

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**“DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y
GENOTÍPICAS DE CARBAPENEMASAS EN EL HOSPITAL
PEDIÁTRICO BACA ORTIZ DE QUITO EN EL AÑO 2013.”**

VALERIA PATRICIA TORRES ESPÍN

DIRECTOR: DR. LUIS SANTIAGO ESCALANTE VANONI

QUITO, 2015

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, VALERIA PATRICIA TORRES ESPÍN, con C.I. 1713986634, autora del trabajo de graduación titulado

“DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE CARBAPENEMASAS EN EL HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ DE QUITO EN EL AÑO 2013”,

previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Escuela de Bioanálisis:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en forma digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información Superior del Ecuador para su difusión pública, respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

VALERIA PATRICIA TORRES ESPÍN

C.I. 1713986634

Quito, 2015

DEDICATORIA

*A mis padres: Rosa y Augusto,
sin cuyo amor incondicional nada hubiera sido posible.*

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Santiago Escalante, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta disertación.

A todos en el Instituto Nacional de Investigación y Salud Pública (INSPI): Dr. Jorge Reyes, Lcdo. Eduardo Villacís, Ing. Xavier Villavicencio, Dra. Ruth Rivera, Lcda. Ruth Vásquez y Lcda. Liliana Ushiña por la paciencia, los consejos, la amistad y los desayunos de todo este largo proceso.

A la Lcda. Adriana Játiva y la Dra. Ximena Villalba por permitirme realizar el estudio en el Hospital de Niños Baca Ortiz.

A Sussanne Karlsmore, del Instituto de Investigaciones de Comida de la Universidad de Tecnologías de Dinamarca, sin cuya apertura y pronta y efectiva ayuda no tendría esos controles y esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo.

A todos mis profesores y profesoras, gracias por sus enseñanzas. A Luchito, gracias por “encontrar” lo que siempre se me pierde.

A los futuros bioquímicos: Carolina Satán, Rafael Tamayo, David Córdova y al Ing. Jorge Coba, por compartir esta pasión por el mundo molecular y alegrar todas las tardes y mañanas (y no bajarse de la camioneta).

A todos mis amigos y amigas que han compartido conmigo a lo largo de la universidad dentro y fuera de las aulas.

A la Dra. Ana Karina García y a las Ings. Ximena Guerra y Verónica Gómez, gracias por ser mis hermanas del alma.

A mi familia por su paciencia y preocupación en cada momento, por su amor y lealtad y por jamás dudar de mí.

Pero sobre todo a mi hijo Nico, porque sin tí y tu increíble paciencia y amor, nada de esto tendría sentido. A ti, por ser lo más importante en la tierra, mi persona favorita, gracias por entender las tardes de no estar contigo y las malas noches. Te amo con todo mi corazón, mi único tesoro.

RESUMEN

“DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE CARBAPENEMASAS EN EL HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ DE QUITO EN EL AÑO 2013.”

Objetivo: Analizar las características fenotípicas y genotípicas de las cepas (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*), sospechosas de presentar una resistencia fenotípica a carbapenémicos, provenientes del Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito remitidas al INSPI, en el año 2013.

Materiales y métodos: Se utilizaron las técnicas fenotípicas de Hodge (CLSI, 2014), test de inhibición con EDTA, test de inhibición con ácido borónico, test en escalera y, como técnica genotípica, dos multiplex para la investigación de los cinco genes más representativos (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}) de las cepas que hayan sido referidas desde el Hospital Pediátrico Baca Ortiz en Quito en 2013 al Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación. Se usó como controles positivos, material genético positivo para cada una de las enzimas, provisto por la Universidad de Tecnologías de Dinamarca.

Resultados: Se logró recuperar 31 cepas, de las cuales el 61% fueron identificadas como *Klebsiella pneumoniae* seguidas de *Enterobacter cloacae* con 10%. Las cepas analizadas mediante las dos multiplex dieron un 67% positivo para *bla*_{KPC} sin co-resistencias y ninguna de las cepas estudiadas dio como positivo para los otros mecanismos de resistencia (*bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-148}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}). La edad con más prevalencia de presentar resistencia a carbapenémicos fue de los menores de un año (25,80%) y el servicio más frecuente, la consulta externa (25%).

Conclusiones y recomendaciones: Un estudio complementario de la relación clonal de las cepas que fueron positivas para *bla*_{KPC} mediante secuenciación o estudios similares (PFGE, MLST) ayudaría a establecer un probable origen del brote que continúa dentro del hospital, además de estudios multivariados en los que se pueda determinar la causa más probable de la diseminación de las carbapenemasas y la variable con mayor éxito para la prevención de la misma

Palabras clave: carbapenemasas, resistencia a antibióticos, KPC, hospital pediátrico.

ABSTRACT

FENOTIPIC AND GENOTIPIC CHARACTERISTICS OF CARBAPENEMASES IN A PEDIATRIC HOSPITAL IN QUITO-ECUADOR DURING 2013.”

Objective: The aim of the study was to analyse the phenotypic and genotypic characteristics of bacterial strains (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) suspected to have a resistance to carbapenems, in a Paediatric Public Health Facility in Quito-Ecuador in the year 2013 that were referred to the National Institute of Research and Public Health.

Materials and methods: Using the CLSI recommended guidelines, the Modified Hodge Test (MHT), differential disk combination of a carbapenem plus Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and phenyl boronic acid (PBA) with the development a multiplex PCR for the detection of five main resistance genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}). All these procedures were made under a restricted budget condition, and in house protocols were developed for each one of the methods. Positive genetic controls were used thanks to help provided from The Technical University of Denmark.

Results: Unfortunately only thirty one (31) bacterial strains could be retrieved and were analysed. From these 61% were *Klebsiella pneumoniae* followed by *Enterobacter cloacae* with 10%. The strains were analysed by the two multiplex PCR developed giving as result 67% positive for *bla*_{KPC} with no co-resistances found and none were positive for the other four genes studied. Children under one year old were more frequent to present resistance to carbapenems (25,80%) and the hospital ward with more strains reported was External Consult.

Conclusions and recommendations: A complementary study that gives an insight in the clonal relationship of the strains analysed and with a positive result for *bla*_{KPC}, could help understand the origin of the outbreak that persists in the Hospital. Furthermore, a multivariate study that analyses the most likely cause to the spread of carbapenemases and the variable that succeeds the most in the control of the outbreak would give us a better understanding of the local situation.

Key words: carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE), antibiotic resistance, carbapenemases, KPC, pediatric hospital.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	x
ÍNDICE DE FOTOS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.1 Justificación.....	4
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
2. CARBAPENEMASAS.....	7
2.1 Clasificación.....	7
2.2 Mecanismo de acción.....	8
2.2.1 <i>Serin carbapenemasas</i>	8
2.2.1.1 Grupo A, KPC.....	9
2.2.1.2 Grupo D, OXA-48.....	10
2.2.2 <i>Metalo-β-lactamasas</i>	11
2.3 Mecanismos de transmisión.....	14
2.3.1 <i>Transmisión vertical</i>	14
2.3.2 <i>Plásmidos</i>	15
2.3.3 <i>Elementos “transposables”</i>	16
2.4 Mecanismos de detección en el laboratorio.....	17
2.4.1 <i>Métodos convencionales</i>	17
2.4.1.1. Difusión en disco.....	17
2.4.1.2 Test de Hodge modificado.....	18
2.4.1.3. Test en escalera.....	18
2.4.1.4 Test del ácido borónico (diferenciación de KPC).....	18
2.4.1.5 Test de EDTA (diferenciación de MBL).....	19
2.4.1.6 Métodos colorimétricos.....	19
2.4.2. <i>Métodos moleculares</i>	20
2.4.2.1 PCR.....	20
3. MARCO METODOLÓGICO.....	21
3.1 Tipo de estudio.....	21
3.2 Población y muestra.....	21

3.2.1 <i>Tamaño muestral</i>	21
3.2.2 <i>Muestreo</i>	21
3.2.2.1 Criterios de inclusión	22
3.2.2.2 Criterios de exclusión.....	22
3.3 Operacionalización de la investigación	22
3.4 Obtención de datos.....	27
3.5 Procedimientos de laboratorio	27
3.5.1 <i>Materiales y equipos</i>	27
3.5.1.1 Materiales	27
3.5.1.2 Equipos	28
3.5.1.3 Reactivos.....	28
3.5.2 <i>Resiembra de cepas</i>	29
3.5.3 <i>Prueba de Hodge</i>	29
3.5.4 <i>Test en escalera</i>	30
3.5.5. <i>Test de ácido borónico</i>	30
3.5.6 <i>Test de EDTA</i>	31
3.5.7 <i>Extracción de ADN</i>	31
3.5.8 <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	32
4.RESULTADOS.....	36
5.DISCUSIÓN	42
6.CONCLUSIONES.....	44
7.RECOMENDACIONES	45
8.BIBLIOGRAFÍA	46
9 ANEXOS.....	53
Anexo 1: Tabla de concentraciones de ADN de muestras y controles empleados, con Nanodrop.	53
Anexo 2: Técnica de preparación de solución de ácido fenilborónico	54
Anexo 3: Tabla de resultados de pruebas fenotípicas y genotípicas de cepas del HBO referidas al INSPI en el año 2013.	55
Anexo 4: Alineamientos de primers específicos con secuencia conocidas para cada una de las enzimas	58
Anexo 5.- Carta de autorización del estudio.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Comparación de la clasificación de B-lactamasas según Ambler y Bush y Jacoby.....</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 2.- Operacionalización de variables</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 3.- Concentración de ADN en muestras y controles.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 4.- Resultados de pruebas fenotípicas y genotípicas de cepas del HBO referidas al Inspi y estudiadas, del año 2013.</i>	<i>57</i>

ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfico 1.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI, distribuidas según género para el 2013.</i>	<i>37</i>
<i>Gráfico 2.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI, en base a servicio hospitalario para el año 2013.</i>	<i>38</i>
<i>Gráfico 3.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI y estudiadas, en base a tipo de muestra para el año 2013.</i>	<i>39</i>
<i>Gráfico 4.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI estudiadas según edad de los pacientes en 2013.</i>	<i>40</i>
<i>Gráfico 5.- Prevalencia de KPC en cepas estudiadas del HBO en 2013.</i>	<i>41</i>
<i>Gráfico 6.- Distribución de cepas estudiadas del HBO en el 2013, según especie identificada</i>	<i>41</i>

ÍNDICE DE FOTOS

<i>Foto 1.- Técnica de Hodge utilizada</i>	<i>30</i>
<i>Foto 2.- Modelos de test en escalera y discos combinados con inhibidores. Derecha, EDTA. Izquierda, ácido borónico.....</i>	<i>31</i>
<i>Foto 3.- Controles individuales y multiplex de cinco.....</i>	<i>34</i>
<i>Foto 4.- PCR en gradiente de controles de multiplex 1 y multiplex 2</i>	<i>34</i>
<i>Foto 5.- Límite de detección con diluciones seriadas dobladas de multiplex 1 (KPC, OXA-48, IMP).....</i>	<i>35</i>
<i>Foto 6.- Límite de detección de multiplex 2 (VIM, NDM)</i>	<i>35</i>
<i>Foto 7.- Multiplex 1: Muestras y controles.</i>	<i>37</i>
<i>Foto 8.- -Multiplex 2: muestras con controles.</i>	<i>37</i>

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1.- Estructura de carbapenémicos</i>	<i>2</i>
<i>Ilustración 2.- Carbapenemasa KPC.....</i>	<i>10</i>
<i>Ilustración 3.- Estructura de OXA-48</i>	<i>11</i>
<i>Ilustración 4: Estructura de Imipenemasa (IMP)</i>	<i>12</i>
<i>Ilustración 5.- Enzima NDM.....</i>	<i>13</i>
<i>Ilustración 6.- Estructura de VIM 2.....</i>	<i>14</i>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

APB: ácido fenilborónico

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (CIM- Minimum Inhibitory Concentration -MIC)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

HBO: Hospital Pediátrico Baca Ortiz

IMP: Imipenemasa (Imipenemase, IMP)

INSPI: Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

VIM: Metallo-beta-lactamasa codificado en integrón de tipo Verona (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase, VIM)

OXA-48: Oxacilinasa (Oxacilinase, OXA-48)

NDM: metallo-beta-lactamasa de Nueva Delhi (New Delhi metallo-Beta-lactamase, NDM)

1. INTRODUCCIÓN

Miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son los agentes causales de varias infecciones comunitarias e intrahospitalarias (Murray, 2006). El tratamiento de estas infecciones ha provocado la selección de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias, como mecanismo de defensa, poco después de usar un antibiótico como tratamiento (Rodrigues, 2011). Este proceso ha ayudado a la creación de nuevas moléculas con acción terapéutica, que se derivan de la penicilina o también, que mejoren su estructura para hacerla menos degradable por la bacteria, creando nuevos medicamentos derivados de penicilinas, como en el caso de imipenem (Fresnadillo Martínez et al, 2010).

De forma natural, *Streptomyces cattleya* produce thienamicina, que demostró propiedades antimicrobianas, en 1976, y que serviría para poder sintetizar imipenem, ertapenem, meropenem y doripenem (Papp-Wallace et al, 2011). Papp-Wallace et al (2011) describe la estructura de los carbapenems como un anillo β -lactámico que en C-2 y C-3 lleva un doble enlace, un carbono en C-1, un grupo hidroxilo en R2 y un acilo en su grupo radical, que le confieren propiedades químicas para su actividad antimicrobiana.

Modificaciones posteriores generaron cambios a la molécula original, siendo un carbapenem actualmente “un azobiciclo formado por la condensación de un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado” según Fresnadillo Martínez et al (2010). La estructura de estos antibióticos se encuentra graficada en la figura 1.

El uso de estos antibióticos en el tratamiento de las infecciones causadas por bacilos Gram negativos ha generado la selección de cepas que expresan una enzima denominada carbapenemasa, enzima que degrada o solubiliza las moléculas con anillos carbapenémicos, por parte de las bacterias, sin que se descarte otras formas de resistencia como pérdida de la permeabilidad y adquisición de información genética de resistencia por transposones o plásmidos (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) Rationale, 2011).

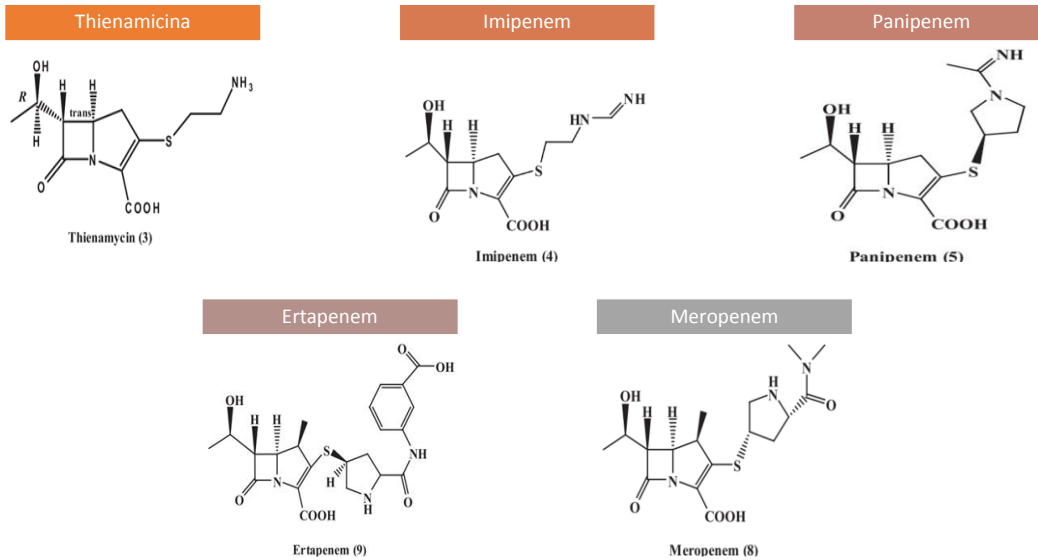


Ilustración 1.- Estructura de carbapenémicos, tomado de (Papp-Wallace, Endimiani, Taracila, & Bonomo, 2011)

1.1 Planteamiento del problema

La primera cepa resistente a carbapenémicos fue identificada en 1996 y publicada en 2001 como blaKPC-1, descrita en Carolina del Norte y su dispersión masiva se corroboró apenas tres años después, cuando el porcentaje de carbapenemasas positivas aumentó de <1% en 2000 a 8% en 2007 (Hirsch, Tam; 2010).

A partir del año 2005, en América Latina se empezó a reportar cepas de enterobacterias con comportamientos cada vez más resistentes a antibióticos, pero con más notoriedad a carbapenémicos (Villegas et al.; 2006). Los estudios de Marcano *et al.* (2008), y de Villegas *et al.* (2006) reportaron modificaciones de estas enzimas, encontrando la enzima de tipo metalo-Beta-lactamasa Verona codificada en un integrón (*Verona Integron-encoded-metallo-B-lactamase - VIM*) y una enzima carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase - KPC tipo 2*), respectivamente.

En nuestro país, la primera cepa carbapenemasa positiva fue confirmada, a partir de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de la provincia del Cañar, por los laboratorios Zurita y Zurita en 2002 (Zurita, 2012). A partir de esta información, se ha realizado estudios de las dos familias de enzimas de carbapenemasas: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) y MBL (Metallo-Beta lactamasa). En el estudio realizado por Gómez (2009), fueron estudiados 434 aislados de cepas de diferentes Hospitales de la ciudad de Quito, con sospecha de producción de betalactamasa de espectro extendido. Su análisis dio como resultado 6 cepas positivas para KPC y 1 para MBL mediante PCR convencional (Gómez, 2010). Otro estudio enfocado a *Pseudomonas aeruginosa*, analizó 129 muestras en total, con 34,11% positivas para serin beta lactamasas; siete de las cuales fueron positivas para la detección mediante PCR del gen bla_{KPC} (Ayala, 2011).

En el HBO, el análisis de laboratorio informa como sospechosas de resistencia a carbapenémicos a las cepas que así analiza el sistema automatizado VITEK 2 que utiliza el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con referencia a los valores de corte proporcionados por Biomerieux para el 2013. Todas las muestras que se consideran bajo este corte como resistentes, son evaluadas para su confirmación en el Instituto de Salud Pública e Investigación para descartar la presencia de KPC únicamente (Lcda. Adriana Játiva, entrevista personal, HBO, 2013).

Para el año 2013, la cifra de cepas presuntamente resistentes a carbapenémicos aumentó a 64, de 14 en el 2012 (Registros de Microbiología, HBO, 2013). Este valor cuadruplicado cumple con las características de las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenem (Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae - CRE) descritas en otros estudios intrahospitalarios como el de Puerto Rico de Robledo *et al* (2011), donde el aumento de cepas positivas para KPC aumentó de 11 en 2003 a 92 en 2009 ($p < 0.01$).

