



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

Vicerrectorado de  
**INVESTIGACIÓN**

## **FACULTAD DE TECNOLOGIA MEDICA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS EN *Klebsiella pneumoniae* Y *Escherichia coli* EN PACIENTES HOSPITALIZADOS DE UN HOSPITAL DE LIMA, 2018**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO Y ANATOMIA PATOLOGICA**

### **AUTOR**

Arias Quispe Jesus Enrique

### **ASESOR**

Diaz Tello Jose Alberto

### **JURADOS**

Guerrero Barrantes César Enrique

Rojas Hernandez Bertha Aide

Lagos Castillo Moraima Angelica

Lima - Perú

**2020**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS EN *Klebsiella pneumoniae* Y *Escherichia coli* EN PACIENTES HOSPITALIZADOS DE UN HOSPITAL DE LIMA, 2018**

**AUTOR**

**JESUS ENRIQUE ARIAS QUISPE**

**ASESOR**

**Mg. JOSE ALBERTO DIAZ TELLO**

## INDICE

RESUMEN .....	5
SUMMARY .....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
<b>1.1 Descripción y formulación del problema .....</b>	<b>8</b>
Problema general .....	9
Problemas específicos.....	10
<b>1.2 Antecedentes.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Objetivos .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Hipótesis .....</b>	<b>22</b>
II. MARCO TEÓRICO .....	23
<b>2.1 Bases teóricas .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Enterobacterias productoras de carbapenemasas .....	23
2.1.2 Carbapenemasas.....	23
2.1.3 Clasificación de carbapenemasas.....	24
2.1.4 Identificación de carbapenemasas en el laboratorio .....	34
2.1.5 Pruebas fenotípicas confirmatorias de producción de carbapenemasas .....	35
III. MÉTODO .....	42
<b>3.1 Tipo de la investigación.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Ámbito Temporal y Espacial.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Variables .....</b>	<b>43</b>
<b>3.4 Población y muestra .....</b>	<b>44</b>
<b>Población .....</b>	<b>44</b>
<b>Muestra.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5 Instrumentos .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6 Procedimientos.....</b>	<b>45</b>

<b>3.7 Análisis de datos .....</b>	<b>50</b>
<b>3.8 Consideraciones éticas .....</b>	<b>50</b>
IV. RESULTADOS .....	51
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	56
VI. CONCLUSIONES.....	60
VII. RECOMENDACIONES .....	61
VIII. REFERENCIAS .....	62
IX. ANEXOS .....	67

## RESUMEN

El Objetivo del presente estudio fue caracterizar fenotípicamente las carbapenemasas encontradas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima en 2018. La Metodología empleada para el desarrollo de este estudio fue descriptiva correlacional, de corte transversal. La población estuvo conformada por 76 cultivos microbiológicos de enterobacterias con sospecha de carbapenemasas. La muestra estuvo representada por 65 cultivos (46) *Klebsiella pneumoniae* y (19) *Escherichia coli* con sospecha de carbapenemasas respectivamente. El Resultado dio lo siguiente, utilizando las pruebas fenotípicas: Método de Hodge Modificado, sinergia de doble disco con EDTA, sinergia de doble disco con Ácido borónico y mCIM (método modificado de inactivación del carbapenem) se obtuvo 61 cepas productoras de carbapenemasas, 44 *Klebsiella pneumoniae* y 17 *Escherichia coli*. Además, en las 44 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y en las 17 de *Escherichia coli* se obtuvo resultados positivos por el método de sinergia de doble disco con EDTA. En conclusión, la caracterización fenotípica de carbapenemasas de las 61 cepas productoras de carbapenemasas fueron metalo- $\beta$ -lactamasas.

**Palabras claves:** Caracterización Fenotípica, Carbapenemasas, *Klebsiella pneumoniae*,  
*Escherichia coli*.

## SUMARY

The objective of this study was to phenotypically characterize the carbapenemases found in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in hospitalized patients of a hospital in Lima in 2018. The methodology used for the development of this study was descriptive correlational, cross-sectional. The population consisted of 76 microbiological cultures of enterobacteria with suspected carbapenemases. The sample was represented by 65 cultures (46) *Klebsiella pneumoniae* and (19) *Escherichia coli* with suspected carbapenemases respectively. The result gave the following, using the phenotypic tests: Modified Hodge Method, double disc synergy with EDTA, double disc synergy with boronic acid and mCIM (modified method of inactivation of carbapenem), 61 carbapenemases producing strains were obtained, 44 *Klebsiella pneumoniae* and 17 *Escherichia coli*. In addition, positive results were obtained in the 44 strains of *Klebsiella pneumoniae* and 17 in *Escherichia coli* by the double disc synergy method with EDTA. In conclusion, the phenotypic characterization of carbapenemases of the 61 strains producing carbapenemases were metallo- $\beta$ -lactamases.

**Keywords:** Phenotypic Characterization, Carbapenemases, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

## I. INTRODUCCIÓN

Estudios realizados en diversos países incluyendo el nuestro, muestran el aumento constante de enterobacterias productoras de carbapenemasas, siendo principalmente intrahospitalarias, que afectan a pacientes con patologías severas, internados en la UCI y con exposición previa a diferentes clases de antibióticos, como Carbapenemes, fluoroquinolonas, cefalosporinas y glucopéptidos. Las enterobacterias productoras de carbapenemasas tiene una mortalidad directamente asociada variable, pero casi siempre superior al 30%, e incluso superior al 50% en el caso de sepsis. Su incidencia puede permanecer estable durante algún tiempo, para luego diseminarse de manera dramática (Velásquez, 2013).

Por estas razones, la emergencia y rápida diseminación de estas enterobacterias resistentes a carbapenemes, a nivel mundial constituye un problema de salud pública de gran importancia.

Según los estudios realizados en el Laboratorio Referencial Nacional (LRN) de Infecciones Intrahospitalarias del Instituto Nacional de Salud de Lima, dónde se realizan confirmaciones moleculares de resistencia a carbapenemasas, se han reportado en doce hospitales de Lima, Trujillo, Arequipa y Junín pertenecientes a Ministerio de Salud (Hospitales generales e Institutos especializados), Seguro Social (EsSalud) y Fuerzas Armadas, desde el 2013 al 2017 (Sacsquispe-Contreras, 2018).

El posible impacto epidemiológico de este mecanismo de resistencia dependerá en gran medida de la capacidad de nuestros laboratorios para detectar de manera precoz y precisa.

## 1.1 Descripción y formulación del problema

El creciente número de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas y más aún en las enterobacterias, especialmente en el caso de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* constituye una alarma mundial, se sabe que el origen epidemiológico y la distribución geográfica de las carbapenemasas son diversas, pero todas aparecieron en los últimos años del siglo XX. En España se ha producido un importante cambio epidemiológico en los últimos años caracterizado por un aumento rápido del número de casos de enterobacterias productoras de carbapenemasas, causando tanto brotes nosocomiales como infecciones esporádicas. Siendo, el mayor impacto producido por, *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 o VIM-1, aunque la prevalencia de otras especies como *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* también está aumentando (Oteo, 2014).

En un reciente estudio a nivel mundial realizado por el programa SENTRY en un periodo de 20 años (1997 a 2016) tomando como muestra 178 825 enterobacterias colectadas de 199 hospitales en 42 países, reveló que existe un incremento del porcentaje de enterobacterias productoras de carbapenemasas de 0.6% to 2.9% y se observaron tendencias similares para todas las regiones y fuentes de infección. Además, se identificó que *Klebsiella pneumoniae* impulsó el aumento de enterobacterias resistentes a carbapenemes. Entre 1298 aislamientos de CRE de los 2 períodos de estudio, se detectó blaKPC entre 186 (49.7%) y 501 (54.2%) aislamientos en 2007–2009 y 2014–2016, respectivamente. Se detectaron genes de metalo- $\beta$ -lactamasa entre el 4,3% de los aislamientos de 2007 a 2009 y el 12,7% de los aislamientos de 2014 a 2016, principalmente debido a la diseminación de aislamientos portadores de blaNDM. Se observaron genes que codifican las enzimas IMP y VIM en 1.9% y 2.4% (7 y 9 aislamientos) de los aislamientos de 2007 a 2009 y 0.4% y 1.9% de los aislamientos de 2014 a 2016. OXA-48 y las variantes aumentaron de 4.3% en



2007–2009 a 12.6% en 2014–2016 (principalmente en Europa). Sin embargo, lo más alarmante fue la identificación de 26 cepas de enterobacterias productoras de dos carbapenemasas en simultaneo en las combinaciones de KPC+OXA-48, KPC +MBL o MBL +OXA-48 solo entre los periodos de 2014 2016 (Castanheira, 2019).

Existe incremento significativo de número acumulativo de hospitales con aislamiento de enterobacterias productoras de carbapenemasas en Argentina desde el año 2006 hasta el 2015 donde predominan los fenotipos KPC, OXA y NDM (Lazovski, y otros, 2017).

Dado los antecedentes es necesario tener un perfil fenotípico que contribuya a la epidemiología de cada hospital.

Debido a los pocos estudios nacionales a nivel de Perú me vi motivado a realizar el presente estudio de Caracterización fenotípica de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018, el cual tiene como finalidad dar a conocer los fenotipos de carbapenemasas encontradas en los cultivos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima en 2018.

### **Problema general**

- ¿cuál es caracterización fenotípica de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima, 2018?

## Problemas específicos

- ¿Cuáles son los fenotipos de carbapenemasas presentes en *Klebsiella pneumoniae* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018?
- ¿Cuáles son los fenotipos de carbapenemasas presentes en *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018?

## 1.2 Antecedentes

La OMS ha determinado que la resistencia bacteriana es uno de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana, convirtiéndose en una de las mayores amenazas para la salud mundial (De la Salud, 2016).

Las primeras carbapenemasas fueron encontradas en bacilos gram positivos específicamente en el *Bacillus cereus* 569/H (Kuwabara, (1967) , en *Aeromonas spp.* y *Stenotrophomonas maltophilia*, que a diferencia de otras  $\beta$ -lactamasas que se conocían hasta el momento, estas enzimas eran inhibidas por el EDTA, entonces se establecieron con el nombre de metaloenzimas. Luego se demostraría que estas enzimas poseían un átomo de Zinc en su sitio activo lo cual permite la hidrólisis del anillo betalactámico (Frère, 2005). Posteriormente las primeras metalo- $\beta$ -lactamasas para las que se determinó la secuencia de aminoácidos fue la enzima BC-II proveniente de *Bacillus cereus* la (Hussain, 1985) cual sirvió como modelo prototípico para las metalo- $\beta$ -lactamasas por muchos años.

A finales de la década de 1980 otro tipo de carbapenemasa surgía entre las enterobacterias, pero esta vez no eran inhibidas por el EDTA. Estudios posteriores demostraron que estas enzimas utilizaban una serina en su sitio activo y eran inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam (Medeiros, 1986). Estas enzimas tales como SME-1 (“*Serratia marcescens* enzyme”) hallada en aislamientos de *Serratia marcescens* en 1982 en Inglaterra, IMI (“Imipenem hydrolysing  $\beta$ -lactamase”) (Rasmussen, 1996) y NMC-A (“Not metalloenzyme carbapenemase”) (Pottumarthy, 2003), ambas descubiertas en aislamientos de *Enterobacter cloacae* se integraron en el grupo A de la clasificación de Ambler.

Hasta comienzos del año 1990 las carbapenemasas eran descritas como especies específicas de  $\beta$ -lactamasas codificadas cromosomalmente, sin embargo la tipificación de IMP-1 codificada por plásmidos, que es una metalo- $\beta$ -lactamasa producida por *P. aeruginosa*, aislada en Japón (Watanabe, 1991 ) y luego en *Serratia marcescens* así como ARI -1 (actual OXA-23) una carbapenemasa de clase D según la clasificación de Ambler encontrada en *Acinetobacter baumannii* (Paton, 1993) y KPC-1, una carbapenemasa de clase A, encontrada en *Klebsiella Pneumoniae* (Yigit, 2008), ambas también codificadas por plásmidos, cambiaron la perspectiva de la diseminación de las carbapenemasas.

En los siguientes años se empezaron a publicar más reportes de carbapenemasas codificadas por plasmidos. En el año 1997 se detectó en un aislamiento de *Pseudomona aeruginosa* en Italia, una metalobetalactamasa codificada por plásmidos a la cual bautizó como VIM -1 (“Verona integron- codified metalo- $\beta$ -lactamase”) (Laurettil, 1999).

En el año 2000 en Sudáfrica se encontró dentro de la familia de enzimas GES una nueva variante, GES-2 la cual es codificada por plásmidos, en un aislamiento de *Pseudomona aeruginosa* de una muestra de hemocultivo que sería la primera en presentar actividad de

carbapenemasa a diferencia de sus predecesoras GES/IBC y GES-1 las cuales solo presentan actividad contra penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido (Poirel L. W., 2001).

Dado el descubrimiento de la OXA -23 se dio a conocer una nueva clase de carbapenemasa que tenía mayor frecuencia en aislamientos de *Acinetobacter baumannii*, no obstante, en 2001, en Turquía por primera vez en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* se encontró una nueva variante de OXA, la OXA-48 (Poirel L. H., 2004). Esta enzima en años siguientes sería principalmente prevalente en especies de enterobacterias dado que solo hasta el año 2012, se han identificado seis variantes similares a OXA-48<sub>like</sub>, siendo OXA-48 la más extendida (Poirel L. P., 2012).

