

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y

BIOQUIMICAS

INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE

DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA BLUE CARBA PARA LA DETECCIÓN DE
CARBAPENEMASAS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS

Tesis de Grado para obtener el Título de Especialista

POR: DJANIRA STEPHANIE KRISTELLER ANTEZANA

TUTORA: DRA. RAQUEL CALDERÓN MORALES

LA PAZ – BOLIVIA

Octubre, 2021

Dedicatoria

A mi mamá por todo su apoyo, fortaleza y perseverancia para concluir el trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	9
1.Introducción.....	12
2. Marco teórico	14
2.1. DEFINICIÓN DE ANTIBIÓTICO.....	14
2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.	14
2.2.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular	15
2.2.2. Inhibición de la función de la membrana celular	18
2.2.3. Inhibición de la síntesis de proteínas	18
2.2.4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.....	19
2.3. CARBAPENEMES	20
2.3.1. Mecanismo de acción de los carbapenemes.....	21
2.4. DEFINICIÓN DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	22
2.5. MÉTODOS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN.....	22
2.5.1. Prueba de sensibilidad por difusión con discos	22
2.5.2. Prueba de sensibilidad por difusión en gradiente.....	24
2.6. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DILUCIÓN	25

2.6.1.	Prueba de sensibilidad por dilución en agar.....	25
2.6.2.	Prueba de sensibilidad por macro dilución en caldo.....	25
2.6.3.	Prueba de sensibilidad por micro dilución en caldo.....	26
2.7.	DEFINICIÓN DE RESISTENCIA BACTERIANA.....	26
2.7.1.	Mecanismos de resistencia.....	28
2.7.2.	Vías de adquisición de la resistencia:.....	28
2.8.	RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	29
2.9.	MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARED BACTERIANA.	29
2.9.1.	Mecanismos de resistencia a betalactámicos	29
2.10.	CARBAPENEMASAS.	34
2.10.1.	Tipos de carbapenemasas.....	34
2.11.	EPIDEMIOLOGIA DE CARBAPENEMASAS.....	37
2.12.	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	40
2.12.1.	Carba NP.....	41
2.12.2.	Blue-Carba	42
2.12.3.	CarbAcineto NP	44
2.12.4.	Test de Hodge Modificado.....	45
2.12.5.	Detección de carbapenemasas con métodos proteómicos.....	46
2.13.	AZUL DE BROMOTIMOL.....	46
3.	Antecedentes	50
4.	Planteamiento del problema	57

5.	Justificación.....	59
6.	Pregunta de investigación	62
7.	Hipótesis.....	62
8.	Objetivos	62
8.1.	OBJETIVO GENERAL:.....	62
8.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	63
9.	Diseño metodológico	63
9.1.	DISEÑO DE ESTUDIO O TIPO DE ESTUDIO	63
9.2.	SITIO DEL ESTUDIO	64
10.	Muestra.....	64
10.1.	TAMAÑO DE MUESTRA	64
10.2.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	70
10.3.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	70
10.4.	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	71
11.	Descripción de las Técnicas y Procedimientos más Importantes.....	71
11.1.	PREPARACIÓN DE REACTIVOS	71
	11.1.1.Reactivos de la técnica Blue Carba.....	72
11.2.	CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS POR EL MÉTODO DE APROXIMACIÓN DE DISCOS:	73
11.3.	PROCEDIMIENTO BLUE CARBA:	76
11.4.	PROCEDIMIENTO HODGE MODIFICADO	81
12.	Análisis Estadístico	85
13.	Aspectos Bioéticos.....	85
14.	Resultados	85

14.1.	DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS AISLADOS:.....	86
14.2.	DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS CON CARBAPENEMASAS IDENTIFICADOS POR EL MÉTODO DE HOSGE MODIFICADO.....	88
14.3.	ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTOS DE LA TÉCNICA BLUE CARBA TOMANDO EN CUENTA LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS PARA LA CIUDAD DE LA PAZ, BOLIVIA:.....	91
14.4.	COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE BLUE CARBA EN RELACIÓN A LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE HODGE MODIFICADO:.....	93
14.5.	CÁLCULO DE SENSIBILIDAD	100
14.6.	CÁLCULO DE ESPECIFICIDAD:	103
14.7.	CÁLCULO DEL VALOR PREDICTIVO POSITIVO:	105
14.8.	CÁLCULO DEL VALOR PREDICTIVO NEGATIVO:	106
14.9.	CÁLCULO DE LA PRECISIÓN:	107
15.	Discusión.....	109
16.	Conclusiones	115
17.	Recomendaciones.....	117
18.	Anexos	125