La facilidad con que estas cepas se pueden diseminar ha sido causa para que las entidades estatales de salud en Estados Unidos (CDC, 2012) y Europa (ECDC, 2012) tomen medidas de reconocimiento e identificación rápida de las cepas, para poder establecer las medidas de contención necesarias y, de ser posible, encontrar el origen de la infección; cambiar los protocolos de medicación por otros más adecuados que favorezcan la

recuperación del paciente y una menor estancia hospitalaria, para evitar la diseminación progresiva, que sólo se consiguen con el estudio molecular y fenotípico de las muestras que tengan CIM reducidas para la familia de carbapenémicos.

1.1 Justificación

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública que aqueja, a nivel global, a diferentes casas de salud. Los primeros brotes de carbapenemasas empezaron en 1996 en la ciudad de New York (Yigit et al, 2001) y desde entonces el comportamiento de esta resistencia ha ido pasando de país a país por la migración de pacientes, portadores de cepas que expresan una enzima que le confiere a la bacteria la capacidad de hidrolizar las moléculas de antibióticos de la familia de carbapenems (ECDC, 2011). El problema grave de esta clase de enzimas es la fácil dispersión de las cepas positivas para estas enzimas y que se encuentran no sólo en el género *Enterobacteriaceae* sino también en los bacilos gram negativos no fermentadores – *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*- como lo muestran los estudios de Ayala (2011) y de Croughs *et al* (2012) en el que el porcentaje de la resistencia a Imipinem aumentó desde 6% en 1998 a 20,6 % en 2009.

La población pediátrica se encuentra vulnerable a las infecciones por *Enterobacteriaceae* que sean positivas para este mecanismo de resistencia bacteriana, que suele ser de tipo nosocomial y que ataca a niños y niñas prematuros, recién nacidos y adolescentes (Maya *et al*, 2013). Esto conlleva tratamientos agresivos como la tigeciclina, colistín, tetracilina, gentamicina y amikacina, para su resolución (Hirsch, Tam; 2010), que causan graves problemas a largo plazo, con estadías hospitalarias más largas, complicaciones en el tratamiento y la incomodidad del paciente y de sus familiares responsables (incapacidad de laborar), como lo recoge el reporte de ECDC (2011).

Por esta razón se ha escogido al Hospital Baca Ortiz de Quito (HBO), cuyas cepas productoras de carbapenemasas se han cuadruplicado desde 2012 en que reportó 14 cepas a 64 cepas en 2013 (Registro de microbiología, HBO, 2013-2012). La población más afectada es aquella menor a un año de edad, con un porcentaje de 35.93% en 2013 y 42.85% en 2012 (Registro de microbiología, HBO, 2013-2012).

El estudio de Nordmann, Naas y Poirel, en 2011, evaluó cepas de Enterobacterias para la presencia de la enzima Oxacilinasas (Oxacilinase, OXA) -entre otras enzimas- e insiste en la dificultad para la evaluación de la misma mediante ensayos fenotípicos solamente y promueve el estudio de las enzimas presentes en cepas bacterianas sospechosas, mediante métodos moleculares que pueden confirmar la existencia de la enzima; aunque, muchas veces, sus características fenotípicas no demuestran una baja reacción hacia los carbapenems in vitro. Por tanto, se vuelve de suma importancia analizar las cepas en sus características fenotípicas para saber la incidencia de la clase de carbapenemasa, sea *Klebsiella-Pneumoniae*-Carbapenemasa (KPC) o Metallo-Beta-Lactamasa (MBL); y la genotipificación, para poder evaluar la presencia de uno o más tipos de resistencia que están presentes en una misma cepa, sobre todo, la clase D que comprende a las enzimas tipo OXA.

Este estudio se centra en la importancia de identificar las principales enzimas β -lactamasas de tipo carbapenemasas mediante una técnica molecular que detecte cinco de las principales enzimas de los grupos A, B y D según la clasificación de Ambler en un hospital Pediátrico y su previa identificación fenotípica, debido al aumento de mecanismos de resistencia a carbapenémicos que se ha expuesto.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Caracterización de las carbapenemasas detectadas en aislamientos bacterianos del Hospital Baca Ortiz de Quito durante el año 2013.

1.2.2 Objetivos específicos

1.- Clasificar y establecer la prevalencia de las enzimas carbapenemasa positivo de acuerdo a los tipos de carbapenemasa *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemasa (KPC) y Metallo- β -lactamasa (MBL) (ensayo fenotípico) mediante la técnica de Hodge,

el test de EDTA, ácido borónico y en escalera, a partir de los aislados recuperados de las muestras biológicas del Hospital Baca Ortiz Quito durante el año 2013.

2.- Estandarizar un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex para las enzimas: Metallo-beta-lactamasa codificado en integrón de tipo Verona (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase, VIM), KPC, metallo-beta-lactamasa de Nueva Delhi (New Delhi metallo-Beta-lactamase, NDM), Imipenemasa (Imipenemase, IMP), Oxacilinas (Oxacilinas, OXA-48), desde los aislados de muestras biológicas del Hospital Baca Ortiz Quito durante el año 2013.

3.- Determinar la frecuencia de las clases de carbapenemasa presentes, el servicio, el origen de la secreción, la edad, la especie, a partir de los aislados de las muestras biológicas obtenidas en el laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Baca Ortiz Quito durante el año 2013.

4.- Generar un cepario para el estudio molecular posterior de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad del Ecuador.

2. CARBAPENEMASAS

Los β -lactámicos en general actúan en la pared de la membrana celular de las bacterias uniéndose a las proteínas de unión a penicilina (penicilin binding proteins, PBP) e impidiendo la generación de péptido glicanos que le dan rigidez a la membrana, vital para la supervivencia de las bacterias; sin embargo, los anillos de carbapenem pueden ser hidrolizados por las enzimas denominadas carbapenemasas, al hidrolizar irreversiblemente la unión del grupo amida del anillo B-lactámico (Perilli, Callenza, Pellegrini y Amicosanto, 2012).

Las dos clasificaciones que se describe a continuación se basan en las características moleculares (aminoácidos y dominios conservados) de Ambler y en las características enzimáticas farmacológicas de importancia médica y microbiológica de Bush y Jacoby (2010).

2.1 Clasificación

La clasificación de Ambler divide a las enzimas según el estudio de aminoácidos de las proteínas y los motivos de aminoácidos conservados que las enzimas comparten (Bush, 2013). Los grupos A, C y D tienen un sitio activo que utiliza al aminoácido serina para poder lograr la actividad hidrolítica necesaria; mientras que el grupo B (metalo-beta-lactamasas) utiliza de uno a dos cationes de zinc (Zn^{+2}) en su sitio activo para poder lograr la hidrólisis efectiva del antibiótico (Perilli, Callenza, Pellegrini y Amicosanto, 2012).

La clasificación de Bush y Jacoby (2010) se centra en las propiedades que exhiben las enzimas a las familias de antibióticos y a los posibles agentes que pueden ser usados como inhibidores para lograr una orientación clínica:

- el grupo 1 corresponde a las cefalosporinasas
- el grupo 2, a las serina-beta-lactamasas
- el grupo 3, a las metalo-beta-lactamasas

Cada uno de estos grupos tiene subclasificaciones, nombradas por letras minúsculas que varían dependiendo de la actividad de la enzima beta-lactamasa frente a inhibidores enzimáticos (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam), además de la beta-lactamasa correspondiente (Bush y Jacoby, 2010) y se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Bush y Jacoby (2010)	Clasificación de Ambler	Antibiótico	Inhibido por	
			Ác.Clav./ Taz.	EDTA
1	C	Cefalosporinas	X	X
1e	C	Cefalosporinas	X	X
2^a	A	Penicilinas	√	X
2b	A	Penicilinas, primeras cefalosporinas	√	X
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactams	√	X
2br	A	Penicilinas	X	X
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactams	X	X
2c	A	Carbenicilina	√	X
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	√	X
2d	D	Cloxacilina	Variable	X
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	X
2df	D	Carbapenems	Variable	X
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	√	X
2f	A	Carbapenems	Variable	X
3^a	B1 (a,b), B3	B-lactámicos excepto monobactam	X	√
3b	B2	Carbapenems	X	√

Tabla 1: Comparación de la clasificación de B-lactamasas según Ambler y Bush y Jacoby

2.2 Mecanismo de acción

2.2.1 Serin carbapenemasas

Según la clasificación de Ambler, la familia de enzimas tipo serin carbapenemasas se divide en tres categorías: A, C y D. Este estudio se centra en las serin carbapenemasas KPC (clasificación de Ambler: A, y de Bush: 2f) y en la enzima OXA-48 (clasificación de Ambler: D, clasificación de Bush: 2df).

2.2.1.1 Grupo A, KPC

En el primer estudio de Ambler en 1980, se identificó la secuencia de aminoácidos de *Staphylococcus aureus* PC1, *Bacillus licheniformis* 728/C, *Bacillus cereus* 569/H β -lactamasa I y *Escherichia coli* pBR322 y se alineó las secuencias, para poder ver la diferencia de aminoácidos que, para sorpresa del investigador, era cercana a ninguna (Ambler, 1980). Estos motivos son repeticiones de aminoácidos que tiene un orden establecido o que en cierta posición se repiten, y están presentes en las enzimas de los grupos A, C y D de Ambler (Bush, 2013).

La estructura globular de las carbapenemasas clase A está compuesta de dos dominios, uno α y uno α/β , con el sitio activo ubicado en la unión de los dos dominios e hidroliza las β -lactamasas mediante la acetilación o desacetilación de la molécula de cabapenem (Perilli, Callenza, Pellegrini y Amicosanto, 2012) y se puede observar su estructura en la Ilustración 1, tomada de RCSB PDB, (Ke, Bethel, Thomson, Bonomo, & van den Akker, 2007).

Se ha descubierto las doce (2-13) variantes de bla_{-KPC} en fermentadoras (*Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, etc) y no fermentadoras (*Pseudomonas aeruginosas*, *Acinetobacter baumannii*) y su esparcimiento se debe primordialmente a la transmisión de un plásmido asociado al transposón Tn4401 con cinco variantes conocidas, las que también pueden llevar consigo información de resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Patel y Bonomo, 2013).



Ilustración 2.- Carbapenemasa KPC

2.2.1.2 Grupo D, OXA-48

Pertenecen a este grupo de enzimas aquellas que presentan actividad frente a las oxacilinasas, meticilina, aztreonam, cefalosporinas de primera generación e inhibidores de β -lactamasas, limitada actividad frente a cefalosporinas de espectro extendido, y una actividad frente a carbapenemasas menor que en las MBL, de allí que es más difícil que sean detectadas (Patel y Bonomo, 2013).

Aunque la mayoría de enzimas tipo OXA son asociadas a *Acinetobacter spp.*, OXA 48 se ha aislado de *Enterobacteriaceae*, que proviene de un único plásmido transmisible que le confiere a la bacteria este único mecanismo de resistencia y se encuentra en el transposón Tn 1999, aislado primero en países de Medio Oriente y luego extendido a países europeos, donde ahora se considera endémico (Poirel, Potron, Nordmann; 2012). La enzima bla_{oxa-163}, identificada en Argentina, difiere en un solo aminoácido con respecto de la enzima bla_{oxa-48} y fue aislada de *Klebsiella pneumoniae* y de *Enterobacter cloacae* (Patel y Bonomo, 2013). La representación tridimensional de la misma se encuentra en la Ilustración 2 [tomado de RCSB PDB, (Docquier et al., 2009)].

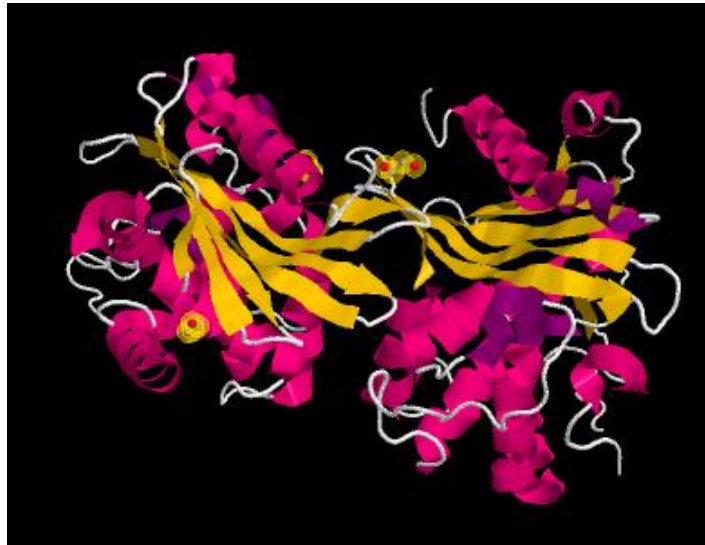


Ilustración 3.- Estructura de OXA-48

Las enzimas de tipo C tienen 50 aminoácidos más que las enzimas A y D; sin embargo, siguen compartiendo dos motivos S – X – X - K o S – T – S - K y K – S - G o K - T- G, además de las variantes S¹³⁰ – X - N, Y¹⁵⁰ – X – N , Y¹⁴⁴ - G - N que difieren en la posición de la serina en donde se ubican. La diferencia molecular del grupo A es un motivo E¹⁶⁶ - X – X – L - N, el grupo D tiene un motivo S¹¹⁸ – X - V y el grupo C no tiene ningún motivo adicional (Bush, 2013).

2.2.2 Metallo- β -lactamasas

Corresponden a este grupo las enzimas que consumen, dentro de su reacción hidrolítica en su sitio activo, uno o dos iones de Zinc (Zn^{2+}): de allí que son dependientes de metales. Sin la presencia de los iones de Zn^{2+} o con el uso de agentes químicos que actúen como agentes quelantes (EDTA, Thiol), las enzimas no logran modificar su sitio activo y empezar la catálisis. Las metallo- β -lactamasas, a diferencia de las enzimas tipo serina, no son sensibles a inhibidores de β -lactámicos (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam) y permanecen sensibles a la familia de los monobactams (aztreonam) [Bush, 2012]. Este grupo de enzimas comparte una estructura proteica de dos dominios: uno $\alpha\beta$ y otro $\beta\alpha$, en cuyo centro se encuentra el sitio activo para la unión de una o dos moléculas de Zn^{2+} (Palzkill, 2013). En la clasificación de las enzimas β -lactamasas, las tres clases de enzimas B1, B2 y B3 se diferencian por la catálisis de diversos antibióticos y sus perfiles

de susceptibilidad, en la secuencia de aminoácidos que actúan dentro del sitio activo, o la presencia de uno o dos átomos de zinc para su activación (Palzkill, 2013). Las enzimas pertenecientes a este estudio corresponden a las de clase B1 que, aunque comparten apenas el 10 % de secuencia de aminoácidos con las otras subclases (B2 y B3), usan para la actividad catalítica enzimática dos iones de Zinc y tienen un plegamiento similar en el sitio de activación usando moléculas de agua para la hidrólisis del carbapenémico y otros antibióticos.

Las metalo-beta-lactamasas de tipo IMP fueron inicialmente identificadas a partir de una *Pseudomonas aeruginosa* en Japón, en 1991 y más tarde en un *Acinetobacter baumannii*, en Italia, y hasta ahora se ha identificado 26 variantes distintas de IMP (Bush, 2012) . En la Ilustración se puede apreciar la estructura de la proteína de IMP con el átomo de Zn^{2+} (tomado de RCSB PDB, Yamaguchi et al., 2005).



Ilustración 4: Estructura de Imipenemasa (IMP) en azul, Zn^{2+} en gris.

La ilustración permite ver la unión del sitio activo con dos de los dominios que están presentes en todas las metalo- β -lactamasas: el sitio “HHH” His¹¹⁶, His¹¹⁸, y His¹⁹⁶, y el sitio “DHH” Asp¹²⁰, His¹²¹, and His²⁶³ (Bebrone, 2014). Esta misma estructura se comparte en

las enzimas VIM, NDM e IMP dado que las tres enzimas forman parte de las enzimas B1 que usan para su activación la unión de dos moléculas de Zn^{2+} .

Las enzimas de tipo NDM fueron detectadas en Suiza en 2008, a partir de un paciente que viajó a Nueva Delhi (Bush, 2013) - de allí su nombre, que en la actualidad se ha esparcido a la mayoría de continentes excepto a América Latina y el Caribe (Gibb, 2011). NDM también se ha encontrado en otras muestras ambientales y otros tipos de bacterias en agua de llaves y de ríos en India (Bush, 2013). Esta particularidad hace que las enzimas NDM sean de especial cuidado, el gen bla_{NDM} se puede desplazar entre diferentes especies de bacterias conjuntamente con otros tipos de resistencia, que incluyen cefalosporinas mediadas por plásmidos, β -lactamasas de espectro extendido, metilasas de RNA 16S, resistencia a macrólidos, rifampicinas y a sulfametoxazol (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011). Debajo se puede apreciar los dos átomos de Zinc en gris y las sub unidades (Tomado de RCSB PDB, Kim, n.d.).



Ilustración 5.- Enzima NDM, en gris moléculas de Zn, en gris y rojo meropenem hidrolizado.

Las enzimas de tipo VIM fueron identificadas en 1991 en Verona, Italia y luego fueron identificadas en Francia en 1996 y, más tarde, en Estados Unidos en 2010 (Queenan & Bush, 2007). En la actualidad, www.lahey.org tiene registradas cuarenta y seis (46) variantes de la enzima VIM (marzo del 2015). Las especies de *Pseudomonas* spp. y

Acinetobacter spp. son las más frecuentes en tener este plásmido, aunque las especies de Enterobacterias se han vuelto más frecuentes (Queenan & Bush, 2007). Las enzimas VIM-1, VIM-2 (Ilustración 5) y VIM-7 tienen modificaciones tanto en los giros de conformación de estructura como en ciertos aminoácidos, que les confieren catálisis específicas a cefepime, cetazidima, ampicilina, imipenem y penicilinas (Meini, Llarrull, & Vila, 2014). La ilustración 5 permite ver la estructura de la enzima bla-VIM (tomado de Brem, n.d.).



Ilustración 6.- Estructura de VIM 2, en gris redondo las moléculas de Zn²⁺, además de un átomo de sodio y ácido fórmico.

2.3 Mecanismos de transmisión

Hemos establecido previamente que el mecanismo por el cual estas enzimas se transmiten es a través de plásmidos (elementos de ADN extra cromosómico); sin embargo, existen varias formas en las que los elementos de ADN móviles se pueden transmitir entre las bacterias y se explica en los siguientes párrafos.

2.3.1 Transmisión vertical

En estudios hechos en *E. coli*, la presión selectiva para streptomycin se expresa en una de cada 10⁹ bacterias expuestas, dando lugar a la mutación específica que luego pasará a

las siguientes bacterias “hijas” por fisión binaria escogiendo sólo a las bacterias con la nueva mutación como viables (Todar, 2012).

