

UNIVERSIDAD SAN PEDRO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA



**Carbapenemasas en bacterias gram negativas no
fermentadoras, aisladas en unidades críticas del Hospital
Regional Docente Cajamarca, agosto a diciembre -2018.**

**Tesis para obtener el Título profesional de Licenciada en Tecnología
Médica con especialidad en Laboratorio clínico y Anatomía
Patológica**

Autora:

Blas Asipali, Victoria Marisela

Asesor:

Flores Neciosup, Luis Alberto

Cajamarca – Perú

2019

Palabras clave: Carbapenemasas, bacterias gram negativas no fermentadoras.

Keywords: Carbapenemases, gram negative non-fermenting bacteria.

Linea de investigación

OCDE			Líneas de investigación
Área	Sub-área	Disciplina	
Ciencias médicas y de salud	Ciencias de la salud	Salud pública	Salud pública

**Carbapenemasas en bacterias gram
negativas no fermentadoras, aisladas en
unidades críticas del Hospital Regional
Docente Cajamarca, agosto a diciembre
- 2018.**

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la presencia de enzimas carbapenemasas en microorganismos gram negativas no fermentadoras, aisladas en las unidades críticas del Hospital Regional Docente de Cajamarca, en los meses de agosto a diciembre del 2018, se realizó un estudio observacional descriptivo, de corte transversal y retrospectivo. Donde se incluyeron cepas de bacterias gram negativas no fermentadoras que presentaron resistencia a los carbapenems. La identificación fenotípica se realizó con los métodos de, Sinergia de doble disco con EDTA, test de Hodge modificado con cepa ATCC 700603 y método modificado de inactivación del carbapenem (mCIM). Resultados: De 41 cepas de microorganismos gram negativas no fermentadoras que presentaron sospecha de carbapenemasas mediante el equipo MicroScan-AutoScan4, el 90,2% manifestaron actividad carbapenemasas mediante los métodos fenotípicos, de las cuales el microorganismo con mayor actividad carbapenemasa fue *Acinetobacter baumannii* con 86,5%, seguidamente de *Pseudomona aeruginosa* con 10,8% y *Pseudomona flourences/pútida* con 2,7%. El tipo de muestra biológica con mayor porcentaje de aislamientos positivos fueron secreción bronquial con 75,6%, luego aspirado bronquial con 19,5% y en menor porcentaje fueron los hemocultivos con 2,4%, al igual que secreción traqueal con 2,4%, el servicio que presento mayor aislamientos positivos fue (UCI) con 53,7%, seguidamente de (UCIN) con 36,6%. Finalmente el método fenotípico con mejor desempeño en detectar carbapenemasas fue el Test Modificado de inactivación del carbapenem- mCIM con 90,2%, seguidamente del Test de Hodge Modificado con cepa ATCC 700603 con 80,5% y el Test de Sinergia de doble disco-EDTA con 12,2%.

ABSTRACT

In order to evaluate the presence of carbapenemase enzymes in non-fermenting gram-negative microorganisms isolated in the critical units of the Regional Teaching Hospital of Cajamarca (Hospital Regional Docente de Cajamarca) from August to December 2018, a descriptive, cross-sectional, retrospective observational study was conducted. Non-fermenting strains of gram-negative bacteria that presented resistance to carbapenems were included. Phenotypic identification was performed with the methods of, Dual Disc Synergy with EDTA, modified Hodge test with ATCC 700603 strain and modified carbapenem inactivation method (mCIM). Results: Out of 41 strains of gram-negative non-fermenting microorganisms suspected of Carbapenemases by the MicroScan-AutoScan4 equipment, 90.2% showed Carbapenemases activity by the phenotypic methods, of which the microorganism with the highest Carbapenemases activity was *Acinetobacter baumannii* with 86.5%, followed by *Pseudomonas aeruginosa* with 10.8% and *Pseudomonas fluorescens/pútida* with 2.7%. The type of biological sample with the highest percentage of positive isolates was bronchial secretion with 75.6%, then bronchial aspiration with 19.5% and in a lower percentage were blood cultures with 2.4%, as well as tracheal secretion with 2.4%. The service that presented the highest percentage of positive isolates was (ICU) with 53.7%, followed by (NICU) with 36.6%. Finally, the phenotypic method with the best performance in detecting carbapenemases was the Modified Carbapenem Inactivation Test - mCIM with 90.2%, followed by the Modified Hodge Test with ATCC strain 700603 with 80.5% and the Double Disc Synergy Test - EDTA with 12.2%.

INDICE GENERAL

Palabras clave:	i
Keywords:	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
1.2.Fundamentación científica.....	6
1.2.1.Bacilos Gram negativos no fermentadoras	6
1.2.2.Genero Pseudomona	7
1.2.3.Especies del Género Pseudomonas.....	7
1.2.4.Pseudomona aeruginosa.....	7
1.2.5.Importancia clínica de Pseudomonas aeruginosa	8
1.2.7. Betalactamasas.....	9
1.2.8.Carbapenemasas de tipo Serina	9
1.3.1. Importancia clinica	10
1.3.2. Factores de virulencia de Acinetobacter baumannii	11

1.3.4.Tipos de mecanismos de resistencia de Acinetobacter Baumannii	13
1.3.4.1.Mecanismos de resistencia intrínsecos	13
1.3.4.2.Mecanismos de resistencia adquiridos.....	13
1.3.6.Carbapenemasas.....	15
1.4.Detección fenotípica de carbapenemasas.	16
2.Justificación de la investigación	19
3. problema.....	20
4.Conceptualización y operacionalización de variables	21
5.Objetivos.....	22
5.1.Objetivo General.....	22
5.2.Objetivos específicos	22
METODOLOGÍA.....	23
2.1. Tipo y diseño de la investigación	23
2.3.4.3.Detección fenotípica de carbapenemasas	25
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	45
ANEXOS	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Carbapenemasas en BGNNF, aisladas en UCI Y UCIN del HRDC, agosto a diciembre 2018.	29
Tabla 2. Tipo de muestra biológica, en los aislados de BGNNF, período de agosto a diciembre 2018.	31
Tabla 3. Procedencia de la muestra, en aislados de BGNNF, periodo de agosto a diciembre 2018.	33
Tabla 4. Producción de Carbapenemasas en BGNNF, aisladas en HRDC, agosto a diciembre 2018.	35
Tabla 5. Producción de Carbapenemasas en BGNNF, según 3 métodos fenotípicos diferentes.....	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Deteccion de carbapenemasa tipo metalocarbapenemasa en aislado de Pseudomona aeruginosa(cepa perteneciente al estudio).	26
Figura 2. Deteccion de carbapenemasa mediante el test de Hodge modificado con cepa ATCC700603, en aislados de Acinetobacter baumannii, (cepas pertenecientes al estudio).....	27
Figura 3. ..detección de carbapenemasa mediante el test modificado de inactivacion del carbapenem en aislados de Acinetobacter baumannii, (cepas pertenecientes al estudio).	28
Figura 4. <i>Carbapenemasas en bacterias gram negativas no fermentadoras aisladas en las unidades críticas del hospital Regional Docente Cajamarca, agosto a Diciembre – 2018.</i>	30
Figura 5. Tipo de muestra biológica, en los aislados de bacterias gram negativas no fermentadoras en los meses de agosto a diciembre-2018.	32
Figura 6. Procedencia de la muestra, en los aislados de bacterias gram negativas no fermentadoras en los meses de agosto a diciembre-2018.	34
Figura 7. Producción de Carbapenemasas en Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y pseudomona flourences/putida.	36
Figura 8. Producción de Carbapenemasas en Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, pseudomona flourences/putida, según 3 métodos diferentes: Sinergia de doble disco con EDTA, método de Hodge modificado con cepa ATCC 700603 y test modificado de inactivación del carbapenem.....	38

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un problema que cada vez va en aumento, generando respuestas de supervivencia en los microorganismos. En los últimos años, las bacterias gram negativas con actividad carbapenemasa como es el caso de *Pseudomona*, *Acinetobacter*, entre otros bacilos no fermentadores se han ido diseminando a nivel global, complicando de esta manera el tratamiento de los pacientes, y prolongando la estadía por mucho más tiempo en las salas de hospitalización. Ante ésta problemática en el año 2017, la OMS, mostró preocupación por el crecimiento de cepas resistentes a la mayoría de antibióticos y detalló una lista en la que señala a 12 familias de bacterias como prioritarias a vigilar; entre éstas, destacan los bacilos gram negativas no fermentadoras multirresistente.

El primer caso en Perú, fue en el 2013, en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza, fue de tipo KPC y se aisló de un cultivo de sangre, perteneciente a un paciente de cuidados intensivos, a partir de aquella fecha lo más probable es que estas enzimas se hayan diseminado a otros hospitales de las regiones del país.

Actualmente la región Cajamarca no cuenta con investigaciones sobre el tema, sin embargo creemos que no es ajeno a este problema, bacterias como *Acinetobacter baumannii*, *pseudomona aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Enterobacteriácea*, son los responsables de causar infecciones intrahospitalarias en las unidades críticas de UCI y UCIN de los hospitales de nuestra región, las características más resaltantes de estas bacterias es la multirresistencia a los antibióticos en especial a los carbapenems.

Con esta investigación se pretende alertar a las entidades correspondientes para el manejo y control de cepas multirresistente y prevenir su diseminación.

1. Antecedentes y fundamentación científica.

1.1. Antecedentes

A nivel internacional Uechi *et al* (2017) Realizaron un estudio en Japón, titulado “Un método modificado de inactivación de carbapenem, CIMTris”, para la detectar carbapenemasa en especies de *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Ellos concluyeron que el método CIMTris es útil en la detección de enzimas carbapenemasas en especies de *Acinetobacter* y *Pseudomonas*.

Remolina & Escobar (2017) En su estudio que realizaron en Colombia, describieron carbapenemasas expresadas en *Klebsiella spp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. Concluyeron que el método fenotípico CarbaNP obtuvo una concordancia muy alta en detectar enzimas carbapenemasas de cualquier tipo.

Reyes, *et al*, (2017) realizaron un estudio sobre un método alternativo para detectar carbapenemasas tipo KPC en Enterobacterias, lo cual llevo como título: “Inactivación del carbapenémico”. Ellos concluyeron que este nuevo método al igual que la reacción en la cadena de la polimerasa son superiores al test de Hodge como también al ABP para identificar carbapenemasas tipo KPC en Enterobacterias. Recomiendan realizar el test como rutina dentro del algoritmo para la contención de infecciones por este tipo de patógenos.

Ronquillo (2016) estudió la prevalencia de infecciones por *Acinetobacter baumannii* multirresistente en pacientes que fueron internados en el Nosocomio General Enrique Garcés, período enero 2013 a enero 2015. Ella concluyó que la mayor prevalencia de infecciones se encuentra en pacientes de 61-80 años de edad, en género masculino, servicio de UCI, muestra de absceso, provincia de Pichincha, resistencia natural a ampicilina/sulbactam, susceptibilidad adquirida (resistencia a imipenem y una sensibilidad a Colistin). Se evidenció la necesidad que el personal de salud aumente las medidas de salubridad para evitar la propagación de la bacteria.

Caldera & Robles (2016) realizaron un estudio en Nicaragua, sobre caracterización fenotípica de bacterias gram negativas con un perfil de multirresistencia, dichas cepas procedían de la red Nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, en el periodo del 2014 al 2016. Concluyeron que de 195 aislamientos bacterianos en estudio, 140 de ellos producían carbapenemasas del tipo Metalobetalactamasas; 9 posibles Serino enzimas; 46 cepas fueron de tipo oxacilinasas u otro mecanismo de resistencia a carbapenems. En el 60% de las cepas de ABA, se observó la producción de posibles carbapenemasas tipo oxacilinasas y un 40% producían Metalobetalactamasas; en PAE, el 92% expresaron carbapenemasa de tipo Metalobetalactamasas y el 8% restante posiblemente producían enzimas de tipo oxacilinasas. En Enterobacterias el 86% expresaron carbapenemasa de Metalobetalactamasas y el 14% posiblemente de tipo KPC.

Peña (2016) Realizó un estudio en Quito, en la cual Caracterizó molecularmente a *Pseudomona aeruginosa*, dicha bacteria fue responsable de un brote infeccioso de un nosocomio de la ciudad de Quito, para ello utilizaron pruebas fenotípicas y genotípicas. Concluyó que aplicando métodos fenotípicos como el de disco difusión con EDTA, 09 aislamientos dieron positivos para Metalobetalactamasas esto correspondió al 100% de las cepas testadas. De la caracterización genotípica se obtuvo como resultado la amplificación del gen IMP para los 9 aislados testados y la secuenciación determinó la presencia de enzima IMP-15 en 6 cepas (5 *pseudomona aeruginosa*, 1 *pseudomona putida*).