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Componentes del peptidoglucano.....	16
Ilustración 2 Síntesis del Peptidoglucano.....	17
Ilustración 3 Método de Kirby Bauer.....	23
Ilustración 4 E test.....	24
Ilustración 5 Esquema de la Serin Betalactamasa.....	33
Ilustración 6 Esquema de Clasificación de Carbapenemasas.....	36
Ilustración 7 Prevalencia de Carbapenemasas en Europa.....	38
Ilustración 8 Interpretación de Resultados Blue Carba.....	43
Ilustración 9 Test de Hodge Modificado.....	45
Ilustración 10 Rango de colores de pH Azul de Bromotimol.....	48
Ilustración 11 Prevalencia de KPC en Europa.....	51
Ilustración 12 Técnica de Aproximación de discos.....	75
Ilustración 13 Metalobetalactamasa.....	77
Ilustración 14 Carbapenemasa Tipo KPC.....	78
Ilustración 15 Resultado Positivo y Negativo.....	80
Ilustración 16 Tubos inoculados con las cepas en estudio.....	81
Ilustración 17 Test de Hodge Modificado.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Frecuencia de Microorganismos aislados en el estudio	87
Tabla 2 Frecuencia de microorganismos con carbapenemasas identificados por la técnica de Hodge Modificado	89
Tabla 3 Tabla Cruzada Blue Carba vs Test de Hodge Modificado	95
Tabla 4 Chi Cuadrado.....	97
Tabla 5 Resumen de valores obtenidos	109

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Técnica de aproximación de discos.....	74
Gráfico 2 Esquema de Procedimientos	84
Gráfico 3 Frecuencia en porcentaje de microorganismos aislados en el estudio	88
Gráfico 4 Frecuencia en porcentaje de microorganismos con carbapenemasas identificados por la técnica de Hodge Modificado	90
Gráfico 5 Nivel de Significancia	98
Gráfico 6 Chi Cuadrado	99

RESUMEN

En los últimos años se ha desarrollado un grupo de bacterias que contienen una enzima denominada carbapenemasa, la cual le da a la bacteria resistencia a los carbapenémicos como ser el imipenem, siendo estos antibióticos la última opción en esquema de tratamiento convirtiéndose en un potencial problema de salud.

Es por eso, que el presente estudio tiene como objetivo validar la Técnica de Blue Carba para la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos en la ciudad de La Paz, Bolivia en el laboratorio de Bacteriología y Micología del Instituto SELADIS, considerando la gran importancia que tiene la detección de carbapenemasas en el menor tiempo posible, se ha realizado este estudio comparando los resultados obtenidos con un Gold estándar, Test de Hodge Modificado.

La presente investigación es de tipo descriptivo- experimental, realizado por muestreo simple aleatorio estratificado para muestras finitas con un total de 33 cepas bacterianas de bacilos gram negativos. Como técnica principal se utilizó la herramienta estadística de chi cuadrado la cual explica la relación entre dos variables (Test de Hodge Modificado y Técnica de Blue Carba).

El valor obtenido de Chi cuadrado fue de 28,463 a un nivel de significancia de 95% con un error del 5% comparando con el valor de chi cuadrado tabulado se concluyó que

existe relación o similitud entre los resultados obtenidos por la técnica de Hodge Modificado y el Test de Blue Carba, por tanto, esta técnica detecta la enzima carbapenemasa.

Posteriormente, se calculó los valores de sensibilidad y especificidad para esta técnica los cuales fueron de 90% y 100% respectivamente. Verificando que la técnica es buena para la detección de carbapenemasas. Además, se elaboró el protocolo de procedimiento de la Técnica de Blue Carba para la ciudad de La Paz.

Palabras clave: Carbapenemasas, Hodge Modificado, Blue Carba.

