<i>K. pneumoniae</i>	12	85	2	15	14

Fuente: Anexo 3.

\*NDM-1: Nueva Dehli Metalcarbapenemasa 1

\*\*KPC-2: *Klebsiella pneumoniae* carbapemenasa 2

**TABLA 5**

**Presencia de carbapenemasas NDM-1\* y KPC-2\*\* según valor en el halo de inhibición de imipenem en enterobacterias obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Rango	KPC-2 Positivo		NDM-1 Positivo	
	f	%	f	%
1-19 (R)	2	10.53	10	45.45
20-22 (I)	0	0.00	0	0.00
>= 23 (S)	17	89.47	12	54.55
Total	19	100	22	100

Fuente: Anexo 3.

\*NDM-1: Nueva Dehli Metalcarbapenemasa 1

\*\*KPC-2: *Klebsiella pneumoniae* carbapemenasa 2

R: Resistente a imipenem

I: Resistencia intermedia a imipenem

S: Sensible a imipenem

**TABLA 6**

**Casos detectados genotípicamente para NDM-1\* de enterobacterias obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Característica	Institución				Total	%
	LNS**		Grupo Hospitalario Privado			
	f	%	f	%		
NDM-1 Positiva	12	23	10	15	22	19
NDM-1 Negativa	39	77	57	85	96	81
Total	51	100	67	100	118	100

Fuente: Anexo 3.

\*NDM-1: Nueva Dehli Metalocarbapenemasa 1

\*\*LNS: Laboratorio Nacional de Salud

**Tabla 7**

**Casos detectados genotípicamente para KPC-2\* de enterobacterias obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Característica	Institución				Total	%
	LNS**		Grupo Hospitalario Privado			
	f	%	f	%		
KPC-2 Positivos	2	4	17	25	19	16
KPC-2 Negativos	49	96	50	75	99	84
Total	51	100	67	100	118	100

Fuente: Anexo 3.

\*KPC-2: *Klebsiella pneumoniae* carbapemenasa 2

\*\*LNS: Laboratorio Nacional de Salud

**TABLA 8**

**Asociación de pruebas fenotípica y genotípica para el gen  $Bla_{NDM-1}$ \* de las muestras obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Estudio Fenotípico	Estudio genotípico				TOTAL
	Bla <sub>NDM-1</sub> +		Bla <sub>NDM-1</sub> -		
	f	%	f	%	
MBL ** Sinergia +	10	25.64	29	74.36	39
MBL**Sinergia -	12	15.19	67	84.81	79
Total	22	18.64	96	81.36	118

Fuente: Anexo 3.

\*NDM-1: Nueva Dehli Metalocarbapenemasa 1

\*\*MBL: Metallo-betalactamasa

**TABLA 9**

**Asociación de pruebas fenotípica y genotípica para el gen  $Bla_{KPC-2}$  de las muestras obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Estudio Fenotípico	Estudio genotípico				TOTAL
	Bla <sub>KPC-2</sub> +		Bla <sub>KPC-2</sub> -		
	f	%	f	%	
KPC Sinergia +	2	66.67	1	33.30	3
KPC Sinergia -	17	14.70	98	85.22	115
Total	19	16.10	99	83.90	118

Fuente: Anexo 3.

\* $Bla_{KPC-2}$ : Gen *Bla Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa 2

\*\*KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

**TABLA 10**

**Distribución según presencia de Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE) y presencia de enzimas NDM-1\* y KPC-2\*\* de enterobacterias obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Característica	Enzima				Total	%
	NDM1 +		KPC2 +			
	f	%	f	%		
BLEE+	22	100	19	100	118	100
BLEE-	0	0	0	0	0	0
Total	22	100	19	100	118	100

Fuente: Anexo 3.

\*NDM-1: Nueva Dehli Metalcarbapenemasa 1

\*\*KPC-2: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa 2

**TABLA 11**

**Distribución de carbapenemasa NDM-1\* según cultivo de muestras obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Tipo de Cultivo	NDM-1 Positivo		NDM-1 Negativo		Total
	f	%	f	%	
Hemocultivo	1	12.50	7	87.50	8
LCR	1	100.00	0	0.00	1
Punta de Catéter	2	20.00	8	80.00	10
Secreción	8	26.67	22	73.33	30
Urocultivo	10	14.49	59	85.51	69
Total	22	18.64	96	81.36	118

Fuente: Anexo 3.

\*NDM-1: Nueva Dehli Metalcarbapenemasa 1

**TABLA 12**

**Distribución de carbapenemasa KPC-2\* según cultivo de muestras obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Tipo de Cultivo	KPC-2 Positivo		KPC-2 Negativo		Total
	f	%	f	%	
Hemocultivo	1	12.50	7	87.50	8
LCR	0	0.00	1	100.00	1
Punta de Catéter	0	0.00	10	100.00	10
Secreción	6	20.00	24	80.00	30
Urocultivo	12	17.39	57	82.61	69
Total	22	18.64	96	81.36	118

Fuente: Anexo 3.

\*KPC-2: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa 2

**TABLA 13**

**Asociación de resultados en las pruebas genotípica para NDM-1\* y KPC-2\*\* de las muestras obtenidas en el Laboratorio Nacional de Salud de enero a diciembre de 2012 y de los hospitales del grupo privado en los meses de febrero a junio de 2013**

Enzimas	KPC-2 +	KPC-2 -	Total
NDM-1 +	6*	16	22
NDM-1 -	13	83	96
Total	19	99	118

Fuente: Anexo 3.

\*NDM-1: Nueva Dehli Metalocarbapenemasa 1

\*\*KPC-2: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa 2

Todas las cepas fueron *E. coli* con numeración 7, 14, 19, 23, 31, 34.



## 6 DISCUSIÓN

Se realizó un estudio descriptivo en los cinco hospitales que integran el grupo hospitalario privado de la Ciudad Capital de Guatemala y el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala (LNS), en el cual se evaluaron un total de 128 cepas de enterobacterias, de las cuales 10 se excluyeron por no cumplir con los criterios de inclusión. Se esperaba que las cepas otorgadas por el LNS fuesen negativas para BLEE, pero se evidenció, según registros de sensibilidad de las mismas, que éstas eran resistentes a Cefotaxime, Ceftazidima y Amoxicilina más Ácido Clavulanico, por lo que fueron tomadas como BLEE positivo para este estudio.(35)(9)(41)

Se incluyeron 51 cepas de enterobacterias provenientes del LNS y 67 provenientes del grupo hospitalario privado para un total de 118 cepas, de las cuales el 58% fueron *E. Coli* y 42% *K. pneumoniae*. Las cepas a estudio fueron aisladas en un 58% de urocultivos, 25% de cultivos de secreción y 8% de punta de catéter. Del total de la muestra a estudio únicamente 35%(42) de las cepas presentaba resistencia a imipenem y meropenem, y de estas solamente 1 cepa provenía del Grupo hospitalario privado, siendo las 41 restantes provenientes del LNS (Tabla 1).