2.3.2 Plásmidos

Aparte del material genético que puede estar dentro de la bacteria, un material genético enrollado en sí mismo puede estar presente dentro del citoplasma de la célula y tener una replicación individual que se autoregula; puede ser transmisible en las divisiones sucesivas cargando consigo información viable para procesos metabólicos, resistencias, fertilidad y virulencia que incluso pueden integrarse al material genético de la bacteria, denominándose episoma (Srivastava, 2013) .

A pesar de ser conocidos como partículas promiscuas de ADN, los plásmidos tienen los siguientes limitantes para su transmisión, según Sirvastava (Sirvastava, 2013} y Birge (Brige, 2006):

- No todos los plásmidos pueden transmitirse a las copias de la bacteria que la posee (no conjugativo-no transmisible), otros pueden transmitir la información pero no hacer el contacto con otra bacteria (plásmido transmisible), y otros llevan por sí solos todo el proceso (plásmidos transmisibles por sí mismos);
- Los plásmidos de una especie de bacteria no funcionan de la misma manera en otra especie de bacteria (un plásmido que tiene un origen replicativo en *E. coli* deberá perder una parte de su estructura para ser funcional en *P. aeruginosa*);
- Se debe completar un proceso de transmisión del plásmido que incluye: contacto efectivo, movilización (preparación para la transferencia), la transferencia y la replicación y restauración del plásmido en la célula hija y la célula madre respectivamente.

Toda esta información se encuentra localizada en las partes que componen el plásmido de aproximadamente 100 pb en alguno casos. Los plásmidos suelen tener un origen de replicación autónoma de la secuencia, llamado *ori* y otra región que contiene

repeticiones de pares de bases o proteínas terminales donde la replicación autónoma termina (Brige, 2006).

2.3.3 Elementos “transposables”

Desde los estudios de los genes “saltarines” en el maíz, de Barba McClintock, se ha realizado estudios en las bacterias, debido a su resistencia a ciertos antibióticos, encontrándose dos tipos de elementos más pequeños que los plásmidos, que pueden transmitirse independientemente sea dentro del plásmido, el ADN cromosómico o individualmente (Griffith, Wessler, Camell, & Doebly, 2012). Se dividen en dos grandes grupos que se diferencian por la información que llevan en sí mismos:

- las secuencias de inserción pueden moverse de un lado a otro de la misma región de ADN, a otra región o bien a otro ADN ajeno a su ubicación y tienen solamente la información necesaria para poder movilizarse (activar la transposasa) (Srivastava, 2013) con un tamaño promedio de entre 800 y 2000 pb
- los transposones que pueden llevar consigo diferente información (sea una resistencia o múltiples resistencias) además de la información necesaria para su traslado (Brige, 2006) y que varían entre 21,000 y 2500 pb

Este es el elemento genómico que, con mayor frecuencia, es el responsable de las resistencias bacterianas en Enterobacteriaceae y en otras especies de bacterias y pueden estar dentro de plásmidos o como elementos que forman parte del ADN cromosómico de las bacterias. Para las cepas con genes de resistencia tipo bla_{KPC-2} llevan consigo el transposon Tn4401 de 10 kb que es delimitada por secuencias invertidas repetidas en cada extremo de 39 pares de bases, en cuyo centro se encuentra transposasas y revolvases y dos secuencias de inserción conocidas como ISKpn6 y ISKpn7 (Cuzon, Naas, Nordmann, 2011). Las tres isoformas de Tn4401: a, b, y c; difieren en 100 a 200 pares de base en dirección secuencia arriba pero secuencia abajo los pares de bases se relacionan estrechamente dando a entender que las secuencias han sido insertadas dentro de Tn4410 (Naas *et al*, 2008).

Los mecanismos de transferencia horizontal entre bacterias se resumen en el cuadro.

Conjugación	Transformación	Transducción
<ul style="list-style-type: none"> •Proceso mediante el cual las células de un mismo género se unen y pueden "transmitir" la información a otra células 	<ul style="list-style-type: none"> •El ADN se encuentra regado en el medio (producto de la lisis de otra bacteria) y puede ser absorbido por las bacterias que circundan el ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> •Transmisión de información a través de bacteriófagos (virus que afecta a bacteria) entre bacterias de géneros relacionados

Tomado y modificado de (Todar, 2012)

2.4 Mecanismos de detección en el laboratorio

2.4.1 Métodos convencionales

2.4.1.1. Difusión en disco

Siguiendo los lineamientos del CLSI (2014), la técnica de Kirby Bauer posibilita la difusión de un antibiótico en un medio Mueller Hinton. Estos halos son medidos en milímetros que luego son evaluados en términos de sensible, intermedio y resistente. A continuación se detallan los puntos de corte para los tres carbapenemes disponibles en Ecuador, a una concentración de 10 ug para CLSI (2014) y EUCAST (2015):

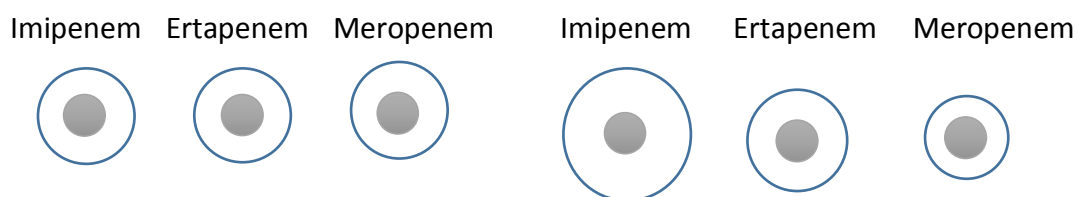
Antibiótico	CLSI (2014)			EUCAST (2015)	
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Resistente
Ertapenem	≥ 22	19-21	≤ 18	≥ 25	< 22
Meropenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 22	< 16
Imipenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 22	< 16

2.4.1.2 Test de Hodge modificado

Según los lineamientos del CLSI 2014, las cepas que correspondan a Intermedio y Resistente deben ser evaluadas por otro método que permita la confirmación de una cepa productora de carbapenemasa. La técnica evaluada por el CDC (CDC, 2013) tiene como principio identificar a una bacteria que pueda crecer en la presencia de carbapenems y que normalmente es susceptible a este pero que, con la presencia de la enzima carbapenemasa, permite el crecimiento de la cepa susceptible a carbapenémicos.

2.4.1.3. Test en escalera

Se evalúa la resistencia consistente de los tres carbapenémicos de uso común (imipenem, ertapenem y meropenem) para evaluar la posibilidad de una modificación en las porinas que pueda dar una impermeabilidad que sea correspondiente a una BLEE más que a una carbapenemasa. La evaluación se da colocando discos de meropenem, ertapenem e imipenem equidistantes, de tal manera que se pueda observar si es que los halos son iguales o hay una selectividad de la resistencia (Birgy et al, 2012).



2.4.1.4 Test del ácido borónico (diferenciación de KPC)

Esta prueba se basa en la ampliación de halos que sea el momento de agregar ácido borónico (fenil borónico- APB) en un disco en una concentración de 10 ug, cerca de un disco con imipenem o meropenem en la evaluación de difusión por disco. El criterio interpretativo es la apertura del halo de imipenem o de meropenem hacia el lado donde se encuentra el disco de APB o el disco combinado de imipenem + APB. Una diferencia de halos, entre el antibiótico solo y el disco combinado, dará el criterio positivo de una cepa portadora de una carbapenemasa de tipo A o serin-carbapenemasa tipo KPC (Maurer et al, 2015).

2.4.1.5 Test de EDTA (diferenciación de MBL)

En párrafos anteriores, hemos determinado que las enzimas de tipo metalo- β -lactamasas requieren de uno a dos átomos de zinc, por lo que la adición de un agente quelante como el ácido etilen-triaminotetraacético (EDTA) impide que los átomos de zinc puedan llegar a su sitio activo y permitir la activación enzimática. De igual manera que en el caso del test de APB, la diferencia de halos dada por los discos de imipenem y de imipenem combinados o la apertura del halo (deformación) hacia el disco impregnado con EDTA (Mathers *et al*, 2013)

2.4.1.6 Métodos colorimétricos

Debido al aumento de casos de carbapenemasas, se ha desarrollado métodos de rápida detección que permiten un resultado en un plazo de horas (menos de dos horas) luego del aislamiento, sin necesidad de realizar las pruebas de detección mencionadas anteriormente.

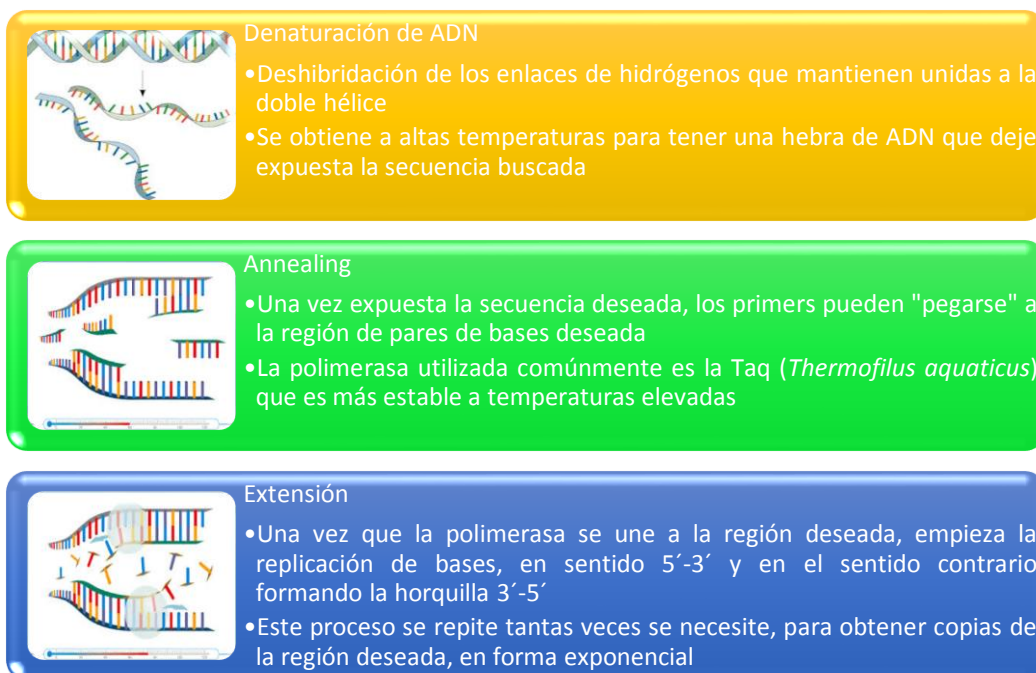
1. Carba NP: desarrollado por Patrice Nordmann y Laurent Poirel (Dortet, Poirel, & Nordmann, 2012), el método utiliza al rojo fenol como indicador de pH cuando se da la hidrólisis del carbapenem, que se añade al medio líquido en el que se suspende una colonia con tratamiento previo.
2. Blue Carba: a diferencia del método anterior, éste utiliza azul de bromotimol como indicador, que tiene un pH adecuado para el funcionamiento de las enzimas (6.0-7.6) (Pires, Novais, & Peixe, 2013). El principio de crecimiento es el mismo, aunque los colores varíen (negativo es azul y positivo, verde, amarillo) y los resultados se dan en un plazo máximo de 2 horas.

2.4.2. Métodos moleculares

2.4.2.1 PCR

La técnica más específica es, sin duda, el estudio molecular de las variantes de enzimas. Varios métodos, tanto convencionales como multiplex y en tiempo real han sido desarrollados para poder determinar la variante de serin-carbapenemasa y de metalo- β -lactamasas.

El principio básico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la obtención de varias copias de un material genético determinado, en cantidades exponenciales a las concentraciones iniciales de reacción; por ejemplo: una copia se duplicará en el primer ciclo, habrán cuatro copias para el segundo ciclo y así sucesivamente, hasta obtener un número determinado de copias en base al número de ciclos del programa (Joshi, 2010). Este método se divide en cuatro etapas fundamentales que se detallan a continuación:



Tomado, traducido y modificado de (Degen, Deufel, Eisel, Grünwald-Janho, & Keesey, 2006)

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de estudio

Este estudio tiene carácter descriptivo, porque sus objetivos son identificar y analizar las variables que dan a las carbapenemasas sus características y no intenta identificar causas o efectos o realizar generalizaciones de los comportamientos de las mismas. Es un estudio transversal retrospectivo porque se lleva a cabo en el año 2013.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Tamaño muestral

Este estudio pretende tomar la población total de cepas que ya han sido detectadas como no sensibles o resistentes a carbapenémicos por parte del Servicio de Microbiología del Hospital Pediátrico Baca Ortiz, durante el año 2013, mediante el equipo automatizado Vitek 2, que determina la especie y la susceptibilidad a antibióticos a través de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI o MIC- Minimum Inhibitory Concentration). Por lo tanto, no se realizará el cálculo de la muestra deseada, ya que la muestra es en realidad la población total.

El valor estimado de las muestras recolectadas para el 2013, hasta el 31 de octubre de ese año, fue de 39 muestras. Estas cepas son enviadas al Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI) para su análisis y de donde se espera recuperarlas para su análisis.

3.2.2 Muestreo

La recolección de las muestras deseadas para el estudio debe cumplir con los siguientes criterios:

3.2.2.1 Criterios de inclusión

- Se tomará como parte del estudio los aislados identificados dentro del servicio de laboratorio del Hospital, sea de consulta externa o del servicio de hospitalización.
- Las muestras deben ser recogidas, procesadas, aisladas e identificadas en el laboratorio de microbiología dentro del año 2013.
- Se aceptará todas las cepas que tengan la información completa (tipo de muestra, nombres del paciente, edad, etc. (ver Anexo 2: Hoja de datos) y que se encuentren registradas y preservadas en el Instituto de Salud Pública e Investigación.

3.2.2.2 Criterios de exclusión

Aquellas muestras que no tengan los datos solicitados en la encuesta, tengan inconsistencias entre los nombres de registro del cepario y las cepas conservadas o, en su defecto, no se encuentre el aislado, no serán tomadas como válidas y no contarán como parte de la población de estudio.

3.3 Operacionalización de la investigación

OBJETIVO	VARIABLE(S)	NATURALEZA	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	METODOLOGÍA / TÉCNICA/ INSTRUMENTO
<p>Clasificar las enzimas carbapenemasa positivo de acuerdo a los tipos de carbapenemasa KPC y MBL mediante la técnica de Hodge, el test de EDTA, ácido borónico y en escalera a partir de los aislados recuperados de las muestras biológicas del Hospital Baca Ortiz de Quito en el año 2013.</p>	<p>CARBAPENEMASA</p>	<p>Cuantitativa nominal</p>	<p>Identifica una enzima tipo KPC mediante características fenotípicas en ensayos de difusión en disco con un test de Hodge positivo y un test de ácido borónico con halo inducido.</p>	<p>KPC MBL</p>	$= \frac{\# KPC}{\# muestras} * 100$	<p>Test de Hodge, test de ácido borónico, test en escalera y test de inducción con EDTA</p>
			<p>Identifica una enzima tipo MBL mediante características fenotípicas en ensayos de difusión en disco con un test de Hodge positivo y un test de EDTA con halo inducido.</p>		$= \frac{\# MBL}{\# muestras} * 100$	

<p>Analizar la frecuencia de enzimas tipo VIM, KPC, NDM, IMP, OXA-48 mediante PCR convencional desde los aislados de muestras biológicas del Hospital Baca Ortiz de Quito en el año 2013.</p>	KPC	Cualitativa nominal dicotómica	Identifica la presencia de una enzima correspondientes a las familia KPC mediante la observación o ausencia de una banda por la técnica de PCR convencional.	KPC	$= \frac{\# KPC}{\# muestras} * 100$	PCR convencional
	OXA	Cualitativa nominal dicotómica	Identifica la presencia de una enzima correspondientes a las familia OXA-48 mediante la observación o ausencia de una banda por la técnica de PCR convencional.	OXA	$= \frac{\# OXA}{\# muestras} \times 100$	
	MBL	Cualitativa nominal dicotómica	Identifica la presencia de una enzima correspondientes a las familia MBL mediante la observación o ausencia de una banda por la técnica de PCR convencional.	VIM IMP NDM	$= \frac{\# NDM}{\# muestras} \times 100$ $= \frac{\# IMP}{\# muestras} * 100$ $= \frac{\# VIM}{\# muestras} * 100$	

<p>Establecer la especie más frecuente de enterobacteria, el servicio en el que se presenta una mayor ocurrencia, el origen de la muestra biológica y la edad de los pacientes a partir de los cuales se aislaron las cepas, provenientes de aislados obtenidos del Hospital Baca Ortiz de Quito en el año 2013.</p>	<p>ÁREA DE SERVICIO HOSPITALARIO</p>	<p>Cualitativa nominal politómica</p>	<p>Clasifica el área de servicio del Hospital Baca Ortiz de donde proviene la muestra biológica</p>	<p>NEFROLOGÍA NEUROLOGÍA EMERGENCIA PEDIATRÍA UROLOGÍA CONSULTA EXTERNA GINECOLOGÍA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATOLOGÍA NEUMOLOGÍA HEMATOLOGÍA CIRUGÍA GENERAL TRAUMATOLOGÍA</p>	$= \frac{\# \text{muestras en c/área}}{\# \text{muestras}} * 100$	<p>Hoja de recolección de datos</p>
--	--------------------------------------	---------------------------------------	---	---	---	-------------------------------------

	ORÍGEN DE SECRECIÓN	Cualitativa nominal politómica	Clasifica a las muestras por el tipo de secreción de donde provino el material biológico.	LÍQUIDO CEFALORA- QUÍDEO SANGRE ORINA ESPUTO ASPIRADO TRAQUEAL EXUDADO (ARTICULAR, ESTOMACAL, DE CATÉTER)	$= \frac{\# \text{muestras de } c/\text{lugar}}{\# \text{muestras}} * 100$	
	EDAD	Cuantitativa discreta	Clasifica las muestras por la edad biológica desde la fecha de nacimiento.	1 año, 2 años, 3 años, etc.	$= \frac{\# \text{muestras de } c/\text{edad}}{\# \text{muestras}} * 100$	

Tabla 2.- Operacionalización de variables

3.4 Obtención de datos

Los datos se obtendrán de los registros de hojas de envío de muestras del HBO y del registro de cepas del INSPI.