Molin (2013) En su estudio realizado en Paraguay, detectó fenotípicamente Carbapenemasas en PAE, en enfermos que acudieron a una Clínica local, de febrero a julio del 2013. Él concluyó que el método de discos combinados es útil en la práctica diaria porque ayuda a identificar de forma rápida y confiable las metalocarbapenemasas en aislados de *Pseudomona aeruginosa*, cuando no contamos con metodologías como biología molecular por ser éstas muy costosas.

Saavedra *et al* (2013) Éste estudio realizado en Colombia, donde tipificaron molecularmente aislamientos de PAE productores de carbapenemasas, en 07 Departamentos de Colombia. Concluyeron que VIM fue la carbapenemasa con más frecuente en Colombia, seguidamente de carbapenemasa tipo KPC en una relación aproximada de 3:1.

A nivel nacional, Casas & Castillo (2018) En esta investigación realizada en Lima, donde se estudió molecularmente los genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like y blaOXA- 58-like en aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenems, de un Hospital Nacional de Referencia en la ciudad de Lima en los meses de diciembre 2017 a marzo 2018. Ellos llegaron a la conclusión que todas las cepas que se recolectaron y fueron evaluadas a través del método MIC, el 100 % expresaron la enzima carbapenemasa; así mismo el 74,5% de estas cepas portaban genes codificantes de blaOXA24-like y blaOXA-58-like, siendo blaOXA-24-like el gen que más prevalecía.

Sulca (2018) Realizó un estudio titulado “Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a carbapenems “in vitro” comparado con el sistema automatizado”. Él concluyó que del total de muestras trabajadas ,13 resultaron ser productoras de carbapenemasas, confirmadas por los bioensayos CMIC y Test de Hodge. Y en las 13 cepas se identificó carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas por los métodos inhibidores por EDTA y ácido borónico.

Carranza & Vásquez (2017) realizaron un estudio en Lima, en la cual utilizaron metodología fenotípica, el estudio llevo como título: Carbapenemasas en PAE, que fueron aislados de pacientes internados de un hospital nacional, los meses de enero a junio del 2017.Ellos llegaron a concluir que la resistencia a los carbapenems en *Pseudomonas aeruginosa* fue de 4 % y fueron de tipo metalocarbapenemasas, por la presencia de sinergismo entre Imipenem y EDTA, en ningún aislamiento se detectó serincarbapenemasa.

Córdova (2017) Realizó un estudio en Lima titulado “Detección fenotípica de Metalobetalactamasas en *Pseudomona Aeruginosa*, aisladas en Clínicas Privadas de Lima, periodo 2016 – 2017. El estudio concluyó que existe un incremento significativo de las enzimas MBLs en muestras clínicas que perfila una alarma y preocupación en la terapia de diferentes infecciones intra y extrahospitalaria.

Matta (2016) Realizó un estudio en Lima, titulado “Detección fenotípica de carbapenemasas en *Acinetobacter spp.* de un hospital de Lima en el 2016”. Él llegó a la conclusión que la frecuencia de actividad carbapenemasa evaluada en 60 cepas de *Acinetobacter spp.* fue de un 58%.

Gastelo (2015) Realizó un estudio en Lambayeque, donde identificó carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras que fueron aisladas en los servicios de atención críticos del Hospital Regional Lambayeque los meses de diciembre del 2014 a julio del 2015. Ella llegó a la conclusión que el 100% de las muestras donde identifico a *Acinetobacter baumannii* presentaron carbapenemasas de tipo oxacilinasas y 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* expresaron carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas.

Aguilar & *et al* (2014) realizaron un estudio de Frecuencia y comparación de tres métodos fenotípicos en cepas de *PAE* productora de Metalobetalactamasas aisladas en el Hospital Regional Lambayeque, durante el 2014. Ellos concluyeron que fueron los primeros en encontrar Metalobetalactamasas en *P. aeruginosa* en dicho nosocomio con un 10,9% de aislamientos positivos, este hallazgo tuvo un impacto en el ámbito clínico y epidemiológico y se dieron recomendaciones de vigilancia constante y promovieron medidas de control para evitar su rápida diseminación en toda la Región Lambayeque.

Gonzales (2013) Estudio realizado en Lima, en la cual se detectó y caracterizó molecularmente Metaloenzimas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, recuperados en el Instituto Nacional de Salud del Niño Lima. Él concluyó, que las metalocarbapenemasas en PAE, no son el mecanismo principal de resistencia a los carbapenems, ya que de los 115 aislamientos de *P. aeruginosa* recuperadas que ingresaron al estudio, solo el 21,7 % presentaron producción de Metalobetalactamasas. Ante este hallazgo se reforzó la necesidad de revisar las medidas de control de todas las infecciones en dicha institución.

A nivel local no existen investigaciones referentes al tema.

1.2.Fundamentación científica

1.2.1. Bacilos Gram negativos no fermentadoras

Son seres microscópicos incapaces de fermentar los hidratos de carbono, se comportan como oportunistas causando infecciones severas en especial a pacientes hospitalizados de los servicios de atención críticos como es el caso de UCI y UCIN, muchas de éstas bacterias están asociadas a infecciones del tracto urinario, meningitis y bacteriemias, pero más está relacionada con neumonías nosocomiales, la gravedad de las infecciones por estos microorganismos radica en la sobrevivencia por meses en el ambiente hospitalario y su facilidad de diseminarse rápidamente causando brotes epidémicos, otra característica preocupante en estas bacterias es su multirresistencia a los antibióticos, su resistencia natural y su gran capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia. En este grupo bacteriano tenemos a *Pseudomonas aeruginosa* y *A. baumannii* como patógenos establecidos que causan neumonías asociadas a ventilación. (Medell Gago & Hart Casares).

1.2.2. Genero Pseudomona

Son bacterias gram negativas, aerobios estrictos, curvos, móviles, no fermentan la glucosa, son oxidasa positiva, utilizan el nitrato como aceptor de electrones. Una de sus características es el de degradar sustratos y utilizar diferentes fuentes de carbono como nutrientes y esto les permite colonizar ambientes y nichos ecológicos, también intervienen en la degradación y reciclaje de la materia orgánica, lo cual contribuye a mantener limpio y saludable el medio ambiente. (Díaz Tello, 2008)

1.2.3. Especies del Género Pseudomonas

Su clasificación se basa en la homología de secuenciación de ARN, donde el género *Pseudomona*, se ubica en cinco grupos importantes: Grupo I donde encontramos a los fluorescente y no fluorescente, al grupo II, grupo III, grupo IV y grupo V, teniendo como especie de mayor importancia clínica a: *Pseudomona aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. pútida*, *P. syringae*, *P. phaseolica*, *P. stutzeri*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. picketti*, *P. acidovorans*, *P. alcaligenes*. *P. veróna* y *P. montelii*, la más estudiada es *Pseudomona aeruginosa* por su impacto clínico en las infecciones nosocomiales. (Díaz Tello, 2008).

1.2.4. Pseudomona aeruginosa

Bacilo gram negativo, catalasa y oxidasa positiva, pueden crecer a temperaturas superiores a 42°C, los encontramos cuando realizamos la coloración Gram, en pares o formando cadenas cortas, miden aproximadamente de 0,5 a 1 µm de ancho por 3 a 4 µm de largo, poseen flagelos. Producen dos pigmentos de importancia clínica: piocianina y pioverdina, algunas cepas pueden producir además los pigmentos de piorrubina y piomelanina. (Díaz Tello, 2008).

Pseudomona aeruginosa tiene gram importancia clínica por su patogenicidad, son oportunistas, causan infecciones con altos índices de morbimortalidad en pacientes inmunocomprometidos, son comúnmente aisladas en pacientes de los

servicios críticos de UCI Y UCIN, son características de esta especie su multirresistencia a los antibióticos. (Molin Queste, 2016).

1.2.5. Importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa tiene gran importancia clínica por ser una bacteria oportunista, la encontramos en los centros hospitalarios causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos, sobre todo en aquellos con cáncer, pacientes quemados, en algunos casos pueden afectar a personas sanas y ocasionar infecciones en el tracto urinario, tracto respiratorio, infecciones en heridas, infecciones por dispositivos intravasculares, septicemia, entre otros. Existen fuentes bibliográficas, donde se considera a *Pseudomonas aeruginosa*, como responsable de neumonías asociadas a asistencia respiratoria mecánica con un 17%, ITU 11% y bacteriemias primarias en unidades de cuidados intensivos con un 3.8%. No obstante, el porcentaje aumenta en las unidades de pacientes quemados, donde *P. aeruginosa*, causa el 21.5% de neumonías; infecciones del tracto urinario 20% y bacteriemias primarias 9%. (Díaz Tello, 2008).

Otra característica importante en *Pseudomonas aeruginosa* es la presencia de biofilms ya que aumentan la patogénesis, porque permite colonizar superficies, materiales médicos; como son los catéteres, tubos endotraqueales, lentes de contacto, etc. La situación se agrava cuando no contamos con antibióticos que atenúen las infecciones causadas por esta bacteria, porque la bacteria presenta un perfil multirresistente donde muchas veces las opciones terapéuticas son pocas. (Gonzales Escalante, 2013).

1.2.6. Mecanismos de resistencia a los antibióticos.

P. aeruginosa presenta mecanismos de resistencia natural y adquirida. La resistencia intrínseca, presenta baja permeabilidad de la membrana externa, la cual actúa como barrera selectiva donde sólo ingresan pequeñas moléculas hidrofílicas y excluye a las más grandes, por ello presenta resistencia natural a betalactámicos, sulfamidas, quinolonas, tigeciclina, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. Además, *Pseudomona aeruginosa*, expresa bombas de expulsión del interior hacia el exterior de la célula, enzimas que inactivan y modifican el sitio diana, todo ello hace que la bacteria sea naturalmente resistente a numerosos antibióticos. (Salvador Luján, 2017).

1.2.7. Betalactamasas

Estas enzimas son capaces de romper el anillo betalactámico que forma parte de la estructura molecular de los agentes antimicrobianos. Las Betalactamasas de tipo AmpC, confieren resistencia a cefalosporinas, aztreonam, e inhibidores de betalactamasas, presentan un nivel bajo de afinidad a carbapenems, no obstante, al presentarse mutaciones espontáneas originan la actividad constitutiva de la enzima en cantidades suficientes y como consecuencia llegan a hidrolizar los antibióticos antes mencionados. Una de las características de resistencia intrínseca son las bombas de expulsión la más frecuente es MexAB-OprM, media la expulsión a Meropenem, Ciprofloxacino, Levofloxacino, tetraciclinas, macrólidos, trimetoprim y novobiocina, también tenemos la Mex XY OprM la cual expulsa aminoglucósidos. La pérdida de porinas OprD, origina disminución de la sensibilidad de *P aeruginosa* a los betalactámicos, lo que lleva a una resistencia. (Molin Queste, 2016).

1.2.8. Carbapenemasas de tipo Serina: contienen en su sitio activo residuos de serina. Están incluidas en la clasificación molecular de Ambler, las de clase A; hidrolizan a todos los betalactámicos, aunque con menos eficacia las cefalosporinas de 3ra y 4ta generación. Las de clase D, son las de tipo OXA en

la cual la acción de las carbapenemasas sobre los carbapenems es bastante modesta. (Molin Queste, 2016).

1.2.9. Metalobetalactamasas (MBLs): Pertenecen a clase B, de Ambler, las enzimas más características son las se describen a continuación.: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM, NDM y KHM, éstas Confieren resistencia a las cefalosporinas, penicilinas y carbapenems, pero no a los monobactam. Las Metalobetalactamasas necesitan de iones bivalentes, Zn^{++} , como cofactor para que se dé la reacción de hidrólisis de betalactámicos, las Metaloenzimas pueden ser identificadas por métodos fenotípicos, colocando discos de imipenem, Meropenem y en el centro ácido etileno diamino tetracético (EDTA). (Molin Queste, 2016).

1.3. *Acinetobacter baumannii*

El término actual de este género bacteriano fue ampliamente aceptado en 1968, son cocobacilos gram negativos, pueden identificarse erróneamente como cocos gram positivos en la coloración de gram porque son difíciles de desteñir, son inmóviles, oxidasa negativa, catalasa positiva, aerobios estrictos y no fermentadores de carbohidratos. En los cultivos incubados en 24 horas se pueden apreciar colonias viscosas, de forma convexa de color blanco grisáceo. Otras especies pertenecientes al complejo *Acinetobacter baumannii* /*Acinetobacter calcoaceticus*, son de mayor tamaño en comparación de otras especies. Entre las pruebas más utilizadas en los laboratorios de microbiología para su identificación a nivel de especie podemos mencionar, la prueba de crecimiento a 44°C. (Casas Moya & Castillo Pardo, diciembre 2017 – marzo 2018)

1.3.1. Importancia clínica

Esta bacteria es capaz de causar numerosas infecciones en pacientes hospitalizados, produciendo afecciones en las vías respiratorias que deriva en neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas, bacteriemias, etc. Todo ello agrava la situación previa y produce relevantes consecuencias, incluso la muerte de los pacientes. Los reportes estadísticos informan que la mortalidad

es muy alta cuando en las infecciones está presente *A. Baumannii* resistentes a carbapenémicos sobre todo en pacientes internados en los servicios de cuidados intensivos. (Luis Hernández, 2017)

Los antibióticos de amplio espectro como es el caso de los carbapenems fueron por mucho tiempo el tratamiento de elección para las infecciones por *A. baumannii*; no obstante, la bacteria ha desarrollado mecanismos de resistencia a dichos antibióticos, lo que complica aún más el tratamiento de las infecciones. La resistencia de *A. baumannii* a los carbapenémicos está mediada por enzimas que degradan el antibiótico y éstas son las llamadas carbapenemasas, específicamente las de tipo oxacilinasas son multirresistente. (Vanegas, y otros, 2015).