Los resultados obtenidos en la detección fenotípica por método de Kirby Bauer demostraron que la prevalencia de metalo-betalactamasas (MBL) fue superior a la de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas (KPC) presentado un 33% contra un 2.5% respectivamente, sobre la totalidad de la muestra (Tabla 2). Según la literatura, las carbapenemasas clasificación A de Ambler, entre ellas KPC, se encuentran presentes en más del 50% de los aislamientos de enterobacterias, lo que las convierte en las carbapenemasas más frecuentes en el mundo, y de estas el gen más frecuentemente encontrado es  $BLA_{KPC}$ , que se disemina a través de amplias áreas geográficas debido a la expansión clonal dominante mediada por plásmidos o transposones (7)(20)(21)(22). Lo que demostró que, a diferencia de lo citado por la literatura, la detección de KPC por método fenotípico fue baja en Guatemala para el año 2012 y 2013, esto evidenciado por los registros del LNS, Unidad de referencia para la vigilancia epidemiológica del año 2012, en donde se reportaron únicamente 5 cepas con mecanismo KPC del total de 204 cepas encontradas positivas para producción de carbapenemasas en ese año, según datos proporcionadas por ésta institución.(7)(18)(19)

Según evaluación fenotípica se observó que existe mayor prevalencia de carbapenemasas MBL y KPC en *K. pneumoniae* que en *E. coli*, siendo la prevalencia de carbapenemasas en *K. pneumoniae* de 32% sobre el total de cepas estudiadas en comparación con el 2% de *E. coli* (Tabla 3). Esto concuerda con otros estudios realizados que indican que la prevalencia de carbapenemasas en *E. coli* es baja, siendo *K. pneumoniae* la principal portadora para KPC y *P. aeruginosa* junto con *A. baumannii* las principales portadoras de MBL. (1)(5)(20)(22).

En la evaluación genotípica, al contrario de lo que sucedió en la evaluación fenotípica, se observó que la prevalencia de carbapenemasas fue mayor en *E. coli* que en *K. pneumoniae* (Tabla 4). Con esto se evidenció que a pesar de que presentara pruebas genotípicas positivas para NDM o KPC, no se había presentado el estímulo necesario para que la bacteria sintetizase la carbapenemasa, lo que explico el resultado fenotípico negativo (Tabla 3). Un importante mecanismo regulatorio desarrollado por las bacterias se basa en la activación o desactivación de la transcripción de grupos de genes con funciones relacionadas, así al ser activados son transcritos de manera coordinada, pero debido a un control positivo, no serán transcritos a menos de que exista el sustrato necesario (23)(24)(25).

Existió, también, un pequeño porcentaje de cepas que presentaron un resultado genotípico positivo tanto para NDM-1 como para KPC-2, siendo el porcentaje de un 5.08% sobre el total de las cepas, con un valor neto de 6 cepas, y todas estas fueron bacterias *E. coli* provenientes del grupo hospitalario privado. La aparición de un doble mecanismo genético de resistencia bacteriana fue explicada por la capacidad genética bacteriana de activar o desactivar la transcripción de grupos de genes presentes ya sea en el ADN, plásmidos o transposones, según sean las condiciones de entorno en que se encuentra la bacteria (23)(24)(25).

Al correlacionar los halos de inhibición de imipenem con la presencia de los genes codificadores para NDM-1 y KPC-2 se observó que el 45.45% para NDM-1 y el 10.53% para KPC-2 se encontró igual o menor a 22mm (Tabla 5), rango estandarizado por la Red Latinoamericana de vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA), para la detección fenotípica de carbapenemasas(49)(52). Aunque también se observó un alto porcentaje de positividad en las pruebas genotípicas de bacterias con halos de inhibición superiores a 22mm. Siendo los valores con mayor frecuencia de aparición 27mm con un 22.36% y 18.18% para KPC-2 y NDM-1 respectivamente; y 31 mm con un 15.79% y



13.64% para KPC-2 y NDM-1 respectivamente (Tabla 5). Lo que evidenció una necesidad en la reevaluación de los valores de detección primaria de carbapenemasas en base al halo de inhibición de imipenem, en busca de un rango más amplio que permita identificar de una manera más sensible éste mecanismo de resistencia, y de así poder documentar más certeramente su prevalencia y evitar su esparcimiento.

Se evaluó la concordancia entre los resultados fenotípicos y genotípicos de las cepas a estudio, y se observó que, del total de 39 cepas fenotípicamente positivas para MBL, solo el 25.64% fue positivo para NDM-1, y el restante 74.36% negativo para NDM-1 probablemente presentaba una metalobetalactamasa distinta ésta. De las 79 cepas negativas para MBL el 84.81% fue negativo genotípicamente para NDM-1. Pero existió un 15.19% de cepas que presentaron un estudio fenotípico negativo y un estudio genotípico positivo, lo que indicó la presencia del gen KPC-2 en la cepa aunque éste no se encontrara expresado aún (Tabla 8). Con los resultados obtenidos para el gen  $Bla_{KPC}$  no se pudieron correlacionar los resultados fenotípicamente positivos con los resultados genotípicos debido a que la muestra era muy pequeña, y únicamente se contaba con 3 cepas KPC+ fenotípicamente. Pero se pudo evidenciar que del total de cepas fenotípicamente negativas, el 85.22% fue genotípicamente negativo para KPC-2 y el 14.78% fue genotípicamente positivo para KPC-2 (Tabla 9).

Con los resultados de las tablas 8 y 9 se obtuvo una sensibilidad de 45.45% y una especificidad de 69.79%, un valor predictivo positivo de 25.64% y un valor predictivo negativo de 84.81% para la detección de NDM; y para KPC se obtuvo una sensibilidad de 10.52% y una especificidad de 98.98%, un valor predictivo positivo de 66.66% y un valor predictivo negativo de 85.21%. Lo que demostró, en ambas pruebas, que el estudio fenotípico fue más sensible que específico, lo que significa que la prueba fue efectiva para detectar negativos, pero su capacidad para detectar positivos fue menor. (Tabla 8 y 9). Esto evidenció la importancia de tener a disposición el estudio genotípico por PCR para la detección de carbapenemasas, y que éste se llegue a convertir en una prueba regular en la validación de los resultados obtenidos por medio del método fenotípico en Guatemala.