3.5 Procedimientos de laboratorio

3.5.1 Materiales y equipos

3.5.1.1 Materiales

- pipeta calibrada Labnet de regulación variable 1-10 ul
- pipeta calibrada Labnet de regulación variable 10-100 ul
- pipeta calibrada Labnet de regulación variable 100-1000 ul
- puntas de 10 ul AXYGEN (paquete de 1000)
- puntas de 20 ul AXYGEN (paquete de 1000)
- puntas de 1000ul AXYGEN (paquete de 1000)
- tubos eppendorf de 0.200 ml AXYGEN (paquete de 1000)
- crioviales de 1,5 ml AXYGEN (paquete de 500)
- papel absorbente
- papel parafinado PARAFILM
- fósforos
- cajas Petri
- guantes de nitrilo sin talco, talla Small
- material de vidrio (frascos con tapa de 500 ml, 100 ml, 50 ml; probetas de 1000 ml, 100 ml y 20 ml)
- hisopos de madera

3.5.1.2 Equipos

- cámara de extracción
- autoclave All American
- mechero
- incubadora Memmert
- refrigeradora con temperatura de -2 °C
- termociclador Eppendorf Mastercycle (Gradient)
- cámara de electrofóresis Hoeffer
- cámara de revelado, transiluminador UVP
- balanza Acculab
- fuente de poder Fisher III
- vórtex
- turbidímetro Micro Scan Siemens

3.5.1.3 Reactivos

- agua bidestilada grado molecular
- cocineta
- agar Mc Conkey frasco de 500 gr, GIBCO
- agar Mueller Hinton frasco de 500 gr, GIBCO
- discos de imipenem, ertapenem, meropenem, imipenem
- primers concentrados a 100 uM INVITROGEN forward y reverse para VIM, KPC, IMP, OXA-48, NDM
- Go Taq Hot Start master mix INVITROGEN para 100 reacciones
- EDTA en solución
- ácido borónico
- solución de HCL al 0,5 %
- marcador de peso molecular de 100 pares de bases para 100 reacciones Promega
- agarosa ULTRA PURE paquete de 250 gramos
- controles positivos para bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP}

Para todas las muestras que se encontraron en el cepario del INSPI se realizó el siguiente procedimiento:



3.5.2 Resiembra de cepas

La preparación de los medios se hizo según indicaciones del fabricante y se dispuso en cajas monopetri en donde se inoculó bajo la técnica de agotamiento individualmente y se las dejó en la incubadora durante 12 horas. Las cepas luego fueron examinadas por tinción de gram para la confirmación de bacilos gram negativos, y luego se procedió a realizar las demás técnicas.

Para la generación del cepario, se tomó una colonia única y se la diluyó en medio de conservación de leche, rotulada con el número de cepa que se tomó del cepario del INSPI, para su posterior repique.

3.5.3 Prueba de Hodge

Se siguió el siguiente protocolo de trabajo que se puede apreciar en la Foto 1 (autora):

- 1 • Preparar en 5 mL de caldo o solución salina una concentración 0,5 McFarland de una cepa de E. coli ATCC 25922
- 2 • Diluir la solución previa en 4,5 mL de caldo o solución salina (dilución 1:10)
- 3 • Realizar el estriado a partir de esta dilución en un agar Mueller Hinton y dejar secar de 3-5 minutos
- 4 • Colocar un disco de meropenem o ertapenem en la mitad de la zona de testeo
- 5 • Inocular la(s) cepa(s) a investigar, desde el borde del disco hacia afuera, hasta el borde de la caja
- 6 • Incubar durante 16-24 horas a 35 ± 2 ° C

Tomado, traducido y modificado de ((CDC), 2013)

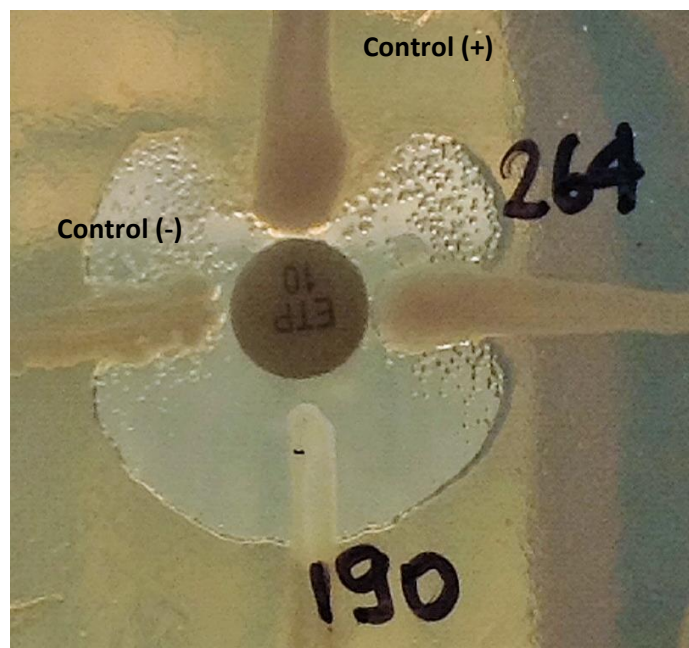


Foto 1.- Técnica de Hodge utilizada

3.5.4 Test en escalera

Realizar una dilución 0,5 Mac Farland

- Estriar un medio Mueller Hinton

Colocar los discos de imipenem, meropenem y ertapenem a 2 cm de cada uno

- Incubar a 37 ° C durante 12 horas

Medir los halos y anotar

3.5.5. Test de ácido borónico

El procedimiento para la preparación del ácido borónico se encuentra en el anexo. Luego de la hilera del test en escalera, se colocó un disco de imipenem y uno de meropenem a los que se añadió diez (10) uL de la solución de ácido borónico.

3.5.6 Test de EDTA

Se siguió la técnica de preparación descrita por Bartolini *et al.* 2014 (Bartolini, Frasson, Cavallaro, Richter, & Palù, 2014) y se colocó diez (10) uL de esta solución en un disco de imipenem. Esta caja, con ambos métodos se dejó durante doce (12) horas en incubadora a 37 °C y luego se procedió a leer los halos y a anotarlos.

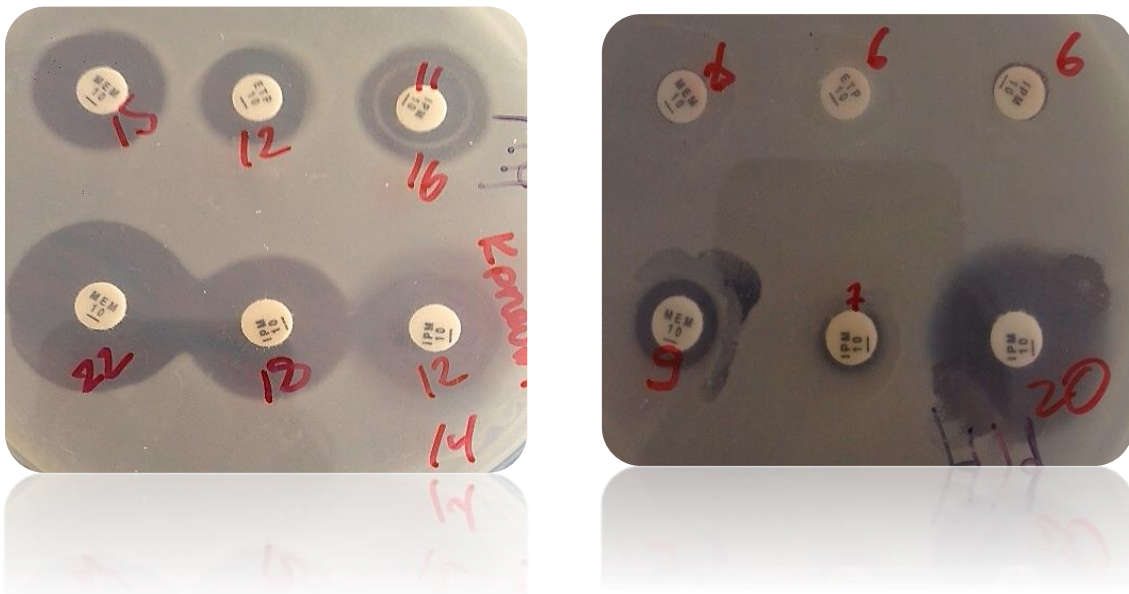


Foto 2.- Modelos de test en escalera y discos combinados con inhibidores. Derecha, EDTA. Izquierda, ácido borónico

3.5.7 Extracción de ADN

Se siguió el protocolo establecido por Newman (Newman, s.f.) que se detalla a continuación:

1	• Con un asa, tomar de dos a tres colonias puras del agar sangre
2	• Disolver la colonia en 100 uL de agua estéril en un tubo eppendorff de 1,5 mL
3	• Mezclar usando un vórtex
4	• Poner en baño María (94°C) durante 15 minutos
5	• Centrifugar a 14 000 rpm durante diez minutos
6	• Retirar el sobrenadante a un criovial de 1,5 ml

La cuantificación de ADN se encuentra en el Anexo 1. Las alícuotas de ADN obtenidas se encuentran guardadas conjuntamente con las cepas conservadas en leche para el cepario.

3.5.8 Reacción en cadena de la polimerasa

Este estudio propone la utilización de una técnica multiplex para la determinación de cinco genes: *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}*. Los primers usados en este estudio se resumen en la tabla a continuación:

PRIMER	SECUENCIA	ENZIMA	AMPLICIÓN
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTC	<i>bla_{IMP}</i>	232
IMP-R	TCGGTTTAAAYAAAACAACCACC		
VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	<i>bla_{VIM}</i>	390
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>bla_{OXA-48}</i>	438
OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	<i>bla_{NDM}</i>	621
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
KPC-Fm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	<i>bla_{KPC}</i>	798
KPC-Rm	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		

(Nordmann et al., 2011)

Se realizó un análisis de alineamiento de las secuencias de cada par de primers con las variantes encontradas para cada una de las enzimas disponibles en www.lahey.org/studies (acceso: 31 enero del 2014), utilizando el programa Mega 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) (ver anexo 4). Dentro de los ensayos de PCR, se intentó realizar una multiplex de los cinco primers; sin embargo, no

se logró diferenciar con claridad las bandas de VIM, OXA-48 Y NDM, por lo que se decidió dividir las reacciones en dos y tener dos multiplex distintas. El protocolo de trabajo se describe a continuación:

Multiplex 1	Concentración	Volumen/reacción
Agua molecular		9 ul
Go Tag Hot start		12 ul
Primer F KPC	10 uM	1 uL
Primer R KPC	10 uM	1 uL
Primer F IMP	10 uM	1 uL
Primer R IMP	10 uM	1 uL
Primer F OXA-48	10 uM	1 uL
Primer R OXA-48	10 uM	1 uL
Volumen		24 uL
Muestra	OD variable	1 uL
Volumen total		25 uL

Multiplex 2	Concentración	Volumen/reacción
Agua molecular		8 ul
Go Tag Hot start		12 ul
Primer F VIM	10 uM	1 uL
Primer R VIM	10 uM	1 uL
Primer F NDM	10 uM	1 uL
Primer R NDM	10 uM	1 uL
Volumen		24 uL
Muestra	OD variable	1 uL
Volumen total		25 uL

Con el siguiente protocolo de trabajo para el termociclador:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación	94°C	10 minutos	1
Annealing	94°C	30 segundos	36
	52,8°C	40 segundos	
	72°C	50 segundos	
Elongación	72°C	5 minutos	1
Final	4°C	Infinito	1

El revelado de los productos de PCR se realizó en un gel de agarosa al 2 %, a 110 voltios durante 90 minutos, con un control positivo y un control negativo por cada

corrida y su respectivo marcador de peso molecular. El resultado de los controles individuales y el ensayo de la multiplex con los cinco primers se muestra a continuación:

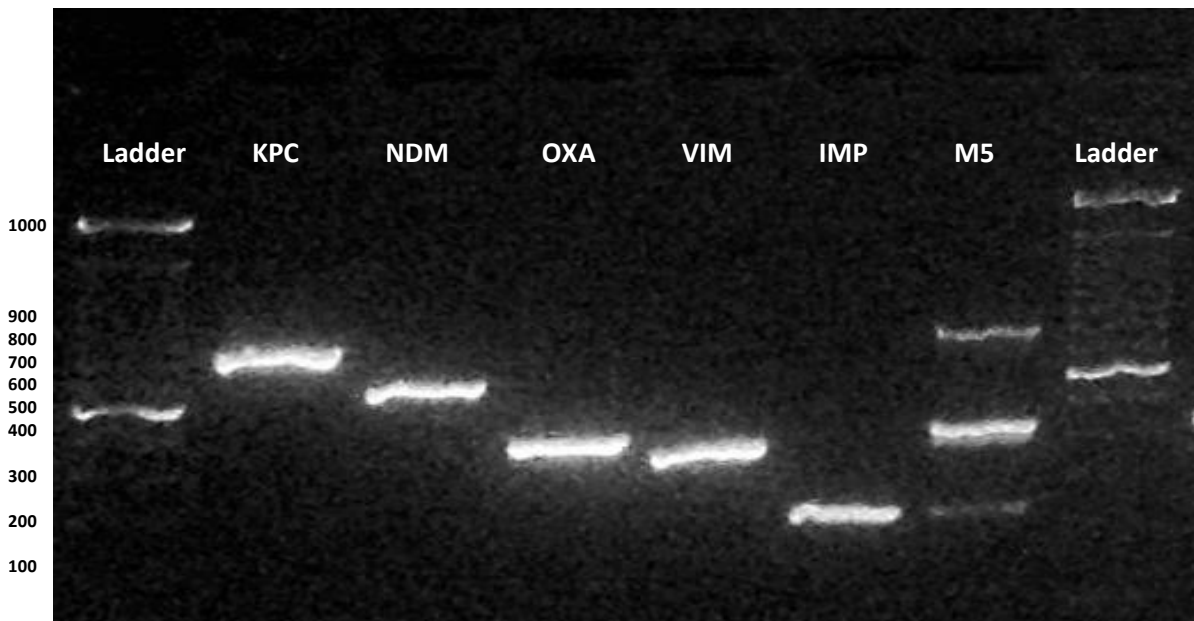


Foto 3.- Controles individuales y multiplex de cinco

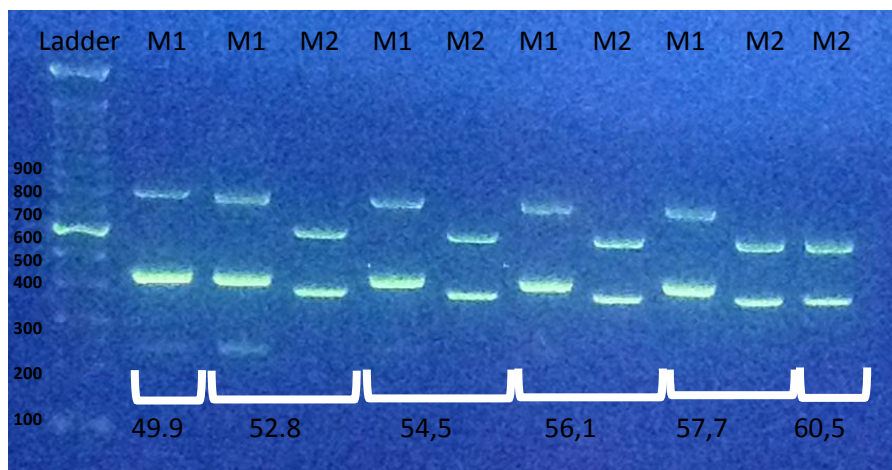


Foto 4.- PCR en gradiente de controles de multiplex 1 y multiplex 2

Los ensayos de sensibilidad se realizaron a partir de soluciones de primers individuales a 20 ng/uL, y luego diluciones seriadas dobladas para poder encontrar el límite de detección, que se encuentra ilustrado en la foto 5 para la multiplex 1 y en la foto 6 para la multiplex 2.



Foto 5.- Límite de detección con diluciones seriadas dobladas de controles de multiplex 1 (KPC, OXA-48, IMP)

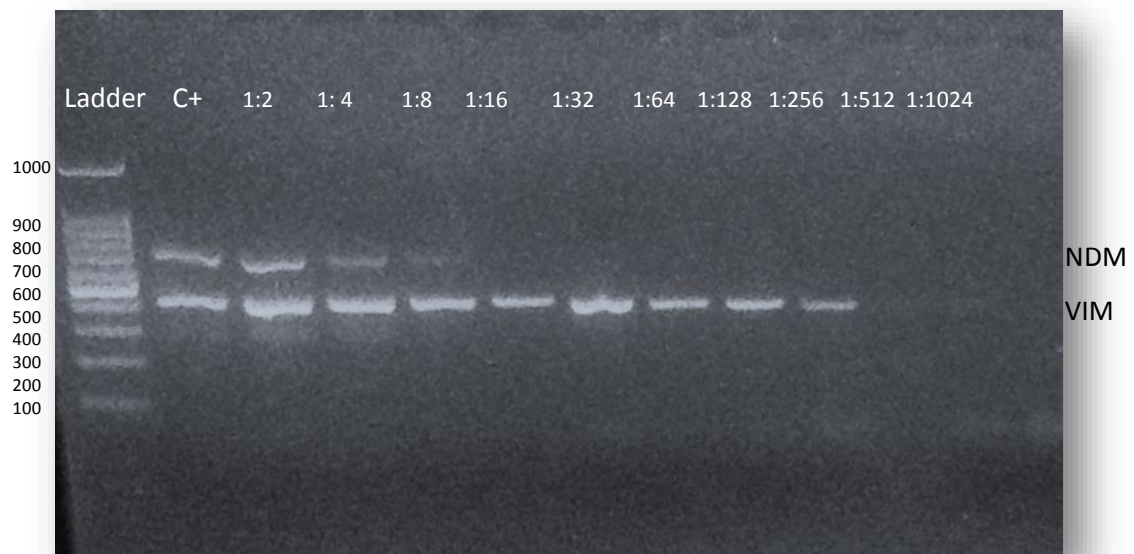


Foto 6.- Límite de detección de controles de multiplex 2 (VIM, NDM)

4. RESULTADOS

Una vez que se inició el proceso de trabajo el primer punto fue replicar el protocolo de trabajo de Nordmann *et al* (2012) donde el set de cinco pares de primers era evaluado en una sola multiplex. Sin embargo, las condiciones de corrida del gel no lo permitieron de esa manera y se procedió al protocolo de trabajo de PCR dividida en dos sets de multiplex, una con tres pares de primers (M1) y otro con dos pares de primers (M2).