Además, en 2002 se halló en *Pseudomona aeruginosa* la enzima GIM-1 (“German imipenemase”) una metalo- $\beta$ -lactamasa de origen alemán; y luego, en 2005 se detecta la enzima SIM-1 (“Seoul imipenemase”), en un aislamiento de *Acinetobacter baumannii*. En 2007 se da a conocer una nueva metalo- $\beta$ -lactamasa, AIM (“Australia metalo- $\beta$ -lactamase”), aislada en *Pseudomona aeruginosa*. En 2009 salió a la luz 3 nuevas metalo- $\beta$ -lactamasas NDM (“Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamase”) en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* en la India, DIM (“Dutch imipenemase”), en un aislamiento de *Pseudomonas stutzeri* en Holanda y se detecta en Libia la enzima TMB (“Tripoli metalo- $\beta$ -lactamasa”) (Gonzales-Escalante, 2012).

En América latina se reporta el primer gen de carbapenemasa proveniente de Brasil en el año 2002 como parte del estudio SENTRY en un aislamiento de *Pseudomona aeruginosa*, esta enzima se dio a conocer por el nombre de SPM-1 (“Sao Paulo metalo- $\beta$ -lactamase”). Dicha enzima presentaba origen cromosómico y no se transmitía por plásmidos (Zavascki, 2005).

En el Perú el primer caso de carbapenemasas tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas) fue registrado el 11 de octubre del 2013 en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Arzobispo Loayza (Gastelo-Acosta, 2016).

Así en el estudio realizado por Ordóñez Varela, W., & Blanco Quirós, L. (2017). En Costa Rica, sobre, “Primer aislamiento de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-1 en el Hospital de San Carlos durante el 2011”. Tuvo como Objetivo; demostrar el aislamiento de una *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-1. La Metodología empleada se basó en la resistencia a antibióticos por medio del sistema Vitek 2. La determinación fenotípica de carbapenemasas se realizó por medio de la prueba de ácido borónico y Hodge modificado. La confirmación molecular se hizo utilizando PCR-RT para el gen blaKPC. Por la prueba de sensibilidad a antibióticos, se sospechó de una betalactamasa de espectro ampliado con sensibilidad reducida a carbapenémicos (imipenem 4 µg/mL, meropenem 1 µg/mL). Las pruebas de ácido borónico y Hodge modificado sugirieron la presencia de carbapenemasas. La confirmación molecular fue positiva para carbapenemasa. Se confirmó la presencia de *Klebsiella pneumoniae* KPC-1 como aislamiento de una infección del tracto urinario. Las pruebas fenotípicas y la confirmación molecular permitieron corroborar la carbapenemasa.

Según la literatura científica consultada, De Abreu, L. D. S., Herrera, M. R. J. C., Ramos, N. M. C., & Ashby, J. M. (2016), en Venezuela, informan: “Primer aislamiento de *Escherichia coli* productora de carbapenemasa tipo New Delhi (NDM) en un hospital de Ciudad Guayana, Venezuela”. El Objetivo; fue informar los dos primeros casos de *Escherichia coli* productoras de metaloenzimas tipo NDM. La Metodología; abarcó desde la identificación con equipo automatizado MicroScan®, La investigación de serinocarapenemasas se realizó empleando el

inhibidor ácido 3-aminofenil-borónico de 300 µg/mL (APB) mientras que para la búsqueda de metaloenzimas se empleó etilendiaminotetraacético/ mercaptoacetato de sodio 1.000 mM (EDTA). Se obtuvo resultado positivo en la inhibición con EDTA y no se observó sinergia en el ensayo para la detección de serinocarbenemasas. Se detectó el gen que codifica para la carbapenemasa tipo NDM en los dos casos. Se demostró la circulación de cepas de enterobacterias productoras de metalobetalactamasas tipo NDM. Este hallazgo, no reportado antes, es un mecanismo emergente y de alta capacidad de diseminación.

Así mismo Rivas Kiese, M., Ortiz, H., Almada, P., Arguello, R., Melgarejo, N., Martínez, C., & Garay, Z. (2016). En Paraguay publican: “*Escherichia coli* metalobetalactamasa en un hospital de alta complejidad en Paraguay”, cuyo objetivo fue dar a conocer el primer caso clínico de *Escherichia coli* metalobetalactamasa. La metodología, se basó en el perfil de resistencia obtenido del equipo automatizado Vitek 2 Compact, de muestras de hemocultivo y partes blandas de una misma paciente. Ambos aislamientos resultaron resistentes a carbapenemes con una concentración inhibitoria mínima (CIM) >16 µg/mL para imipenem y meropenem. Se realizó el test de Hodge modificado (MHT), para la identificación y se confirmó, con pruebas moleculares la presencia de New Delhi Metalobetalactamasa (NDM1). Se confirmó el aislamiento de *Escherichia coli* MBL, siendo el primer caso descrito en este país.

En el estudio realizado por Reyes-Chacón(2017). En Colombia publican: “Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en

Enterobacteriaceae”. El Objetivo; fue evaluar al método de inactivación del carbapenémico (MIC\*) respecto al Test de Hodge modificado (THM), ácido 3-aminofenilborónico (APB) y la reacción en cadena de la polimerasa en enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) tipo KPC. La metodología, se seleccionaron 88 aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E.coli*, *S. marcescens*, *C. freundii* sensibles y 91 resistentes a los carbapenémicos. El APB y el método MIC\* se realizaron siguiendo las publicaciones originales. El THM se realizó de acuerdo al CLSI 100S Edición 26-2016. El gen *blaKPC* se identificó por multiplex PCR. Resultados; El MIC\* en EPC tipo KPC presentó una sensibilidad/especificidad cercana al 100% y kappa de 1 comparado con la PCR; se determinó la ausencia de halo en todas los aislados enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC a diferencia de los aislados sensibles a los carbapenémicos que presentaron halo > 19mm. Se observó el 3 % de resultados falsos positivos y el 5 % de falsos negativos en THM y ABP respectivamente.

En el estudio realizado por Escobar Castaño(2018) titulado:“Descripción de tipos de carbapenemasas expresadas en *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales de tercer nivel de la ciudad de bogotá, estudio descriptivo”. Objetivo: Caracterizar y describir la frecuencia de los diferentes tipos de carbapenemasas en *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella sp.*, en distintas instituciones hospitalarias de la ciudad de Bogotá. La Metodología; en 6 instituciones de tercer nivel de complejidad se realizó la recolección de estos microorganismos a los cuales se les realizó múltiples pruebas fenotípicas (Test de Hodge, EDTA, Acido borónico, carbaNP y mCIM) con el fin comprobar la producción de carbapenemasa y posteriormente se hicieron pruebas moleculares para la detección de distintos genes de carbapenemasas (KPC, GES, IMP, VIM, NDM, OXA-48). Obteniendose los siguientes resultados; la probabilidad de producción de carbapenemasas en

*Pseudomonas aeruginosa* fue entre 64 – 80%, con alta producción de KPC (55%) en comparación con la de metalobetalactamasas (15%), situación contraria a la documentada en la literatura mundial. En *Klebsiella* sp., se documentó una probabilidad de producción de carbapenemasas de 98%, predominantemente del tipo KPC en el 96.8%, con cepas aisladas que tuvieron co-producción KPC-Metalobetalactamasa (VIM/NMD). La prueba de detección fenotípica CarbaNP tuvo una concordancia muy alta en detección de carbapenemasas de cualquier tipo.

En el estudio realizado por Shokri(2017) titulado: “Resistotyping, phenotyping and genotyping of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) among gram-negative bacilli from Iranian patients”. En el cual se analizó aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*(120), *Acinetobacter baumannii*(110) y *Pseudomonas aeruginosa*(100) respectivamente aisladas en muestras de Orina, Sangre, Otros fluidos corporales estériles, Muestras respiratorias, Herida y Absceso; además evaluó comparativamente del rendimiento diagnóstico de tres métodos fenotípicos para la detección de NDM, con PCR considerada como el estándar de oro. La concentración inhibitoria mínima (MIC) de antibióticos contra cepas positivas para NDM se determinó usando pruebas E-test y análisis de relación clonal usando CPP de consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC) en estas cepas.

Resultados: Los antibióticos más efectivos contra las cepas de la especie *K. pneumoniae* fueron Colistina, Cloranfenicol y Tigeciclina; contra *P. aeruginosa* fueron Fosfomicina y Polimixinas, y contra *A. baumannii* fueron Polimixinas, Ampicilina / Sulbactam y Minociclina. En general, se observaron 66, 31 y 40 resistotipos diferentes entre *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, respectivamente. El gen blaNDM-1 se detectó en 28 (8,5%) cepas de la bacteria investigada. Las sensibilidades y especificidades de la prueba de disco combinado Meropenem-EDTA, la prueba



de disco combinado de ácido meropenem-dipicolínico y los métodos de prueba modificados de Hodge para la detección de NDM fueron 96.43, 55.15; 96,43, 54,85; y 89.29, 35.15, respectivamente. Además, a pesar de los bajos valores predictivos positivos de estas pruebas, sus valores predictivos negativos fueron altos. Los resultados de ERIC-PCR revelaron dos grupos principales en cepas positivas para NDM de cada una de las especies *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, y diez grupos principales en *K. pneumoniae*. En todas las cepas NDM positivas, se observaron tasas máximas de MIC (> 256) para todos los antibióticos betalactámicos. Conclusión: Hubo altos niveles de resistencia a los antibióticos y una alta frecuencia de resistencia a múltiples fármacos y perfiles de resistencia a fármacos extensivos, así como genes blaNDM-1 altamente prevalentes en las bacterias investigadas.

En el estudio realizado por Hoang, en 2019, el cual es titula “Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) Production by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern Vietnam and Appropriate Methods of Detection: A Cross-Sectional Study” el cual tiene como Objetivo: Estudiar las características de *Escherichia coli* y *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem (CR-E / K) en dos hospitales en el sur de Vietnam y realiza algunos métodos simples para detectar las dos enzimas. Método: Se recolectaron un total de 100 cepas de CR-E / K (50 cepas de *Escherichia coli* y 50 cepas de *Klebsiella pneumoniae*) de aislamientos clínicos del Hospital Popular de Gia Dinh y del Hospital General Dong Nai, Vietnam. Se utilizaron los métodos fenotípicos de Test de Hodge modificada (MHT) y prueba de disco combinada (CDT) y además se usó como método de referencia la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR). Resultados: Se detectaron genes codificadores de carbapenemasas en 47 aislamientos (36 NDM, 10 KPC y un aislante que

albergaba ambos genes). Se detectó que 58,3% (21/36) de las cepas con blaNDM y el 80% (8/10) de las cepas con blaKPC fueron *Klebsiella pneumoniae* y el 41,7% (15/36) de las cepas con blaNDM y el 20% (2/10) de las cepas con blaKPC fueron *Escherichia coli*. La cepa de *E. coli* que transportaba simultáneamente estos dos genes fue el primer caso reportado en Vietnam. La orina (31%) y el esputo (37%) fueron dos especímenes comunes de CRE. La verdadera tasa positiva sensibilidad y especificidad del imipenem – EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para la detección de NDM y el imipenem – PBA (ácido fenilborónico) para la detección de KPC en *Escherichia coli* fueron 93.8%, 97.1 % y 66.7%, 95.7%, respectivamente. Mientras tanto, el imipenem – EDTA para la detección de NDM y el imipenem – PBA para la detección de KPC entre *Klebsiella pneumoniae* lograron 90.5%, 100% de sensibilidad y 100%, 92.9% de especificidad respectivamente. Sin embargo, MHT mostró baja sensibilidad y especificidad. Nuestros hallazgos mostraron que CP-E / K se detectaron con alta prevalencia en los dos hospitales. Se sugiere el uso de la prueba de disco combinada (CDT) como método eficaz y de bajo costo.

En nuestro país, Sacsquispe-Contreras, R., & Bailón-Calderón, H. (2018). Publican “Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017”. El Objetivo; fue describir la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos tipo KPC y metalobetalactamasas en enterobacterias aisladas de hospitales de Perú. La Metodología; fue un estudio descriptivo observacional de serie de casos realizado en el Laboratorio de Referencia Nacional (LRN) de Infecciones Intrahospitalarias del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú, donde se realizaron las confirmaciones moleculares de resistencia a carbapenemasas. Las muestras analizadas fueron provenientes de orina (28), sangre (16), aspirado bronquial (5),

secreción de herida (5), catéter venoso central (5), secreción de dren (3), absceso (2), esputo (1), secreción pancreática (1), secreción de oído (una muestra), secreción bronquial (una muestra), tejido necrótico (1), sin datos (14). La detección fenotípica de mecanismos de resistencia se realizó con los métodos del Test de Hodge modificado según las recomendaciones de la CLSI. La detección bioquímica de la producción de carbapenemasa fue determinada por el método de blue carba. Las pruebas fenotípicas para detección presuntiva de la presencia del mecanismo de resistencia se realizaron por el método de aproximación de discos (test de sinergia) entre Imipenem 10 ug (Oxoid) y meropenem 10 ug (Oxoid) con discos de ácido fenilborónico (Britania) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA (Britania)) el cual fue realizado siguiendo las recomendaciones del Instituto Carlos Malbran (comunicación oral). La detección de genes blaKPC y de metalobetalactamasas (blaNDM, blaVIM, blaIMP) se realizó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional. En Conclusion; Se confirmó la presencia de carbapenemasas en las siguientes enterobacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*. Se identificaron 83 cepas con carbapenemasas: 26 (31,3 %) portando el gen blaKPC, 56 (67,5 %) el gen blaNDM y una (1,2 %) cepa con el gen blaIMP. En Lima se encontraron 55 cepas NMD, 24 cepas KPC y una cepa IMP. En Trujillo se detectó una cepa NMD, en Junín una cepa KPC y en Arequipa una cepa KPC. Es el primer reporte que da a conocer los genes de carbapenemasas circulantes en hospitales de Perú.