No se logró evaluar la asociación entre la existencia de BLEE positivo y la presencia de Carbapenemasas debido a que dentro de la muestra a estudio no existían negativos para BLEE, con lo cual únicamente se demostró que un 33% de las cepas BLEE fueron positivas para una Carbapenemasa, lo que es apoyado si tomamos en cuenta que hasta hace relativamente pocos años la resistencia a carbapenems en las enterobacterias era

una verdadera rareza microbiológica, mediada principalmente por la presencia conjunta de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) e impermeabilidad en la membrana. Por lo que inferimos que la presencia de BLEE no excluye la presencia de carbapenemasas, ni viceversa.(26)(27)

En cuanto a la prevalencia de carbapenemasas según la institución estudiada, en el grupo hospitalario privado el gen KPC-2 fue el gen más prevalente con un 25%, a comparación del gen NDM-1 con un 15% (tabla 6). Lo cual coincide con la tendencia que se sigue a nivel mundial indicando que el gen KPC se encuentra más ampliamente extendido que el gen NDM de reciente descubrimiento(11)(12). En cuanto al LNS el gen NDM-1 presentó una mayor prevalencia con un 23% en comparación con KPC-2 con un 4% (tabla 7). Esto es contrario a lo presentado a nivel mundial, y nos da la pauta de que probablemente exista una relación en la aparición de una enzima más preponderante con el tipo de paciente atendido, puesto que existe un mayor razonamiento del uso de antibióticos en los pacientes que acuden a los hospitales del sector privado, esto por razones de nivel educativo, y que en los pacientes que acuden a los hospitales del sector público muchas veces consultan a un farmacéutico para el uso de un tratamiento antibiótico. También entran en juego las medidas de bioseguridad manejadas en las instituciones públicas y privadas, ya que existe mayor probabilidad de transmitir un mecanismo mediado por ADN en instituciones públicas, puesto que existe mayor contaminación y transmisión del mismo por medio de bacterias muertas usando seguramente la transformación como principal mecanismo de transmisión de resistencia entre bacterias (23)(24)(25).

La prevalencia de carbapenemasas según tipo de cultivo evidenció que los dos tipos de cultivos con mayor prevalencia fueron cultivos de secreción y urocultivos en ese orden, con una prevalencia de 14.49% para NDM y 26.67% para KPC en cultivos de secreción, y una prevalencia de 17.39% para NDM y 20% para KPC en urocultivos. Los cultivos de LCR, hemocultivos y punta de catéter no se tomaron en cuenta para las prevalencias pues las muestras obtenidas eran muy pequeñas dando resultados altos, por lo que no son estadísticamente significativos (Tabla 11 y 12).

## 7 CONCLUSIONES

- 7.1 La Carbapenemasa MBL presentó una mayor prevalencia con un 39 % seguido por KPC con un 2.54%, ambas identificadas con método fenotípico, esto representó un total de 42 cepas positivas del total de 118 muestras.
- 7.2 La prevalencia del Gen  $Bla_{NDM-1}$  en los hospitales del grupo hospitalario privado fue de un 15 % y en el LNS de un 23%, por lo que en esta última institución fue la que se presenta mayor prevalencia de NDM-1.
- 7.3 El Gen  $Bla_{KPC-2}$  presentó una prevalencia de 25% en los hospitales del Grupo hospitalario privado y una prevalencia de un 4% en LNS, por lo que los hospitales que conforman dicho grupo hospitalario fueron los que presentaron la mayor prevalencia en el gen  $Bla_{KPC-2}$ .
- 7.4 La presencia de BLEE+ no excluye la presencia de carbapenemasa, ni la presencia de carbapenemasa excluye la presencia de BLEE+.
- 7.5 De las enterobacterias evaluadas, *E. coli* presentó mayor prevalencia de carbapenemasas con un 37 % para NDM y 63% para KPC, represento así un total de 27 cepas positivas. Y *K. pneumoniae* con una prevalencia del 85% para NDM y 15 % para KPC de un total de 14 positivos.
- 7.6 El gen  $Bla_{NDM-1}$  fue el que mostró mayor prevalencia en el total de cepas estudiadas con un 18 % representado en un total de 22 positivos. Y el gen  $Bla_{KPC-2}$  tuvo un 16% representado en un total de 19 cepas positivas.
- 7.7 El tipo de cultivo que presentó una mayor prevalencia de positividad para las carbapenemasas tanto NDM-1 como KPC-2 fue el cultivo de secreción con una prevalencia de 14.49% para NDM-1 y 26.67% para KPC-2, seguido por el urocultivo.



## **8 RECOMENDACIONES**

- 8.1 A los Médicos para que contribuyan con labúsqueda activa de éste mecanismo de resistencia, notificando toda cepa que presente resistencia a cualquier carbapenemico, y así evitar la falta detección por subregistro. Se recomienda el uso racional de los antibióticos carbapenémicos, evitando una mala dosificación y destinando éstos solo para pacientes que lo ameriten, guiándose para la elección de tratamiento antibiótico por un antibiograma, evitando tratamientos empíricos.
- 8.2 Al grupo hospitalario privado, para colaborar con la búsqueda activa de carbapenemasas en las cepas de bacterias aisladas por su laboratorio de microbiología, notificando aquellas cepas sospechosas de producción de carbapenemasas. Así como tambiénmantener un listado de microorganismos de alerta, que indique la emergencia de cualquier tipo de resistencia antibiótica en los hospitales que conforman dicho grupo hospitalario e informe de la necesidad de cambios en las políticas de antibióticos.
- 8.3 Al Laboratorio Nacional de Salud (LNS), para reforzar la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica con más personal, equipo e insumos, fortaleciendo el plan de monitoreo y vigilancia de carbapenemasas, de tal manera que se logren extraer datos que colaboren con el control del fenómeno local y regionalmente. También se debe buscar agilizar el proceso de detección de mecanismos de resistencianuevos o emergentes, y de esta manera alertar al sistema de salud nacional tempranamente para poder tomar las medidas preventivas y de control necesarias para cada caso.
- 8.4 Al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) se recomienda equipar al LNS con todos los insumos necesarios para poder implementar la evaluación genotípica como parte del protocolo de detección de carbapenemasas, y así poder realizar una detección certera de cada tipo de carbapenemasa, con el fin de tomar las medidas de control pertinentes, evitando el esparcimiento de este mecanismo de resistencia en Guatemala. La implementación de PCR para la identificación de carbapenemasas crearía la posibilidad de realizar una base de datos nacional, con información acorde a la realidad guatemalteca sobre la resistencia antibiótica presente en las bacterias circulantes en nuestro país, tanto para la vigilancia epidemiológica como de terapéutica clínica.