Para la estandarización de la técnica molecular, se hizo una PCR en gradiente, que permitió decidir la temperatura de annealing adecuada para los primers, tomando en cuenta la temperatura sugerida por el estudio de Nordman *et al.* (Nordmann *et al.*, 2011) y partiendo de allí, el gradiente consistió en tomar dos grados de temperatura mayor y dos grados de temperatura menor, resultados que se encuentran en la foto 4. Ahí se observa que la temperatura ideal es la de 52,8 aunque el inconveniente presentado ha permanecido en el amplicón de IMP que tiene poca visibilidad en otras temperaturas. Todas las demás bandas de los amplicones estudiados son visibles a las demás temperaturas, sin inconvenientes. Ambos ensayos (de gradiente y de multiplex de cinco, se realizaron con los controles estandarizados por la Universidad Tecnológica de Dinamarca). El revelado del gel se intentó, en primer lugar, con las recomendaciones del autor original (Nordmann *et al.*, 2011); sin embargo, el corrimiento del ladder hizo que sea modificado el protocolo descrito previamente: 90 minutos a 110 voltios en la cámara electroforética utilizada. Una vez que los controles fueron observados con claridad, se procedió a realizar el límite de detección por diluciones seriadas dobladas de las multiplex respectivas con los controles, llegando a identificar hasta diluciones de 1:4 (5 ng/uL) partiendo de una concentración de 20 ng/uL en cada multiplex. En las fotos 7 y 8 se puede observar algunas muestras con los controles respectivos de cada multiplex.

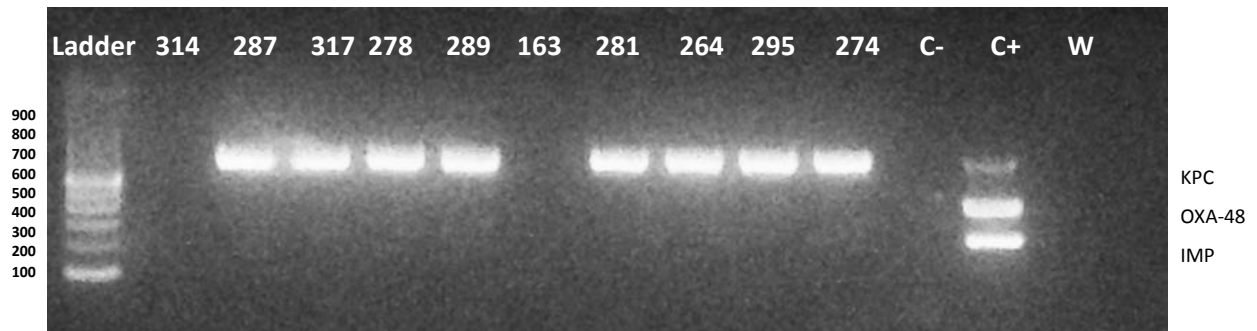


Foto 7.- Multiplex 1: Muestras y controles.

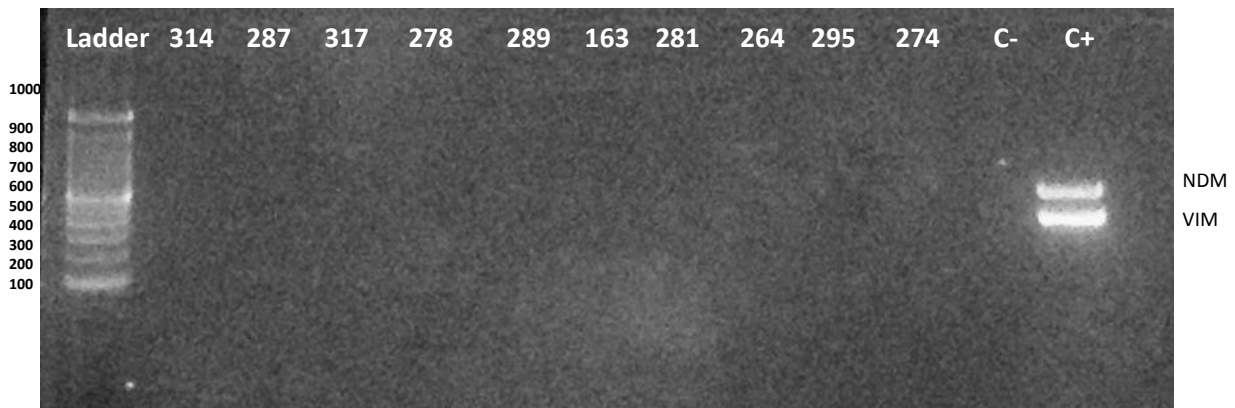


Foto 8.- Multiplex 2: muestras con controles.

La distribución de las cepas con sospecha de ser productoras de carbapenemasas para el año analizado, se encuentra a continuación:

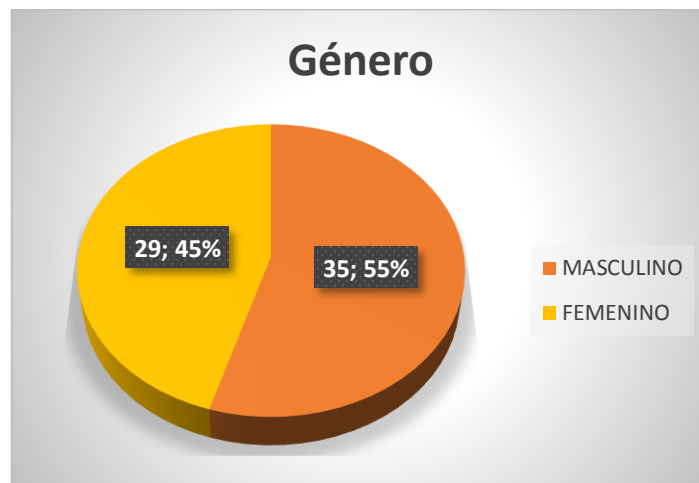


Gráfico 1.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI, distribuidas según género para el 2013.

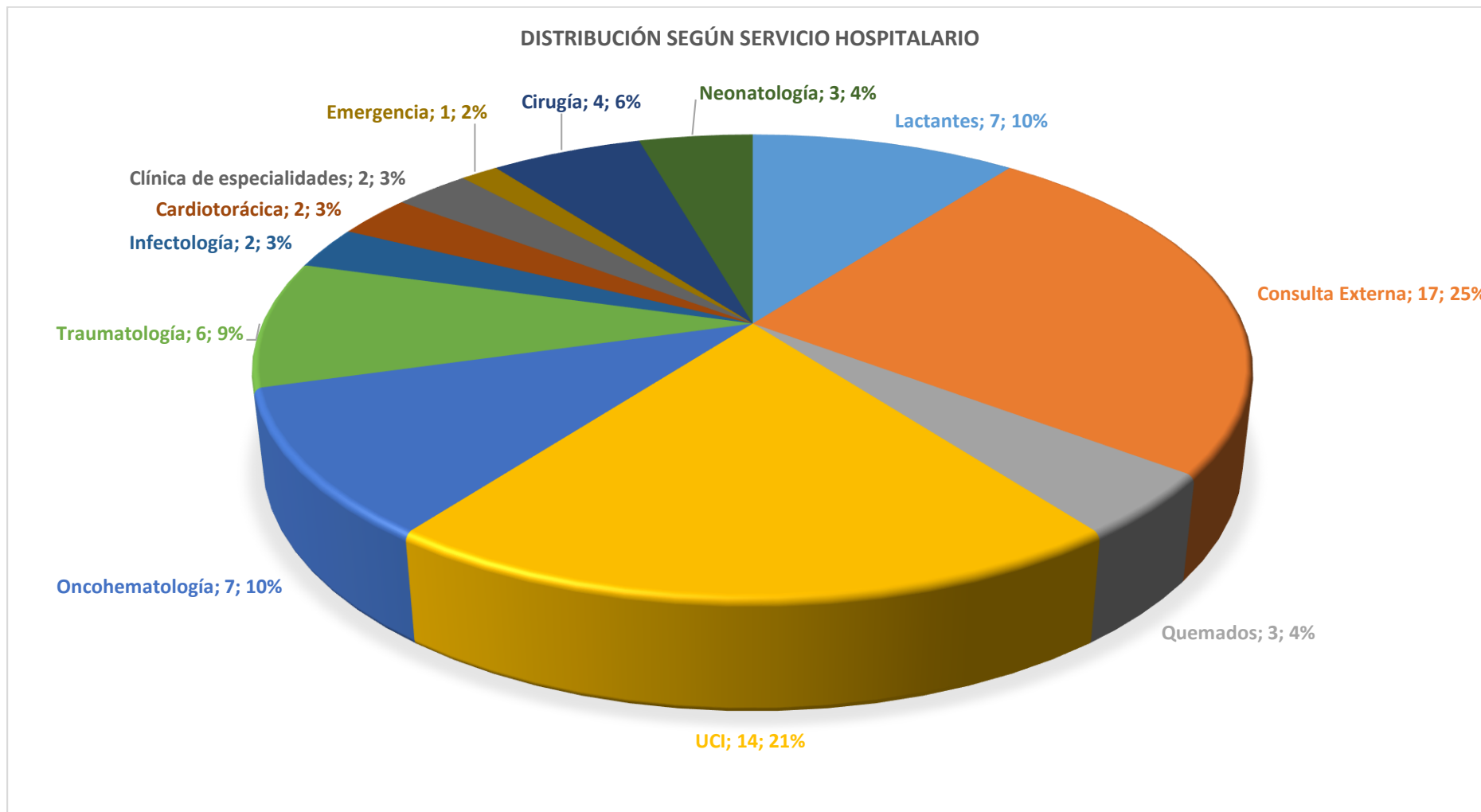


Gráfico 2.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI, en base a servicio hospitalario para el año 2013.

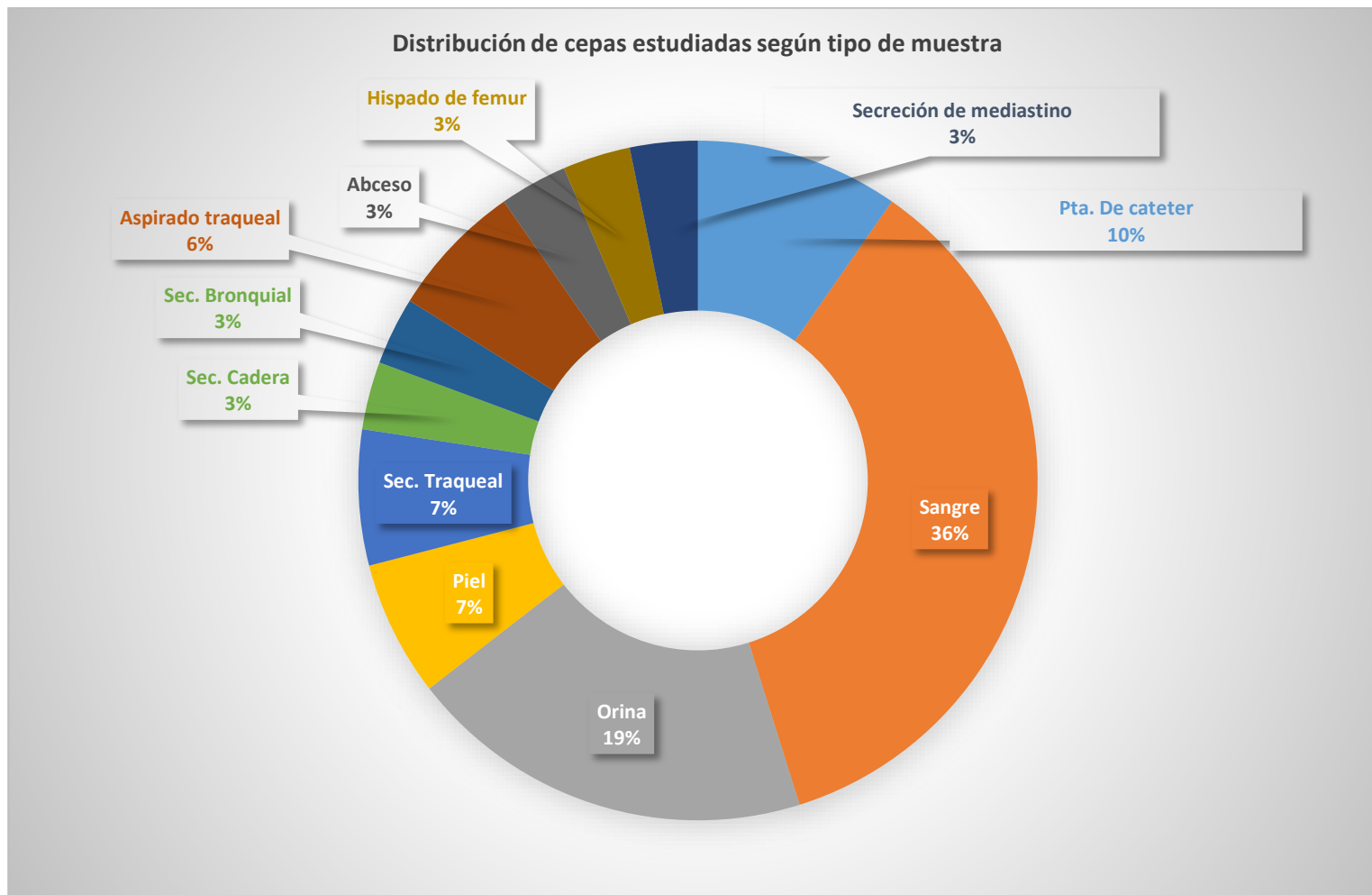


Gráfico 3.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI y estudiadas, en base a tipo de muestra para el año 2013.

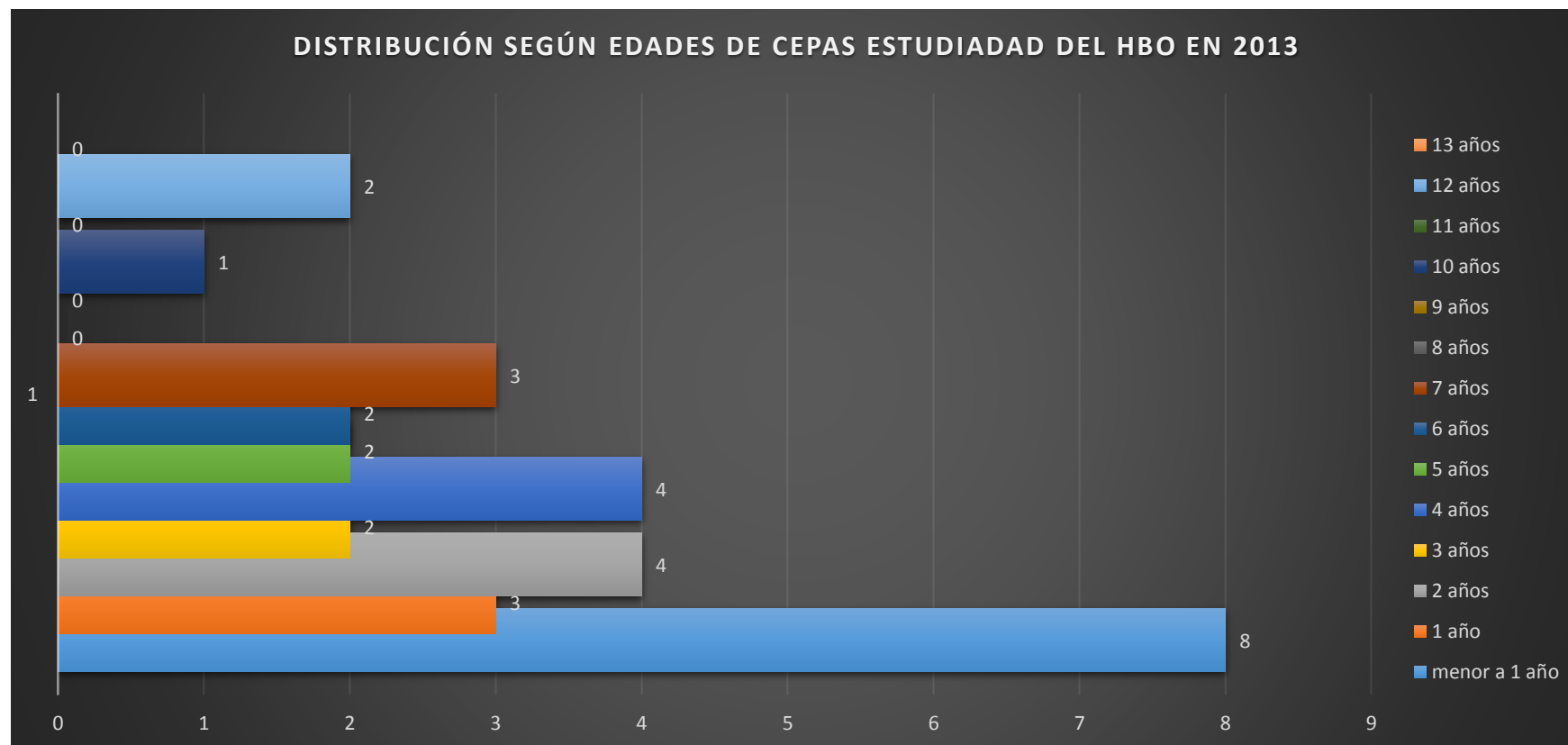


Gráfico 4.- Distribución de cepas del HBO referidas al INSPI estudiadas según edad de los pacientes en 2013.

Los resultados de las pruebas fenotípicas y genotípicas se resumen en la tabla 3 (véase Anexo 3).

No se encontraron MBL en las cepas estudiadas ni mecanismos de resistencia combinados. La única resistencia encontrada fue la de KPC, con una prevalencia de 67% en las cepas estudiadas.



Gráfico 5.- Prevalencia de KPC en cepas estudiadas del HBO en 2013.

Más de la mitad de las muestras estudiadas fueron *Klebsiella pneumoniae* (61%) como se muestra en la Tabla 7, seguido de *Enterobacter cloacae* con 7% (tres muestras).