Latinoamérica informa las tasas más altas de resistencia a carbapenems en comparación a otros países del continente. La situación en América central es distinta ya las cifras que reporta son bajas, en Brasil y Argentina informan valores altos de resistencia. El programa de vigilancia de resistencia a los antibióticos en latinoamericana, informó el aumento progresivo de tasas de resistencia desde el año 2000 hasta el 2013, aunque no especifica las especies de *Acinetobacter* en estudio. (Matta Chusquisapon, 2018)

1.3.2. Factores de virulencia de *Acinetobacter baumannii*

Factores de adherencia: Tenemos los siguientes:

Pilis y fimbrias: Permite que la bacteria se adhiera a las superficies de vidrio y plástico logrando la formación de biopelículas en los equipos médicos.

Superficie hidrofóbica: Protege frente a la fagocitosis y permite la adhesión a las células hospederas y superficies como catéteres y prótesis. (Ronquillo Pilatasig, 2016)

Factores de colonización: El hospedero debe mantener buenas condiciones ambientales para que la bacteria pueda multiplicarse. En este caso los

sideróforos permiten que la bacteria se adapte a lugares limitados de hierro. (Ronquillo Pilatasig, 2016,p.11)

Factores de invasión: para que se pueda dar un proceso infeccioso,el microorganismo requiere de elementos que le defiendan de las respuestas inmunológicas del hospedero,para este mecanismo se cuenta con los siguientes factores asociados.

Las fosfolipasas: Enzimas que causan lisis,facilitando la invasión

Capsulas : Innecesarias en el crecimiento de las bacterias,pero de gran importancia en la sobrevivencia del hospedero.

Proteínas de membrana externa: La traducción de señales,adhesión y patogenesis. (Ronquillo Pilatasig, 2016)

1.3.3. Resistencia Bacteriana en *Acinetobacter baumannii*

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana para *Acinetobacter spp.* son variables, tenemos a las betalactamasas, sobreexpresión del fármaco, bombas de eflujo, disminución de la permeabilidad en la membrana externa. Sin embargo, la producción de enzimas hidrolizantes de carbapenems es de gran preocupación, la mayoría de estas especies desarrollan resistencia a los carbapenems por la producción de Metalobetalactamasas (MBLs) y carbapenemasa tipo oxacilinas. Nueva Delhi Metalobetalactamasas (blaNDM-1) es una nueva Metalobetalactamasas con gran capacidad para proporcionar resistencia a casi todos los betalactámicos, así como a los carbapenems. Esta es la característica más crítica porque los carbapenems son entre los pocos antibióticos de respaldo para el uso contra las bacterias productoras de MBL.Los genes del blaNDM-1 son altamente transmisibles y pueden albergar un gran número de resistencias, es por ello que el blaNDM-1 se está convirtiendo en la carbapenemasa más amenazadora de los últimos tiempos. (Elbrolosy, Labeeb, & Hassan, 2019).

Acinetobacter baumannii es considerado multidrogorresistente cuando presenta resistencia de dos a más clases de antibióticos: cefalosporinas antipseudomónicas, carbapenémicos antipseudomónicas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Y se considera pandrogorresistente (PDR) cuando además de presentar resistencia a todas las clases de antibióticos presenta resistencia a la polimixina y/o Colistin. (Ronquillo Pilatasig, 2016 p.15)

1.3.4. Tipos de mecanismos de resistencia de *Acinetobacter Baumannii*

1.3.4.1.Mecanismos de resistencia intrínsecos

Las betalactamasas en *Acinetobacter baumannii* se debe a que la bacteria posee una enzima cefalosporinasa no inducible de tipo AmpC denominada ADC, los niveles elevados de ADC son debido a la presencia de promotores ISAbal e ISAbal25 que favorecen la transcripción del gen, en cuanto a la resistencia a las penicilinas se debe a niveles bajos de ADC, pero cuando los niveles de ADC están elevados, afectan a cefalosporinas de 1ra.generacion, 2da.generacion, 3ra.generacion, piperacilina y aztreonam, pero no afectan a los carbapenémicos. La enzima oxacilinasasa OXA- 51 intrínseca y una no inducible AmpC cefalosporinasa presente en el *A. baumannii* hidrolizan débilmente a las penicilinas y carbapenems. (Ronquillo Pilatasig, 2016).

1.3.4.2.Mecanismos de resistencia adquiridos.

Mecanismos enzimáticos: las diferentes betalactamasas degradan el anillo betalactámico, éstas enzimas contienen elementos genéticos móviles donde encontramos a integrones, plásmidos y transposones los cuales pueden llevar los mecanismos de resistencia de una bacteria a otra, entre ellas tenemos a las betalactamasas de clase A,son de espectro ampliado con resistencia a las penicilinas, carbenicilinas, BLEE y tipo KPC,la de tipo Metalobetalactamasas;presentan resistencia a los aminoglucósidos, no se inhiben por ácido clavulánico o el tazobactam, pero son inhibidos por

quelantes como el EDTA. Los de clase D u Oxacilinasas: Son más frecuentes en *Acinetobacter baumannii*, puesto que sus enzimas son codificadas en los cromosomas, plásmidos o usados como marcador de especie. En los no enzimáticos la resistencia a los betalactámicos alteran las proteínas de membrana disminuyendo la permeabilidad de la misma, las bombas de expulsión impiden el ingreso del antibiótico al sitio de la infección y las proteínas de unión de penicilina también se ven alteradas. (Ronquillo Pilatasig, 2016).

1.3.5. Carbapenemas.

Son antibióticos de amplio espectro, su estructura básica está formada por un anillo betalactámico, son utilizados generalmente en los hospitales para tratar infecciones severas, esta familia de antibióticos lo conforman: Imipenem, Meropenem, Ertapenem, faropenem, Doripenem, Panipenem, Panipenem-Betaniprom. Como primer carbapenem en salir al mercado fue Imipenem –cilastatina que por sus características de amplio espectro fue el más utilizado especialmente en infecciones graves del ambiente hospitalario, ya para el año 1994 ingresó al mercado Meropenem que presentó mejores ventajas que Imipenem, aparte de ello mostró un excelente perfil de tolerancia. (Díaz Tello, 2008).

Ertapenem es uno de los más actuales del grupo, si bien es cierto no hay evidencia clínica que soporte su uso frente a *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, Ertapenem actúa específicamente sobre una PBP que no está presente en especies de *P. aeruginosa*. Para el 2007 se comercializa un nuevo betalactámico del grupo de los Carbapenem el Doripenem, quien actúa en la inhibición de la síntesis de la pared celular de la bacteria al inactivar las proteínas de unión a penicilinas, lo que le confiere superioridad frente a Imipenem para *Pseudomonas*. (Perozo Mena, 2014)

Los antibióticos carbapenémicos son betalactámicos que tienen mayor espectro de acción, en muchos casos es la última opción terapéutica frente a infecciones por bacterias resistentes. La resistencia adquirida a los carbapenems resulta de distintos mecanismos, que incluyen la inactivación enzimática y la disminución de la concentración del antimicrobiano en el sitio blanco. La importancia relativa de cada mecanismo de resistencia es variable y en muchos casos coexisten más de un mecanismo. Sin embargo, la producción de carbapenemasas de clase A, B y D sigue siendo, el mecanismo de resistencia al carbapenem más importante clínicamente. (Kamel, El-Tayeb, & El-Ansary, 2018).

1.3.6. Carbapenemasas

Ambler los clasifica molecularmente en clase A, B, y D; todas ellas con características sobresalientes. Las carbapenemasas de clase A o (grupo 2f), confieren una marcada resistencia a los carbapenémicos con un perfil hidrolítico donde incluye al aztreonam y en menor medida a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, son inhibidas por el ácido fenil borónico; dentro de este grupo la enzima KPC es de mayor importancia clínica porque hidroliza de forma eficiente penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Es preciso mencionar que el APB, se utiliza para el reconocimiento fenotípico, otro dato importante sobre APB es que su inhibición no es exclusiva de las enzimas KPC ya que también es un inhibidor eficiente de las betalactamasas de tipo AmpC. Las primeras carbapenemasas de clase B, fueron de origen plasmídico las IPM y VIM, dentro de este grupo tenemos la más reciente denominada Nueva Delhi-tipo1, que ha generado un gran impacto clínico debido al perfil multirresistente o panresistente, todas las enzimas de este grupo son consideradas Metalobetalactamasas, su perfil hidrolítico de las metalo-enzimas incluyen todos los antibióticos betalactámicos, a diferencia de las enzimas de clase A, estas no hidrolizan al aztreonam; son inhibidas por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA. Finalmente tenemos a las de clase D u Oxacilinasas,

entre ellas destacan algunas variantes que hidrolizan carbapenémicos, dentro de este grupo tenemos a las más importantes: OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 y en menor medida, OXA-51 descritas en *Acinetobacter spp.* y OXA-48 descrita en enterobacterias. La detección fenotípica de este grupo es muy compleja ya que la hidrólisis a los carbapenémicos es poco eficiente e inexistente para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. En aislados de *Acinetobacter spp.* que presentan OXA-23, OXA-24, OXA-58 u OXA-143 suelen presentar en el antibiograma unos valores de MIC elevados a Imipenem y Meropenem. En *P. aeruginosa* las carbapenemasas de tipo OXA tienen menos importancia que en el género *Acinetobacter*. (Calvo, Cantón, Fernández Cuenca, Mirelis, & Navarro, 2011).

1.4. Detección fenotípica de carbapenemasas.

La resistencia a los carbapenems puede evaluarse mediante sistemas automatizados de microbiología, sin embargo, las concentraciones inhibitorias mínimas altas o bajas (CIM) no reflejan necesariamente la producción de carbapenemasas; actualmente contamos con protocolos estandarizados como CLSI(Clinical and Laboratorio Standards Institute) que ha recomendado pruebas fenotípicas fáciles de aplicar en los laboratorios de microbiología entre ellos contamos con la prueba de Hodge modificada (MHT) , la prueba de NP de Carba (CNPt), método modificado de inactivación de los carbapenémicos(mCIM), para controlar las carbapenemasas con fines de control epidemiológico o de infección. (Sun, Xu, Yan, & Zhang, 2017).

Para identificar fenotípicamente las enzimas carbapenemasas hay que evaluar muchos factores, como el perfil de susceptibilidad de la cepa problema, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local, muy importante es conocer la identidad del microorganismo al que se pretende detectar las enzimas carbapenemasas. (Calvo, Cantón, Fernández Cuenca, Mirelis, & Navarro, 2011)

1.4.1. Test de Hodge Modificado.

Fue descrito por Lee y colaboradores en el 2000, es llamada modificada porque se realizaron cambios en el procedimiento, la cepa indicadora ATCC 25923 se sustituyó por el de *Escherichia coli* ATCC 25922 y el disco de penicilina se cambió por el de Imipenem de 10 ug, este test es empleado para confirmar si el mecanismo de resistencia es debido a la presencia de enzimas carbapenemasas. (Lee K. , Lim, Yong, Yum, & Chong, 2001).

A partir de una cepa calificada de *E. Coli* ATCC 25923 se realiza una suspensión con solución fisiológica y lo llevamos a 0.5 escala de Mc Farland, luego inocular con ella una placa de agar Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones para técnica de difusión en disco; colocar en el centro de la placa un disco de Imipenem, Meropenem o Ertapenem, con un asa estéril tomar de 3 a 5 colonias de la cepa problema , realizar una estría desde el borde hasta el centro de la placa sin tocar el disco carbapenémico. Finalmente incubar a 35°C durante 16 a 20 horas. (Calvo, Cantón, Fernández Cuenca, Mirelis, & Navarro, 2011).

1.4.2. Test de Sinergia de doble disco.

Aplicada y descrita el 2000 por Arakawa y colaboradores, ellos recomendaron el uso de ceftazidima y discos de ácido 2-mercaptopropiónico para el desarrollar la prueba. Al año siguiente, Lee y colaboradores utilizaron sensidisco de Imipenem y acido etilendiaminotetraacético, para desarrollar la prueba. Posteriormente en el año 2003, se evaluó el desempeño del método usando un disco de EDTA de 750ug más SMA de 2mg; concluyendo que este último tiene una mejor performance para detectar enzimas carbapenemasas. (Lee K. , Lim, Yong, Yum, & Chong, 2003).