## **9 APORTES**

- 9.1 Se realizó con éxito la estandarización de PCR para detección de KPC-2 y NDM-1 en Guatemala, que puede ser repetida y utilizada en estudios posteriores, y también puede llegar a protocolizarse para su realización regular en la detección de carbapenemasas por parte del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social o entidades privadas.
- 9.2 El estudio aportó información sobre la existencia de mecanismos de resistencia antibiótica no estudiados previamente en instituciones privadas guatemaltecas.
- 9.3 Para las instituciones públicas se aportó información y resultados sobre detección genotípica de carbapenemasas, ya que en Guatemala por falta de insumos no se realiza esta prueba y las cepas que se desean confirmar deben ser enviados al extranjero.





## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. [en línea]. 2011 Oct [accesado 12 Mar 2013]; 17(10):1791-8. Disponible en : <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3310682&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 2 Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez J, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *K. pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother* [en línea]. 2006 Ago [accesado 13 Mar 2013]; 50(8): 2880-2. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 3 Escobar Pérez JA, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, Martínez de la Barrera L, et al. Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiellapneumoniae* in a Neonatal Unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* [en línea]. 2013 Abril [accesado 29 Mar 2013]; 27(4): 1957-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357776>
- 4 Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents* [en línea]. 2012 Jun [accesado 29 Mar 2013]; 39(6): 529-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22526013>
- 5 Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* [en línea]. 2007 Jul [accesado 4 Mar 2013]; 20(3): 440-58. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 6 Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of Enterobacteriaceae?. *J Clin Microbiol* [en línea]. 2011 Feb [accesado 26 Mar 2013];49(2): 697-701. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3043475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- 7 Morales M, Arbizú E, Barrios J, Valenzuela C. Resistencia a los carbapenems en *klebsiella pneumoniae*: primeros aislamientos clínicos en Guatemala. Rev Col Med Gua. 2011;6(3):45–50.
- 8 Gaitán S, Espinal P. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiellapneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. Rev Chil Infect. 2009;26(3):239–46.
- 9 Whonet. Protocolo de Trabajo Whonet-argentina. [en línea]. Argentina: Whonet; 2010. [accesado 25 Mar 2013]. Disponible en: <http://www.whonet.org/DNN/LinkClick.aspx?fileticket=xisiyc9fpdw%3D&tabid=62&mid=619&language=en-US>
- 10 Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990;262(4):6–61, 64–5. PMID 2315679.
- 11 Risueño FN, Cardona E, Otero B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enferm Infecc Microbiol [en línea]. 2002 [accesado 28 Mar 2013]; 20(5): 225-34. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es/revistas/enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28/lectura-interpretada-antibiograma-enterobacterias-13031076-formacion-medica-continuada-2002?bd=1>
- 12 Lowe CF, Kus JV, Salt N, Callery S, Louie L, Khan MA, et al. Nosocomial transmission of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Klebsiellapneumoniae* in Toronto, Canada. Infect Control Hosp Epidemiol. [en línea]. 2013 Ene [accesado 29 Mar 2013]; 34(1): 49-55. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221192>
- 13 Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. Nucleic Acids Res [en línea]. 1997 Ago 15 [accesado 25 Mar 2013]; 25(16): 3235-3241. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146890/>
- 14 Cockerill F, Wikler M, Alder J, Dudley M. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-second informational supplement. [en línea] Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012 [accesado 28 Mar 2013]. Disponible en : <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>
- 15 Templeton N. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. Diagn Mol Pathol. 1992;1(1):58–72.
- 16 Pasteran F, Corso A. Alerta: Diseminación de kpc en argentina. [en línea]. Buenos Aires, Argentina: PCCN; 2010. [accesado 15 Abr 2013]. Disponible en: [www.cocemi.com.uy/docs/PandemiaKPC-2.pdf](http://www.cocemi.com.uy/docs/PandemiaKPC-2.pdf)

- 17 Organización Panamericana de la Salud. Alerta epidemiológica: Primer hallazgo de carbapenemasas de tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM) en Latinoamérica. [en línea]. Washington, D.C.: OPS; 2011 [accesado 12 Feb 2013]. Disponible en: <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=73731>
- 18 Mejía C, Grazioso C, Cazali IL. Guía de tratamiento de las enfermedades infecciosas multirresistentes en hospitales de Guatemala. Guatemala: Hospital Roosevelt; 2012.
- 19 Pasteran F, Alborno E. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiellapneumoniae* in Guatemala. J Antimicrob Chemother [en línea]. 2012 Jul [accesado 26 Mar 2013 ]; 66(12): 2781-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930570>
- 20 Suarez C, Kattán J, Guzmán AM, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a Carbapenems en P. Aeruginosa, Acinetobacter y Enterobacteriaceae y estrategias para su prevención y control. Infectio. [en línea]. 2006. [accesado 25 Mar 2013] 10(2): 85-93. Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/3269096/MECANISMOS-DE-RESISTENCIA-A-CARBAPENEMS-EN-P-AERUGINOSA-ACINETOBACTER-Y>
- 21 Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother [en línea]. 1995. [accesado 28 Mar 2013]; 39(6): 1211-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162717/>
- 22 Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. J Antimicrob Chemother [en línea]. 2009 [accesado 4 Mar 2013]; 63(1): 1-4. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2721700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 23 Murray P, Rosenthl K, Pfaller M. Microbiología médica. 5 ed. Barcelona, España: Elsevier; 2008.
- 24 Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiological Reviews. [en línea]. 1994 Sep. [accesado 12 Ago 2013]; 58(3):563–602. Disponible en: <http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/11.-%20Genetica%20bacteriana.pdf>
- 25 Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. En: Universidad de la Republica, Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología. Temas de bacteriología y virología médica. 2 ed. Uruguay: Udelar; 2008:p.649-662.