ABSTRACT

In recent years, a group of bacteria has developed that contain an enzyme called carbapenemase. Which gives the bacteria resistance to carbapenems such as imipenem, these antibiotics being the last option in the treatment scheme, becoming a potential health problem.

That is why the present study aims to validate the Blue Carba Technique for the detection of carbapenemases in large negative bacilli in the city of La Paz, Bolivia in the Bacteriology and Mycology laboratory of the SELADIS Institute, Considering the great importance of the detection of carbapenemases in the shortest possible time, this study has been carried out comparing the results obtained with a standard Gold, Modified Hodge Test.

The present investigation is descriptive-experimental, carried out by simple stratified random sampling for finite samples with a total of 33 bacterial strains of gram negative bacilli. The main technique used was the statistical tool of chi square which explains the relationship between two variables (Modified Hodge Test and Blue Carba Technique).

The Chi-square value obtained was 28.463 at a significance level of 95% with an error of 5%. Comparing with the tabulated chi-square value, it was concluded that there is a relationship or similarity between the results obtained by the Modified Hodge technique and the Therefore, this Blue Carba test detects the enzyme carbapenemase.

Subsequently, the sensitivity and specificity values for this technique were calculated, which were 90% and 100% respectively. Verifying that the technique is good for the detection of carbapenemases. In addition, the procedure protocol for the Blue Carba Technique for the city of La Paz was developed.

Keywords: Carbapenemases, Modified Hodge, Blue Carba.

1. Introducción

El descubrimiento de sustancias químicas capaces de eliminar microorganismos infecciosos como lo son las bacterias ha sido la respuesta a tantas muertes ocasionadas por estos microorganismos, es por ello que las grandes industrias farmacéuticas, los investigadores han ido desarrollando nuevas moléculas con el transcurso de los años. Sin embargo, no fueron los únicos que desarrollaron, sino estas bacterias fueron adquiriendo mecanismos de resistencia a estas moléculas llamadas antibióticos para poder sobrevivir.

Es así como cada vez se ha ido incrementando los mecanismos de resistencia a los antibióticos y estos han quedado obsoletos. Por tanto, se tenía que sintetizar nuevas moléculas para contrarrestar este efecto además de identificar estos mecanismos de resistencia para que los pacientes puedan tener nuevas opciones de tratamiento que sean eficaces para la infección que cursan.

Se desarrollaron protocolos para identificar estos mecanismos de resistencia y de esta manera proporcionar al médico un esquema de tratamiento. Sin embargo, las bacterias han evolucionado mucho más rápido que los investigadores con los protocolos y es así que se desarrolló un grupo de bacterias que contienen una enzima denominada carbapenemasa la cual le da a la bacteria resistencia a los carbapenémicos como ser el imipenem, siendo estos antibióticos la última opción en esquema de tratamiento.

Si bien existen técnicas fenotípicas, moleculares y colorimétricas para la detección de este grupo de bacterias no han sido validadas en nuestro medio a excepción de las fenotípicas. Es por ello que al realizar la validación de la técnica blue carba para la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos podemos facilitar la detección de estos microorganismos en un tiempo mucho más corto, con una técnica sencilla y reactivos de fácil adquisición.

Esta técnica permite principalmente detectar las carbapenemasas de tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) que son las más comunes en este tipo de mecanismo, sin embargo, también detecta otro tipo de carbapenemasas como ser metalobetalactamasas (MBL) entre otras, en un tiempo máximo de 2 horas pudiendo adelantar el resultado al médico y este actuar mucho más rápido y así poder colaborar en el tratamiento y recuperación del paciente.

2. Marco teórico

2.1. Definición de Antibiótico

Los antibióticos son medicamentos cuya función principal es la inhibición del desarrollo de bacterias utilizando diferentes mecanismos para lograr su propósito y así prevenir y tratar infecciones bacterianas. (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 2017).

Por tanto, según Procop y cols (2018) un antibiótico es un compuesto derivado de la naturaleza o bien que se ha sintetizado químicamente, que actúa sobre las bacterias inhibiendo las funciones bioquímicas normales.