En ese sentido, el estudio realizado por; Resurrección-Delgado, C., Montenegro-Idrogo, J. J., Chiappe-Gonzalez, A., Vargas-Gonzales, R., Cucho-Espinoza, C., Mamani-Condori, D. H., & Huaroto-Valdivia, L. M. (2017). Titulado: “*Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-

betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo. Lima, Perú”. El Objetivo fue dar a conocer los primeros reportes de *Klebsiella pneumoniae* NDM en el Perú. La Metodología; consistió en el descarte de carbapenemasa en 11 aislamientos en pacientes hospitalizados provenientes de muestras de aspirado bronquial (3), urocultivo (4), secreción de herida (1), punta de catéter (2) y hemocultivo (1) respectivamente por medio de dos metodologías: a) Sinergia a doble disco con ácido fenilborónico (APB) y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), las que descartan carbapenemasas KPC (IMPAPB-MEM) o MBL (IMP-EDTA-MEM). b) Test de Hodge modificado (MHT) de acuerdo al Manual CLSI 26th Ed. Los Resultados; los 11 aislamientos presentaron positividad para método de sinergia a doble disco con el disco de EDTA (IMP-EDTA-MEM), y negativo a la sinergia con (MEM-APB-IMP) clasificándolas como metalo-betalactamasas. Los resultados del MHT no fueron concluyentes para la detección de carbapenemasas, evidenciando, ocasionalmente, falsos negativos. Esta prueba es negativa cuando se tratan de lipoproteínas como metalobetalactamasas tipo NDM. Se realizó el MIC (Método de Inactivación del Carbapenem) como técnica alternativa a MHT y evidenció, en los 11 aislamientos, presencia enzimática las cuales fueron remitidas al INS para confirmación molecular y tipificación, en todos los casos siendo reportada como cepas productoras de carbapenemasa tipo NDM.

### **1.3 Objetivos**

#### **Objetivo General**

- Caracterizar fenotípicamente las carbapenemasas *en Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima, 2018

## **Objetivos Específicos**

- Determinar los fenotipos de carbapenemasas presentes en *Klebsiella pneumoniae* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018.
- Determinar los fenotipos de carbapenemasas presentes en *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018.

### **1.4 Justificación**

la resistencia de enterobacterias a Carbapenemes es un problema alarmante en los hospitales regionales y de Lima.

Estudios confirman la presencia de carbapenemasas en las siguientes enterobacterias, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* (Sacsquispe-Contreras, 2018).

Las enterobacterias mencionadas son causas de infecciones intrahospitalarias incluyendo infecciones urinarias, heridas post operatorias, infecciones del tracto sanguíneo en pacientes con catéteres, neumonía frecuentemente asociadas a ventilación mecánica aumentando así la posibilidad de propagación (Van Duin, 2013).

Los laboratorios de microbiología ya cuentan con sistemas automatizados para la identificación y susceptibilidad bacteriana, pero en presencia de los diferentes mecanismos de resistencia se limita a dar solo una alarma, teniendo que confirmarse con los métodos fenotípicos.

El presente estudio realizado en un Hospital Nacional tiene como objetivo caracterizar fenotípicamente las carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en pacientes hospitalizados mediante los métodos de bioensayo de Test de Hodge modificado, mCIM, método inhibidor de EDTA y método inhibidor de ácido borónico.

Los resultados obtenidos serán supervisados y validados por el profesional a cargo del área, sirviendo de aporte al departamento de epidemiología del hospital.

## **1.5 Hipótesis**

El presente estudio no requiere de hipótesis.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Bases teóricas**

#### **2.1.1 Enterobacterias productoras de carbapenemasas**

Son aquellas bacterias de la familia de las Enterobacteriae que codifican ya sea cromosómicamente o por medio de plásmidos las carbapenemasas, lo cual representa un mecanismo de resistencia a los carbapenems. Los factores que han permitido que estos microorganismos a nivel hospitalarios sean los causantes de brotes epidemiológicos, incrementando las tasas de morbimortalidad, son su rápida diseminación, su difícil control y la escasez de opciones terapéuticas, para combatir estas infecciones (Vera-Leiva, 2017).

#### **2.1.2 Carbapenemasas**

Estas enzimas reciben el nombre de carbapenemasas por ser un grupo específico de betalactamasas con una alta eficiencia catalítica para la hidrólisis de carbapenems que a su vez combinada con otros mecanismos de resistencia y/o producción de otras betalactamasas genera bacterias MDR y panresistentes dejando ningún o muy limitadas opciones terapéuticas. Los genes que las codifican están localizados en cromosomas y elementos genéticos tales como los plásmidos, lo que favorece su rápida propagación y la frecuente transferencia de múltiples genes de resistencia a los antibióticos (Queenan, 2007).

### **2.1.3 Clasificación de carbapenemasas**

Existen 2 principales formas de clasificar a las carbapenemasas la primera es una clasificación molecular en grupos A, B y D propuesta por Ambler y la otra propone clasificar por grupos funcionales y subgrupos funcionales principales siendo propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros (Díaz Tello, 2008).

No obstante, para un mejor entendimiento partiremos de la tipificación fenotípica que se da en base al sustrato que utilizan en el sitio activo para realizar la acción hidrolítica para luego proceder a combinar las dos clasificaciones anteriormente mencionadas además de clasificar las enzimas que son codificadas mediante plásmidos y las que son codificadas cromosómicamente. Si partimos de la tipificación fenotípica contamos con dos grandes grupos carbapenemasas tipo serina y tipo metalo- $\beta$ -lactamasa (Bush, 2018).(fig.1)

#### **2.1.3.1 Carbapenemasas tipo serina**

Se caracterizan por presentar serina en la posición 70 de su sitio activo. Se divide en dos grupos, grupo A y grupo D. La carbapenemasa con más interés clínico en el grupo A son las KPC.

La carbapenemasa de mayor importancia clínica del grupo D es la OXA-48, que tiene mayor actividad que el resto, hidroliza a imipenem unas 10 veces más, y es la más frecuente en enterobacterias (Tafur, 2008).

##### **2.1.3.1.1 Carbapenemasas de clase A (subgrupo principal 2f de la Clasificación Funcional)**

Dentro de este grupo encontramos carbapenemasas que son codificadas cromosómicamente y otras por plásmidos, siendo estas últimas las que han cobrado protagonismo en los últimos 20



años por su rápida diseminación. Generalmente inhibidas por ácido borónico, avibactam y parcialmente por ácido clavulánico.

## **a) Enzimas codificadas cromosomicamente**

### **a.1) Enzimas NMC-A**

Las enzimas NMC-A (“Not metalloenzyme carbapenemase”) se identificaron en Francia en 1990, en un aislamiento clínico de *E. cloacae*, con resistencia a ampicilina, cefalotina e imipenem, pero con sensibilidad al ceftoxitín y a las cefalosporinas de espectro extendido. El gen se codificó en el cromosoma de este microorganismo y difirió de las características fenotípicas de todas las carbapenemasas descritas previamente, hallazgo relevante por ser un nuevo mecanismo de resistencia a los carbapenémicos (Rada, 2019).

### **a.2) Enzimas SME**

Denominadas SME por “*Serratia marcescens* enzyme” fue detectada en Inglaterra en 1982 como su nombre lo indica en *Serratia marcescens*. A diferencia de otras enzimas, SME es fenotípicamente única exhibiendo poca acción hidrolítica contra cefalosporinas de espectro extendido por ende a menudo en los aislamientos de SME resulta sensible a ceftazidima o ceftriaxona pero resistente a carbapenems y aztreonam. Hasta el día de hoy se han reportado 5 variantes de SME; SME-1 a SME-5 (Hemarajata, 2018).

### **a.3) Enzimas IMI**

Llamada IMI por “imipenem-hydrolyzing betalactamase” encontrada por vez primera en un aislamiento de *Enterobacter cloacae* en USA en el año 1984. Tiempo después IMI ha sido identificada en China, Finlandia, Francia, Irlanda, Singapur, Tahiti (Polinesia francesa) y Estados Unidos. En contraste con IMI-1; IMI-2 y IMI-3 han sido descritas como enzimas

mediadas por plásmidos en *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* respectivamente. Alrededor de 20 variantes se han descrito actualmente. Cabe destacar que hay muy pocos reportes de IMI que no pertenezcan al género *Enterobacter* sin embargo se ha detectado en *E.coli* en España y más reciente en *Klebsiella variicola* en Reino Unido (Hopkins, 2017).

## **b) Enzimas codificadas mediante plásmidos**

### **b.1) Enzimas KPC**

Las enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) son más las prevalentes a nivel mundial. Hidrolizan eficientemente las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenemes; además, son inhibidas por el ácido borónico y el tazobactam pero parcialmente por los inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico por tanto se le considera una de las carbapenemasas más letales (Villegas, 2019).

La primera variante (KPC-1) fue aislada por vez primera en una cepa de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte en 1996 como parte del proyecto de vigilancia ICARE. Se diseminó rápidamente mediante plásmidos, y se reportó en otras enterobacterias y en bacterias Gram negativas no fermentadoras (Nordmann, 2009).

En el 2007, apareció el primer reporte en el mundo de la KPC-2 en *P. aeruginosa*. En el 2008, se caracterizó el transposón Tn4401 de estos aislamientos, y se sugirió que constituía un elemento genético involucrado en la movilización del gen bla-KPC a plásmidos, con

capacidad de desplazar el gen de su posición inicial a varias regiones del elemento móvil (Naas, 2008).

En estudios posteriores, se demostró que los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de la enzima KPC estaban asociados con un clon de mayor linaje genético ST258 y sus variantes cercanas, lo que sugirió que su propagación era internacional. Además, los genes bla-KPC ubicados en el transposón Tn4401 estaban presentes en una variedad de plásmidos, lo que facilitó la rápida propagación de la enzima KPC-2 a *K. pneumoniae* y a otras especies bacterianas (Cuzon, 2010 ).

Otra variante de la enzima KPC, identificada como la KPC-3 en *K. pneumoniae*, causó un primer brote en Colombia. Se estableció que el paciente índice provenía de Israel, lo que evidenció la propagación intercontinental de *K. pneumoniae* productora de KPC-3 (Lopez, 2011). Después de este reporte, se demostró que los aislamientos relacionados con el caso índice pertenecían al clon ST512, el cual se integra al complejo clonal 258, lo cual es congruente con estudios previos. Otros hallazgos demostraron la diseminación de la enzima KPC-3 perteneciente al clon ST258 y su circulación por fuera del ambiente hospitalario en pacientes de diferentes ciudades del país (Leal, 2013).

## **b.2) Enzimas GES**

Los genes que codifican la familia de las betalactamasas de espectro extendido de Guyana (GES), se han detectado principalmente en integrones de clase 1, localizados en plásmidos y reportados en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y Enterobacteriaceae.

La primera enzima GES se detectó en 1998 en un aislamiento de *K. pneumoniae* (GES-1) en un hospital de Francia, originalmente, se identificó como integrante de la familia de las BLEE por su espectro de hidrólisis contra penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido. Sin embargo, la sustitución de aminoácidos específicos del sitio activo de algunas de las variantes de esta enzima, extendió el espectro de su actividad a los carbapenémicos generándose la segunda variante de enzima, GES-2 la cual ya entra en la categoría de carbapenemasa (Queenan, 2007).

Actualmente, se reconocen más de 27 variantes de enzimas GES. Estas se han reportado en países latinoamericanos como Brasil (GES-5, GES-16), México (GES-5) y Argentina (GES-2), en *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Serratia marcescens* (Escandon-Vargas, 2017).

En Colombia, se reportó por primera vez las enzimas GES en aislamientos de *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, y *Pseudomonas spp.*, así como la producción simultánea de KPC más GES y de VIM más GES (Ovalle, 2017).

### 2.1.3.1.2 Carbapenemasas de clase D (subgrupo principal 2df de la Clasificación Funcional)

#### Enzimas OXA

Las carbapenemasas de clase D se denominaron enzimas de tipo oxacilinasas (OXA), por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la cloxacilina sin embargo poseen moderado efecto hidrolítico sobre los carbapenems. Sus genes están integrados en el cromosoma, los plásmidos o los integrones. Además, poseen una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos y se han identificado 498 variantes, las cuales se caracterizan porque no son inhibidas por ácido clavulánico, ácido borónico, EDTA ni ácido dipicolínico pero parcialmente inhibido por avibactam (Bush, 2018).

La primera betalactamasa de tipo OXA se describió en 1993, de un aislamiento de *A. baumannii* con resistencia a múltiples medicamentos, proveniente de un hospital escocés; posteriormente, se denominó OXA-23 y constituyó un nuevo subgrupo de la familia OXA. Otro subgrupo es el de la OXA-51, identificado por primera vez en *A. baumannii* en Argentina en el 2005, el cual correspondía a enzimas codificadas en el cromosoma y, por lo tanto, presentes de forma natural en este microorganismo. Además de estos subgrupos, se han reconocido otros, como los OXA-24/40, OXA-58, OXA-48, OXA-143 y OXA-235, en Latinoamérica y el Caribe (Escandon-Vargas, 2017).