- 26 Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of  $\beta$ -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other  $\beta$ -lactams in *Klebsiellapneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. [en línea]. 2004 Ago [accesado 15 Ago 2013]; 48(8):3203-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273152>
- 27 Karlowsky JA, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Trends in antimicrobial susceptibilities among enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. [en línea]. 2003 May [accesado 15 Ago 2013]; 47(5): 1672–1680. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153325/>
- 28 Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ed. España: McGraw-Hill; 2006.
- 29 Florez J, Armijo JA, Mediavilla Á. Farmacología humana. 3ed. Barcelona, España: Masson; 199.
- 30 Organización Panamericana de la Salud. Tratamiento de las enfermedades infecciosas. 5 ed. Washington D.C.: OPS; 2011.
- 31 Martínez MJF, García MIG, Sánchez EG, Sánchez JEG. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. Enferm Infecc Microbiol Clin [en línea]. Elsevier; 2010 [accesado 26 Mar 2013]; 28 Suppl 2: 53-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130931>
- 32 Organización Mundial de la Salud. Programa de Acción sobre Medicamentos Esenciales. Guía de la buena prescripción. [en línea]. Ginebra: OMS; 1994. [accesado 20 Mar 2013]. Disponible en: [www.icf.uab.es/universidad/gbp/castella/gbp.pdf](http://www.icf.uab.es/universidad/gbp/castella/gbp.pdf)
- 33 Morejón Garcia M. Betalactamasas de espectro extendido, un problema actual. [en línea]. Cuba, Hospital Universitario “Manuel Fajardo”; [200?]. [accesado 30 Mar 2013]. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/b1-betalactamasas\\_de\\_espectro\\_extendido.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/b1-betalactamasas_de_espectro_extendido.pdf)
- 34 Cavalieri S, Rankin I, Harbeck R, Sautter R, McCarter Y. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. [en línea]. Washington, D.C.: OPS; 2005 [accesado 15 Abr 2013]. Disponible en: [http://www1.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs\\_sucep\\_antimicro.pdf](http://www1.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_sucep_antimicro.pdf)
- 35 Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho P-L, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?. J Antimicrob Chemother [en línea]; 67(7): 1569-77. 2012 Jul [accesado 8 Mar 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461311>

- 36 Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiellapneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. [en linea]. 2009 Abr [accesado 1 Mar 2013]; 9(4): 228-36. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19324295>
- 37 Goren MG, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Carmeli Y. Carbapenem-resistant KPC-2-producing *Escherichia coli* in a Tel Aviv Medical Center, 2005 to 2008. Antimicrob Agents Chemother. [en linea]. 2010 Jun [accesado 22 Mar 2013]; 54(6): 2687-91. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2876404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 38 Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect [en linea]. 2010 Feb [accesado 25 Mar 2013]; 16(2): 112-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085605>
- 39 Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. Clinical Infectious Diseases [en linea]. 2006 Ene 15 [accesado 29 Mar 2013];42 Suppl 2: S82–9. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355321>
- 40 Scott II RD. The direct medical costs of health care associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. [en linea]. Atlanta: CDC; 2009 [accesado 12 Abr 2013]. Disponible en: [www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott\\_costpaper.pdf](http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf)
- 41 PedrosoW, Godínez A. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). Rev Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias [en linea]. 2006 [accesado 30 Mar 2013];5(1):256–64. Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mie/vol5\\_1\\_06/mie03106.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mie/vol5_1_06/mie03106.htm)
- 42 Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. Emergence of metallo-β-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. Antimicrob Agents Chemother. [en linea]. 2010 Jun [accesado 30 Mar 2013]; 54(11): 4914-6. Disponible en: <http://aac.asm.org/content/54/11/4914>
- 43 Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. Curr Opin Investig Drugs. [en linea]. 2002 Mar [accesado 29 Mar 2013]; 3(2): 218-24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020049>
- 44 GallegoL, Josune M, Sevillano E, Pujana I, Calvo F, Umaran A, et al. Detección de carbapenemasas en clones de acinetobacter baumannii resistentes a imipenem. Enferm Infecc Microbiol Clin [en linea]. 2004 [accesado 28 Mar 2013]; 22(5): 262-6. Disponible es: <http://zl.elsevier.es/es/revista/enfermedades-infecciosas->

[microbiologia-clinica-28/deteccion-carbapenemasas-clones-acinetobacter-baumannii-resistentes-imipenem-13059818-originales-2004](#)

- 45 Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiellapneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* [en línea]. 2010 [accesado 1 Mar 2013]; 16(9):1349–56. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3294963&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 46 Teo J, Ngan G, Balm M, Jureen R, Krishnan P, Lin R. Molecular characterization of NDM-1 producing Enterobacteriaceae isolates in Singapore hospitals. *Western Pacific Surveillance and Response* [en línea]. 2012 Feb [accesado 12 Mar 2013];3(1):19–25. Disponible en: [http://www.wpro.who.int/wpsar/volumes/03/1/2012\\_OR\\_Teo\\_etal/en/](http://www.wpro.who.int/wpsar/volumes/03/1/2012_OR_Teo_etal/en/)
- 47 Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* [en línea]. 2010 Ago [accesado 9 Mar 2013];65(8):1664–71. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542902>
- 48 Nicola F, Nievas J, Smayevsky Jo. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiellapneumoniae*. *Rev Argent Microbiol* [en línea]. 2012 [accesado 28 Mar 2013]; 44:290–302. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412012000400010&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412012000400010&script=sci_arttext)
- 49 Corso A, Guerriero L, Pasterán F, Ceriana P, Callejo R, Prieto M, et al. Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes. *Rev Panam Salud Pública* [en línea]. 2011 [accesado 23 Mar 2013]; 30(6): 619-26. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2012/01/capacidad-de-los-laboratorios-nacionales-de-referencia-en-latinoamerica-para-detectar-mecanismos-de-resistencia-emergentes/>
- 50 MacDougall C. APUA birth of a public surveillance system: PAHO combats the spread of antimicrobial resistance in Latin America. *NEWSLETTER* [en línea]. 2006 [accesado 25 Mar 2013];24(1):6–8. Disponible en: [http://www.tufts.edu/med/apua/news/APUA\\_v24n1.pdf](http://www.tufts.edu/med/apua/news/APUA_v24n1.pdf)
- 51 Carmeli Y, Akova M. Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* [en