2.2. Clasificación de los Antibióticos.

Los antibióticos se clasifican de acuerdo a varios criterios siendo el más importante su mecanismo de acción: por toxicidad selectiva, por inhibición de la síntesis y la función de la membrana celular. (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018). Además, enfatiza también que un antibiótico al igual que cualquier otro medicamento debe cumplir el requisito de tener toxicidad selectiva, es decir, que no debe dañar a la célula humana.

2.2.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular

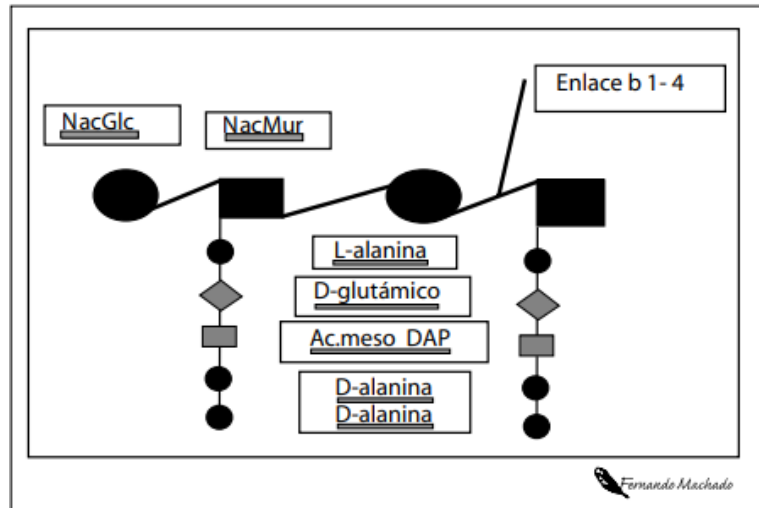
Las bacterias en su estructura poseen una capa externa rígida, llamada pared celular. Esta conserva el tamaño y la forma del microorganismo cuya presión osmótica es elevada. Cuando la pared celular se lesiona o su formación se inhibe la célula se lisa y en consecuencia muere.

Según (Vignoli, 2016) la pared celular contiene un polímero complejo y distinto desde el punto de vista químico que es un mucopéptido (peptidoglucano) que consta de polisacáridos y un polipéptido con numerosos enlaces cruzados. Los polisacáridos normalmente contienen los aminoglucósidos N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico. Este último se encuentra exclusivamente en las bacterias. Los aminoácidos se unen a cadenas peptídicas cortas.

La pared celular es la característica de las bacterias y por tanto su composición es lo que las diferencia en dos grandes grupos las bacterias gram negativas y las bacterias gram positivas, esto va a depender de la capa de peptidoglucano que es mucho más gruesa en la pared celular de los microorganismos grampositivos que en la de los gramnegativos. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016, pág. 371)

Ilustración 1 Componentes del peptidoglucano

Figura 1. Esquema de los Componentes del Peptidoglucan



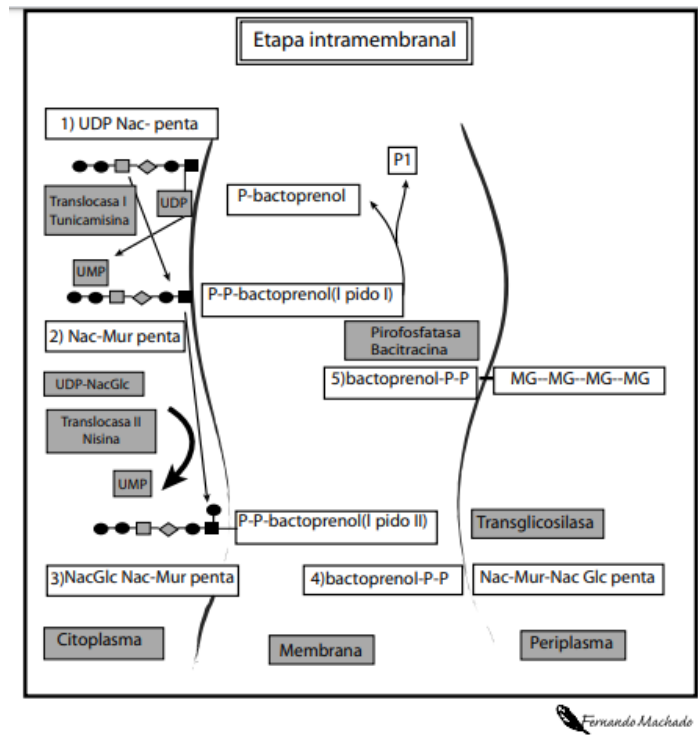
Fuente: (Vignoli R. 2016, Esquema de los componentes del peptidoglucano, principales mecanismos de resistencia antibiótica.)