A partir de una cepa control de *E. Coli* ATCC 25923 realizar una suspensión con solución salina y llevarlo a 0.5 escala de Mc Farland, inocular con ella una placa de agar Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones para técnica de difusión

en disco; colocar los discos de Imipenem y Meropenem-EDTA si buscamos carbapenemasas de tipo Metalobetalactamasas, si buscamos serincarbapenemasa utilizar APB en cambio de EDTA. Finalmente llevamos a incubación por 18 a 24 horas a 35°C. (Calvo, Cantón, Fernández Cuenca, Mirelis, & Navarro, 2011)

1.4.3. Metodo modificado de inactivacion del Carbapenem.

Diversos métodos fenotípicos se encuentran descritos en el documento del CLSI M100S 27th Ed, tabla 3D, el cual tiene por objetivo la detección de enzimas carbapenemasas; uno de los más recientes es el método modificado de inactivación de carbapenems o mCIM, dicho test ha demostrado ser confiable para detectar la producción de carbapenemasas en *P. aeruginosa*. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

Las modificaciones que se realizaron al método que inicialmente fue descrito por Zwaluw y colaboradores en el 2015, son las siguientes: Se sustituye el agua estéril de 400 µL por 2 mL de caldo tripticasa de soya, la suspensión de TSB y el disco, se incuba por 4 horas a 35°C, lo que inicialmente fue por 2 horas a 35°C. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).3).”Si la cepa sospechosa se tratase de *Pseudomona aeruginosa*, tomar el inóculo con un asa de 10 µL para realizar la suspensión en 2 ml de caldo TSB”. (CLSI, 2018)

2. Justificación de la investigación

Los microorganismos gram negativas no fermentadoras, ocupan el primer lugar como agentes principales de múltiples infecciones sobre todo en el ambiente hospitalario, son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia a los antibióticos, en los últimos años la aparición de cepas bacterianas con un perfil multirresistente ha cobrado muchas vidas, lo cual a generado una gran alarma a nivel mundial

El propósito de la investigación fue determinar la presencia de enzimas carbapenemasas en bacterias gram negativas no fermentadoras, aisladas en los servicios críticos de UCI y UCIN, del Hospital Regional Docente de Cajamarca durante el periodo de agosto a diciembre del 2018.

Es de vital importancia distinguir si la resistencia a los antibióticos carbapenémicos es mediada por enzimas carbapenemasas o por otros mecanismos de resistencia ya que los genes que codifican estas bacterias se encuentran con mayor frecuencia en plásmidos y pueden transferirse entre especies rápidamente.

En la actualidad nuestra Región de Cajamarca no cuenta con estudios previos sobre este problema de resistencia antimicrobiana y ello no permite evaluar y comparar la prevalencia e incidencia de carbapenemasas en estos microorganismos, es por eso la iniciativa y la necesidad de realizar este estudio que nos ayudará a comprender y tomar medidas de acción frente a nuestra realidad.

Por todo lo mencionado y la poca información sobre la situación de la multirresistencia en la Región de Cajamarca; se considera de vital importancia identificar estas enzimas, mediante métodos rápidos y de bajo costo, como es el caso de los métodos fenotípicos, de esta manera se pretende dar a conocer a toda la comunidad médica Cajamarquina acerca de la situación actual de la resistencia antimicrobiana en dicho nosocomio y evitar brotes intrahospitalarios en nuestra Región.

3. Problema

¿Cómo determinar la presencia de carbapenemasas en bacterias gram negativas no fermentadoras, aisladas en unidades críticas del Hospital Regional Docente Cajamarca, agosto a diciembre - 2018?

4. Conceptualización y operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de medición	Instrumento
Carbapenemasas	Son enzimas que hidrolizan a todos los antibióticos betalactámicos, como penicilinas, cefalosporinas y carbapenems.	Se agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler y grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010.	Clase A grupo funcional 2f: Serincarbapenemasa.	Sinergia con APB	Nominal	1. ficha de actividad carbapenemasas.
			Clase B grupo funcional 3: Metallo-betalactamasa.	Sinergia con EDTA		
			Clase D grupo funcional 2df: Oxacilinasas	Test de inactivación del carbapenem		

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Determinar la presencia de carbapenemasas en bacterias gram negativas no fermentadoras, aisladas en unidades críticas del Hospital Regional Docente Cajamarca, agosto a diciembre - 2018.

5.2. Objetivos específicos

- Identificar el tipo de muestra biológica, en aislados de bacterias gram negativas no fermentadoras, periodo de agosto a diciembre -2018.
- Identificar la procedencia de la muestra, en aislados de bacterias gram negativas no fermentadoras, periodo de agosto a diciembre-2018.
- Determinar la producción de Carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *pseudomona flourences/putida*, periodo de agosto a diciembre-2018.
- Identificar la producción de Carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *pseudomona flourences/putida*, según 3 métodos diferentes: test de sinergia de doble disco con EDTA, método de Hodge modificado con cepa ATCC 700603 y test modificado de inactivación del carbapenem.

METODOLOGÍA

2.1. Tipo y diseño de la investigación

Estudio de tipo observacional, descriptivo, de corte transversal y retrospectivo.

El diseño es no experimental.

2.2. población – Muestra

2.2.1. Población

Conformada por todos los aislamientos clínicos de microorganismos gram negativos no fermentadoras, que se aislaron en las unidades críticas del Hospital Regional Docente de Cajamarca en el periodo de agosto a diciembre -2018.

2.2.2. Muestra

Todos los aislamientos clínicos de microorganismos gram negativos no fermentadoras, que presentaron resistencia a los carbapenemes (Ertapenem, Meropenem, Imipenem) con una concentración mínima inhibitoria igual o mayor a 4 ug/ml, identificados mediante el sistema MicroScan-AutoScan4.

2.2.3. Tipo de muestreo

No probabilístico por conveniencia

2.2.4. criterios de selección

2.2.4.1. Criterios de inclusión

Todos los aislamientos clínicos de microorganismo gram negativos no fermentadoras, que presentaron resistencia a los carbapenemes (Ertapenem, Meropenem, Imipenem) con una concentración mínima inhibitoria igual o mayor a 4 ug/ml, identificados mediante el sistema MicroScan-AutoScan4.

2.2.4.2. Criterios de exclusión

Aislamientos clínicos que no pudieron ser recuperados de la preservación en crioviales y aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia*, no se consideraron en el estudio por ser resistentes naturales a los carbapenems.

2.3. Técnicas e instrumentos de investigación

2.3.1. Técnicas

Los datos fueron obtenidos del cuaderno de trabajo del servicio de microbiología del hospital Regional Docente de Cajamarca y de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de la base de datos del Sistema automatizado MicroScam-AutoScan4. Se imprimieron todos los resultados positivos de bacterias gram negativas no fermentadoras con resistencia tanto a imipenem, Meropenem y Ertapenem, en el periodo de agosto a diciembre del año 2018, de los datos que se generaron se recolectaron las cepas bacterianas que cumplieron con los criterios de inclusión para su posterior aplicación de los ensayos fenotípicos.

2.3.2. Instrumento

La recolección de datos de los resultados de los métodos fenotipos será a través de la ficha que indica actividad carbapenemasa. (ficha de recolección de datos – ver anexo 04)

2.3.3. Procesamiento y análisis de la información

Para el registro de datos se utilizó el programa Microsoft Excel 2016, el cual nos permitirá hacer uso eficiente de las herramientas principales existentes para el presente estudio. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 25, teniendo en cuenta las variables en estudio.

2.3.4. Procesamientos de muestras biológicas

2.3.4.1. Selección y conservación de cepas.

Se recolectaron y seleccionaron un total de 67 aislamientos de microorganismos gram negativas no fermentadoras, de los cuales 02 fueron *Stenotrophomonas maltophilia* (éstas presentan resistencia natural a los carbapenemes) y 18 cepas bacterianas no se recuperaron de la preservación de los crioviales, por lo tanto sólo se incluyeron 41 aislamientos en el estudio, todos ellos resistentes a Meropenem, imipenem y Ertapenem con una concentración mínima inhibitoria igual o mayor a 4 ug/ml, identificados mediante el sistema semiautomatizado MicroScan-AutoScan4, las cepas fueron recuperadas en el periodo de febrero y marzo del 2019 y pertenecieron a pacientes atendidos en el Hospital Regional Docente de Cajamarca de los servicios críticos de UCI Y UCIN. Dentro del estudio fueron considerados los aislamientos recuperados de diferentes líquidos biológicos: Sangre, cultivos de secreción bronquial, aspirados bronquiales y cultivos de aspirado traqueal. Los aislamientos fueron conservados en Caldo Tripticasa de Soya (Marca: CYR laboratorios/Lot:103019 F.V: marzo – 2022) más glicerol al 20%, luego almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

2.3.4.2. Recuperación de los aislamientos.

Los aislamientos conservados, fueron recuperados en Agar Tripticasa de Soya (TSA) e incubados a 35°C por 24 horas.

2.3.4.3. Detección fenotípica de carbapenemasas

Test de Sinergia de doble disco.

Se realizó el test de sinergia de doble disco utilizando sensidisco de EDTA comercial de marca Bioanalyse (EDTA 750MCG X50 und. Lot:181231K F. V:30-12-2020). Para cada cepa bacteriana se realizó el procedimiento estándar de un antibiograma, en una placa de Agar Mueller Hinton (marca Himedia x

500gr.Lot:0000341708 F. V: mayo-2023). Se consideraron productoras de carbapenemasas aquellas que mostraron la expansión del halo de inhibición de crecimiento (sinergia) de las bacterias analizadas en la región entre los antibióticos y el inhibidor.

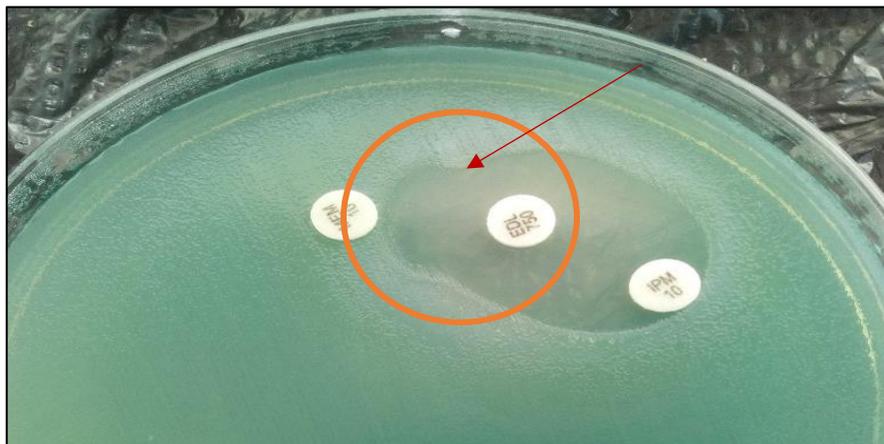


Figura 1. Detección de carbapenemasa tipo metalcarbapenemasa en aislado de *Pseudomona aeruginosa* (cepa perteneciente al estudio) se puede observar el efecto sinérgico entre meropenem y EDTA, lo cual confirma la presencia de la enzima de tipo metalobetalactamasa.

Fuente: fotos del investigador

Test de Hodge modificado con cepa ATCC 700603

Teniendo en cuenta las recomendaciones de Pasterán y colaboradores, en el año 2011 y Yauri Córdor (2016). Se realizó una suspensión de la cepa ATCC 700603 con una turbidez de 0.5 escala de McFarland. Luego, se inoculó la suspensión en una placa de Mueller-Hinton, se colocó un disco de Meropenem en el centro y se realizó una estría de 2-3cm de la muestra (3 a 5 colonias de la muestra problema). Finalmente, se llevó a incubar $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: positivo, si había presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora de lo contrario, negativo.