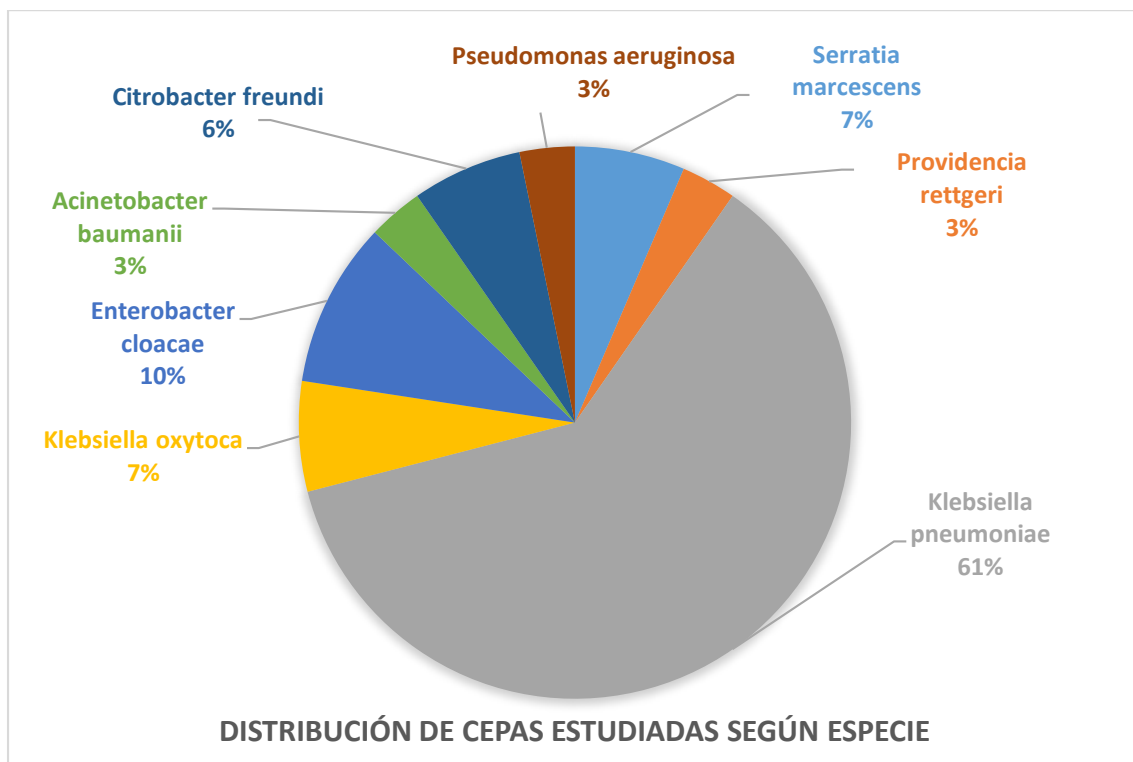


Gráfico 6.- Distribución de cepas estudiadas del HBO en el 2013, según especie identificada

5. DISCUSIÓN

El estudio tenía por objetivo estudiar las cepas provenientes del HBO que sean referidas al INSPI durante el 2013, pero debido a que no todas las cepas se encontraron viables (tres de ellas al resembrar eran cocos gram positivos y las demás no se encontraron en el cepario) sólo se llegó a analizar treinta y un muestras. Los controles positivos son visibles en las bandas respectivas que el estudio de Nordmann *et al.* (2012) describió y no ha habido interferencias siguiendo el protocolo aquí establecido con los controles utilizados.

Las cepas estudiadas pueden ser categorizadas como negativas solamente para los primers analizados, y no se descarta que haya otros tipos de resistencias; al igual que las cepas que son positivas para KPC pueden ser positivas para otros mecanismos de resistencia a antibióticos que no son contempladas en este estudio. De la misma manera, aquellas muestras que no dieron un resultado positivo para las enzimas estudiadas y que, sin embargo, presentan halos disminuidos para ertapenem, meropenem e imipenem, podrían explicarse por una pérdida de porinas o algún otro mecanismo asociado a AMPc o BLEE que no han sido cubiertos en este estudio y que podrían ser evaluados en otros estudios.

Los estudios realizados en América Latina dan cuenta de que las carbapenemasas tipo KPC tienen un índice de mortalidad superior y que aquellas que se muestran susceptibles a carbapenémicos pero que, genóticamente, son positivos para KPC dan fallas terapéuticas que provocan la muerte del paciente por falta de una prueba acertada, incluso en aquellos que han dado halos de sensibilidad dentro de los rangos de susceptibilidad (Maya et al., 2013) que en el caso de los pacientes pediátricos se convierte en un escenario más crítico. De allí que el screening de cepas para mecanismos de resistencias que no se limiten exclusivamente a carbapenemasas es de gran utilidad para el tratamiento y la recuperación del paciente debido a que la terapéutica mejora una vez que los perfiles de resistencia a antibióticos se informan de manera oportuna.

Esto se vuelve aún más importante en las enzimas de tipo OXA-48 que pueden no denotar las características de resistencia a carbapenémicos y allí radica la importancia de evaluar estas cepas y las de años subsiguientes en busca de otro mecanismo de resistencia o de co-resistencias, además del reciente anuncio de una cepa de NDM tipo 1 en la ciudad de Guayaquil por parte de Zurita y Parra. En un estudio de Zurita et al (2013) se indica que de 23 cepas estudiadas, todas *Klebsiella pneumoniae*, el 100% dio positivo para KPC-2 y tres cepas fueron resistentes a la vez para VIM; lo que no se encontró en este estudio. Sin embargo, la frecuencia de KPC entre ambos estudios es muy similar (19 cepas de 31, todas positivas para KPC). Por lo que sigue siendo de relevancia los estudios como este que permiten ver las características genéticas o pesquisar posibles nuevos mecanismos de resistencia todavía no descritos en el HBO.

La diferencia de halos entre los discos de imipenem con EDTA y de imipenem con ácido borónico no dio el resultado que la bibliografía relata ((Tsakris et al., 2009), (Tsakris et al., 2010), (Birgy et al., 2012)) por lo que estas técnicas in house deberían ser mejoradas y puestas a prueba de nuevo para poder realizar estadísticas de sensibilidad y especificidad.

6. CONCLUSIONES

- No se encontraron multiresistencias genéticas de carbapenemasas en las cepas estudiadas en el año 2013 en el HBO, como lo analizó Gómez en 2011 en nueve hospitales -donde apenas el 2% de las cepas presentaba un patrón de resistencia a carbapenémicos- (Gómez Jaramillo, 2011) sin encontrar muestras positivas para bla_{VIM}, bla_{IMP} o bla_{GES} en 42 muestras sospechosas de carbapenemasas.
- Sin embargo, a diferencia del estudio de Gómez (Gómez Jaramillo, 2011) donde 14,29% muestras fueron positivas para el bla_{KPC}, este estudio encontró un 67% de cepas positivas para el gen.
- El estudio de Ayala (Ayala Sánchez, 2011) realizado en *Pseudomonas aeruginosa* indica que existen cepas con resistencias múltiples detectando IMP y VIM (cepas 429, 403, 16) conjuntamente, sin embargo, no se encontraron multiresistencias en ninguna de las cepas estudiadas.
- Un estudio adicional que podría realizarse es el análisis clonal entre las cepas que son KPC positivas, para poder encontrar un origen al brote y, de ser posible, comparar éstas con otros brotes en hospitales públicos por técnicas moleculares de genotipaje (Multi Locus Sequence Typing-MLST, secuenciación).
- Se debería establecer un protocolo de respaldo de cepas para cada laboratorio, para que estudios retrospectivos puedan ser llevados a cabo con el uso de nuevas tecnologías y el mejor entendimiento de las transmisiones genéticas entre bacterias.

7. RECOMENDACIONES

Debido a que las condiciones de esta investigación no permitieron el desarrollo de una multiplex de los cinco pares de primers, es recomendable que se desarrolle una investigación (tal vez con modificaciones de los pares de primers) para poder realizar el screening de manera más rápida en un mismo protocolo de trabajo e incluso se podría lograr incluir otro set de primers (bla-*CXM*, bla-*TEM*, bla-*SHV*) para que el screening de mecanismos de resistencia puedan ser más eficientes, logrando resultados epidemiológicos más rápidos y completos.

El desarrollo de técnicas moleculares como la que se describen en este estudio, son de vital importancia para el desarrollo de otros estudios complementarios que incluyan más grupos de resistencias a otros antibióticos y de pérdidas de permeabilidad que provocan la muerte del paciente o estadías innecesarias que pudieren ser evitadas con tiempos de respuesta más cortos y resultados moleculares relevantes.

El trabajo conjunto, la creación de redes de trabajo interinstitucional (privado y público) con la difusión de la información y de técnicas, hacen que las medidas en pro del paciente mejoren; toda vez que se entienden los procesos de transmisión y las medidas preventivas que se pueden tomar en todas las instancias del sistema de salud manejando los brotes epidemiológicos de manera acertada

8. BIBLIOGRAFÍA

Ayala, Sofía. (2011) **Detección de genes que codifican la resistencia a carbapenems (tipo Serin-B-lactamasas) en *Pseudomonas aeruginosa***, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, páginas 30-40, 2011.

Bartolini, A., Frasson, I., Cavallaro, A., Ritcher, S. N., & Palu, G. (2014). **Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae**. *Gut Pathogens*, 6, 13. <http://doi.org/10.1186/1757-4749-6-13>. 2014.

Birgy, André. Bidet, Philippe. Genel, Nathalie. Doit, Catherine. Decré, Dominique. Arlet, Guillaume. Bingena, Edouard. (2012) **Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated -Lactamases in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae**. *Journal of clinical Microbiology*, abril 2012, volumen 50, número 4, p. 1295–1302. [doi:10.1128/JCM.06131-11](https://doi.org/10.1128/JCM.06131-11).

Brem, J. . V. S. S. . Z. D. . S. C. J. (n.d.). **B1 Mbl Inhibitor Structures**. *A ser publicado*. Recuperado de: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=4BZ3&bionumber=1>.

Bush, K. (2012). **Chapter 12: Evolution of B-lactamases: Past, Present and Future**. En T. J. Dougherty & M. J. Pucci (Eds.), *Antibiotic Discovery and Development* (1° ed., págs. 397–425). Springer US. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1>. 2012

Bush, K. (2013). **Carbapenemases: Partners in crime**. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.01.005>. 2013.

Centros para el control y prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) (2012) **Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) 2012 CRE Toolkit**, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Healthcare Quality Promotion. 2012.

Centros para el control y prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) (2013). **Modified Hodge test for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae**, 2–4. 2013.

Cifuentes, Marcela *et al.* (2012) **First isolation of kpc in Chile: from Italy to a public hospital in Santiago**. Revista chilena de Infectología, Santiago, v. 29, n. 2, abril 2012. [doi: 10.4067/S0716-10182012000200018](https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200018).

Clinical and Laboratory Standards Institute, (2014) **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty first information supplement**; páginas 55-57, CLSI M100-S21 (ISBN 1-56348-742-1) Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, E.E.U.U., 2014.

Croughs P. D., Li B., Hoogkamp-Korstanje J. A. A., Stobberingh E. (2012) **Resistance to carbapenems is often the result of loss of the OprD porin**, European Journal of Clinical Microbiology of Infectious Disease (2012) 32:283–288. [doi 10.1007/s10096-012-1741-4](https://doi.org/10.1007/s10096-012-1741-4). 2012.

Cuzon, Gaelle. Naas, Thierry. Nordmann, Patrice. (2011) **Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in bla_{KPC} Gene Mobilization**. American Society for Microbiology, Nov. 2011, p. 5370–5373 Vol. 55, No. 11. [doi:10.1128/AAC.05202-11](https://doi.org/10.1128/AAC.05202-11). (2011)

Docquier, J.-D., Calderone, V., De Luca, F., Benvenuti, M., Giuliani, F., Bellucci, L., Mangani, S. (2009). **Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases**. *Chemistry & Biology*, 16(5), 540–7. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.04.010>. 2009.

Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). **Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <http://doi.org/10.1128/AAC.01395-12>. 2012.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2011). **Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer.** ECDC; Stockholm, September 2011. ISBN 978-92-9193-317-4. [doi: 10.2900/59034](https://doi.org/10.2900/59034). 2011.

Fresnadillo M, García García M, García Sánchez E, García Sánchez J. (2010). **Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias**, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volumen 28, Páginas 53-64. 2010

Gibb, B. C. (2011). **The emergence of emergence.** *Nature Chemistry*, 3(1), 3–4. <http://doi.org/10.1038/nchem.934>. 2011.

Gómez, Ana María. (2011) **Presencia de carbapenemasas de muestras recolectadas en nueve hospitales de la ciudad de Quito, de mayo del 2009 a noviembre del 2010**, Tesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, paginas 41-69, 2011.

Hirsch E., Tam V. (2010) **Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistance infection.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*(2010). [Doi:10.1093/jac/dkq108](https://doi.org/10.1093/jac/dkq108). 2010.

Joshi, M. (2010). **Polymerase Chain Reaction : Principles and Methods.** *International Journal of Biomedical Research*. Retrieved from www.ssjournals.com. 2010.

Kassis-Chikhani N., Decré D., Ichai P., Sengelin C., Geneste D., Mihalía L., Dussaix E., Arlet G. (2010) **Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [doi: 10.1093/jc/dkq132](https://doi.org/10.1093/jc/dkq132). 2010.

Ke, W. . B. C. R. . T. J. M. . B. R. A. . A. F. W., Bethel, C. R., Thomson, J. M., Bonomo, R. A., & van den Akker, F. (2007). **Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A beta-lactamases.** *Biochemistry*, 46(19), 5732–5740. <http://doi.org/17441734>. 2007.

Kim, Y. . T. C. . J. R. . B. G. . S. J. . J. A. (n.d.). **Crystal Structure of New Delhi Metallo-beta-Lactamase-1 in the Complex with Hydrolyzed Meropenem.** *To Be Published*. Recuperado de: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=4RBS&bionumber=1>.

Marcano, D., Pasterán, F., Rapoport, M., Faccone, D., Ugarte, C., Salgado, N., Payares, D., Spadola, E., Lopez, Y., Maggi, G., Galas, M., Sanchez, D. (2008) **First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela.** *The Journal of Infection in Developing Countries*, North America, 2, junio, 2008. Disponible en: <http://www.iidc.org/index.php/journal/article/view/19738358/158>. Fecha de acceso: 2 de febrero del 2013.

Maurer, FP. Castelberg, C. Quiblier, C. Bloemberg, GV. Hombach, Q. (2015) **Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with Enterobacteriaceae and development of a practical diagnostic algorithm.** *Journal of Clinical Microbiology*, Jan;53(1):95-104. [doi: 10.1128/JCM.01692-14](https://doi.org/10.1128/JCM.01692-14). Epub 2014 Oct 29.

Mathers, Amy J. Carroll, Joanne. Sifri, Costi D. Hazenb, Kevin C. (2013) **Modified Hodge Test versus Indirect Carbapenemase Test: Prospective Evaluation of a Phenotypic Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) in Enterobacteriaceae.** *Journal of Clinical Microbiology*, abril 2013, Volume 51 Número 4, p. 1291–1293. 2013.

Maya, Juan. Ruiz, Sory. Blanco, Victor. Gotuzzo, Eduardo. Guzman-Blanco, Manuel. Labarca, Jaime. Salles, Mauro. Quinn, Jhon. Villegas, María. (2013). **Current Status of Carbapenemases in Latin America.** *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2013;11(7):657-667.

Meini, M.-R., Llarrull, L., & Vila, A. (2014). **Evolution of Metallo-β-lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution.** *Antibiotics*, 3(3), 285–316. <http://doi.org/10.3390/antibiotics3030285>. 2014.

Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis L. (2003) ***Escherichia coli* with a Self-Transferable, Multiresistant Plasmid Coding for Metallo- β -Lactamase VIM-1** Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2003 Enero; 47(1): 395–397. doi: [10.1128/AAC.47.1.395-397.2003](https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.395-397.2003)

Monteiro J., Fernandes A., Dutra M., Peirano G. y Gales A. (2009) ***First Report of KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae Strains in Brazil***. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 53(1):333. doi: [10.1128/AAC.00736-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00736-08), 2009.

Murray, P. Rosenthal, K. Pfaller, M. (2005) **Microbiología médica**, capítulo 31, **Enterobacteriaceae**, páginas 323-324. Quinta edición, Elsevier Masson, 2006

Naas,Thierry. Cuzon,Gaelle. Villegas, Maria-Virginia. Lartigue, Marie-Frédérique. Quinn, John P. Nordmann, Patrice. (2008) **“Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase *bla*_{KPC} Gene”**, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, abril 2008, p. 1257–1263 Vol. 52, No. 4 . doi:[10.1128/AAC.01451-07](https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07). 2008.

National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Healthcare Quality Promotion. (2012) **Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)**, 2012.

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). **Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae**. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–8. <http://doi.org/10.3201/eid1710.110655>. 2011.

Palzkill, T. (2013). **Metallo- β -lactamase structure and function**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 91–104. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x>. 2013.

Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. a., & Bonomo, R. a. (2011). **Carbapenems: Past, present, and future**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <http://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>. 2011.

Pires, J., Novais, A., & Peixe, L. (2013). **Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures.** *Journal of Clinical Microbiology*. <http://doi.org/10.1128/JCM.01634-13>. 2013.

Pulido I, Mantilla J. R, Valenzuela E., Reguero M. T., González E. B. (2011) **Distribution of extended spectrum β -lactamases-codifying genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals of Bogota, D.C., Colombia.** *Biomédica*; 31(1): 15-20. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01204572011000100003&lng=en. Recuperado el 7 de febrero del 2013.

Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). **Carbapenemases: The versatile β -lactamases.** *Clinical Microbiology Reviews*. <http://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>. 2007.

Robledo I.E., Aquino E.E., Santé M.I. *et al.* (2010) **“Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico”.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy*,54(3), 1354–1357, 2010.

Rodrigues, Camila. (2011) **Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: a reality check,** Regional health forum-Volumen 15, número 1, 2011.

Servicio Antimicrobianos, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) “Dr. Carlos G. Malbran”. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/01/Preparacion-discos-cim-BORONICO-PCCLatin.pdf>.

Tegmark-Wisell K, Hæggman S, Gezelius L, Thompson O, Gustafsson I, Ripa T, Olsson-Liljequist B.(2007). **Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden.** *Euro Surveillance*; **12(51):pii=3333**. Disponible online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3333>. 2007

Villegas MV, Lolans K, Correa A , *et al.* (2006) **First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South**

America; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug. 2006, p. 2880–2882 Vol. 50, No. 8 0066-4804/06/\$08.00_0. [doi:10.1128/AAC.00186-06](https://doi.org/10.1128/AAC.00186-06).

Yamaguchi, Y., Kuroki, T., Yasuzawa, H., Higashi, T., Jin, W., Kawanami, A., Kurosaki, H. (2005). **Probing the role of Asp-120(81) of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies, and X-ray crystallography.** *The Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20824–32. <http://doi.org/10.1074/jbc.M414314200>. 2005.

Yigit H, Queenana AM, Anderson GJ *et al.* (2001) **Novel carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.** *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy* 45:1151-61, 2001.

Zurita, Jeannette. (2012) **Resistencia bacteriana en el Ecuador**, Centro de documentación, Pontificia Universidad Católica, página 72, 2012.

Zurita, Iñiguez, Alcócer, Ortega, Gómez, Maldonado. (2010) ***Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC: primer reporte en el Ecuador.** Disponible en www.zuritalaboratorios.com/indez.php?option=com_content&view=article&id=77:carbapenemasa-kpc&catid=37:congresos-postera-temas-libres&itemid=50. Recuperado el 22 de marzo del 2012.

Zurita, Alcocer, Ortega-Paredes, Barba, Iñiguez, Mora. (2013) **Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals.** [doi:10.1016/j.jgar.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.06.001)

9. ANEXOS

Anexo 1: Tabla de concentraciones de ADN de muestras y controles empleados, con Nanodrop.