En el caso puntual de enterobacterias la familia más relevante es la OXA-48. El gen blaOXA-48 se identifica comúnmente en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Es codificada por plásmidos y por ende permite su fácil diseminación alrededor del mundo. En general, las enzimas OXA-48<sub>like</sub> hidrolizan débilmente tanto el carbapenem como las cefalosporinas de amplio espectro. Sin embargo, una variante de OXA-48; OXA-163, que presenta hidrólisis eficaz de las cefalosporinas. Este pobre perfil hidrolítico enmascara la

detección de OXA-48. Puede pasar inadvertido en el diagnóstico de rutina y dificulta la opción de tratamiento (Bakthavatchalam, 2016).

### **2.1.3.2 Metallo- $\beta$ -lactamasas (MBL)**

Se caracterizan por contener en su sitio activo, en vez de serina, uno o varios iones de  $Zn^{2+}$ , responsable del ataque nucleofílico al anillo betalactámico. Actualmente, las carbapenemasas más frecuentes de clase B son las de tipo VIM, NDM e IMP (Suárez, 2011).

#### **2.1.3.2.1 Carbapenemasas de clase B (subgrupo principal 3a de la Clasificación Funcional)**

Llamadas también Metalobetalactamasas, estas enzimas conforman un grupo heterogéneo de enzimas con la característica de ser inhibidas por EDTA y compuestos tiólicos como el ácido 2-mercaptopropionico, ácido dipicolínico y el Mercapto acetato de Sodio, además de no ser inhibidos por ácido borónico y generalmente muestran sensibilidad por monobactámicos como aztreonam (Franklin, 2006). Son codificadas por plásmidos y también cromosómicamente, siendo las primeras las que han tomado protagonismo por su rápida diseminación. Entre las principales tenemos las enzimas IMP, VIM, GIM, SPM, AIM, KHM, NDM, DIM y TMB (Gonzales-Escalante, 2012). Se detallará a continuación las principales Metalobetalactamasas aisladas en enterobacterias.

#### **a) Enzimas IMP**

La enzima IMP (betalactamasa de clase B que hidroliza imipenem), fue la primera carbapenemasa detectada de la familia de las metalo-betalactamasas en Japón, en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa*; fue identificada en un plásmido de conjugación con un perfil de resistencia a imipenem y a cefalosporinas de espectro extendido. Además, la

actividad enzimática fue inhibida por EDTA, yodo, p-cloromercuribenzoato, CuSO<sub>4</sub> y HgCl<sub>2</sub> pero no por ácido clavulánico o sulbactam (Watanabe, 1991 ). Se han detectado más de 50 variantes. En Latinoamérica, la primera descripción de una enzima IMP (IMP-1) se hizo en un aislamiento de *K. pneumoniae* multirresistente (Lincopan, 2005).

## **b) Enzimas VIM**

Entre las carbapenemasas de clase molecular B, se han identificado las enzimas VIM (“Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase”), las cuales constituyen uno de los más grandes subgrupos de las metalo-betalactamasas de subclase molecular B1 (MLB B1), de las que han identificado enzimas VIM en plásmidos "multirresistencia" de múltiples especies gramnegativas; Actualmente se han identificado más de 50 variantes de VIM diferentes (Salimraj, 2018).

La enzima VIM-1 se detectó por primera vez en 1997, en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos en Verona, Italia. La enzima VIM-2, que comparte el 90 % de identidad con la VIM-1 por los aminoácidos que las componen, es la metalo-betalactamasa más extendida en *P. aeruginosa* y ha sido la fuente de múltiples brotes (Walsh, 2005 ).

En Latinoamérica, se ha reportado la enzima VIM-2 en Colombia, Chile, Venezuela, Brasil y Argentina, en aislamientos de *P. aeruginosa* (Escandon-Vargas, 2017).

Una nueva variante es la enzima VIM-24, identificada en un aislamiento de *K. pneumoniae*

en el 2011, en un estudio posterior, en el 2013, se detectó la presencia simultánea de la VIM-24 y la KPC-2 en un aislamiento de *K. pneumoniae*, y su codificación en dos plásmidos diferentes, lo que significó nuevas limitaciones en las opciones terapéuticas (Rojas, 2013).

### **c)Enzimas NDM**

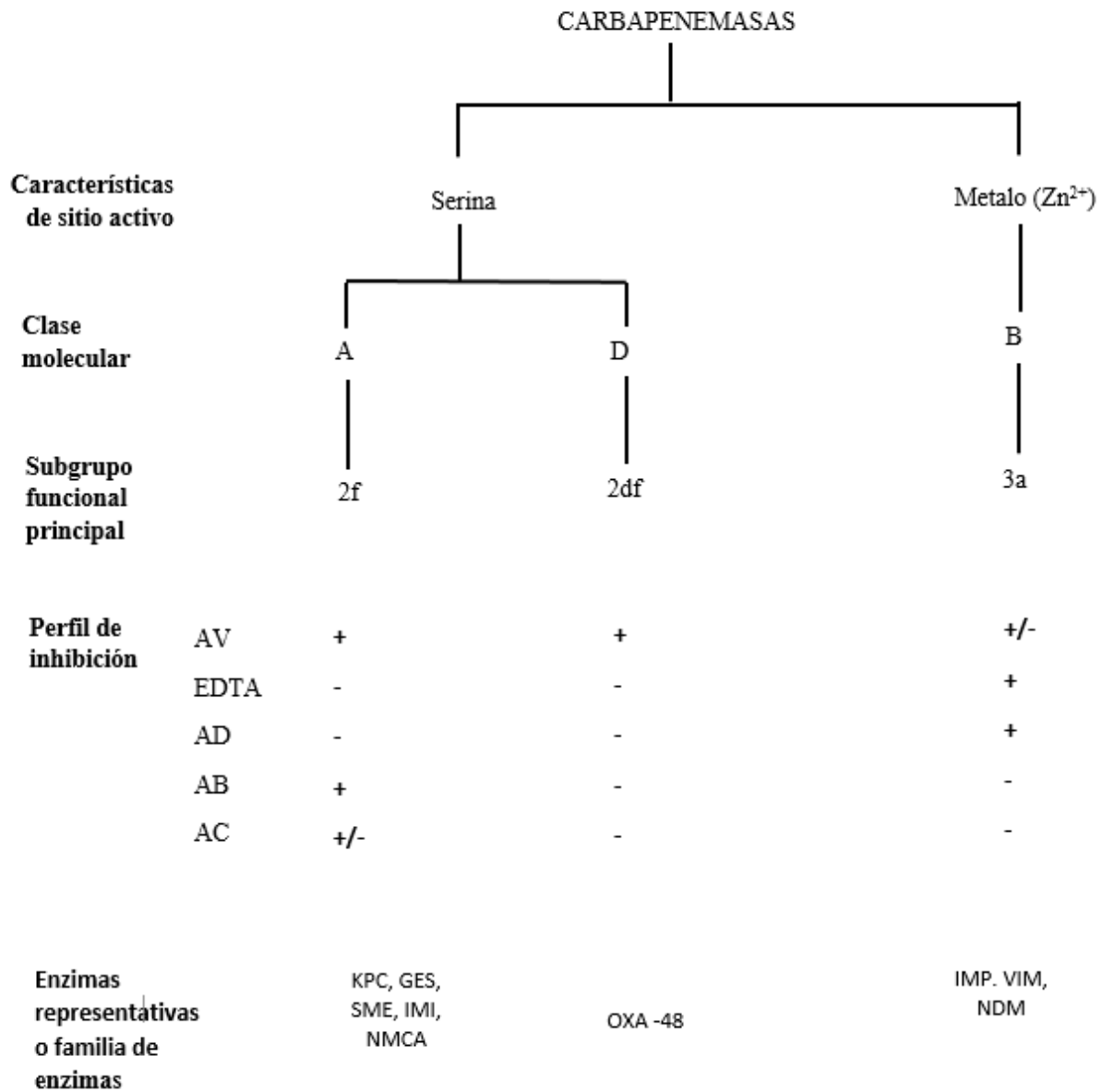
Las enzimas NDM (metalo-betalactamasas de tipo Nueva Delhi) confieren una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos y tienen un gran efecto negativo en los tratamientos. Esta familia de enzimas NDM pertenece a la clase molecular B y comprende 16 variantes (Rada, 2019).

Se reportó por primera vez en el 2008 en Nueva Delhi, en un aislamiento de *K. pneumoniae* y *E. coli*, recuperado de un paciente sueco, las enzimas NDM son resistentes a los carbapenémicos y a todos los antibióticos probados, a excepción de la Colistina (Yong D. T., 2009).

Su diseminación se ha detectado principalmente en enterobacterias y, en menor proporción, en *Acinetobacter spp.* y *P. aeruginosa* (Dortet, 2014).



fig. 1



### Clasificación de carbapenemasas en Enterobacterias

Abreviaturas: AV: Avibactam, AD: ácido dipicolínico, AB: ácido borónico, AC: ácido clavulánico, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Fuente: Adaptación personal de acuerdo a la bibliografía realizada

### 2.1.4 Identificación de carbapenemasas en el laboratorio

Los puntos de corte dados por las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de carbapenémicos otorgadas por CLSI o EUCAST otorgados desde 2010, dependiendo de cuales use el laboratorio, constituyen el punto de partida para sospechar la presencia de una enzima carbapenemasa. Cabe resaltar que, aunque estos puntos de corte actuales mejoraron los errores de cepas falsas negativas todavía existen otros mecanismos por los cuales se puede activar la alarma traduciéndose en MICs elevados (Doern, 2011). (**tabla1**)

**tabla 1**

Puntos de corte CLSI vigentes para carbapenémicos						
Agente	Disco difusión (mm)			Microdilución (µg/mL)		
	S	I	R	S	I	R
Doripenem	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Ertapenem	≥22	19-21	≤18	≤0.5	1	≥2
Imipenem	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Meropenem	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4

### Puntos de corte de CLSI vigentes para carbapenémicos

Fuente: Tomado de Estrategias para la implementación y reporte de los puntos de corte CLSI vigentes y pruebas fenotípicas confirmatorias para BLEE y carbapenemasas en bacilos Gram negativos en laboratorios clínicos de Colombia. Infectio. 2013; 17 (2).

### 2.1.5 Pruebas fenotípicas confirmatorias de producción de carbapenemasas

Como bien es sabido la alerta de carbapenemasas en el sistema automatizado basándose en los MICs definidos por el CLSI y EUCAST pueden enmascarar otros mecanismos de resistencia como la producción de Amp-C y/o ESBL con defectos de permeabilidad de membrana (van Duin, 2017). Debido a esto los laboratorios se ven en la necesidad del desarrollo de pruebas fenotípicas que apoyen en la detección de la resistencia a los carbapenemens. (**tabla 2**)

Estas pruebas se pueden clasificar en “Test de captura”, aquellos que solo detectan la presencia o ausencia de carbapenemasa en un determinado aislamiento, tiene un tiempo promedio de respuesta entre 15 min a 24h. Algunos ejemplos son el Test de Hodge modificado, Método de inactivación del carbapenem modificado(mCIM) y Carba NP/Blue Carba. Por otro lado, tenemos los “Test de diferenciación y clasificación” algunos ejemplos son el Test de sinergia de doble disco o sinergia de disco combinado, estos test nos servirán para identificar el tipo tipo de carbapenemasa involucrado en la resistencia ya sea por la inhibición por ácido borónico o EDTA/ac. Dipicolínico para carbapenemasas de Grupo A y para carbapenemasas de grupo B respectivamente. Actualmente contamos con un nuevo test incorporado al CLSI en 2018, el eCIM, que usado en combinación con el mCIM puede detectar metalo- $\beta$ -lactamasas pudiendo así incluirse como un “Test de diferenciación y clasificación” (Villegas, 2019).

tabla 2

Prueba	rendimiento diagnóstico	Tiempo de respuesta	alcance	limitaciones
Método de Hogde modificado	Sensibilidad: 72-100% Especificidad:100%	18-24h	Detección de KPC y OXA-48 en rango aceptable para aislamientos de <i>K.pneumoniae</i> y <i>E.coli</i> .	Falsos positivos con productores de AmpC y productores de BLEE con defectos de permeabilidad.  Falsos negativos con metalocarbapenemasas.
Test de sinergia con ácido borónico	Sensibilidad: 92% Especificidad:94%	18-24h	Diferenciación de carbapenemasas clase A (KPC).	Falsos positivos con AmpC cromosómicos productores de <i>Enterobacter</i> y <i>Serratia</i> . Cambios de sensibilidad según la variante carbapenemasa. No detecta metalocarbapenemasas. Los cambios en la distancia de los discos y / o su potencia disminuyen el rendimiento diagnóstico de la prueba.
Test de sinergia con EDTA	Sensibilidad: 92% Especificidad: 94%	18-24h	Diferenciación de carbapenemasas clase B(VIM-NDM).	Falsos positivos debido a alteraciones de la porina. Cambios de sensibilidad según la variante de carbapenemasas. No detecta serina-carbapenemasas. Los cambios en la distancia de los discos y / o su potencia disminuyen el rendimiento diagnóstico de la prueba
Prueba de inactivación de carbapenem modificada (mCIM y eCIM)	Sensibilidad: 98-100% Especificidad: 99-100%	18-24h	Diferenciación de carbapenemasa clase A, B y D. Adición de EDTA al eCIM permite la diferenciación de carbapenemasas de clase B (NDM, VIM, etc.)	No diferencia entre las carbapenemasas de las clases A y D. Algunos falsos positivos con AmpC que produce el complejo <i>E. cloacae</i> .
Carba NP/Blue Carba	Sensibilidad: 84% Especificidad: 100%	15 min-2h	Detección de carbapenemasa clase A, B y D.	No diferencia enzimas individuales. Algunos falsos positivos con variantes OXA-48 y con cepas mucoides de <i>Klebsiella</i> spp.
Inmunoensayo de flujo lateral	Sensibilidad: 100% Especificidad: 95-100%	15 min	Detección de carbapenemasa clase A, B y D.	Bajo número de estudios de validación y poca experiencia. Falsos positivos con enzimas tipo-OXA sin actividad carbapenemasa.