En el mecanismo de inhibición de la síntesis de la pared celular el paso inicial consiste en enlazar el fármaco a los receptores celulares, proteínas de unión a la penicilina (PBP) éstas se encuentran bajo regulación cromosómica y las mutaciones alteran su número o su afinidad por los betalactámicos. (Vignoli, 2016)

Como segundo paso se inhibe la reacción de transpeptidación y se impide la síntesis del peptidoglucano, el siguiente paso comprende la eliminación o la inactivación de un inhibidor de las enzimas autolíticas en la pared celular, de esta manera se activa la enzima

lítica, con lo cual empieza la lisis siempre y cuando el ambiente sea isotónico. (Vignoli, 2016)

Ilustración 2 Síntesis del Peptidoglucano



Fuente: (Vignoli R. 2016, Esquema de los componentes del peptidoglucano, principales mecanismos de resistencia antibiótica.)

2.2.2. Inhibición de la función de la membrana celular

Según Carrol y cols (2016) el citoplasma de las células vivas está limitado por la membrana citoplasmática, la cual sirve como barrera selectiva de permeabilidad, lleva a cabo funciones de transporte activo y por tanto regula la composición interna de la célula, cuando se altera la integridad funcional de dicha membrana, las macromoléculas y los iones salen de la célula y esta se daña o muere.

2.2.3. Inhibición de la síntesis de proteínas

El primer paso es la unión del aminoglucósido a una proteína receptora específica en la subunidad 30S del ribosoma microbiano, en segundo lugar, el aminoglucósido bloquea la actividad normal del complejo de iniciación para la formación del péptido mRNA+formilmetionina+tRNA, en tercer lugar, el mensaje del mRNA se lee mal en la región de reconocimiento del ribosoma. De esa forma se inserta el aminoácido incorrecto en el péptido, lo cual origina la formación de una proteína no funcional. En cuarto lugar, la unión del aminoglucósido produce la desintegración de los

polisomas¹ y su separación con formación de monosomas que no pueden llevar a cabo la síntesis de proteínas`. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016, pág. 374)

2.2.4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Para la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos se bloquea la girasa de DNA topoisomerasa que interviene de forma decisiva en la réplica y reparación de DNA (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018). Para muchos microorganismos el ácido p-aminobenzoico (PABA) es un metabolito indispensable, el modo específico de acción del PABA comprende una condensación sujeta al trifosfato de adenosina (ATP) de una pteridina con un PABA para obtener ácido dihidropterico, que posteriormente es convertido en ácido fólico. El PABA participa en la síntesis de ácido fólico, precursor importante para la síntesis de ácidos nucleicos.

¹ Un polisoma o polirribosoma es un conjunto de ribosomas asociados a una molécula de ARN para realizar la traducción simultánea de una misma proteína.

Las sulfonamidas pueden entrar en la reacción en lugar del PABA y competir por el centro activo de la enzima. Como resultado se forman análogos no funcionales del ácido fólico, lo que impide aún más la proliferación de la célula bacteriana. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016, pág. 375).

2.3. Carbapenemes

El grupo de antibióticos denominado carbapenémicos son derivados del grupo de los betalactámicos con la diferencia de que su espectro, actividad y resistencia a las betalactamasas es mayor y están dirigidos a pacientes cuyos aislamientos han presentado multiresistencia y no hay otra opción terapéutica. (Fresnadillo, García , García Sánchez, 2010).

Según Fresnadillo y cols (2010) estos antibióticos tienen una estructura molecular pequeña que les permite ingresar fácilmente al espacio periplásmico de los bacilos gram negativos, pasando a través de las porinas cual si fuesen nutrientes esenciales. Esta capacidad de ingreso añadida a la alta fijación a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) y la estabilidad frente a las betalactamasas, les confiere su amplio espectro antimicrobiano.