- linea]. 2010 Feb [accesado 28 Mar 2013];16(2):102–11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085604>
- 52 Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol [en linea]. 2009 [accesado 28 Mar 2013];47(6):1631–9. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2691115&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  - 53 Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiellapneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother [en linea]. 2009 [accesado 22 Mar 2013];63(2):265–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028717>
  - 54 Tyagi S, Kramer F. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hibridization. Nat Biotechnol [en linea]. 1996 [accesado 16 Mar 2013];14:303–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630890>
  - 55 Baumforth K, Nelson P. Demystified... the polymerase chain reaction. Mol Pathol [en linea]. 1999 [accesado 29 Mar 2013];52(1):1–10. Disponible en: <http://mp.bmjjournals.com/content/52/1/1.short>
  - 56 Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology [en linea]. 2008. [accesado 20 Mar 2013];26(10):1135–45. Dispoible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846087>
  - 57 Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology [en linea]. 1993 [accesado 20 Mar 2013];11:1026–30. Disponible en: <http://www.gene-quantification.net/higuchi-1993.pdf>
  - 58 Kellogg D, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasic T, *et al.* TaqStart antibody: “hot start” PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. Biotechniques [en linea]. 1994 [accesado 4 Mar 2013];16:1134–7. Disponible en: <http://lib.bioinfo.pl/paper:8074881>
  - 59 Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. [en linea]. 2000 [accesado 14 Mar 2013];38(9):3194–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970356>
  - 60 Centers for Disease Control and Prevention. Multiplex real-time PCR detection of *klebsiellapneumoniae* carbapenemase ( KPC ) and new delhi metallo-β-lactamase ( NDM-1 ) genes. [en linea] . Atlanta: CDC; 2011. [accesado 19 Mar 2013].



Disponible en: <http://www.cdc.gov/HAI/pdfs/labSettings/KPC-NDM-protocol-2011.pdf>

- 61 Ong DCT, Koh T-H, Syahidah N, Krishnan P, Tan TY. Rapid detection of the blaNDM-1 gene by real-time PCR. J Antimicrob Chemother [en línea]. 2011 Jul [accesado 26 Mar 2013];66(7):1647–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565805>
- 62 Posso Duque D, Ghneim Herrera T. Electroforesis del adn en geles de agarosa. [en línea] Venezuela: IVIC; 2009 [accesado 23 May 2013]. Disponible en: <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20del%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf>
- 63 Antimicrobianos. [en línea] Buenos Aires, Argentina: Antimicrobianos; 2008. [accesado 18 Mar 2013]. Protocolo de PCR para la detección del gen kpc en aislamientos de bacilos gram-negativos. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Detecci%C3%B3n-KPC.pdf>
- 64 Antimicrobianos. [en línea] Buenos Aires, Argentina: Antimicrobianos; 2012. [accesado 18 Mar 2013]. Protocolo de PCR para la detección del gen ndm en aislamientos de bacilos gram-negativos. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Detecci%C3%B3n-NDM.pdf>
- 65 Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). [en línea]. Ginebra: OMS; 2012. [accesado 12 Julio 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>



## 11 ANEXOS

### ANEXO 1

Protocolo de PCR para la detección del gen KPC, Servicio Antimicrobianos, Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran"

## KPC

### Protocolo de PCR para la detección del gen *kpc* en aislamientos de bacilos gram-negativos

Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3'
KPC-F	KPC	AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG
KPC-R		AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA

Tamaño amplicon	Ciclado
916 pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado= 30-35 ciclos: 94°C 30seg -- 50° 30seg -- 72°C 60seg; Extension final = 72°C por 10min

Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
ADN	2,5 ul
Buffer 10X	2,5 ul
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 ul
dNTP's (10 mM)	0,5 ul
Taq pol (5U/ul)	0,15 ul
Primer Forward (10 nM)	0,5 ul
Primer Reverse (10 nM)	0,5 ul
H <sub>2</sub> O	17,6 ul
<b>Vol. Final</b>	<b>25 ul</b>

Referencia
Pasterán F, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccone D, Di Martino A, and Galas M. (2008) " <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina". Emerging Infectious Diseases, 14:1178-1180.

**ANEXO 2**  
**Protocolo de PCR para la detección del gen NDM, Servicio**  
**Antimicrobianos, Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de**  
**Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbran”**

**NDM**

**Protocolo de PCR para la detección del gen *ndm* en**  
**aislamientos de bacilos gram-negativos**

Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3'
NDM-F	NDM	AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC
NDM-R		GGC GTA GTG CTC AGT GTC

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

Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
ADN	2,5 ul
Buffer 10X	2,5 ul
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 ul
dNTP's (10 mM)	0,5 ul
Taq pol (5U/ul)	0,15 ul
Primer Forward (10 nM)	0,5 ul
Primer Reverse (10 nM)	0,5 ul
H <sub>2</sub> O	17,6 ul
<b>Vol. Final</b>	<b>25 ul</b>

Referencia
Pasteran F., Alborno E., Faccone D., Gomez S., Valenzuela C., Morales M., Estrada P., Valenzuela L., Matheu J., Guerriero L., Arbizú E., Calderón Y., Pardo P., Corso A. (2012) Emergence of NDM-1-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Guatemala. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> . 67:1795-1797.





ANEXO 3  
BOLETA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Grupo Privado	
LNS	
No.	

DATOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRA

1. Muestra obtenida en:

- a. LNS ☐  
b. Grupo Privado  
i. Hospital No. 1 ☐  
ii. Hospital No. 2 ☐  
iii. Hospital No. 3 ☐  
iv. Hospital No. 4 ☐  
v. Hospital No. 5 ☐

2. Tipo de cultivo:

- a. Hemocultivo ☐  
b. Urocultivo ☐  
c. Coprocultivo ☐  
d. LCR ☐  
e. Secreción ☐  
f. Punta de Catéter ☐

3. Tipo Enterobacteria aislada:

- a. Escherichia Coli ☐  
b. Klebsiella Pneumoniae ☐

4. Características de la muestra:

- BLEE + ☐  
• Resistencia a  
Carbapenemico:  
o Imipenem ☐  
o Meropenem ☐  
o Ertapenem ☐

ESTUDIO FENOTÍPICO

1. Halo de inhibición de Imipenem \_\_\_\_\_ mm.

2. Placa complementaria APB y EDTA

- a. Carbapenemasa MBL Positivo ☐ Negativo ☐  
b. Carbapenemasa KPC Positivo ☐ Negativo ☐  
c. Otro mecanismo de resistencia \_\_\_\_\_