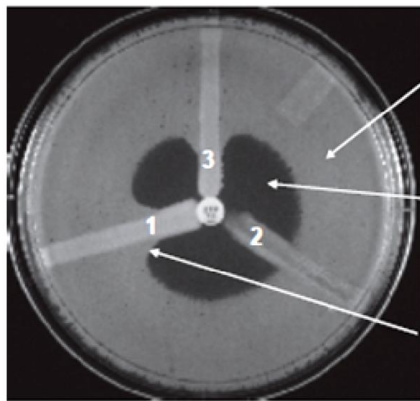
**Métodos usados para Caracterización fenotípica De Enterobacterias con actividad carbapenemasa**

Fuente: tomado de Villegas, M. V., Jiménez, A., Esparza, G., & Appel, T. M. (2019)

**a) Test de Hodge modificado(MHT)**

Se basa en la capacidad de las bacterias productoras de carbapenemasas para hidrolizar el ertapenem y el meropenem, se ha utilizado ampliamente como método fenotípico para la detección de carbapenemasas y es el único método aprobado por la CLSI con propósitos de tamizaje hasta 2018. No permite la diferenciación del tipo de carbapenemasa, pueden detectarse casos falsos positivos en enterobacterias con expresión de BLEE tipo CTX-M o hiperexpresión de AmpC, también existen casos de falsos negativos en metalobetalactamasas con baja actividad de carbapenemasa. En consecuencia, no puede utilizarse como método único para el diagnóstico de carbapenemasas en el laboratorio clínico(Esparza, 2013). (fig.2)

**fig. 2**



*Escherichia coli* ATCC 25922

*Inhibición E. coli* ATCC 25922 por disco ertapenem

2. *K. pneumoniae* BAA 1706  
carbapenemasa -. Control negativo

1. *K. pneumoniae* BAA 1705  
carbapenemasa +. Control positivo

3. Ceba en estudio  
carbapenemasa +.

**Casos de Método de Hodge Modificado positivo y negativo**

1)Control positivo de *K. pneumoniae* BAA 1705, evidencia THM positivo.2) Control negativo de *K. pneumoniae* BAA 1706, evidencia THM negativo.3) Ceba en estudio evidencia THM positivo.

Fuente: Tomado de Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS.

**b) Método modificado de Inactivación de Carbapenemes (mCIM – modified Carbapenem Inactivation Method)**

En la edición del 2017 el CLSI se incorporó una nueva metodología para la búsqueda de carbapenemasas en Enterobacterias: el mCIM (método modificado de inactivación de carbapenemes – en inglés: modified carbapenem inactivation method). Esta prueba consiste en la inactivación de un disco de meropenem mediante la incubación ya sea en TSB o en agua con la posible cepa productora de carbapenemasas, para luego probar la actividad del meropenem previamente expuesto a la cepa problema colocándolo una cepa de *E.coli* ATCC 25922 sensible a los carbapenemes.(fig.3) El resultado será dar a conocer según la medida del halo de inhibición. Se realiza para conocer la epidemiología o para el control de infecciones. No es necesario el cambio en la interpretación de la sensibilidad a carbapenemes si se obtiene un resultado positivo de mCIM. El mCIM no está recomendado como prueba de rutina (Malbrán, 2017).(fig.4)

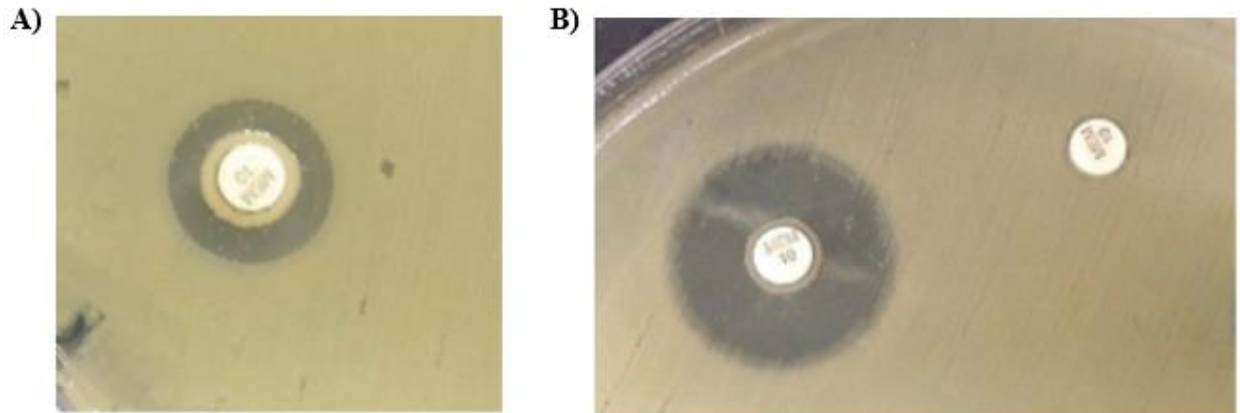
**fig.3**



**Desarrollo del Método modificado de inactivación al carbapenem(mCIM)**

Fuente: Tomado de Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS

**fig. 4**



**Casos de Método modificado de inactivación del carbapenem(mCIM) positivo y negativo**

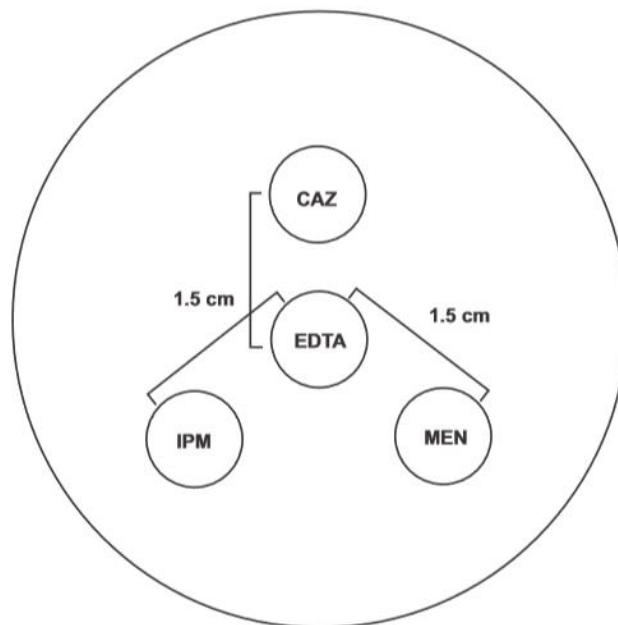
- A)** Ejemplo de aislamiento productor de carbapenemasa = mCIM positivo. **B)** Resultado de *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706TM (negativo), y *K. pneumoniae* ATCC BAA1705TM (positivo). Un pequeño anillo de crecimiento alrededor del disco de meropenem no debe tenerse en cuenta (es el resultado del arrastre de la suspensión bacteriana).

Fuente: Tomado de Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS.

**c) Detección de metalobetalactamasas con agentes quelantes**

El EDTA priva a las metalo- $\beta$ -actamasas de sus cationes divalentes de zinc esenciales para su actividad hidrolítica, haciéndolas inactivas contra betalactámicos. La prueba consiste en colocar un disco de un betalactámico (meropenem, ceftazidima) cercano a un disco de EDTA, es conocida como prueba de sinergia con doble disco. **(fig.4)** La formación de un patrón de sinergia indica la presencia de una metalobetalactamasa (Lee, 2003). Un método alternativo consiste en determinar el halo de inhibición de un disco de imipenem junto a su inhibidor quelante contra un disco de imipenem solo (test de disco combinado), el incremento del halo de inhibición denota la actividad de metalobetalactamasa (Yong D. L., 2002).

**fig.5**



CAZ: ceftazidima; IPM: imipenem; MEN: meropenem; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

### **Representación esquemática de Método de sinergia de doble disco con EDTA**

Representación esquemática de las distancias (1.5cm de centro a centro), sustratos y agente quelante sugerido para la detección fenotípica de aislamientos productores de MBLs.

Fuente: Tomado de Gonzales-Escalante, E. (2012)

### **d) Detección de carbapenemasas de clase A basada en boronatos**

Se trata de la detección fenotípica de carbapenemasas inhibidas por el ácido borónico y sus derivados. Los derivados de ácido borónico recuerdan estructuralmente a los betalactámicos y se han utilizado para la detección de otros tipos de betalactamasas como las de clase C. En una placa de Muller Hinton previamente sembrada con la cepa problema, se coloca discos de MEROPENEM-ACIDO BORONICO- IMIPENEM para luego de 18-24h de incubación observar los resultados. Un resultado positivo se evidenciará por la sinergia entre el ácido



borónico y el carbapenem. **(fig.5)** Las principales limitaciones de la prueba radican en que pueden existir problemas de especificidad cuando los aislamientos producen betalactamasas de tipo Amp-C, ya que el ácido borónico es un potente inhibidor de este tipo de enzimas, problema que puede solucionarse con el uso de discos de cloxacilina que hacen una inhibición selectiva de la cefalosporinasa (Pasteran, 2011).

**fig. 6**



**Sinergia de doble disco con ácido borónico positiva**

Sinergia positiva entre MEM-APB-IPM (Meropenem- ácido borónico- imipenem)

Fuente: Tomado de Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS.

### **III. MÉTODO**

#### **3.1 Tipo de la investigación**

La presente investigación es un estudio Descriptivo, correlacional de corte transversal- no experimental.

#### **3.2 Ámbito Temporal y Espacial**

##### **Delimitación Temporal**

Los datos que fueron considerados para la realización del estudio de investigación propuesto fueron enmarcados dentro del periodo de febrero a octubre del 2018.

##### **Delimitación Espacial**

El proyecto de investigación propuesto se realizó en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza.

### 3.3 Variables

#### Operacionalizacion de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i>	microorganismos provenientes de la Familia enterobacteriae	Enterobacterias capaces de inhibir los carbapenems	Medida del halo	<p>Imipenem: sensible <math>\geq 23</math> mm intermedio 20-22mm resistente <math>\leq 19</math>mm</p> <p>Meropenem: sensible <math>\geq 23</math>mm intermedio 20-22mm resistente <math>\leq 19</math>mm</p>
Caracterización fenotípica de carbapenemasas	Se realiza mediante técnicas diagnósticas para la detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasas	Test de Hodge Modificado	Observacion de hendidura del halo de inhibición	<p>Presencia de hendidura.</p> <p>Ausencia de hendidura</p>
		Método Modificado de Inactivación de Carbapenem(mCIM)	Medición de halo de inhibición	<p>Positivo (6-15 mm)</p> <p>Intermedio (16-18 mm)</p> <p>Negativo &gt;19mm)</p>
		Método de sinergia de doble disco con Ácido Borónico	Observacion de deformidad de los halos de inhibición en forma de huevo(sinergia)	<p>Presencia de deformidad del halo de inhibición</p> <p>Ausencia de deformidad de halo de inhibición</p>
		Método de sinergia de doble disco con EDTA	Observacion de deformidad de los halos de inhibición en forma de huevo(sinergia)	<p>Presencia de deformidad del halo de inhibición</p> <p>Ausencia de deformidad de halo de inhibición</p>

### **3.4 Población y muestra**

#### **Población**

Conformada por 76 cultivos intrahospitalarios positivos de enterobacterias con sospecha de carbapenemasas, procedentes del área de microbiología del hospital Nacional de febrero a octubre del 2018.

#### **Muestra**

Conformada por 65 cultivos de cultivos intrahospitalarios positivas, 46 de *Klebsiella pneumoniae* y 19 *Escherichia coli*, con sospecha de carbapenemasas, procedentes del área de microbiología del hospital Nacional de Lima, de febrero a octubre del 2018.

#### **Diseño Muestreal**

El diseño muestreal estará facilitado por el tipo de Muestreo Aleatorio Simple (MAS).

#### **Criterios de inclusión**

Todos los cultivos microbiológicos positivos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con sospecha de producción de carbapenemasas que proceden de pacientes hospitalizados.

#### **Criterios de exclusión**

Todos los cultivos microbiológicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* sin sospecha de producción de carbapenemasas que procedan de pacientes hospitalizados.

Todos los cultivos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* que proceden de consulta externa con o sin sospecha de carbapenemasas.

### **3.5 Instrumentos**

Para el estudio de investigación, se elaboraron fichas de recolección de datos, comprendidas por Fichas microbiológicas donde reunirá la información requerida: Tipo de cultivo, Servicio

de procedencia, Germen identificado, Susceptibilidad (sensibilidad, sensibilidad intermedia, y resistencia a los antimicrobianos) estandarizados.

### 3.6 Procedimientos

#### Test de Hodge modificado (MHT)

Test fenotípico para confirmación de la producción de carbapenemasas en Enterobacterias.