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
Blank								
oxa 48	96,9	ng/μl	1,939	1,072	1,81	0,9	DNA	50
vim	25	ng/μl	0,499	0,276	1,81	0,9	DNA	50
kpc 3	29,8	ng/μl	0,596	0,297	2,01	1,01	DNA	50
ndm	23,7	ng/μl	0,473	0,235	2,02	1,49	DNA	50
imp	28,8	ng/μl	0,576	0,272	2,12	1,73	DNA	50
kpc2	48,3	ng/μl	0,966	0,493	1,96	1,25	DNA	50
312	37,2	ng/μl	0,745	0,404	1,84	0,95	DNA	50
269	31,9	ng/μl	0,638	0,378	1,69	0,61	DNA	50
266	21,4	ng/μl	0,428	0,259	1,65	0,62	DNA	50
279	53,1	ng/μl	1,062	0,606	1,75	0,72	DNA	50
320	10,5	ng/μl	0,209	0,114	1,83	0,53	DNA	50
282	44	ng/μl	0,88	0,506	1,74	0,64	DNA	50
288	41,3	ng/μl	0,825	0,5	1,65	0,59	DNA	50
267	32,3	ng/μl	0,646	0,407	1,59	0,48	DNA	50
313	13,4	ng/μl	0,267	0,151	1,76	0,89	DNA	50
294	125,2	ng/μl	2,503	1,138	2,2	1,58	DNA	50
314	177,6	ng/μl	3,551	1,801	1,97	1,22	DNA	50
287	162,7	ng/μl	3,254	1,555	2,09	1,24	DNA	50
317	71,5	ng/μl	1,431	0,681	2,1	1,6	DNA	50
278	93,4	ng/μl	1,868	0,865	2,16	1,58	DNA	50
289	82,5	ng/μl	1,649	0,746	2,21	1,65	DNA	50
163	70,4	ng/μl	1,407	0,681	2,07	1,67	DNA	50
281	89,7	ng/μl	1,793	0,983	1,82	1,12	DNA	50
264	122,4	ng/μl	2,447	1,172	2,09	1,58	DNA	50
295	110,8	ng/μl	2,215	1,019	2,17	1,79	DNA	50
274	115,8	ng/μl	2,316	1,081	2,14	1,39	DNA	50
311	60,9	ng/μl	1,219	0,76	1,6	0,86	DNA	50
270	30,3	ng/μl	0,606	0,372	1,63	1,07	DNA	50
190	11,5	ng/μl	0,231	0,115	2,01	1,05	DNA	50
277	17,1	ng/μl	0,342	0,182	1,88	1,05	DNA	50
272	31,9	ng/μl	0,638	0,348	1,84	0,87	DNA	50
264	13,4	ng/μl	0,268	0,138	1,94	1,51	DNA	50
286	18,7	ng/μl	0,375	0,208	1,8	1,1	DNA	50
273	17	ng/μl	0,34	0,174	1,95	1,17	DNA	50
309	22,4	ng/μl	0,449	0,245	1,84	0,95	DNA	50
284	23	ng/μl	0,46	0,241	1,9	0,96	DNA	50
276	30,6	ng/μl	0,613	0,367	1,67	1,63	DNA	50
162	39,8	ng/μl	0,796	0,437	1,82	0,73	DNA	50
266	62,7	ng/μl	1,254	0,699	1,79	0,75	DNA	50
280	15,8	ng/μl	0,317	0,162	1,95	0,93	DNA	50

Tabla 3.- Concentración de ADN en muestras y controles

Anexo 2: Técnica de preparación de solución de ácido fenilborónico según www.antimicrobianos.com.ar

b

**3-aminofenil
BORONICO
Sol madre (SM)
300 mg/ml**

Solvente para la preparación de la SM según presentación química del APB:

APB hemisulfato (Boron Molecular, catálogo BM563; Sigma Aldrich catálogo A71751; Fluka catálogo 09198): agua

APB monohidrato (Boron Molecular, catálogo BM130; Sigma Aldrich catálogo 287512): DMSO o N-N-dimetil-formamida

APB hidrocloreto (Sigma Aldrich catálogo 410705): agua

Conservar en freezer o refrigerado. Solución extemporánea. En todas las presentaciones descriptas, la pureza de APB supera el 97% por lo que no es necesario efectuar correcciones

**Doble disco y
Disco
combinado:**

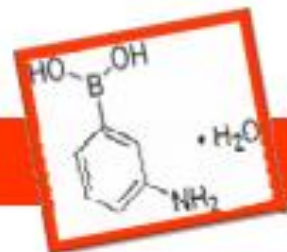
Diluir 1/10 SM en H₂O
(cc. final 30 mg/ml = 30 µg/µl)
Agregar 10 µl por disco
(300 µg/disco)

Cim

(agar dilucion):

Diluir 1/50 SM en H₂O (6 mg/ml)
Agregar 1 ml por placa, suplementar
con el ATB a ensayar y agregar
cantidad suficiente de Mueller Hinton
agar hasta volumen final de 20 ml.
(cc. final 0.3 mg/ml = 300 µg/ml).

PREPARACION DE DISCOS Y CIM CON ACIDO 3-AMINOFENIL-BORONICO
Servicio Antimicrobianos - INEI-ANLS "Dr. Carlos G. Malbrán"
Buenos Aires, Argentina. © 2010



Pastaran y cols *Journal Clinical Microbiology*, 47:1631-1639, 2009

Anexo 3: Tabla de resultados de pruebas fenotípicas y genotípicas de cepas del HBO referidas al INSPI en el año 2013.

CEPA	EDAD	MUESTRA	GÉNERO Y ESPECIE	Meropenem	Ertapenem	Imipenem	IMI EDTA	IMI APB	MERO APB	HODGE	KPC	IMP	OXA-48	NDM	VIM
163	7 años	Pta. Catéter	Providencia rettgeri	26	24	20	30	32	33	-	-	-	-	-	-
264		Sangre	Klebsiella oxytoca	13	14	10	22	22	23	+	+	-	-	-	-
266	4 años	Orina	Klebsiella Neumoniae	6	6	6	13	16	20	+	+	-	-	-	-
267	10 años	Piel	Entobacter cloacae	18	6	21	28	23	18	-	-	-	-	-	-
269	9 meses	Orina	Klebsiella pneumoniae	6	6	11	18	15	16	+	+	-	-	-	-
270	4 años	Sangre	Klebsiella pneumoniae	12	6	11	15	18	17	+	+	-	-	-	-
271/272	1 año	Orina	Enterobacter cloacae	1	10	10	13	14	17	+	+	-	-	-	-
273	2 meses	Sangre	Acinetobacter baumannii	18	16	15	17	18	21	+	+	-	-	-	-
274	3 años	Orina	Klebsiella pneumoniae	10	6	11	16	14	11	+	+	-	-	-	-

276	2 meses	Sangre	Citrobacter freundii	8	6	14	+			+	+	-	-	-	-
277	4 años	Sangre	Klebsiella pneumoniae	20	15	17	17	21	23	+	+	-	-	-	-
278	11 días	Sangre	Klebsiella pneumoniae	14	14	10	13	12	16	+	+	-	-	-	-
279	2 años	Sangre	Citrobacter freundii	10	6	10	15	16	16	+	+	-	-	-	-
280	4 años	Sangre	Klebsiella pneumoniae	17	16	19	22	22	20	+	+	-	-	-	-
281	1 mes	Sangre	Klebsiella pneumoniae	17	17	18	20	19	19	+	+	-	-	-	-
282	12 años	Orina	Serratia marcescens	26	18	22	26	23	28	+	-	-	-	-	-
284	1 año	Sec. Traqueal	Klebsiella pneumoniae	17	16	19	20	23	22	+	-	-	-	-	-
286		Pta. Catéter	Enterobacter cloacae	30	27	26	33	36	37	-	-	-	-	-	-
287	12 años	Sec. Bronquial	Klebsiella pneumoniae	13	10	14	16	17	17	+	+	-	-	-	-
288	5 años	Aspirado traqueal	Klebsiella pneumoniae	6	6	10	18	19	19	+	+	-	-	-	-
289	7 años	Sec. Traqueal	Klebsiella pneumoniae	13	11	18	19	19	17	+	+	-	-	-	-
294	6 años	Sec. Cadera	klebsiella oxytoca	30	30	30	29	30	32	-	-				
295	11 meses	Pta. Catéter	Klebsiella pneumoniae	10	10	10	13	13	14	+	+	-	-	-	-

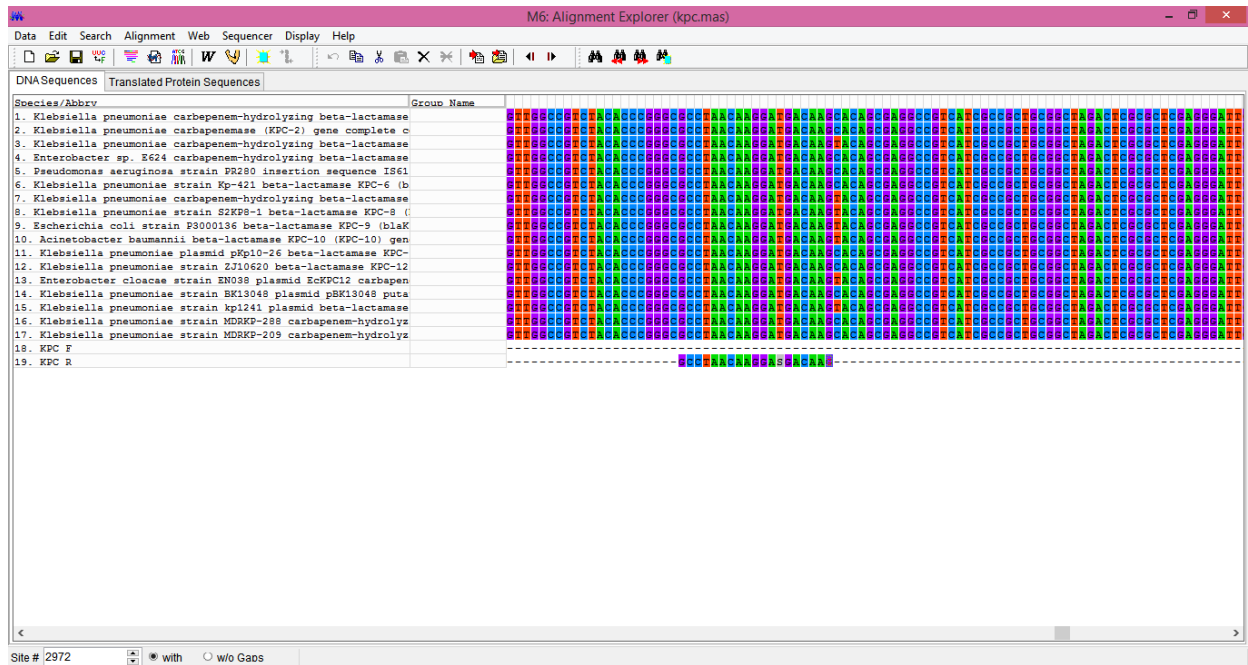
297	5 años	Aspirado traqueal	Klebsiella pneumoniae	6	6	10	17	16	16	+	+	-	-	-	-
309	2 años	Sangre	Klebsiella pneumoniae	14	10	15	18	19	19	+	+	-	-	-	-
312	7 años	Piel	Pseudomonas spp	6	6	6	23	6	6	-	-	-	-	-	-
313	1 año	Absceso	Klebsiella pneumoniae	30	25	26	30	33	35	-	-	-	-	-	-
314	3 meses	Orina	Serratia marcescens	27	26	22	22	22	27	-	-	-	-	-	-
317	6 años	Hisopado de Fémur	Klebsiella pneumoniae	11	12	10	14	12	14	+	+	-	-	-	-
318	16 días	Secreción de mediastino	Klebsiella pneumoniae	28	24	28	30	34	33	-	-	-	-	-	-
320	2 años	Sangre	Klebsiella pneumoniae	6	6	10	17	12	15	+	+	-	-	-	-

Tabla 4.- Resultados de pruebas fenotípicas y genotípicas de cepas del HBO referidas al Inspi y estudiadas, del año 2013.

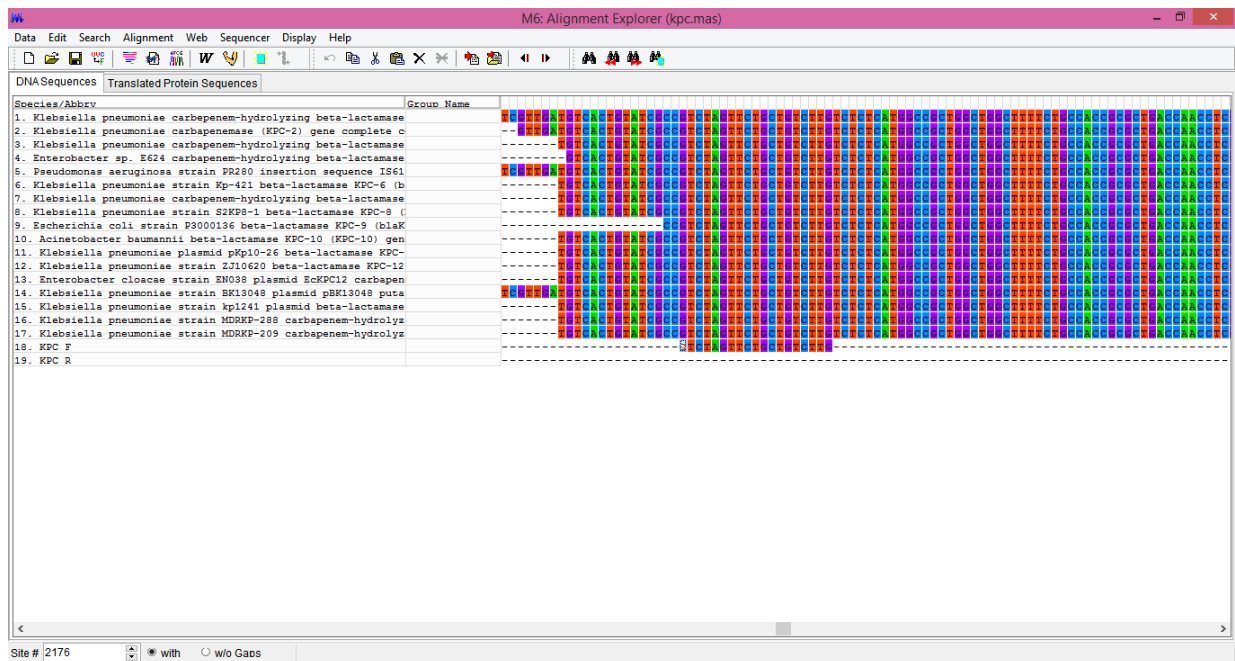
Anexo 4: Alineamientos de primers específicos con secuencia conocidas para cada una de las enzimas