ESTUDIO GENOTÍPICO

1. Gen Bla<sub>NDM-1</sub> Presente ☐ Ausente ☐  
2. Gen Bla<sub>KPC-2</sub> Presente ☐ Ausente ☐

# **ANEXO 4** **Inserto Primer NDM-F, descripción del producto**

DILAB, SA

Juan Fernando Estrada  
12 Calle 3-31 Zona 1  
01010 Guatemala City  
Guatemala

**Product Description no. 258635**  
TIB reference no : 000129745

**NDM-F**  
20 - mer 07.25.2013

**5' - AgCACACTTCCTATCTCgAC**

Amount / Concentration of product in 1 ml

Synthesis scale and purification :

Modifications :

Number of bases :

Wobble bases and GC content :

5,0 nmol / 5,0 µM

Synthesis: 0.01 µmol Purification: GSF Condition: 5 nmol lyo

Prels pro Mengeneinheit: %1 %2

A : 5 G : 2 C : 8 T : 5 total 20

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-content 60.0%

Chemical properties and constant factors of the product :

Molar extinction coefficient :

198420 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH<sub>4</sub><sup>+</sup> :

6320,6 g / mol

Molecular weight free acid :

5997,0 g / mol

Picomoles per OD<sub>260</sub> :

5039,8 pmol / OD

Micrograms per OD<sub>260</sub> :

31,9 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD<sub>260</sub> :

1,0 OD

Molar amount :

5,0 nmol

Amount in µg mass units :

31,8 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution :

5,0 µM (pmol / µl)

20 µM ( 20 pmol/µl) requires a volume of :

250 µl

50 µM ( 50 pmol/µl) requires a volume of :

100 µl

(To prepare stock solutions of

100 µM ( 100 pmol/µl) requires a volume of :

50 µl

different concentration)

Mass concentration (for hybridization) :

Concentration, when dissolved in 1 ml :

0,032 µg / µl

Dilution when preparing a solution with 0,5 µg/ml :

1 : 63 dilution factor from a 1 ml solution

To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in :

316 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOL BIOL)

51,0 °C

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)

47,5 °C

Suggested PCR annealing temperature (<= 72°C) :

59,8 °C

Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)

60,0 °C

Melting point G/C-content rule

54,3 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid :

Δ G / Δ H / Δ S -129,8 / -583,8 / -1523,6 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.

W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thioate

# **ANEXO 5** **Inserto Primer NDM-R, descripción del producto**

DILAB, SA

Juan Fernando Estrada  
12 Calle 3-31 Zona 1  
01010 Guatemala City  
Guatemala

**Product Description no. 258636**  
TIB reference no: 000129745

**NDM-R**  
18 - mer 07.25.2013

5' - ggCgTAgTgCTCAgTgTC

Amount / Concentration of product in 1 ml  
Synthesis scale and purification:  
Modifications:  
Number of bases:  
Wobble bases and GC content:

5,0 nmol / 5,0 µM  
Synthesis: 0.01 µmol Purification: GSF Condition: 5 nmol lyo  
Preis pro Mengeneinheit: %1 %2  
A: 2 G: 7 C: 4 T: 5 total 18  
Wobble: 0 Mod: 0 GC-content 61.1%

## Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient $\epsilon$	184670 l / mol cm
Molecular weight ammonium salt NH <sub>4</sub>	5836,2 g / mol
Molecular weight free acid:	5546,7 g / mol
Picomoles per OD $\approx$	5415,1 pmol / OD
Micrograms per OD $\approx$	31,8 µg / OD

## Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD $\approx$	0,9 OD
Molar amount:	5,0 nmol
Amount in µg mass units:	29,2 µg
<u>Molar concentration when delivered in 1 ml solution:</u>	5,0 µM (pmol / µl)
20 µM ( 20 pmol/µl) requires a volume of:	250 µl
50 µM ( 50 pmol/µl) requires a volume of:	100 µl (To prepare stock solutions of
100 µM ( 100 pmol/µl) requires a volume of:	50 µl different concentration)

## Mass concentration (for hybridization):

Concentration, when dissolved in 1 ml:	0,029 µg / µl
Dilution when preparing a solution with 0,5 µg/ml:	1 : 58 dilution factor from a 1 ml solution
To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in:	292 µl

## Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)	52,4 °C
Suggested PCR annealing temperature ( $\approx$ 72°C):	48,9 °C
Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)	61,2 °C
Melting point GC-content rule	58,0 °C
	55,1 °C

## Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

$\Delta G / \Delta H / \Delta S$	-122,7 /	-529,3 /	-1364,5 kJ / mol
----------------------------------	----------	----------	------------------

## Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C	Y = C/T	M = A/C	H = A/C/T	D = A/G/T	N = A/C/G/T	X = Modif.
W = A/T	R = A/G	K = G/T	B = C/G/T	V = A/C/G	I = Inosin	s = Thioate

# **ANEXO 6** **Inserto Primer KPC-F, descripción del producto**

DILAB, SA

Juan Fernando Estrada  
12 Calle 3-31 Zona 1  
01010 Guatemala City  
Guatemala

**Product Description no. 258637**  
TIB reference no: 000129745

**KPC-F**  
20 - mer 07.25.2013

**5' - AACAAggAATATCgTtgATg**

Amount / Concentration of product in 1 ml

Synthesis scale and purification:

Modifications:

Number of bases:

Wobble bases and GC content:

Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient

Molecular weight ammonium salt NH

Molecular weight free acid:

Picomoles per OD

Micrograms per OD

5,0 nmol / 5,0 µM

Synthesis: 0.01 µmol Purification: GSF Condition: 5 nmol lyo

Preis pro Mengeneinheit: %1 %2

A: 8 G: 5 C: 2 T: 5 total 20

Wobble: 0 Mod.: 0 GC-content 35.0%

237750 l / mol cm

6512.8 g / mol

6189,2 g / mol

4206,1 pmol / OD

27,4 µg / OD

Delivered amount (per vial) when delivered in aliquots

Amount in optical units OD

Molar amount:

Amount in µg mass units:

Molar concentration when delivered in 1 ml solution:

20 µM ( 20 pmol/µl) requires a volume of:

50 µM ( 50 pmol/µl) requires a volume of:

100 µM ( 100 pmol/µl) requires a volume of:

1,2 OD

5,0 nmol

32,5 µg

5,0 µM (pmol / µl)

250 µl

100 µl

(To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization):

Concentration, when dissolved in 1 ml:

Dilution when preparing a solution with 0,5 µg/ml:

To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in:

0,033 µg / µl

1 : 65 dilution factor from a 1 ml solution

325 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)

Suggested PCR annealing temperature (<= 72°C):

Melting point GC/AT rule (A/T = 2°C, G/C = 4°C)