El procedimiento indicado es el siguiente:

- Estandarizar 0,5 MF cepa *E. coli* ATCC® 25922. Esta cepa es utilizada como siembra base de la placa por su característica de ser sensible a los carbapenémicos. Diluir 1/10 en suero fisiológico.
- Sembrar 2 placas agar Mueller Hinton con la cepa *E. coli* ATCC® 25922 diluida 1/10.
- Dejar secar entre 3 – 10 minutos.
- Colocar en una placa al centro el disco de meropenem 10µg y en la otra placa el disco de ertapenem 10 µg. No es recomendado el uso de discos de imipenem para esta prueba
- Con asa 10 µL sembrar en línea hacia el antimicrobiano las cepas en estudio y las cepas controles. Incubar 35 + -2°C por 16-20 horas.
- Control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1705, la cual constituye una cepa productora de carbapenemasas tipo KPC.
- Control negativo *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1706 que corresponde a una cepa resistente a carbapenémicos por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.

### **Interpretación de los resultados:**

**Resultado positivo**, se observa formación de una punta de flecha por el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC® 25922 en la intersección entre el halo de inhibición (generado por la difusión del antibiótico) y la estría de la cepa productora de carbapenemasa.

La carbapenemasa es liberada al medio, permitiendo el desarrollo de la *E. coli*, observándose una hendidura en la parte proximal al disco de meropenem y/o ertapenem.

### **Método modificado de Inactivación de Carbapenemes (mCIM – modified Carbapenem Inactivation Method)**

Método fenotípico para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas incorporado por la CLSI desde M100 27th Edition (2017). (Malbrán, 2017)

El procedimiento indica lo siguiente:

- Para cada aislamiento a evaluar, disolver una ansada de 1µl de un cultivo fresco de *Klebsiella pneumoniae* o *Escherichia coli* proveniente de agar sangre, en 2 ml de TSB.
- Mezclamos con vortex 10-15 seg.
- Agregar al tubo de TSB un disco de meropenem. Asegurarse que todo el disco quede sumergido en la suspensión.
- Incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en aerobiosis, durante 4 hs.  $\pm$  15 min.
- Justo antes o inmediatamente a continuación de la incubación de la suspensión con el disco de meropenem, preparamos una suspensión de 0.5 de Mc Farland de *E. coli* ATCC 25922 en caldo nutritivo o solución fisiológica.

- Inocular una placa con agar MH con la suspensión de *E. coli* ATCC 25922, de igual manera que durante la rutina de las pruebas de sensibilidad. La preparación del inóculo, como la inoculación de la placa, se realizarán en no más de 15 min. Dejamos secar las placas por 3-10 min antes de agregar el disco de meropenem.
- Remover el disco de meropenem de la suspensión de la cepa a evaluar utilizando un ansa de 10µl y ayudándose con las paredes del tubo para levantar el disco de meropenem. Con cuidado presionar contra las paredes del tubo para remover el exceso de líquido del disco. Colocar el disco en la placa de MH previamente inoculada con la cepa ATCC. No colocar más de 4 discos de meropenem en las placas de 100mm y 8 discos en las placas de 150mm. Ver figura 1.
- Invertir la placa e incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en aerobiosis, durante 18-24 hs.

#### **Interpretación de los resultados:**

**Carbapenemasa positivo:** zonas de inhibición entre 6-15mm o presencia de colonias dentro de zonas de inhibición de entre 16-18mm. Si el aislamiento a evaluar produce carbapenemasa, el disco de meropenem será hidrolizado durante la incubación y no habrá inhibición o limitación del crecimiento para *E. coli* ATCC 25922 sensible a meropenem.

**Carbapenemasa negativo:** zonas de inhibición  $\geq 19\text{mm}$ . Si el aislamiento a evaluar no produce carbapenemasa, el disco de meropenem no será hidrolizado durante la incubación y podrá inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 sensible a meropenem.

**Indeterminado:** Zonas de inhibición entre 16-18mm (sin la presencia de colonias intra halo). La presencia o ausencia de carbapenemasa no puede ser confirmada.

### **Test de Ácido borónico**

El ácido borónico es un inhibidor selectivo de las carbapenemasas tipo A – serin carbapenemasas (KPC, Sme, Nmc, IMI y GES) observándose una sinergia entre el disco de ácido borónico y el antibiótico carbapenémico.

La prueba se realiza utilizando discos impregnados con una concentración de 300 µg de ácido borónico. Estos discos pueden ser comerciales o preparados localmente en el laboratorio (impregnación de discos estériles). La duración de los discos si son preparados en el laboratorio, la dan los resultados del control de calidad con las cepas controles ATCC® positivas y negativas, si son comerciales de acuerdo a indicaciones del fabricante.

Consideraciones:

El ácido borónico tiene baja especificidad para detectar la presencia de carbapenemasas en cepas que presenten altos niveles de AmpC, como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y en *P. aeruginosa*.

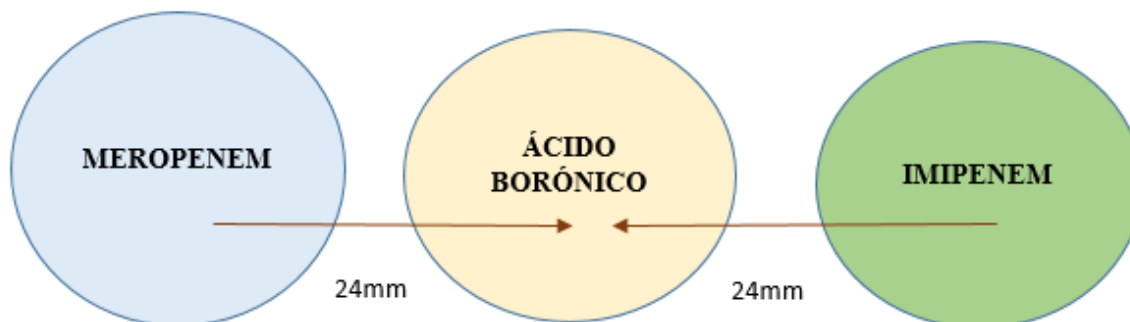
El procedimiento de colocación de los discos ácido borónico, se realiza de la siguiente manera:

Estandarizar la cepa en estudio a 0,5 Mac Farland y sembrar placa de agar Mueller Hinton. Colocar los discos de imipenem 10µg y de meropenem 10 µg y ácido borónico de acuerdo a esquema(**fig.6**); se deben depositar cuidadosamente a una distancia de centro a centro igual a la mitad de la lectura obtenida con imipenem (radio en mm) más la mitad de la lectura obtenida con meropenem (radio en mm) más 5 mm.2.



**Interpretación:** El test es positivo cuando se observa sinergia o ensanchamiento del halo de inhibición entre los discos de los carbapenémicos y el disco de ácido borónico, debe haber sinergia con ambos carbapenemicos.

**fig. 7**



**Ejemplo:**

Imipenem: Halo 20 mm / 2 = 10 mm (radio)

Meropenem: Halo 18 mm / 2 = 9 mm (radio)

Por lo tanto:  $10 + 9 + 5 = 24$  mm (distancia a aplicar)

### **Representación esquemática de método de Sinergia de doble disco con Ácido Borónico**

Representación esquemática de la colocación de discos para la prueba de Sinergia de doble disco con ácido borónico.

Fuente: Adaptación personal en base a la bibliografía revisada.

### **Test de EDTA**

Este método consiste en la capacidad inhibitoria del EDTA para las carbapenemasas de tipo metalo- $\beta$ -lactamasas debido a que secuestra los cationes de Zinc necesarios para su acción hidrolítica observándose sinergia entre el disco de betalactámico y el EDTA.

El procedimiento de colocación de los discos de EDTA se realiza de la siguiente manera: Estandarizar la cepa en estudio a 0,5 Mac Farland y sembrar placa de agar Mueller Hinton. Luego se coloca el disco de EDTA al medio de la placa y los discos de Meropenem, Imipenem y CTA van de acuerdo al esquema. **(fig.4)** Se dejará incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 18-24 horas.

**Interpretación:** El test es positivo se observa sinergia o ensanchamiento del halo de inhibición entre el disco del betalactámico y el disco de EDTA.

### **3.7 Análisis de datos**

Los datos obtenidos serán analizados utilizando el programa computarizado el MICROSOFT EXCEL 2010 el cual nos permitirá hacer uso eficiente de las herramientas cuantitativas principales existentes para el presente trabajo, considerando un nivel de confianza del 95%.

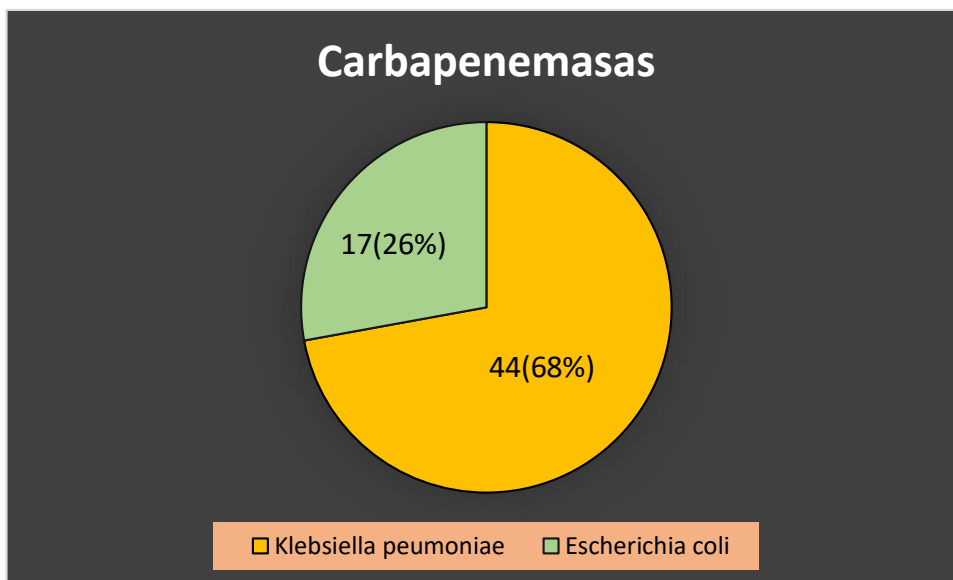
### **3.8 Consideraciones éticas**

Se tendrá en cuenta los códigos de ética vigente, y se mantendrá la reserva correspondiente de los resultados.

#### IV. RESULTADOS

Sobre los 76 cultivos de enterobacterias con sospecha de carbapenemasas, se tomó como muestra a 65 cultivos de los que 46 fueron de *Klebsiella pneumoniae* y 19 fueron de *Escherichia coli* para realizar la comprobación de actividad carbapenemasa mediante las pruebas fenotípicas.

De los 65(100%) cultivos de *Klebsiella pneumoniae* (46) y *Escherichia coli* (19) con sospecha de carbapenemasas, se confirmaron mediante las pruebas fenotípicas: *Klebsiella pneumoniae* 44(68%) y *Escherichia coli* 17(26%) productoras de carbapenemasas. (**grafica 1**)

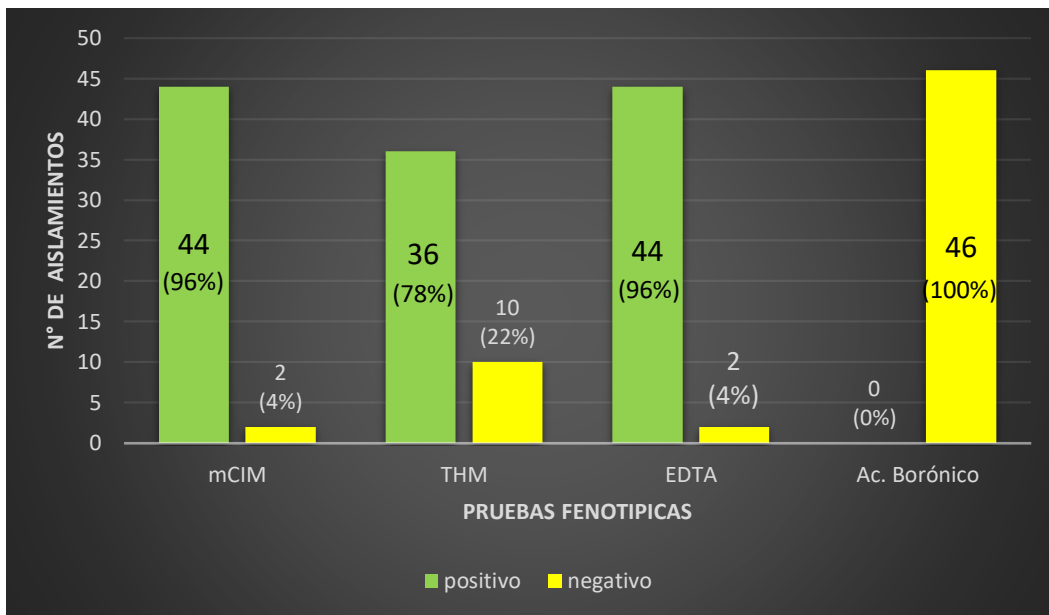


**Grafica 1:** Frecuencia de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* confirmadas mediante las pruebas fenotípicas.

Fuente: Datos obtenidos de la investigación

De acuerdo a los resultados positivos obtenidos por las pruebas fenotípicas realizadas en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* con sospecha de carbapenemasas 46(100%) en se obtuvo: 36(78%) Test de Hodge Modificado, 44(96%) mCIM, 44(96%) sinergia de doble disco con EDTA y 0(0%) sinergia de doble disco con Ácido borónico respectivamente.