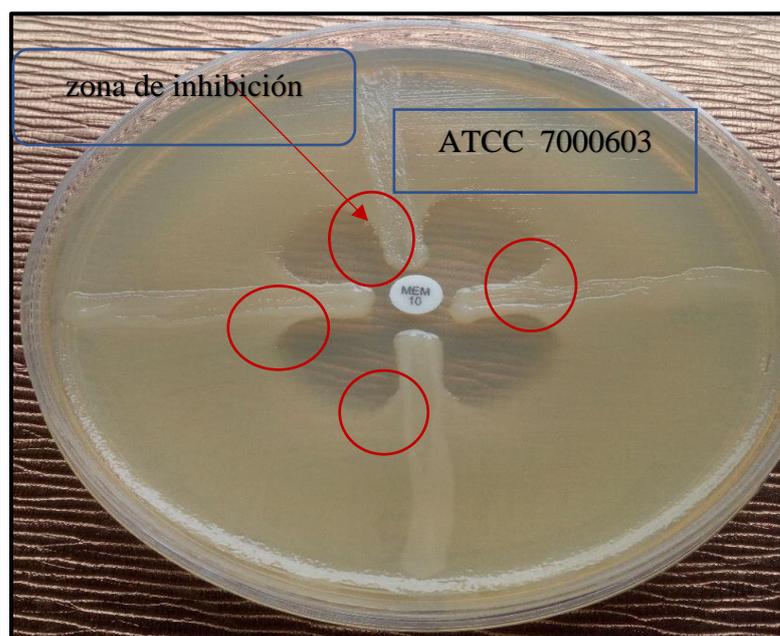


Figura 2. Detección de carbapenemasa mediante el test de Hodge modificado con cepa ATCC700603, en aislados de *Acinetobacter baumannii*, (cepas pertenecientes al estudio). Podemos observar la presencia de una zona de inhibición distorciónada a los lados de las estrías, cada estría representa una cepa problema, lo cual indica la presencia de la enzima carbapenemasa.

Fuente: fotos del investigador

Test modificado de inactivación del carbapenem

Es uno de los más recientes métodos fenotípicos recomendados por la CLSI para detectar la producción de enzimas carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, en nuestro estudio demostró que también es útil en aislados de *Acinetobacter baumannii*.

Carbapenemasa positiva: Halo 6-15 mm o presencia de colonias dentro de un halo de 16-18 mm.

Carbapenemasa negativa: Halo ≥ 19 mm.

Indeterminado: Halo 16-18 mm (no se puede confirmar si el aislamiento es o no es productor de carbapenemasa) (CLSI, 2018).

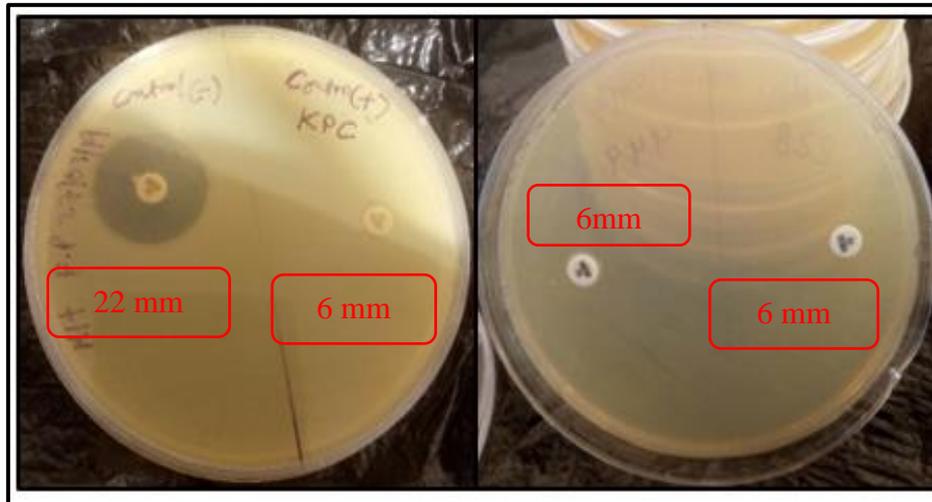


Figura 3. Detección de carbapenemasa mediante el test modificado de inactivación del carbapenem en aislados de *Acinetobacter baumannii*, (cepas pertenecientes al estudio). Se puede observar (lado izquierdo) test positivo de una cepa tipificada molecularmente que contiene la enzima KPC que en el estudio se usó como control positivo y vemos también una cepa negativa, al (lado derecho) cepas en estudio con la presencia de la enzima carbapenemasa.

RESULTADOS

De un total de 41 cepas de bacterias gram negativas no fermentadoras, aisladas en las unidades críticas del Hospital Regional Docente de Cajamarca, que provinieron de muestras biológicas como secreciones de vías respiratorias y hemocultivos; obtuvimos los resultados que presentamos a continuación.

En la Tabla 1, se observa que de las 41 cepas bacterianas trabajadas en el estudio el 90,2 % (37) son productoras de carbapenemasas y el 9,8% (4) no presentan la enzima carbapenemasa.

Tabla1. Carbapenemasas en BGNNF, aisladas en UCI Y UCIN del HRDC, agosto a diciembre 2018.

Carbapenemasas en BNF	N°	%
Positivo	37	90,2
Negativo	4	9,8
Total	41	100,0

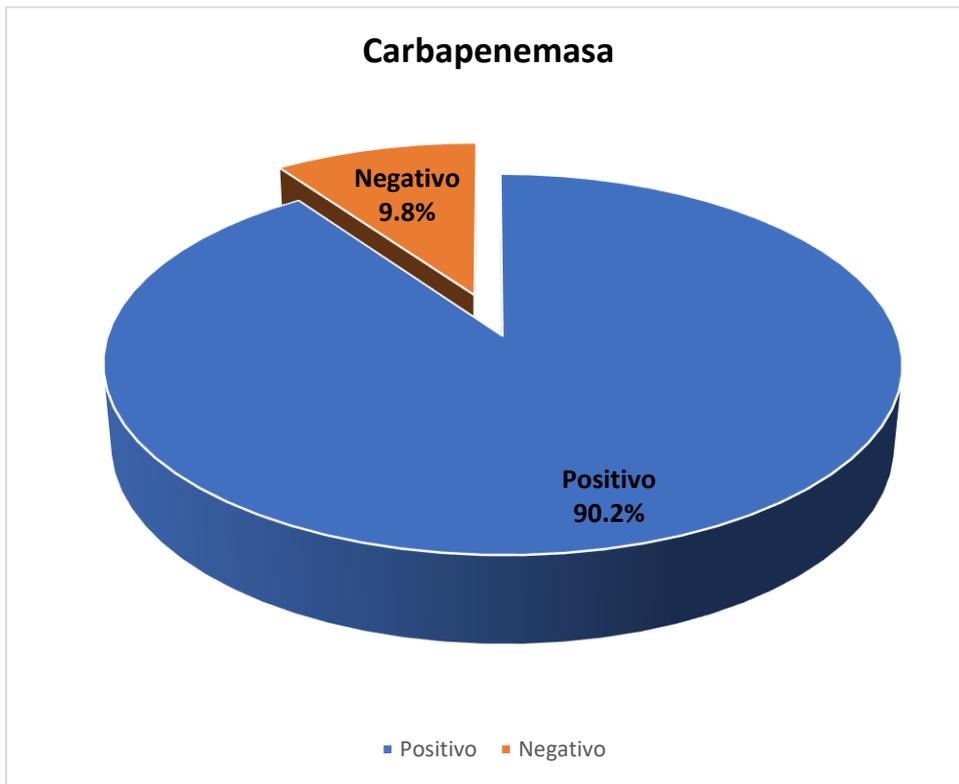


Figura 4. Carbapenemasas en BGNNF, aisladas en UCI Y UCIN del HRDC, agosto a diciembre 2018.

En la Figura 4, se observa que el 90,2 % de microorganismos gram negativos no fermentadoras presentan la enzima carbapenemasa y el 9,8%, no presentan la enzima carbapenemasa.

En la tabla 2, en cuanto al tipo de muestra biológica de un total de 41 cepas bacterianas, el mayor porcentaje de aislamientos bacterianos se observó en secreciones bronquiales con un 75,6% (31), seguidamente de aspirado bronquial 9,5% (8) y en menor porcentaje fueron los hemocultivos con 2,4% (1) y secreción traqueal con 2,4% (1).

Tabla 2. Tipo de muestra biológica, en los aislados de BGNNF, período de agosto a diciembre 2018.

Tipo de muestras	N°	%
Aspirado Bronquial	8	19,5
Hemocultivo	1	2,4
Secreción Bronquial	31	75,6
Secreción Traqueal	1	2,4
Total	41	100,0

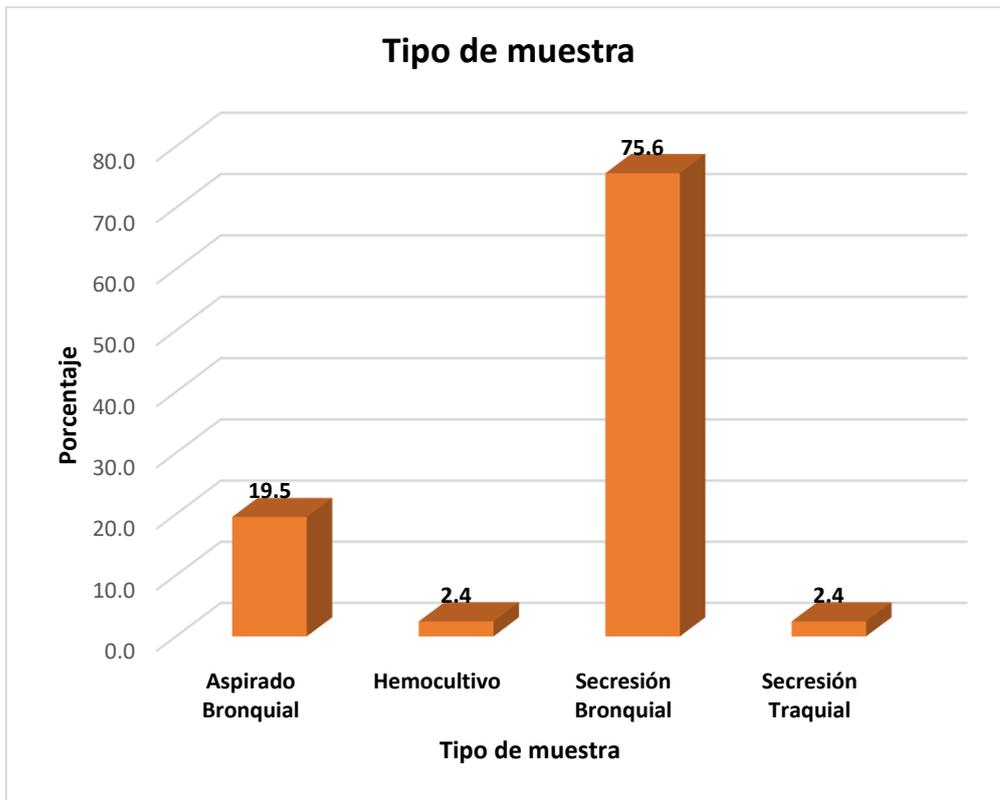


Figura 5. Tipo de muestra biológica, en los aislados de BGNNF, período de agosto a diciembre 2018.

En el Figura 5, en cuanto al tipo de muestra biológica, el mayor porcentaje de aislamientos se dio en secreciones bronquiales con 75,6%, seguidamente de aspirado bronquial con 19,5%; y con un menor porcentaje fueron los hemocultivos con 2,4%; y secreción traqueal con 2,4%.

En la Tabla 3, Con respecto al servicio de procedencia de la muestra, de las 41 muestras biológicas, se observa que el servicio con mayores aislamientos de bacterias gram negativas no fermentadoras es la Unidad de cuidados intensivos (UCI) 22 (53,7%); seguidamente la unidad de cuidados intermedios (UCIN) 15 (36,6%).

Tabla 3. *Procedencia de la muestra, en aislados de BGNNF, periodo de agosto a diciembre 2018.*

Tipo de servicio	Positivo		Negativo		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
UCI	22	53,7	0	0,0	22	53,7
UCIN	15	36,6	4	9,8	19	46,3
Total	37	90,2	4	9,8	41	100,0

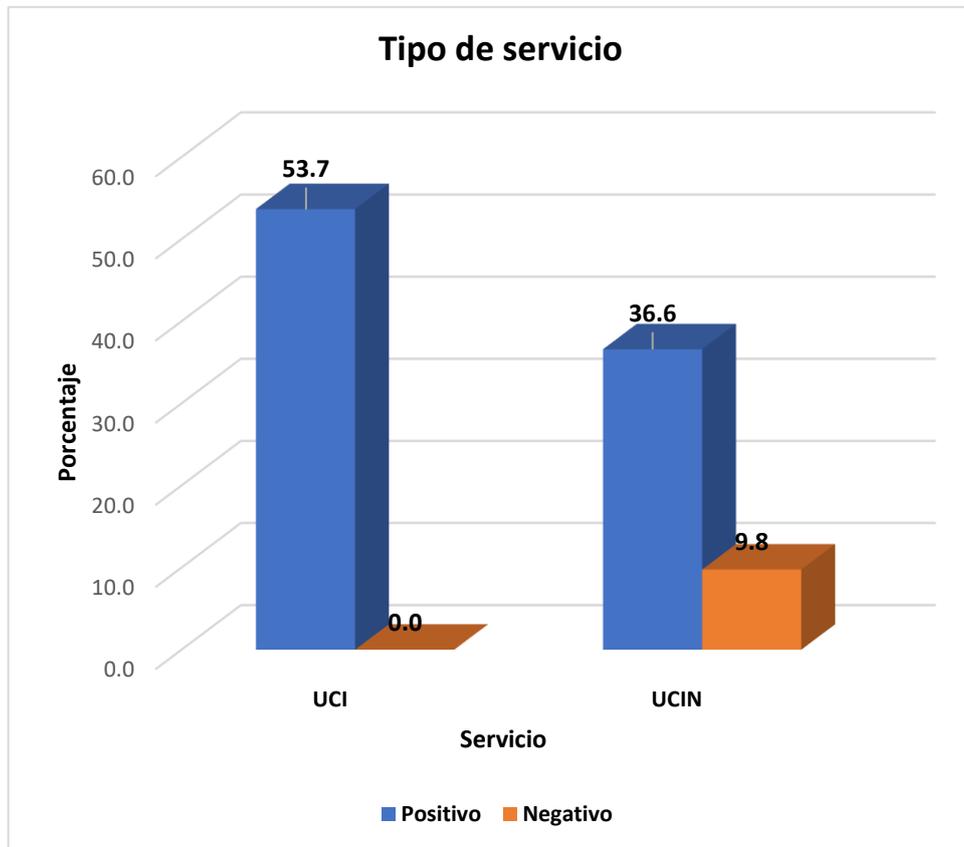


Figura 6. Procedencia de la muestra, en aislados de BGNNF, periodo de agosto a diciembre 2018.