2.3.1. Mecanismo de acción de los carbapenemes

El mecanismo de acción de los carbapenémicos al igual que los demás β -lactámicos muestran una elevada afinidad por las diferentes enzimas que participan en el ensamblaje del peptidoglucano, es decir, las PBPs. (Monge, 2014). Se conoce que en bacterias Gram negativas los carbapenémicos muestran una elevada afinidad por PBPs de alto peso molecular y la diferencia de esta afinidad es lo que determina la capacidad antimicrobiana de cada carbapenémico. Una vez en el sitio son capaces de inhibir la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, ya que al unirse a residuos de serina que forman parte de las PBPs impiden que la pared bacteriana se ensamble adecuadamente dando como resultado el debilitamiento de ésta y en última instancia la lisis de la célula bacteriana. (Monge, 2014).

2.4. Definición de Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Las pruebas de sensibilidad tienen como objetivo conocer si los microorganismos ensayados son sensibles o resistentes a los antimicrobianos y sirven para elegir de forma óptima el tratamiento antimicrobiano. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016). Existen diferentes métodos entre los cuales están:

2.5. Métodos de sensibilidad por difusión

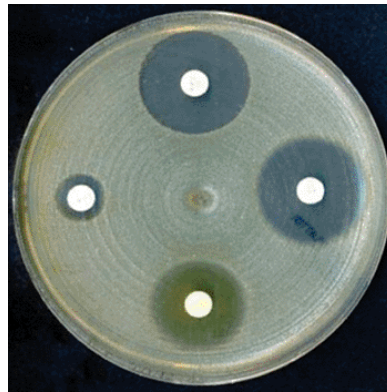
2.5.1. Prueba de sensibilidad por difusión con discos

Este método es aun ampliamente utilizado debido a su facilidad de empleo y aún menor costo en comparación con los otros métodos. En este método se compara el diámetro del halo de inhibición del antibiótico con los valores de CIM de la misma cepa² para predecir la categoría de sensibilidad. Las pruebas de difusión con discos deben realizarse estrictamente de acuerdo con los métodos estándar descritos por el instituto de estándares para el laboratorio clínico (CLSI). (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016)

² Es una población de microorganismos de una sola especie descendientes de una única célula o que provienen de una determinada muestra en particular.

En este método se utilizan discos de antibióticos impregnados en papel filtro, lo que permite su difusión a través del agar que en este caso se utiliza el agar Muller Hinton. Una vez inoculado la cepa en estudio se colocan los discos correspondientes y al cabo de 24hrs se mide el halo de inhibición, pudiendo clasificar a la cepa estudiada como resistente, intermedia o sensible. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016) (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018, pág. 1107)

Ilustración 3 Método de Kirby Bauer



Fuente: (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick,
2016)

2.5.2. Prueba de sensibilidad por difusión en gradiente

La prueba de sensibilidad por difusión en gradiente o prueba de epsilómetro (Etest), consiste en tiras impregnadas con antibióticos que se colocan sobre la superficie de agar y aprovechan los mismos principios que la prueba de difusión en disco, pero los valores de CIM se generan aplicando un gradiente del antibiótico a evaluar a lo largo de la tira. (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018, pág. 1111)

Ilustración 4 E test



Fuente: (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018)

La interpretación del E test según (RedLabRa, 2021) es de la siguiente manera:

Positivo: El valor de la ratio de CMI Imipenem/CMI Imipenem+EDTA ≥ 8 o ≥ 3 diluciones dobles. Presencia de una zona “fantasma” entre las dos secciones de gradientes o deformación de la elipse de Imipenem independientemente de la ratio.

Negativo: El valor de la ratio de CMI Imipenem/CMI Imipenem+EDTA < 8 o de deformación de la elipse del imipenem.

No interpretable: Valores de CMI de Imipenem $< 4\text{mg/L}$ o imipenem+EDTA $> 64\text{mg/L}$.

2.6. Prueba de sensibilidad por dilución

2.6.1. Prueba de sensibilidad por dilución en agar

El procedimiento de dilución en agar es el método de referencia para la prueba utilizando medio sólido. Se caracteriza por que se inocula una suspensión estandarizada de bacterias sobre una serie de placas de agar, cada una de las cuales contiene una concentración diferente de antibiótico que abarca el intervalo terapéutico para un antibiótico determinado. (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018, pág. 1111).