Basándonos en las pruebas fenotípicas se obtuvo 44(96%) cepas de *Klebsiella pneumoniae* identificadas como productoras de carbapenemasas. Además, en las 44 cepas se identificó carbapenemasas de fenotipo metalo-β-lactamasa (100%) mediante el método de sinergia de doble disco con EDTA. (gráfico2)

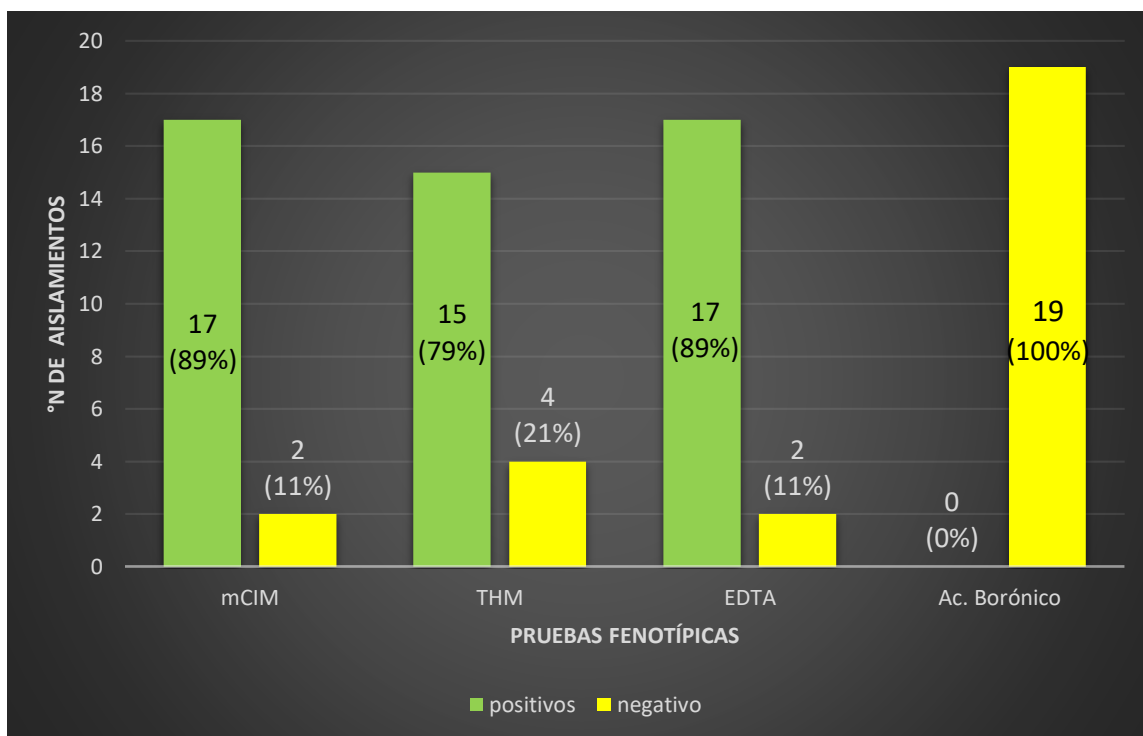


**Grafico 2:** Resultados positivos/negativos en *Klebsiella pneumoniae* mediante los métodos fenotípicos de mCIM, Test de Hodge modificado, Sinergia de doble disco con EDTA y sinergia de doble disco con Ácido borónico

Fuente: Datos obtenidos de la investigación.

De acuerdo a los resultados positivos obtenidos por las pruebas fenotípicas realizadas en los aislamientos de *Escherichia coli* con sospecha de carbapenemasas 19(100%) se obtuvo: 15(79%) Test de Hodge Modificado, 17(89%) mCIM, 17(89%) sinergia de doble disco con EDTA y 0(0%) sinergia de doble disco con Ácido borónico respectivamente.

Basándonos en las pruebas fenotípicas se obtuvo 17(89%) cepas de *Escherichia coli* identificadas como productoras de carbapenemasas. Además, en las 17 cepas se identificó carbapenemasas de fenotipo metalo- $\beta$ -lactamasas (100%) mediante el método de sinergia de doble disco con EDTA. (gráfica 3)



**Grafica 3°:** Resultados positivos/negativos en *Escherichia coli* mediante los métodos fenotípicos de mCIM, Test de Hodge modificado, Sinergia de doble disco con EDTA y sinergia de doble disco con Ácido borónico.

Fuente: Datos obtenidos de la investigación

Se determinó que del total de muestras de *Klebsiella pneumoniae* con actividad carbapenemasa comprobada mediante las pruebas fenotípicas 44(100%) mostró una distribución mayor en muestras de Urocultivo 11(25%), Aspirado bronquial 9(20%), Secreción de herida 8(18%) y Hemocultivos 8(18%) respecto a las muestras de LCR 1(2%), Bilis 1(2%) Secreción abdominal 1(2%), Espujo 1(2%), Tejido óseo 2(5%) y Secreción faríngea 2(5%). **(Grafica 4)**

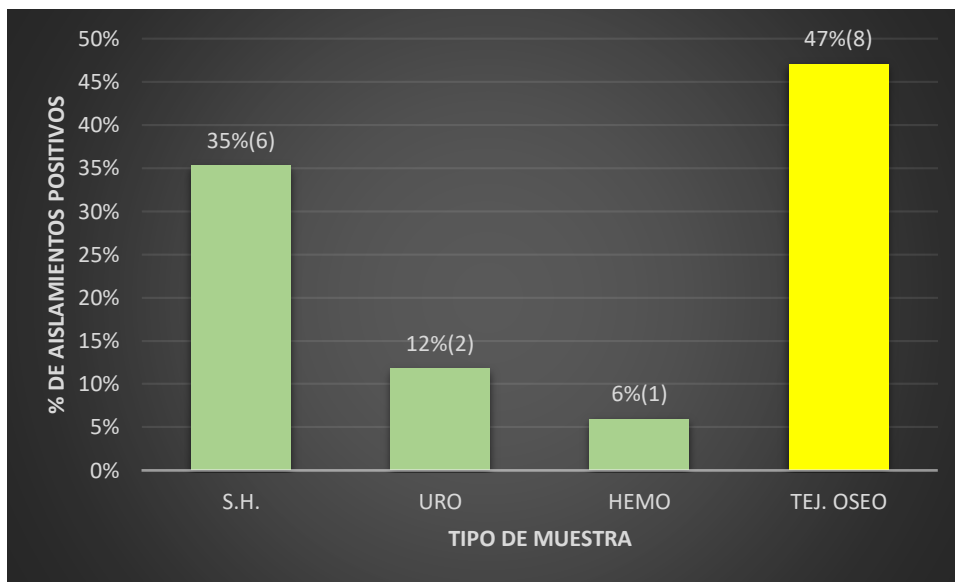


**Grafica 4:** Aislamientos positivos a carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* comprobadas mediante las pruebas fenotípicas según tipo de muestra.

Fuente: datos obtenidos de la investigación

S.H: Secreción de herida, URO: Urocultivo, LCR: Líquido cefaloraquídeo, Hemo: hemocultivo, Asp. Bronquial: aspirado bronquial, Sec. Abdominal: Secreción abdominal, Tej. Oseo: Tejido óseo, S.F.: Secreción faríngea.

Se determinó que del total de muestras de *Escherichia coli* con actividad carbapenemasa comprobada mediante las pruebas fenotípicas 17(100%) mostró una distribución mayor en muestras de Tejido óseo 8(47%) y Secreción de herida 6(35%) respecto a las muestras de Hemocultivos 1(6%) y Urocultivos 2(12%). **(Grafica 5)**



**Grafica 5:** Aislamientos positivos a carbapenemasas en *Escherichia coli* comprobadas mediante las pruebas fenotípicas según tipo de muestra.

Fuente: Datos obtenidos de la investigación.

S.H: Secreción de herida, URO: Urocultivo, Hemo: hemocultivo, Tej. Oseo: Tejido óseo.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según la investigación realizada por Hoang, en 2019, sobre: “Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) Production by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern Vietnam and Appropriate Methods of Detection: A Cross-Sectional Study” el cual tiene como objetivo estudiar las características de *Escherichia coli* y *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem (CR-E / K) en dos hospitales en el sur de Vietnam . En el cual se recolectaron un total de 100 cepas de CR-E / K (50 cepas de *Escherichia coli* y 50 cepas de *Klebsiella pneumoniae*). Dando como resultado la detección de carbapenemasas en 47 aislamientos (36 NDM, 10 KPC y un aislante que albergaba ambos genes). Además se detectó que las muestras de orina (31%) y el esputo (37%) fueron dos especímenes más comunes de CRE. En comparación con nuestro estudio obtuvimos una mayor cantidad de cepas de fenotipo metalo- $\beta$ -lactamasas(100%) de las cepas con actividad carbapenemasa comprobada mediante las pruebas fenotípicas. Además podemos decir que hay una aproximación en la cantidad de muestras de *Klebsiella pneumoniae*(46) analizadas sin embargo para las muestras de *Escherichia coli*( 19) tuvimos menor una cantidad. Según el tipo de muestra se obtuvo para *Klebsiella pneumoniae* similar cantidad en muestras de Orina 11(25%) colocandola como la principal muestra en cepas portadoras de carbapenemasas. Cabe destacar que en nuestro estudio el Test de Hodge modificado dio menos resultados positivos (15) comparado al método de sinergia de doble disco con EDTA (17) para las cepas de *Escherichia coli* y para *Klebsiella pneumoniae* fue de Hodge modificado (42) y sinergia de doble disco con EDTA(44) respectivamente. Esto es similar a lo dicho por



Hoang, quien afirma que el test de Hogde tiene una baja sensibilidad y especificidad para la detección de carbapenemasas.

Respecto al estudio realizado por Resurrección-Delgado, en el año 2017, el cual se titula “*Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo, Lima, Peru” en el cual se analizaron 11 muestras de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de aspirado bronquial (3), urocultivo (4), secreción de herida (1), punta de catéter (2) y hemocultivo (1) respectivamente. Dando como resultado para las 11 muestras la presencia carbapenemasas de fenotipo metalo- $\beta$ -lactamasa tuvo una semejanza respecto a nuestro estudio ya que la frecuencia de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* se dio principalmente también en muestras de urocultivo (11/44) y además en todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* comprobados mediante las pruebas fenotípicas se identificó carbapenemasas de fenotipo metalo- $\beta$ -lactamasa (44/44).

En el estudio publicado por Sacsquispe-Contreras, en el año 2018, titulado “Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017”. Se identificaron 83 cepas con carbapenemasas que fueron provenientes de orina (28), sangre (16), aspirado bronquial (5), secreción de herida (5), catéter venoso central (5), secreción de dren (3), absceso (2), esputo (1), secreción pancreática (1), secreción de oído (1), secreción bronquial (1), tejido necrótico (1), sin datos (14) respectivamente. De las 83 cepas con carbapenemasas la distribución de genotipos para *Klebsiella pneumoniae* (55) fue de KPC (14), NDM (40) Y IMP (1) y para *Escherichia coli* (3) se encontró KPC (2) y NDM (1) respectivamente. Comparado con

nuestro estudio, se encuentra una aproximación en la cifra de *Klebsiella pneumoniae* con actividad carbapenemasas positiva (44) sin embargo el fenotipo de carbapenemasa encontrado en este estudio fue metalo- $\beta$ -lactamasas para todas estas cepas. Cabe resaltar que en este estudio tuvo un mayor número de cepas con actividad carbapenemasas para *Escherichia coli* (17) las cuales fueron comprobadas mediante los métodos fenotípicos y que también fueron en su totalidad metalo- $\beta$ -lactamasas.

De acuerdo al estudio realizado en Colombia por Reyes-Chacón, en 2017, de nombre: “Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae”. Se evaluó al método de inactivación del carbapenémico (MIC\*) respecto al Test de Hodge modificado (THM), ácido 3-aminofenilborónico (APB) y la reacción en cadena de la polimerasa en enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) tipo KPC. Se seleccionaron 91 cepas resistentes a los carbapenémicos de *K. pneumoniae* (64), *K. oxytoca* (6), *E.coli*(13), *S. marcescens*(7) y *C. freundii*(1) en las que el MIC\* tubo una especificidad y especificidad del 100% mientras que el THM tuvo una sensibilidad de 98% y especificidad de 97% . En nuestro estudio se puede establecer una aproximación en la cantidad de muestras analizadas ya que obtuvimos 17 cepas de *Escherichia coli* resistentes a los carbapenemes comprobados mediante las pruebas fenotípicas, además también obtuvimos mayores resultados positivos para *Escherichia coli* mediante el método de mCIM 17(89%) comparado con el THM 15(79%) y de igual manera para *Klebsiella pneumoniae*; mCIM, 44(96%) comparado con el Test de Hodge Modificado 36 (78%).

Cabe resaltar que el THM tiene mejor sensibilidad para detectar carbapenemasas de clase A y D sin embargo esta prueba tiende a falsos negativos en metalo- $\beta$ -lactamasas (Villegas, 2019).

En el estudio realizado por Escobar Castaño (2018) titulado: “Descripción de tipos de carbapenemasas expresadas en *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá, estudio descriptivo”. En *Klebsiella sp.*, se obtuvo una probabilidad de producción de carbapenemasas de 98%, predominantemente del tipo KPC en el 96.8%, con cepas aisladas que tuvieron co-producción KPC-Metalobetalactamasa (VIM/NMD). Comparando con los datos obtenidos de nuestro estudio tuvimos un 100% de metalo- $\beta$ -lactamasas en el caso de *Klebsiella pneumoniae*.