Melting point G/C-content rule

48,3 °C

44,8 °C

57,1 °C

54,0 °C

48,1 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

Δ G / Δ H / Δ S -129.4 / -599.0 / -1576.0 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C H = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.  
W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thioate

**ANEXO 7**  
**Inserto Primer KPC-R, descripción del producto**

DILAB, SA

Juan Fernando Estrada  
12 Calle 3-31 Zona 1  
01010 Guatemala City  
Guatemala

**Product Description no. 258638**  
TIB reference no: 000129745

**KPC-R**  
20 - mer 07.25.2013

**5' - AgATgATTTTCaGgCCTTA**

Amount / Concentration of product in 1 ml

Synthesis scale and purification:

Modifications:

Number of bases:

Wobble bases and GC content:

5,0 nmol / 5,0 µM

Synthesis: 0.01 µmol Purification: GSF Condition: 5 nmol lya

Preis pro Mengeneinheit: %1 %2

A: 6 G: 4 C: 3 T: 7 total 20

Wobble: 0 Mod: 0 GC-content 35.0%

Chemical properties and constant factors of the product:

Molar extinction coefficient

219190 l / mol cm

Molecular weight ammonium salt NH

6454,7 g / mol

Molecular weight free acid:

6131,1 g / mol

Picomoles per OD

4582,3 pmol / OD

Micrograms per OD

29,4 µg / OD

Delivered amount (per vial when delivered in aliquots)

Amount in optical units OD

1,1 OD

Molar amount:

5,0 nmol

Amount in µg mass units:

32,3 µg

Molar concentration when delivered in 1 ml solution:

20 µM ( 20 pmol/µl) requires a volume of:

5,0 µM (pmol / µl)

50 µM ( 50 pmol/µl) requires a volume of:

250 µl

100 µM ( 100 pmol/µl) requires a volume of:

100 µl

(To prepare stock solutions of different concentration)

Mass concentration (for hybridization):

Concentration, when dissolved in 1 ml:

0,032 µg / µl

Dilution when preparing a solution with 0,5 µg/ml:

1 : 65 dilution factor from a 1 ml solution

To prepare a 0,1 µg / µl solution dissolve the product in:

323 µl

Melting point, thermodynamic approach (TIB MOLBIOL)

47,5 °C

Melting point in the case of a single mutation (-3,5 °C)

44,0 °C

Suggested PCR annealing temperature (<= 72 °C):

56,2 °C

Melting point GC/AT rule (A/T = 2 °C, G/C = 4 °C)

54,0 °C

Melting point GC-content rule

48,1 °C

Thermodynamic parameter for the double stranded hybrid:

Δ G / Δ H / Δ S -128,5 / -602,3 / -1590,0 kJ / mol

Code for degenerated base positions (wobble positions IUB Code)

S = G/C Y = C/T M = A/C R = A/C/T D = A/G/T N = A/C/G/T X = Modif.  
W = A/T R = A/G K = G/T B = C/G/T V = A/C/G I = Inosin s = Thioate



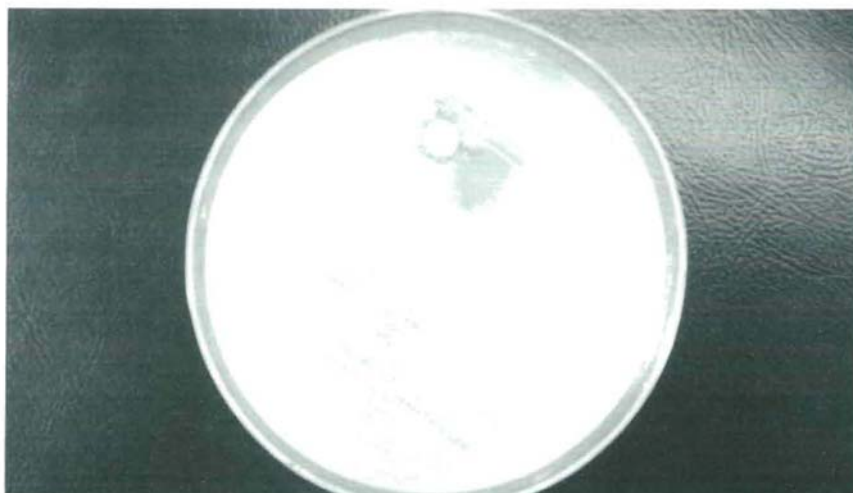
ANEXO 8

INSTITUCIONES PRIVADAS QUE CONFORMAN EL GRUPO  
HOSPITALARIO MEDAX

Hospital No.	Nombre del Hospital Privado
1	Hospital Novicentro
2	Hospital Eskala
3	Hospital Ciudad Vieja
4	Hospital Las Américas
5	Hospital Cedros del Líbano

---

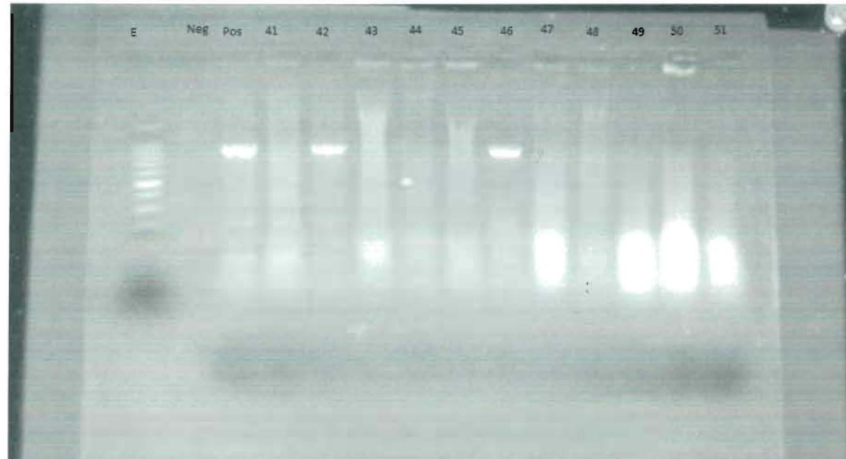
ANEXO 9



**Figura 1.** Kirby Bauer de *K. pneumoniae* con sinergia positiva para carbapenemada tipo MBL.



**Figura 2.** Kirby Bauer de *E. coli* sin presencia de sinergia para carbapenemasa.



**Figura 3.** Electroforesis en gel agarosa mostrando los productos amplificados del gen  $Bla_{KPC}$ , con peso 916pb. E: Escalera de 100pb, Neg: Negativo, Pos: Positivo.