2.6.2. Prueba de sensibilidad por macro dilución en caldo

La prueba de sensibilidad por macro dilución en caldo se lleva a cabo realizando las diluciones derivadas del antibiótico primero en medio líquido y después de que se añade una suspensión bacteriana estandarizada, las cantidades de antibiótico se diluyen en serie en nueve de estos tubos desde una concentración alta de 100ug/ml hasta 0,4 ug/ml una vez finalizado el periodo de incubación los tubos se examinan visualmente para determinar la turbidez, ésta indica que el crecimiento bacteriano no ha sido inhibido por la concentración de antibiótico contenido en el medio. (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018, pág. 1113).

2.6.3. Prueba de sensibilidad por micro dilución en caldo

El funcionamiento del procedimiento de dilución de micro caldo es similar en principio, al método de macro caldo excepto que la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos se determina en una serie de pocillos en microtubos que se moldean en una placa de plástico. (Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger, 2018, pág. 1115).

2.7. Definición de resistencia bacteriana

La resistencia a los antimicrobianos (farmacorresistencia) se produce cuando los microorganismos ya no responden a ciertos antibióticos o dicho de otra manera los antibióticos pierden su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano lo que conlleva a una falla terapéutica. (Serra, 2017).

Según (Serra, 2017) la resistencia se produce cuando ocurren mutaciones en las bacterias en respuesta al uso continuado de estos fármacos esto hace que se incrementen los costos médicos, se prolonguen las estancias hospitalarias y aumente la mortalidad como está sucediendo en los últimos años.

En un comunicado de prensa del 27 de febrero de 2017, en Ginebra, y difundido mundialmente, la OMS publica las problemáticas más serias con respecto a las reacciones adversas a los medicamentos (RAM), según reportes e investigaciones de diferentes países analizados por expertos de la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tübingen (Alemania). El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia*, y *Proteus*. (Serra, 2017).

2.7.1. Mecanismos de resistencia.

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos³, a través de mecanismos como:

- ✓ Transformación
- ✓ Transducción
- ✓ Transposición
- ✓ Conjugación

2.7.2. Vías de adquisición de la resistencia:

- ✓ Mutaciones en el cromosoma que pueden ser espontáneas, estables y de transmisión vertical de generación en generación.
- ✓ Intercambio de genes de resistencia por transferencia horizontal a través de diferentes procesos que pueden ser conjugación, traducción, transformación. (Quiñones, 2017).

³ Los fagos son virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción

2.8. Resistencia a los antibióticos

Hay numerosos mecanismos a través de los cuales los microorganismos adquieren resistencia contra los fármacos dentro de los más importantes tenemos la producción de enzimas que destruyen al fármaco, cambio en la permeabilidad del fármaco, forman un sitio de acción estructural modificado para el fármaco o forman una vía metabólica modificada. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016, pág. 376).

2.9. Mecanismos de resistencia a los antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana.

2.9.1. Mecanismos de resistencia a betalactámicos

Este mecanismo de resistencia es uno de los más importantes debido a que existen numerosos antibióticos que forman parte de este grupo el cual se ve afectado por dicho mecanismo. Por tanto, su identificación significa para el paciente y para el médico el cambio de esquema terapéutico de uno que podríamos llamar convencional a uno más agresivo.

Según Procops y cols (2018) y Vignoli (2016) hay tres formas de que se de este mecanismo las cuales son: los trastornos de permeabilidad que corresponden fundamentalmente con la disminución de la expresión de porinas⁴, no es un mecanismo que por sí mismo promueva altos niveles de resistencia, pero puede ser muy importante en conjunción con distintos tipos de betalactamasas. La modificación del sitio blanco de acción de los betalactámicos son las diferentes PBP. La expresión de un gen alternativo, que codifique una PBP básicamente distinta a la existente.