Respecto al estudio realizado por Shokri, en 2017, titulado: “Resistotyping, phenotyping and genotyping of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) among gram-negative bacilli from Iranian patients”. Se Realizó el Antibiograma-resistotipo y la detección de Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa (NDM) en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*(120), *Acinetobacter baumannii*(110) y *Pseudomonas aeruginosa*(100) respectivamente aisladas en muestras de Orina, Sangre, Otros fluidos corporales estériles, Muestras respiratorias, Herida y Absceso. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* se obtuvo muestras de Orina(25), Sangre(15), Otros fluidos corporales estériles(6) Muestras respiratorias(65), Herida y Absceso(9) y otros no especificados (4). Dando como resultado la detección 28 (8,5%) cepas que portadoras del gen blaNDM-1 del total de bacterias investigadas; además se identificó 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de NDM sobre el total de aislamientos de la misma(120). Comparado con la cantidad de muestras de urocultivo analizadas para *Klebsiella pneumoniae*(11) en nuestro estudio fue inferior debido a que posiblemente las muestras seleccionadas en nuestro estudio fueron solamente de *Klebsiella pneumoniae* con sospecha de carbapenemasas y no se incluyó todos los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* sin sospecha de carbapenemasas.

## VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos por los métodos fenotípicos de Test de Hodge Modificado, EDTA, Acido borónico y mCIM se obtuvo 44 cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas y 17 cepas de *Escherichia coli* productoras de carbapenemasas. Para las 44 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y para las 17 cepas de *Escherichia coli* se indentificó carbapenemasas de fenotipo metalo- $\beta$ -lactamasa De este estudio entonces podemos decir que las todas muestras positivas a carbapenemasas son de fenotipo metalo- $\beta$ -lactamasas.

## VII. RECOMENDACIONES

Dados los antecedentes y este presente estudio se debe considerar y poner en evaluación el rendimiento del Test de Hogde modificado para la detección de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* ya que en nuestro país presentamos gran población de metalobetalactamasas y justo con estas enzimas es donde esta prueba fenotípica demostró poca sensibilidad. Sin embargo, esto dependerá de la epidemiología de cada hospital.

La CLSI recientemente en el 2018 incorporó una variante al mCIM, el eCIM (método de inactivación de carbapenem EDTA) con el cual se tiene la posibilidad de detectar metalobetalactamasas siempre y cuando se lo use de la mano del mCIM. Este método en combinación con la sinergia de doble disco con EDTA podría darnos un resultado óptimo en la búsqueda de metalobetalactamasas.

Se recomienda una vez identificada la carbapenemasa mediante los métodos fenotípicos realizar las pruebas moleculares a fin de dar a conocer la enzima que causa la resistencia, esto contribuye a poder tener la certeza los genotipos prevalentes de carbapenemasas en cada país.

Debe haber una constante capacitación al personal de laboratorio para el uso de pruebas accesibles para la determinación de mecanismos de resistencia a carbapenemes.

## VIII. REFERENCIAS

- Bakthavatchalam, Y. D. (2016). Laboratory detection and clinical implication of oxacillinase-48 like carbapenemase: the hidden threat. *Journal of global infectious diseases*, 8(1), 41.
- Brañas, P., Gil, M., Villa, J., Orellana, M., & Chaves, F. (2018). Epidemiología molecular de las infecciones/colonizaciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de Madrid. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 100-103.
- Bush, K. (2018). Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(10).
- Castanheira, M. D. (2019). Variations in the occurrence of resistance phenotypes and carbapenemase genes among Enterobacteriaceae isolates in 20 years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *In Open forum infectious diseases*, Vol. 6, No. Supplement\_1, pp. S23-S33.
- Cuzon, G. N. (2010). Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce  $\beta$ -lactamase blaKPC-2 gene. *Emerging infectious diseases*, 16(9), 1349.
- De la Salud, A. M. (2016). Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos: Informe de la Secretaría (No. A69/24). *Organización Mundial de la Salud*.
- De Sousa De Abreu, L. H. (2016). Primer aislamiento de *Escherichia coli* productora de carbapenemasa tipo New Delhi (NDM) en un hospital de Ciudad Guayana, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36(2), 40-45.
- Díaz Tello, J. A. (2008). *Detección de metalobetalactamasas (MBLs) en Pseudomonas aeruginosa resistentes a los carbapenemas en un Hospital Nacional, en los meses de enero a octubre del año 2008*. Lima.
- Doern, C. D. (2011). Detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) production in non-*Klebsiella pneumoniae* Enterobacteriaceae isolates by use of the Phoenix, Vitek 2, and disk diffusion methods. *Journal of clinical microbiology*, 49(3), 1143-1147.
- Dortet, L. P. (2014). Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed research international*.
- Escandon-Vargas, K. R. (2017). The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert review of anti-infective therapy*, 15(3), 277-297.
- Escobar Castaño, C. J. (2018). *Descripción de tipos de carbapenemasas expresadas en Klebsiella sp. Y Pseudomonas aeruginosa en hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá, estudio descriptivo*. tesis de Especialidad en Infectología / Especialidad en Medicina Interna, Universidad Nacional de Colombia, medicina interna, Bogotá.

- Esparza, G. A.-R. (2013). Estrategias para la implementación y reporte de los puntos de corte CLSI vigentes y pruebas fenotípicas confirmatorias para BLEE y carbapenemasa en bacilos gram negativos en laboratorios clínicos en Colombia. *Infectio*, 80-89.
- Franklin, C. L. (2006). Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3139-3144.
- Frère, J. M. (2005). Is it necessary to change the classification of  $\beta$ -lactamases? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1051-1053.
- Gastelo-Acosta, R. M.-S. (2016). Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque diciembre 2014-julio 2015. *Acta Médica Peruana*, 33(3), 183.
- Gonzales-Escalante, E. (2012). Metallo- $\beta$ -lactamasas: ¿el fin de los  $\beta$ -lactámicos? *Revista Peruana de Epidemiología*, 01-08.
- Hemarajata, P. A. (2018). Selection of hyperproduction of AmpC and SME-1 in a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolate during antibiotic therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1256-1262.
- Hoang, C. Q. (2019). Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) Production by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern Vietnam and Appropriate Methods of Detection: A Cross-Sectional Study. *BioMed research international*, .
- Hopkins, K. L. (2017). IMI-2 carbapenemase in a clinical *Klebsiella variicola* isolated in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(7), 2129-2131.
- Hussain, M. C. (1985). Cloning and sequencing of the metalloprotein beta-lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 223-229.
- Kiese, M. R. (2016). *Escherichia coli* metalobetalactamasa en un hospital de alta complejidad en Paraguay. *Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna*, 3(2), 12.
- Kuwabara, S. &. ((1967). Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochemical Journal*.
- Lauretti, L. R. (1999). Cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1584-1590.
- Lazovski, J., Corso, A., Pasteran, F., Monsalvo, M., Frenkel, J., Cornistein, W., . . . Nacinovich, F. (2017). Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. *Rev Panam Salud Publica*.

- Leal, A. L. (2013). Emergence of resistance to third generation cephalosporins by Enterobacteriaceae causing community-onset urinary tract infections in hospitals in Colombia. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 31(5), 298-303.
- Lee, K. L. (2003). Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, 41(10), 4623-4629.
- Lincopan, N. M. (2005). First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *Journal of clinical microbiology*, 516-519.
- Lopez, J. A.-V. (2011). Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clinical microbiology and infectio*, 17(1), 52-56.
- Malbrán, C. G. (2017). *NOVEDADES 2017 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)*. Servicio Antimicrobianos - Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos – INEI – ANLIS, Argentina.
- Medeiros, A. A. (1986).  $\beta$ -Lactamase-mediated resistance to penems and carbapenems amongst Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology*.
- Naas, T. C. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1257-1263.
- Navarro, F. C.-C. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 29(7), 524-534.
- Nordmann, P. C. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 9(4), 228-236.
- Ordóñez Varela, W. &. (2017). Primer aislamiento de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-1 en el Hospital de San Carlos durante el 2011. *Rev. costarric. salud pública*, 26(1), 69-73.
- Oteo, J. M.-V. (2014). Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 32, 17-23.
- Ovalle, M. V. (2017). Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Biomédica*, 473-485.
- Pasteran, F. V. (2011). A simple test for the detection of KPC and metallo- $\beta$ -lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1438-1441.



- Paton, R. M. (1993). ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, 81-87.
- Poirel, L. H. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 15-22.
- Poirel, L. P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1597-1606.
- Poirel, L. W. (2001). GES-2, a Class A  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2598-2603.
- Pottumarthy, S. M. (2003). NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerging infectious diseases*, .
- Queenan, A. y. ( 2007). Carbapenemasas: las  $\beta$ -lactamasas versátiles . *Revisiones de microbiología clínica* , 20 (3), 440-458.
- Rada, A. M.-G. ( 2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39, 199-220.
- Rasmussen, B. A. (1996). Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae* . *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2080-2086.
- Resurrección-Delgado, C. M.-I.-G.-G.-E.-C.-V. (2017). *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metallo-betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo, Lima, Peru. . *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. , 34, 261-267.
- Reyes-Chacón, J. A.-A.-A.-S.-I.-C.-V. (2017). Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en *Enterobacteriaceae*. *Infectio*, 21(4), 251-254.
- Rojas, L. J. (2013). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1101-1102.
- Sacsquispe-Contreras, R. &.-C. (2018). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35, 259-264.
- Salimraj, R. H. (2018). Crystal structures of VIM-1 complexes explain active site heterogeneity in VIM-class metallo- $\beta$ -lactamases. *The FEBS journal*, 286(1), 169-183.
- Shokri, D. K.-D. (2017). Resistotyping, phenotyping and genotyping of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) among Gram-negative bacilli from Iranian patients. *Journal of medical microbiology*, 66(4), 402-411.
- Suárez, C. J. (2011 ). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. . *Infectio* , 10(2).

- Tafur, J. D. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio* , 12(3), 227-232.
- van Duin, D. &. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*, 8(4), 460-469.
- Van Duin, D. K. (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Review of treatment and outcomes. Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(2), 115-120.
- Velásquez, J. H. (2013). Klebsiella pneumoniae resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Soc Peru Med Interna*, 192-196.
- Vera-Leiva, A. B.-L.-A.-R.-R. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. . *Revista chilena de infectología*, 34.
- Villegas, M. V. (2019). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: A diagnostic, epidemiological and therapeutic challenge. *Infectio*, 23(4), 358-368.
- Walsh, T. R. (2005 ). Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 306-325.
- Watanabe, M. I. (1991 ). Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 147-151.
- Yigit, H. Q.-S. (2008). Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial agents and chemotherapy. Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(2), 809.
- Yong, D. L. (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3798-3801.
- Yong, D. T. (2009). Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12), 5046-5054.
- Zavascki, A. P. (2005). Outbreak of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1148-1151.

## **IX. ANEXOS**

## MATRIZ DE CONSISTENCIA LOGICA

Título:” **Caracterización fenotípica de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* y**

***Escherichia coli* en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima, 2018”**

Problema	Objetivos	Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores
<p><b>Problema general</b></p> <p>¿Cuál es la caracterización fenotípica de carbapenemasas en <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima, 2018?</p>	<p><b>Objetivo General</b></p> <p>Caracterizar fenotípicamente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> productoras de carbapenemasas en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima, 2018.</p>	<p>Caracterización fenotípica de carbapenemasas</p>	<p>Se realiza mediante técnicas diagnósticas para la detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasas</p>	<p><b>Test de Hodge Modificado</b></p>	<p>Positivo: Formación de hendidura en el halo de inhibición de Meropenem.</p> <p>Negativo: Ausencia de hendidura en el halo de inhibición de Meropenem</p>
<p><b>Problemas específicos</b></p> <p>¿Cuáles son los fenotipos de carbapenemasas presentes en <i>Klebsiella</i> en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018?</p> <p>¿Cuáles son los fenotipos de carbapenemasas presentes en <i>Escherichia coli</i> en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018?</p>	<p><b>Objetivos Específicos</b></p> <p>Determinar los fenotipos presentes de carbapenemasas en <i>Klebsiella pneumoniae</i> en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018.</p> <p>Determinar los fenotipos de carbapenemasas presentes en <i>Escherichia coli</i> en pacientes hospitalizados de un hospital de Lima 2018.</p>			<p><b>mCIM (Método modificado de inactivación de carbapenem)</b></p>	<p>Positivo (6-15 mm)</p> <p>Intermedio (16-18 mm)</p> <p>Negativo &gt;19mm)</p>
				<p><b>Método de sinergia de doble disco con ácido borónico</b></p>	<p>Positivo: Presencia de deformidad del halo de inhibición</p> <p>Negativo: Ausencia de deformidad de halo de inhibición</p>
				<p><b>Método de sinergia de doble disco con EDTA</b></p>	<p>Positivo: Presencia de deformidad del halo de inhibición</p> <p>Negativo: Ausencia de deformidad de halo de inhibición</p>

		<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i>	Microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.	<b>Medida del halo</b>	<b>Imipenem</b> sensible $\geq 23$ mm intermedio 20-22mm resistente $\leq 19$ mm  <b>Meropenem</b> sensible $\geq 23$ mm intermedio 20-22mm resistente $\leq 19$ mm