En la Figura 6, se observa que el servicio con mayor porcentaje de microorganismos gram negativas no fermentadoras es la Unidad de cuidados intensivos (UCI) con 53,7%; seguidamente de la unidad de cuidados intermedios (UCIN) con 36,6%.

En la Tabla 4, se observa; de las 37 cepas productoras de carbapenemasas, se pudo evidenciar que 32 de ellas, expresadas en porcentajes de 86,5% pertenecieron a *Acinetobacter baumannii* ,4 correspondientes a 10,8% pertenecieron a *Pseudomonas aeruginosa* y 1 correspondiente al 2,7% perteneció a *Pseudomona flourences/putida*.

Tabla 4. Producción de Carbapenemasas en BGNNF, aisladas en HRDC, agosto a diciembre 2018.

Bacterias no fermentadoras productoras de Carbapenemasas	Positivo		Negativo		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
Acinetobacter baumannii	32	86,5	0	0,0	32	78,0
Pseudomona aeruginosa	4	10,8	4	100,0	8	19,5
Pseudomona flourences/putida	1	2,7	0	0,0	1	2,4
Total	37	100,0	4	100,0	41	100,0

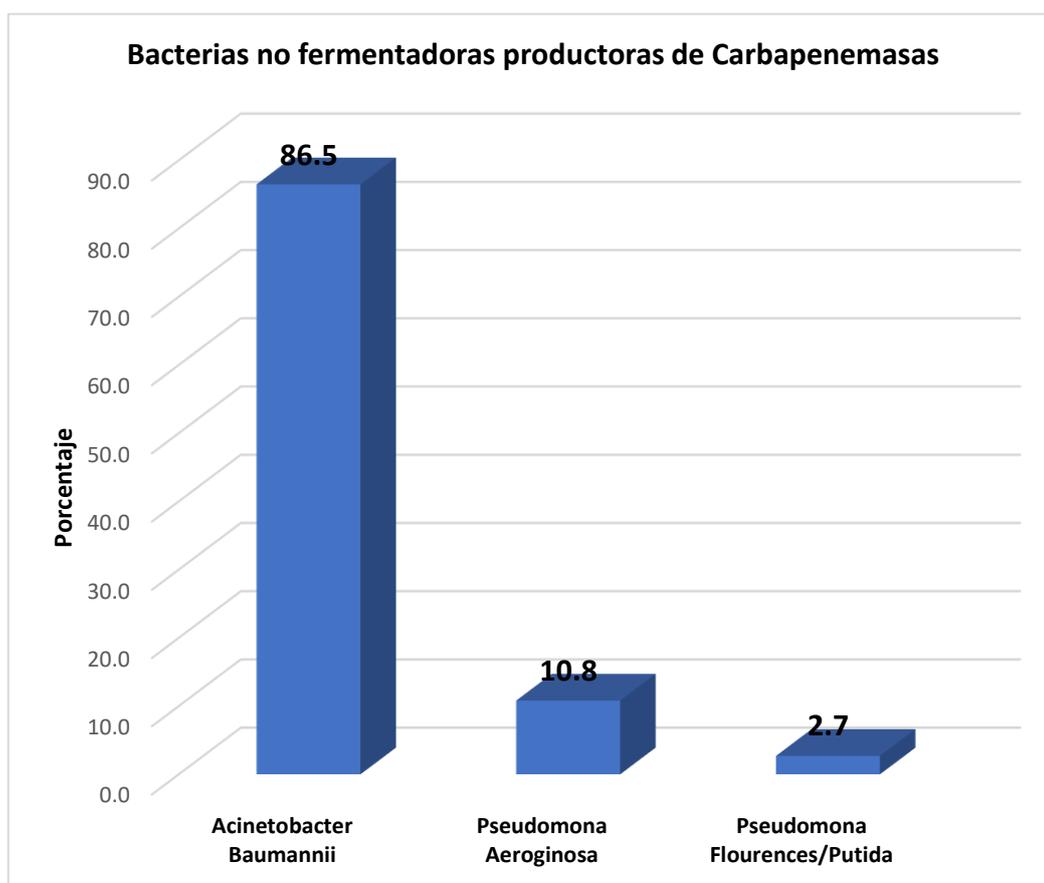


Figura 7. Producción de Carbapenemasas en BGNNF, aisladas en HRDC, agosto a diciembre 2018.

En la Figura 7, se puede observar que *Acinetobacter baumannii* con un 86,5% produce mayor porcentaje de carbapenemasas, seguidamente de *Pseudomona aeruginosa* con 10,8%, finalmente *Pseudomona flourences/putida* con 2,7%.

En la Tabla 5, observamos, que al aplicar el test de Hodge modificado con cepa indicadora *K. pneumoniae* ATCC 700603 se identificó 33(80,5%) aislamientos positivos, 5(12,2%) aislamientos negativos y 3(7,3%) como indeterminados, el test de sinergia de doble disco utilizando como inhibidor EDTA detectamos 5 (12,2%) aislamientos positivos y 36 (87,8%) aislamientos negativos, finalmente con el test modificado de inactivación del carbapenem se determinó que 37(90,2%) aislamientos fueron positivos, evidenciando de esta manera que fue el método con mejor desempeño en detectar enzimas carbapenemasas fenotípicamente.

Tabla 5. Producción de Carbapenemasas en BGNNF, según 3 métodos fenotípicos diferentes.

Detección de carbapenemasas – métodos fenotípicos	Test de Hodge Modificado ATCC700603		Test de Sinergia de doble disco-EDTA		Test Modificado de inactivación del carbapenem-mCIM	
	N°	%	N°	%	N°	%
Positivo	33	80,5	5	12,2	37	90,2
Negativo	5	12,2	36	87,8	4	9,8
Indeterminado	3	7,3	0	0,0	0	0,0
Total	41	100,0	41	100,0	41	100,0

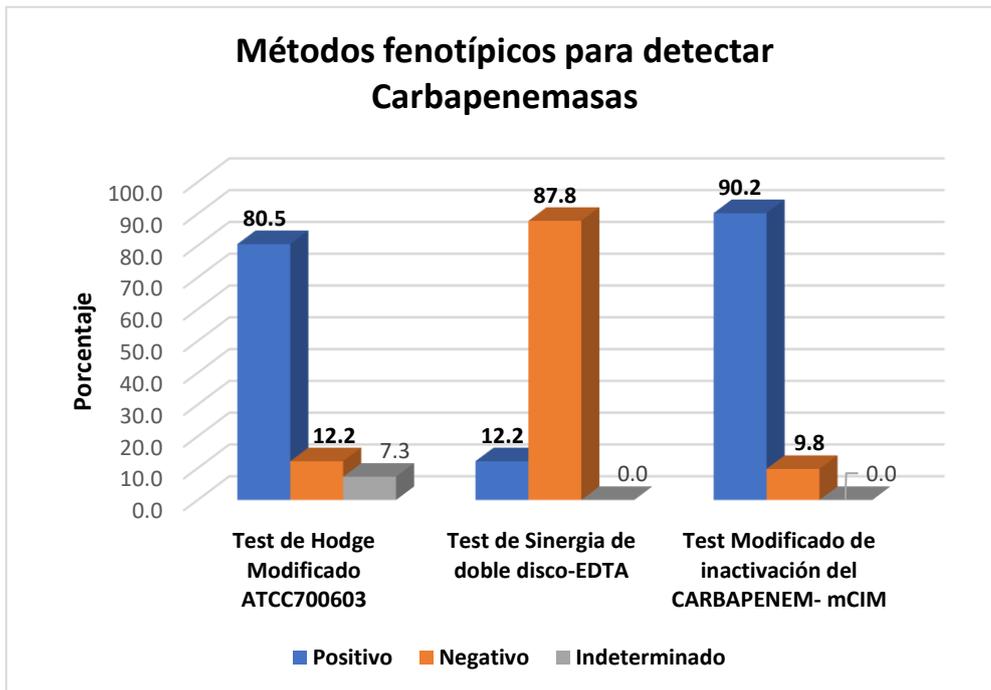


Figura 8. Producción de Carbapenemasas en BGNNF, según 3 métodos fenotípicos diferentes.

En la figura 5, podemos observar los tres métodos fenotípicos que se aplicaron en este estudio para la detección de carbapenemasas de los cuales, el test modificado de inactivación del carbapenem identificó el mayor porcentaje de carbapenemasas con un 90,2 % una cifra muy alta, seguidamente el test de Hodge modificada con cepa ATCC 700603 detecto el 80.5%, finalmente el test de sinergia de doble disco con EDTA detecto solo el 12,2% de carbapenemasas.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis

Los microorganismos gram negativos no fermentadores con resistencias a los carbapenems son estudiados actualmente con mucha preocupación, ya que son causantes de múltiples infecciones severas especialmente en pacientes hospitalizados. El problema no es sólo identificar estos microorganismos multirresistente, también tenemos que lidiar en buscar sus mecanismos de resistencia mediante técnicas muchas veces engorrosas y muy costosas como es el caso de las metodologías genotípicas; no obstante, el CLSI cuenta con guías estandarizadas donde podemos encontrar procedimientos fáciles de implementar en los laboratorios de microbiología y que nos ayudan a identificar fenotípicamente los mecanismos de resistencia presentes en bacterias multirresistente. Mediante el estudio se evidenció el problema de la multirresistencia en 41 cepas de bacterias gram negativas no fermentadores, identificadas en los servicios críticos del Hospital Regional Docente de Cajamarca. La situación actual es bastante preocupante en el caso de *Acinetobacter baumannii* porque todas las cepas en estudio presentaron la enzima carbapenemasa y representaron el 86,6% (32) de los casos, el 10% (4) de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* lo presentaron y el 2,7% (1) de los aislamientos de *pseudomona flourences/putida* también presentaron la enzima.

La confirmación de las enzimas presentes en las bacterias se realizó mediante pruebas fenotípicas ya estandarizadas que encontramos los procedimientos en el CLSI, como test de sinergia de doble disco con EDTA, test de Hodge modificado con cepa ATCC 700603 y test modificado de inactivación del carbapenem, obteniendo como resultado que el 90,2 % (37) de estas bacterias son productoras de carbapenemasas y el 9,8% (4) no presentan la enzima carbapenemasa.

En cuanto al tipo de muestra biológica el mayor porcentaje de aislamientos se obtuvo en secreción bronquial 75,6% (31), seguidamente de aspirado bronquial con

el 19,5% (8) y en menor porcentaje fueron los hemocultivos con el 2,4%(1) al igual que secreción traqueal también con 2,4%(1).