Alineamiento de primer KPC

Primer Reverse

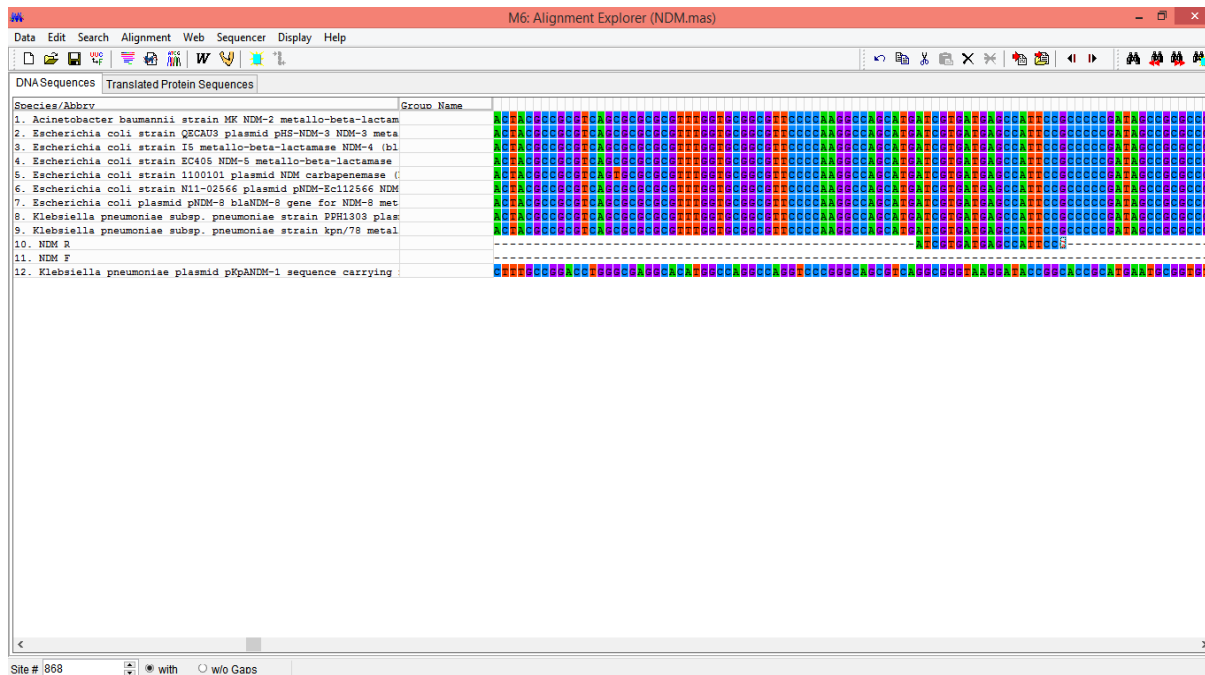


Primer Forward

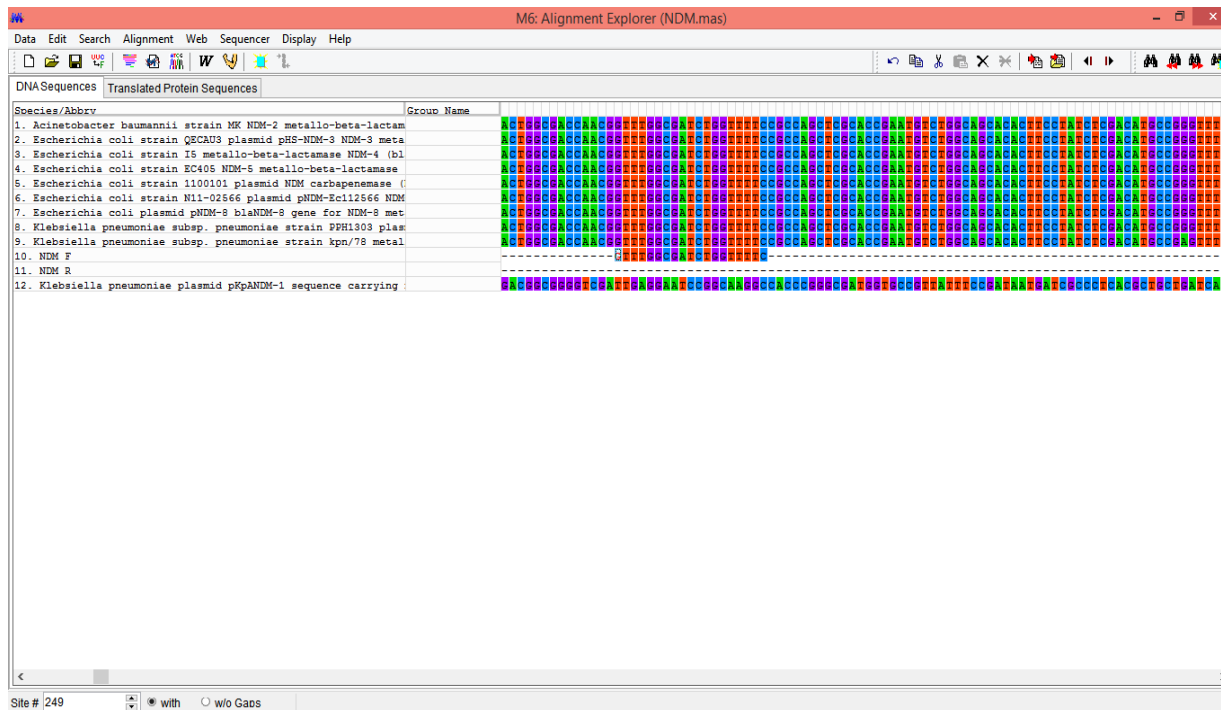


Alineamiento para primers NDM

Primer Reverse

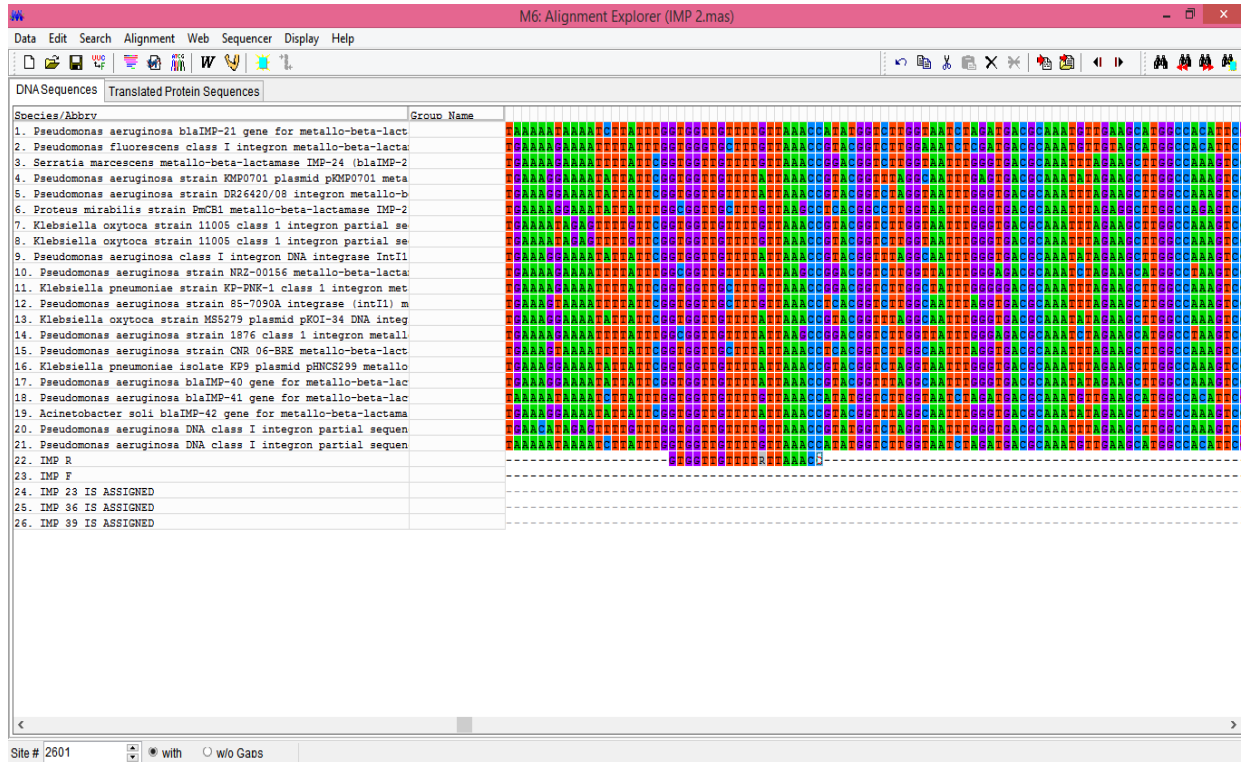


Primer Forward

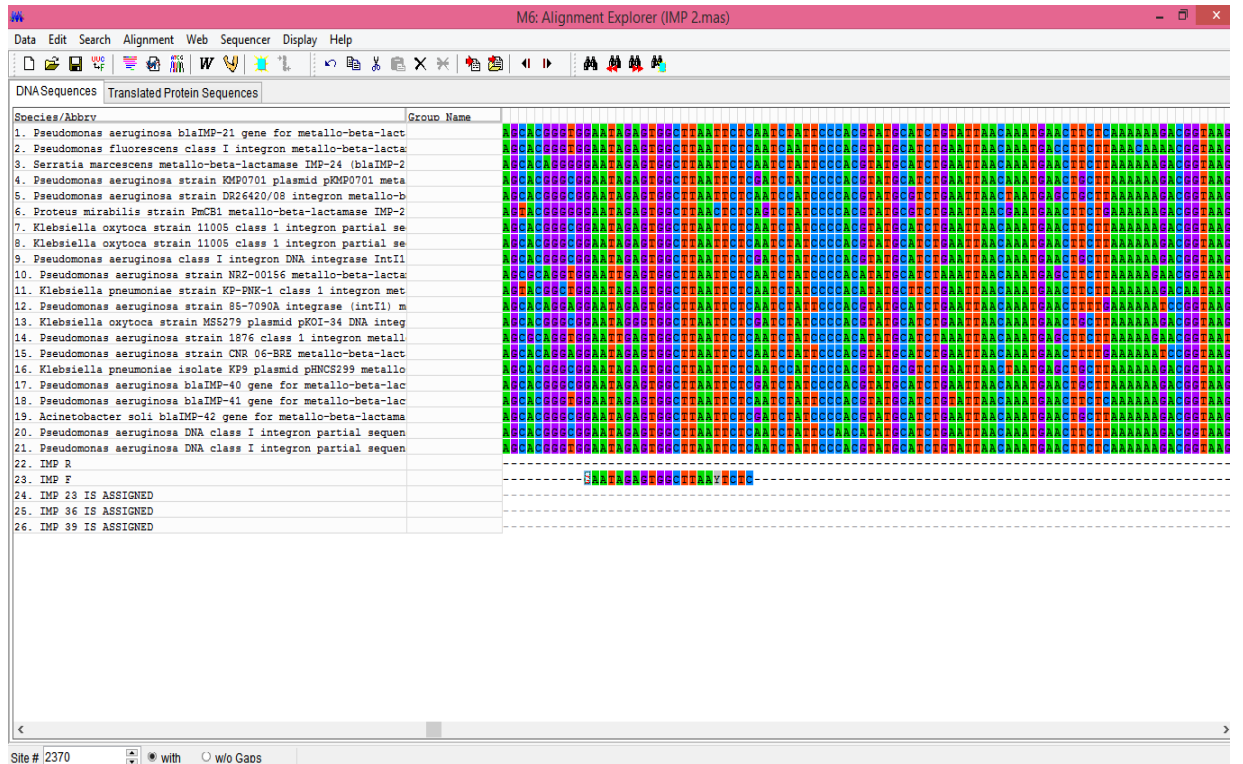


Alineamientos para primers IMP

Primer Reverse

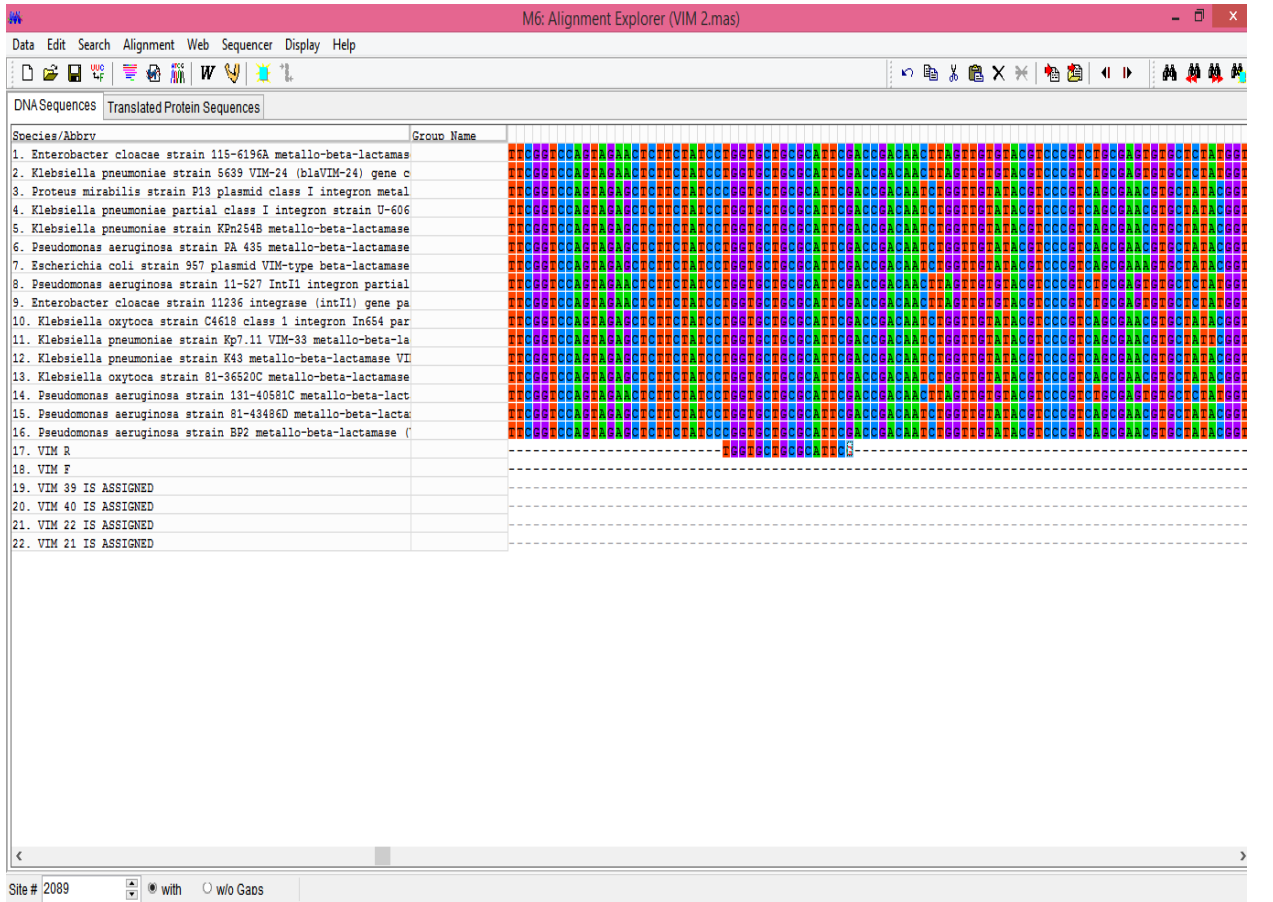
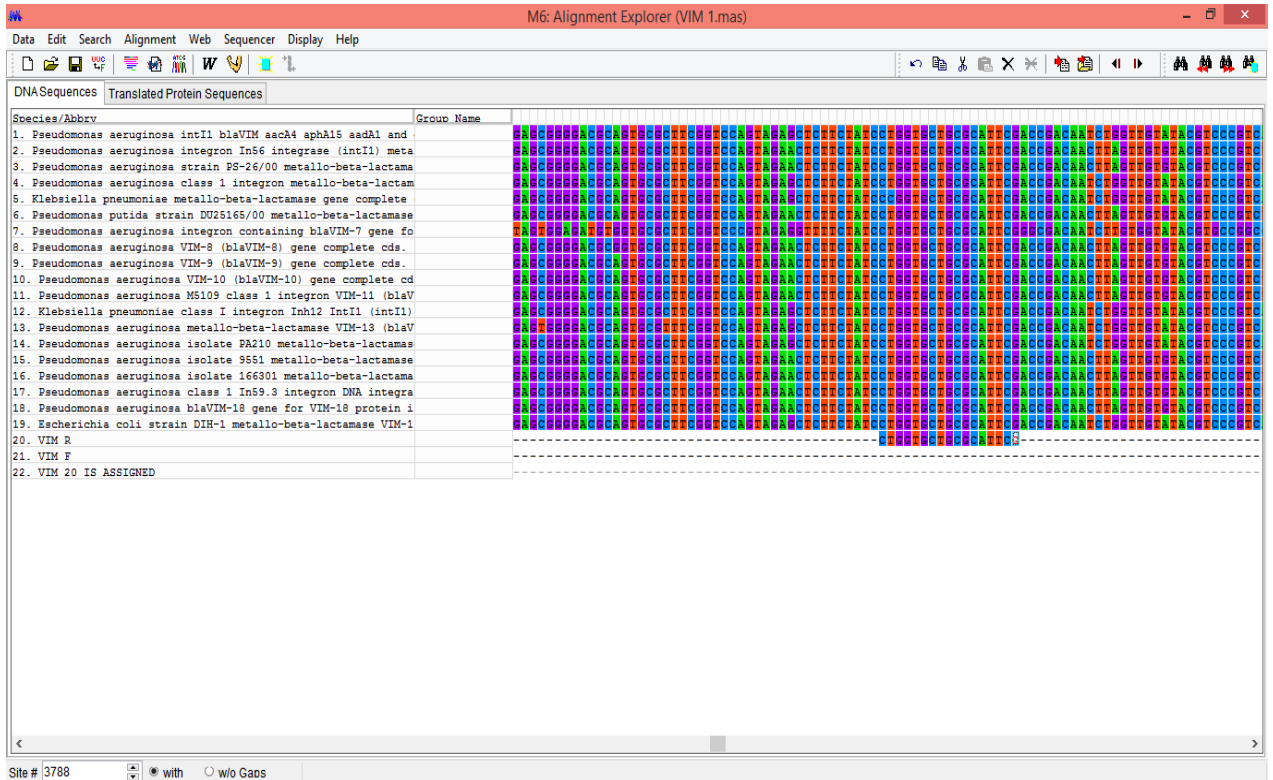


Primer Forward



Alineamientos para VIM

Primer Reverse



Primer Forward

M6: Alignment Explorer (VIM 1.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrv	Group Name
1. Pseudomonas aeruginosa intI1 blaVIM aacA4 aphA15 aadA1 and	
2. Pseudomonas aeruginosa integron In56 integrase (intI1) meta	
3. Pseudomonas aeruginosa strain PS-26/00 metallo-beta-lactama	
4. Pseudomonas aeruginosa class 1 integron metallo-beta-lactam	
5. Klebsiella pneumoniae metallo-beta-lactamase gene complete	
6. Pseudomonas putida strain DU25165/00 metallo-beta-lactamase	
7. Pseudomonas aeruginosa integron containing blaVIM-7 gene fo	
8. Pseudomonas aeruginosa VIM-8 (blaVIM-8) gene complete cds.	
9. Pseudomonas aeruginosa VIM-9 (blaVIM-9) gene complete cds.	
10. Pseudomonas aeruginosa VIM-10 (blaVIM-10) gene complete cd	
11. Pseudomonas aeruginosa M5109 class 1 integron VIM-11 (blaV	
12. Klebsiella pneumoniae class I integron Inh12 IntI1 (intI1)	
13. Pseudomonas aeruginosa metallo-beta-lactamase VIM-13 (blaV	
14. Pseudomonas aeruginosa isolate PA210 metallo-beta-lactama	
15. Pseudomonas aeruginosa isolate 9551 metallo-beta-lactamase	
16. Pseudomonas aeruginosa isolate 166301 metallo-beta-lactama	
17. Pseudomonas aeruginosa class 1 In59.3 integron DNA integra	
18. Pseudomonas aeruginosa blaVIM-18 gene for VIM-18 protein i	
19. Escherichia coli strain DIR-1 metallo-beta-lactamase VIM-1	
20. VIM R	
21. VIM F	
22. VIM 20 IS ASSIGNED	

Site # 3400 with w/o Gaps

M6: Alignment Explorer (VIM 2.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrv	Group Name
1. Enterobacter cloacae strain 115-6196A metallo-beta-lactamas	
2. Klebsiella pneumoniae strain 5639 VIM-24 (blaVIM-24) gene c	
3. Proteus mirabilis strain F13 plasmid class I integron metal	
4. Klebsiella pneumoniae partial class I integron strain U-606	
5. Klebsiella pneumoniae strain KPN254B metallo-beta-lactamase	
6. Pseudomonas aeruginosa strain PA 435 metallo-beta-lactamase	
7. Escherichia coli strain 957 plasmid VIM-type beta-lactamase	
8. Pseudomonas aeruginosa strain 11-527 IntI1 integron partial	
9. Enterobacter cloacae strain 11236 integrase (intI1) gene pa	
10. Klebsiella oxytoca strain C4618 class 1 integron In654 par	
11. Klebsiella pneumoniae strain Kp7.11 VIM-33 metallo-beta-la	
12. Klebsiella pneumoniae strain K49 metallo-beta-lactamase VI	
13. Klebsiella oxytoca strain 81-36520C metallo-beta-lactamase	
14. Pseudomonas aeruginosa strain 131-40581C metallo-beta-lact	
15. Pseudomonas aeruginosa strain 81-43486D metallo-beta-lacta	
16. Pseudomonas aeruginosa strain BP2 metallo-beta-lactamase (
17. VIM R	
18. VIM F	
19. VIM 39 IS ASSIGNED	
20. VIM 40 IS ASSIGNED	
21. VIM 22 IS ASSIGNED	
22. VIM 21 IS ASSIGNED	

Site # 1701 with w/o Gaps

Anexo 5.- Carta de autorización del estudio



Ministerio de Salud Pública
Hospital Pediátrico "Baca Ortiz"
Departamento de Docencia e Investigación

Oficio N° HBO-DOCE-2013-251

Quito, 21 de Octubre del 2013.

Dr.

Santiago Escalante

Escuela de Bioanálisis Universidad Católica del Ecuador.

Presente.-

Por medio del presente informo a usted que está autorizado que las estudiantes Valeria Torres Espín CI. 1713986634, de octavo nivel de la carrera de Bioquímica Clínica de su prestigiosa Universidad, a que realice su proyecto de investigación en el Hospital Pediátrico Baca Ortiz con el tema: "Determinación molecular de carbapenemasas detectadas en aislamientos bacterianos de tres casas de salud de la ciudad de Quito durante el año 2013".

Con la consideración de siempre

Dr. Carlos Valencia.

Director del Departamento de Docencia e Investigaciones HBO