4.2. Discusión

El resultado obtenido en la investigación guarda relación con el estudio realizado por Gastelo en el 2015, ella estudió 53 aislados positivos de bacterias Gram negativas no fermentadoras, la mayoría de ellas procedieron de muestras de secreción bronquial 41 (77,36%) haciendo comparable nuestro estudio. Con respecto al servicio de procedencia de la muestra, de las 41 cepas estudiadas, se observó que el servicio con mayores aislamientos de bacterias gram negativas no fermentadoras es la Unidad de cuidados intensivos (UCI) 22 (53,7%); seguidamente de la unidad de cuidados intermedios (UCIN) 15 (36,6%). Igualmente comparando el estudio realizado por Gastelo (2015) donde se identificaron 53 cultivos de bacterias Gram negativas no fermentadoras, la frecuencia de producción de carbapenemasas fue de 48,00% (24/50), siendo la mayoría procedentes de UCI con un 87,50%. También Carranza (2016) Con respecto al servicio de procedencia de *Pseudomonas aeruginosa* del total de 1658 muestras biológicas, se observa que el servicio con mayor procedencia es la Unidad de cuidados intensivos (UCI) 31 (18%), otro estudio similar es el de Ronquillo en el 2016, él estudió la prevalencia de infecciones por *Acinetobacter baumannii*, los resultados obtenidos según distribución del servicio de hospitalización, el que presentó un mayor porcentaje es la UCI con 42 %, seguidamente por el servicio de medicina interna con 36%.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, de las 8 cepas que se seleccionaron para determinar la presencia de carbapenemasas, 04 (10.8%) cepas tuvieron la enzima carbapenemasa tipo Metalobetalactamasas, evaluadas con los discos de imipenem, Meropenem y EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético). Nuestro resultado es muy similar con el trabajo realizado en Lambayeque por Gastelo (2015) quien evaluó 29 cepas de *pseudomona aeruginosa* de las cuales se seleccionaron 17 siguiendo los criterios de la CLSI-2015, teniendo como resultado que 03 (12.50%) cepas sí tuvieron la enzima carbapenemasa tipo Metalobetalactamasas, evaluadas con la

misma metodología usando discos de antibiótico imipenem, meropenem y EDTA. A diferencia de Carranza & Vásquez en el 2017, quienes evaluaron a 150 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de las cuales 80 (53.3%) fueron sospechosas de carbapenemasas teniendo como resultado que 77 (96%) fueron negativas y solo 3 (4%) fueron positivas para carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas utilizando la metodología del efecto sinérgico entre imipenem y meropenem y EDTA.

Resultados obtenidos de investigaciones internacionales como el de Molin en el 2013 estudio realizado en Paraguay, de un total de 232 aislamientos de *P. aeruginosa*, 54 cepas fueron seleccionadas en el estudio por ser sospechosas de carbapenemasas y solo 30 de ellas dieron sinergia por la técnica de doble disco con EDTA confirmándose que son productoras de metalcarbapenemasa.

En el caso de *Acinetobacter baumannii* los resultados fueron muy alarmantes, de las 32 cepas en estudio todas presentaron la enzima carbapenemasa, lo cual se confirmó con el test modificado de inactivación del carbapenem recomendada por la CLSI M100 Ed28. Los resultados son similares a estudios nacionales como internacionales, el problema de la multirresistencia que presenta *Acinetobacter baumannii*, es por la sobreexpresión de los fármacos, bombas de eflujo, agregando a ello la disminución de la permeabilidad de la membrana.

Finalmente, en cuanto a los métodos utilizados para la detección de carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens/putida*, fueron 3 los test desarrollados: Test de sinergia de doble disco con EDTA, test de Hodge modificado con cepa ATCC 700603 recomendado por Pasteran y colaboradores (2011) y Yauri Condor (2016) y test modificado de inactivación del carbapenem, todos ellos recomendados y validados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de esta manera se garantizan los resultados confiables en esta investigación. En cuanto a estudios de detección fenotípica de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* tenemos a Córdova (2017), Gastelo (2015) y Aguilar y colaboradores (2014) con resultados similares a nuestro estudio. Métodos fenotípicos para detección de *Acinetobacter*

baumannii no se encontró muchos estudios, si bien es cierto el método modificado de inactivación del carbapenem la CLSI no lo recomienda en *Acinetobacter baumannii* por presentar muchos falsos negativos, no obstante, nuestro estudio demostró todo lo contrario ya que fue el método que identifico mayor porcentaje de cepas con carbapenemasas tanto en *Pseudomona aeruginosa* y especies como también en *Acinetobacter baumannii*. Casas y castillo en el 2018 demostraron en su estudio que mediante el método de inactivación del carbapenem todos los aislados de *Acinetobacter baumannii* 51/51 (100%) presentaron la enzima carbapenemasa, demostrando una vez más que nuestros resultados son comparables con otros estudios previos.

Los resultados en nuestra investigación evidencian que la presencia de carbapenemasas en las especies de *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona flourences/putida*, es relativamente baja en comparación con *Acinetobacter baumannii*. Sin embargo, contar con estas cepas multirresistente en nuestro Hospital Regional De Cajamarca nos debe preocupar porque son una amenaza sustancial para la salud de los pacientes, teniendo en cuenta que los genes que codifican estas bacterias se encuentran con mayor frecuencia en plásmidos y estos pueden transferirse entre especies muy rápidamente.

Si bien es cierto los resultados obtenidos pertenecen a un periodo corto y la situación epidemiológica es diferente en cada hospital, no obstante, debemos impulsar la vigilancia permanente y realizar estrategias para erradicar estas bacterias multirresistente de nuestra Región.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. Se llega a la conclusión que, en el Hospital Regional de Cajamarca, existen bacterias multirresistente productoras de las enzimas carbapenemasas, nuestro estudio lo demuestra, como vemos los porcentajes son muy altos; de 41 cepas bacterianas en estudio durante el periodo de agosto a diciembre del 2018, el 90,2 % (37) son productoras de carbapenemasas.
2. En cuanto al tipo de muestra biológica de un total de 41 cepas bacterianas, el mayor porcentaje de aislamientos positivos se presentó en secreciones bronquiales 31 (75,6%), seguidamente de aspirado bronquial 8 (19,5%) y con un menor porcentaje fueron los hemocultivos 1 (2,4%), al igual que secreción traqueal 1 (2,4%).
3. Con respecto al servicio de procedencia de la muestra se observó que el servicio con mayores aislamientos positivos de bacterias gram negativas no fermentadoras es la Unidad de cuidados intensivos (UCI) 22 (53,7%); seguidamente de la unidad de cuidados intermedios (UCIN) 15 (36,6%).
4. En cuanto a la producción de carbapenemasas se concluye, que *Acinetobacter baumannii* con un 86,5% produce mayor porcentaje de carbapenemasas, seguidamente de *Pseudomona aeruginosa* con 10,8%, finalmente *Pseudomona flourences/putida* con 2,7%.
5. El método fenotípico con mejor desempeño en detectar carbapenemasas fue el test modificado de inactivación del carbapenem ,se determinó que 37(90,2%) aislamientos fueron positivos, seguidamente se observó que el test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *K. pneumoniae* ATCC 700603 identificó 33 (80,5%) aislamientos positivos, 5(12,2%) aislamientos negativos y 3 (7,3%) como indeterminados, finalmente el test de sinergia de doble disco utilizando como inhibidor EDTA detectó 5 (12,2%) aislamientos positivos y 36 (87,8%) aislamientos.

5.2. Recomendaciones

- 1.** Monitorizar constantemente la vigilancia epidemiológica en dicho nosocomio para poder conocer la incidencia y prevalencia de microorganismos multirresistente, de esta manera se evitarán brotes hospitalarios.
- 2.** Complementar este estudio con métodos de biología molecular para así conocer con mayor exactitud qué tipos de genes son los más predominantes en dicho nosocomio.
- 3.** Capacitar al personal de laboratorio de microbiología del Hospital Regional Docente de Cajamarca, para poner en práctica métodos estandarizados que ayuden a identificar tempranamente bacterias multirresistente con metodologías fáciles de implementar y de bajo costo.
- 4.** Se deben estrechar las medidas de contención primaria, especialmente las técnicas de lavado de manos, la desinfección y esterilización de equipos en las unidades críticas del Hospital Regional Docente de Cajamarca, para evitar la transmisión cruzada.
- 5.** Mejorar la desinfección e esterilización en todas las áreas de UCI y UCIN, de dicho nosocomio para así evitar la propagación de cepas multirresistente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fifth Informational supplement M100-S25. Wayne, PA: CLSI; 2015. [Google Scholar].
- Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., & Goto, M. (2000). Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *Journal of Clinical Microbiology.*, 38(1):40-3.
- Caldera Gutiérrez, F., & Robles Cortes, D. (Enero - Diciembre de 2014 - 2016). Caracterización fenotípica de bacilos gram negativos resistentes a carbapenemasas procedentes de la red Nicaraguense vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, Nicaragua, enero del 2014 - diciembre del 2016. Nicaragua: (Tesis).
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández Cuenca, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. España: Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades 2da ed. ed2011.
- Carranza Vasquez, S. M., & Vasquez Quispe, W. I. (2017). Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en aislados de pacientes hospitalizados de un Hospital Nacional en San Juan de Miraflores de enero a junio, Lima-2017. Lima, Peru: (tesis).
- Casas Moya, G. D., & Castillo Pardo, K. F. (diciembre - marzo de diciembre 2017 – marzo 2018). Prevalencia de genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like y blaOXA-58-like en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos de un Hospital Nacional de Referencia en Lima durante diciembre 2017 – marzo 2018. Lima-Peru: (tesis).

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI document M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. 13th ed. CLSI standar M02. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Díaz Tello, J. A. (2008). Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008. Lima, Peru: (Tesis).
- Elbrolosy, A., Labeeb, A., & Hassan, D. (11 de Febrero de 2019). New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter* isolates among late-onset VAP patients: multidrug-resistant pathogen and poor outcome. *Infection and drug resistance*, 12, 373–384. doi:10.2147/IDR.S186924.
- Gonzales Escalante, E. (2013). Detección y Caracterización Molecular de Metallo- β -lactamasas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados en el Instituto Nacional de Salud del Niño Lima-Peru. Lima, Peru: (Tesis).
- Kamel, N., El-Tayeb, W., & El-Ansary, M. (2018). Phenotypic screening and molecular characterization of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli recovered from febrile neutropenic pediatric cancer patients in Egypt. *PLoS one*, 13(8), e0202119. doi:10.1371/journal.pone.0202119.
- Lee, K., Lim, Y. S., Yong, D., Yum, J. H., & Chong, Y. (2003). Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10):4623-9.
- Lee, K., Lim, Y., Yong, D., Yum, J., & Chong, Y. (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of

Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clinical Microbiology and Infection.*, 7(2):88-91.

Luis Hernández, E. (2017). Importancia de Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos a nivel hospitalario. *Importancia de Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos a nivel hospitalario*. España.

Luján Roca, D. Á. (2014). Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* , 465-74.

Matta Chusquisapon, M. A. (2018). Detección fenotípica de Carbapenemasas en Acinetobacter spp. de un Hospital de Lima 2016. Lima, Peru: (Tesis).

Medell Gago, M., & Hart Casares, M. (2012). Acinetobacter baumannii versus Pseudomonas aeruginosa. Comportamiento en pacientes críticos con ventilación mecánica. *Revista Cubana de Medicina*, 239-246.

Molin Queste, C. O. (2016). Detección Fenotípica de Carbapenemasas en Pseudomonas aeruginosa en pacientes que acudieron al Hospital de Clinicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 14(1):25-31.

Pasteran, F., Veliz, O., Rapoport, M., Guerriero, L., & Corso, A. (2011). Sensitive and Specific Modified Hodge Test for KPC and Metallo-Beta- Lactamase Detection in Pseudomonas aeruginosa by Use of a Novel Indicator Strain, Klebsiella pneumoniae ATCC 700603. *Journal of Clinical Microbiology.*, 49(12):4301-3.

Peña Navarrete, E. (Abril de 2016). caracterización de Pseudomonas aeruginosa productora de carbapenemasas causante de un brote infeccioso en un Hospital público de la ciudad de Quito, utilizando pruebas fenotípicas ,genotípicas. Quito, Ecuador: (Tesis).

- Perozo Mena, A. (Junio de 2014). Evaluación de Métodos Fenotípicos para la Detección de Carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas en Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Maracaibo, Venezuela: (Tesis).
- Remolina Granados, S., & Escobar Castaño, C. (2017). Descripción de tipos de carbapenemasas expresadas en *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* en Hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá, estudio descriptivo. Bogotá, Colombia: (Tesis).
- Reyes Chacón, J. A., Villacís Acuña, J., Chicaiza Alomoto, S., Satán Salazar, C., Salas Iglesias, S., Ushiña Cueva, L., Escalante Vanoni, S. (2017). Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae. *Infectio*, 21(4): 251-254.
- Ronquillo Pilatasig, S. C. (2016). Prevalencia de infecciones por *Acinetobacter baumannii* multiresistente en pacientes hospitalizados en el Hospital General Enrique Garcés, período Enero 2013 A Enero 2015. Quito, Ecuador.
- Saavedra, S., Duarte, C., Nilse Gonzalez, M., & Realpe, M. (2014). Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas de siete departamentos de Colombia. *Biomedica*, 217-223 doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685>.
- Salvador Luján, G. N. (2017). Identificación de genes de Metalo β -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* de aislados clínicos hospitalarios 2016. Lima, Peru: (Tesis).
- Sun, K., Xu, X., Yan, J., & Zhang, L. (2017). Evaluation of Six Phenotypic Methods for the Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria With Characterized Resistance Mechanisms. *Annals of laboratory medicine*, 37(4), 305–312. doi:10.3343/alm.2017.37.4.305.

- Tijet, N., Patel, S., & Melano, R. (January 2016). Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: Comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, volume 71, Issue 1, 274-276, <https://doi.org/10.1093/jac/dkv283>.
- Uechi, K., Tada, T., Shimada, K., Kuwahara-Arai, K., Arakaki, M., Tome, T., Fujita, J. (2017). A modified carbapenem inactivation method, CIMTris, for carbapenemase production in Acinetobacter and Pseudomonas species. Japan: *Journal of Clinical Microbiology*.55:3405–3410. <https://doi.org/10.1128/JCM.00893-17>.
- van der Zwaluw, K., De Haan, A., Pluister, G., Bootsma, H., De Neeling, A., & Schouls, L. (2015). The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One.*, 10(3):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>.
- Vanegas, J. M., Higueta, L. F., Vargas, C. A., Cienfuegos, A. V., Rodríguez, É. A., Roncancio, G. E., & Jiménez, J. N. (2015). Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis e infecciones de la piel y los tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud.*, vol. 35, núm. 4, 2015, pp. 522-530.
- Yauri Condor, K. S. (2016). Desempeño de cinco métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en bacilos gram negativos tipificados genotípicamente. Lima, Peru: (tesis).

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al Dr. Segundo Nicolás López Chegne – Jefe de Laboratorio clínico del Hospital Regional Docente de Cajamarca y a la Bióloga Gladys Huayán Dávila, por darme las facilidades de obtener las cepas bacterianas para la realización de este estudio.

A mi asesor: Mg. Luis Alberto Flores Neciosup, gracias por su dedicación y paciencia.

A la universidad San Pedro filial-Cajamarca por permitirme hacer uso de los equipos de laboratorio para realizar gran parte de mi proyecto de investigación.

Victoria Marisela Blas Asipali

ANEXOS

Anexo 01. Solicitud para autorización al acceso de datos - Hospital Regional Docente de Cajamarca.

CAJAMA

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

Cajamarca, 22 de abril del 2019

Carta N° 07-2019-USP-CAJIDG.
DOCTOR:
SEGUNDO NICOLAS LOPEZ CHEGNE
JEFE DE LABORATORIO CLINICO DEL HOSPITAL REGIONAL DOCENTE DE CAJAMARCA.

CIUDAD.

Es grato dirigirme a usted para expresarle el cordial saludo a nombre de la Universidad San Pedro Filial Cajamarca, a la vez presentarle a la Bachiller en Tecnología Médica **BLAS ASIPALI, Victoria Marisela**, con código de matrícula N° 2813100066 DNI N° 41713872, quien se encuentra realizando su tesis de investigación titulada: "CARBAPENEMASAS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS NO FERMENTADORAS, AISLADAS EN UNIDADES CRITICAS DEL HOSPITAL REGIONAL DOCENTE CAJAMARCA AGOSTO A DICIEMBRE – 2018"; motivo por el cual solicito autorización para que pueda obtener cepas bacterianas por el lapso que el comprende el estudio.

Agradezco anticipadamente por la atención que brinde a la presente y hago propicia la ocasión para expresarle las muestras de mi especial consideración.

Atentamente,


GUSTAVO H. TRUJILLO CALAGUA, P.N.D.
DIRECTOR GENERAL
USP FILIAL CAJAMARCA

cc:
Archivo
Su C.


Hospital Regional de
SERVICIO DE PATOLOGÍA CL.
NICOLAS LOPEZ CHEGNE
PATROLOGO CLINICO JEFE
Jefe de Servicio
06-05-2019

Anexo 02. Puntos de Corte y MICs para *Pseudomonas aeruginosa* – CLSI 2019

Table 2B-1
Pseudomonas aeruginosa
M02 and M07

Table 2B-1. *Pseudomonas aeruginosa* (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
CARBAPENEMS									
B	Doripenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(15) Breakpoints for doripenem are based on a dosage regimen of 500 mg administered every 8 h.
B	Imipenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(16) Breakpoints for imipenem are based on a dosage regimen of 1 g administered every 8 h or 500 mg administered every 6 h.
B	Meropenem	10 µg	≥19	16–18	≤15	≤2	4	≥8	(17) Breakpoints for meropenem are based on a dosage regimen of 1 g administered every 8 h.
LIPOPEPTIDES									
O	Colistin	–	–	–	–	≤2	–	≥4	(18) Colistin (methanesulfonate) should generally be administered with a loading dose and at the maximum recommended doses, in combination with other agents. (19) The only approved MIC method for testing is broth microdilution. Disk diffusion and gradient diffusion methods should not be performed.
O	Polymyxin B	–	–	–	–	≤2	4	≥8	(20) The MICs obtained from testing colistin predict MICs for polymyxin B.
AMINOGLYCOSIDES									
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16	
B	Amikacin	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64	
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13–14	≤12	≤8	16	≥32	
FLUOROQUINOLONES									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥25	19–24	≤18	≤0.5	1	≥2	(21) Breakpoints are based on a dosage regimen of 400 mg IV administered every 8 h.
B	Levofloxacin	5 µg	≥22	15–21	≤14	≤1	2	≥4	(22) Breakpoints are based on a dosage regimen of 750 mg administered every 24 h.
O	Lomefloxacin	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤2	4	≥8	(23) For testing and reporting of urinary tract isolates only.
O	Ofloxacin	5 µg	≥16	13–15	≤12	≤2	4	≥8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; CAMHE, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; I, intermediate; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control; R, resistant; S, susceptible.

Anexo 03: Puntos de Corte y MICs para *Acinetobacter* spp – CLSI 2019

©Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2B-2. *Acinetobacter* spp. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
O	Piperacillin	100 µg	≥21	18–20	≤17	≤16	32–64	≥128	
β-LACTAM COMBINATION AGENTS									
A	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12–14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16	
B	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18–20	≤17	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4	
O	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥20	15–19	≤14	≤16/2	32/2–64/2	≥128/2	
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I)									
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	
B	Cefepime	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32	
B	Cefotaxime	30 µg	≥23	15–22	≤14	≤8	16–32	≥64	
B	Ceftriaxone	30 µg	≥21	14–20	≤13	≤8	16–32	≥64	
Inv.	Cefiderocol	-	-	-	-	≤4	8	≥16	(2) Breakpoints are based on a dosage regimen of 2 g every 8 h administered over 3 h. (3) Testing cefiderocol requires iron-depleted CAMHB. Chelation is used for iron depletion, which also removes other cations (ie, calcium, magnesium, and zinc). Following this process, cations are added back to concentrations of calcium 20–25 mg/L, magnesium 10–12.5 mg/L, and zinc 0.5–1.0 mg/L.
CARBAPENEMS									
A	Doripenem	10 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	(4) Breakpoints for doripenem are based on a dosage regimen of 500 mg administered every 8 h.
A	Imipenem	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤2	4	≥8	(5) Breakpoints for imipenem are based on a dosage regimen of 500 mg administered every 6 h.
A	Meropenem	10 µg	≥18	15–17	≤14	≤2	4	≥8	(6) Breakpoints for meropenem are based on a dosage regimen of 1 g administered every 8 h or 500 mg administered every 6 h.

Anexo 04: ficha de actividad carbapenemasa

ficha de recolección de datos de Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras	
Fecha:	P: Positivo I: Indeterminado N: Negativo
Microorganismo aislado:	
Tipo de muestra:	
Servicio de procedencia:	

INTERPRETACION	
Detección fenotípica	Tipo de carbapenemasa
Sinergia con APB (+) Test de Hodge (+) mCIM (+) No Sinergia con EDTA	SERIN
Sinergia con EDTA (+) Test de Hodge (+) mCIM (+) No sinergia con APB	METALO
No sinergia con APB No sinergia con EDTA Test de Hodge (-) mCIM (+)	OXA

Anexo 05: Recolección de datos del cuaderno de microbiología HRDC

2018

Identificación	Servicio	Muestra	Fecha	Microorganismo aislado	Reporte
0174	UCI 200	Secreción Bronquial	02-08-18	Acinetobacter baumannii	04-08-18
0176	UCI 200	Secreción Bronquial	03-08-18	Acinetobacter baumannii	04-08-18
0177	UCI 303	Secreción Bronquial	03-08-18	Acinetobacter baumannii	04-08-18
0180	Med 5008	Secreción Bronquial	04-08-18	Pseudomonas aeruginosa	05-08-18
0183	UCI 301	Secreción Troqueal	04-08-18	Acinetobacter baumannii	05-08-18
0185	UCI 200	Secreción Bronquial	05-08-18	Acinetobacter baumannii	07-08-18
0199	UCI 302	Secreción Bronquial	08-08-18	Acinetobacter baumannii	10-08-18
0228	UCI 209	Secreción Bronquial	14-08-18	Acinetobacter baumannii	16-08-18
0230	Eme 200	Descenso testicular	15-08-18	Salmonella enterica	17-08-18
0211	UCI 200	Orina	13-08-18	Klebsiella pneumoniae	17-08-18
0240	UCI	Aspirado Bronquial	17-08-18	Pseudomonas fluorescens/Pantoea	20-08-18
0247	UCI 300	Aspirado Bronquial	20-08-18	Acinetobacter baumannii	23-08-18
0222	UCI 301	Urocultivo	21-08-18	Pseudomonas aeruginosa	23-08-18
0253	UCI 301	Aspirado Bronquial	23-08-18	Staphylococcus aureus	25-08-18
0253	UCI 200	Aspirado Bronquial	23-08-18	Acinetobacter baumannii	25-08-18
0262	UCI 302	Secreción Bronquial	25-08-18	Acinetobacter baumannii	27-08-18

Anexo 06: Base de datos en Excel para obtener los resultados

Aislamientos de BGNF CULTIVOS DE LIQUIDOS BIOLOGICOS - HRC agosto - diciembre 2018								
ITEM	N° DE REGISTRO	SERVICIO	TIPO DE MUESTRA	FECHA DE INGRESO	MICROORGANISMO AISLADO	TEST DE HODGE MODIFICADO ATCC 700603	TEST DE SINERGIAS DE DOBLE DISCO (EDTA)	TEST MODIFICADO DE INACTIVACION DEL CARBAPENEM(mCIM)
1	0177	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	3/08/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
2	0183	UCIN	SECRECION TRAQUEAL	4/08/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
3	0185	UCI	SECRECION BRONQUIAL	5/08/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
4	0228	UCI	SECRECION BRONQUIAL	14/08/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
5	0240	UCI	ASPIRADO BRONQUIAL	17/08/2018	PSEUDOMONA FLOURENCES/PUTIDA	positivo	positivo	positivo
6	0247	UCI	ASPIRADO BRONQUIAL	20/08/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
7	0253	UCIN	ASPIRADO BRONQUIAL	23/08/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	negativo	negativo	positivo
8	0262	UCI	SECRECION BRONQUIAL	25/08/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
9	0290	UCI	SECRECION BRONQUIAL	1/09/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
10	0313	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	7/09/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
11	0320	UCI	ASPIRADO BRONQUIAL	8/09/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
12	0356	UCI	SECRECION BRONQUIAL	19/09/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
13	0359	UCI	SECRECION BRONQUIAL	19/09/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
14	0363	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	20/09/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	indeterminado	negativo	positivo
15	0375	UCI	SECRECION BRONQUIAL	19/09/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	positivo	positivo	positivo
16	0408	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	3/10/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	negativo	negativo	negativo
17	0414	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	3/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
18	0417	UCI	SECRECION BRONQUIAL	4/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
19	047	UCI	HEMOCULTIVO	3/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
20	0423	UCI	SECRECION BRONQUIAL	8/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
21	0427	UCI	SECRECION BRONQUIAL	9/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
22	0450	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	15/10/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	positivo	positivo	positivo
23	0449	UCI	SECRECION BRONQUIAL	15/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
24	0452	UCI	ASPIRADO BRONQUIAL	16/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
25	0461	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	18/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
26	0464	UCI	SECRECION BRONQUIAL	19/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
27	0486	UCI	SECRECION BRONQUIAL	25/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
28	0489	UCIN	ASPIRADO BRONQUIAL	26/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	indeterminado	negativo	positivo
29	0512	UCI	ASPIRADO BRONQUIAL	31/10/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
30	0524	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	3/11/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
31	0526	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	5/11/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	positivo	positivo	positivo
32	0544	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	9/11/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
33	0545	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	9/11/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	indeterminado	negativo	positivo
34	0560	UCI	ASPIRADO BRONQUIAL	12/11/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
35	0561	UCI	SECRECION BRONQUIAL	12/11/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
36	0589	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	19/11/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	negativo	negativo	negativo
37	0637	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	30/11/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	negativo	negativo	negativo
38	0657	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	6/12/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	positivo	positivo	positivo
39	0667	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	7/12/2018	PSEUDOMONA AERUGINOSA	negativo	negativo	negativo
40	0677	UCIN	SECRECION BRONQUIAL	8/12/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo
41	0736	UCI	SECRECION BRONQUIAL	27/12/2018	ACINETOBACTER BAUMANII	positivo	negativo	positivo

Anexo 07: Preparación del inóculo para detección fenotípica.



Anexo 08: Detección fenotípica