La formación de genes mosaico, por incorporación de fragmentos de material genético de otro microorganismo es generado por transformación y recombinación homóloga, genera genes en parches, cuya secuencia queda constituida en parte por la información preexistente, y en parte por la recientemente adquirida. La hidrólisis enzimática implica la inactivación de los betalactámicos como consecuencia de la acción de enzimas que reciben el nombre de betalactamasas, y es el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos``. (Vignoli, 2016, pág. 655).

⁴ Las porinas son proteínas que funcionan como poros a través de los cuales las moléculas se pueden difundir.

2.9.1.1. Clasificación de las betalactamasas

Basándose en datos de secuencia parcial del ADN de las betalactamasas, Ambler en 1980 propone clasificarlas en cuatro clases: A, B, C y D. Las enzimas de clase A, cuyo prototipo es la enzima TEM-1, están codificadas en plásmidos y su peso molecular oscila entre 25 y 30 kilodaltons (kD) (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016).

Las enzimas de clase B tienen una característica que es que requieren zinc para su actividad y son consideradas por ello metalobetalactamasas (MLB). En general son plasmídicas, inhibibles por ácido etilendiaminotetracético (EDTA), incluyéndose aquí las enzimas que confieren resistencia a los carbapenemes. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016).

Las enzimas de clase C, están generalmente codificadas en el cromosoma bacteriano y son típicamente inducibles por betalactámicos. Se trata de proteínas que presentan unos 100 aminoácidos más que la de los otros grupos. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016).

Las enzimas de clase D constituyen un grupo reducido de enzimas plasmídicas, con actividad incrementada sobre oxacilina (OXA-1), inhibibles por iones cloruros y de forma variable por inhibidores del tipo

ácido clavulánico o sulbactam. (Carrol, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick, 2016)

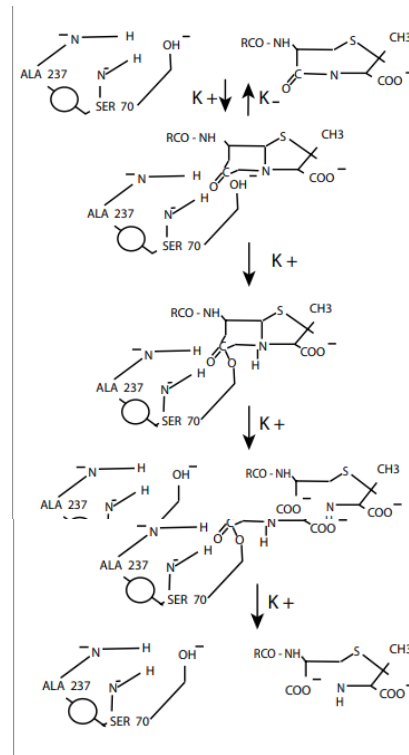
En 1995 Bush, Jacob y Medeiros proponen una clasificación funcional para las betalactamasas. Esta se basa en el peso molecular de la enzima, su punto isoeléctrico (pI), el perfil de sustrato y la propiedad de ser inhibidas por la presencia de ácido clavulánico o EDTA. En base a este esquema surgen cuatro grupos funcionales que se correlacionan bien con la clasificación de Ambler, denominándose: 1, 2, 3 y 4. Las del grupo 1 corresponden a enzimas con acción cefalosporinasa, no inhibibles ni por ácido clavulánico ni por EDTA, y que se correlacionan con las enzimas cromosómicas de bacilos gramnegativos de tipo adenosin monofosfato cíclico (AmpC). (Vignoli, 2016, pág. 656).

Las del grupo 2 están constituidas por penicilinasas y cefalosporinasas inhibibles por ácido clavulánico, y coinciden mayoritariamente con el tipo A de Ambler. Las del grupo 3 son inhibibles por EDTA, pero no por ácido clavulánico, se corresponden con las metaloenzimas de tipo B. Por último, un grupo poco importante no descrito por Ambler, las del grupo 4, que incluye penicilinasas no inhibibles por ácido clavulánico encontradas en *Pseudomonas cepacia*. (Vignoli, 2016, pág. 656).

Lo que ocurre con las betalactamasas es que el antibiótico ingresa al sitio activo y se producen muchas interacciones químicas, por ejemplo,

en las serin betalactamasas, el oxígeno con carga negativa del grupo carbonilo de los betalactámicos es atacado por los grupos amino (de carga positiva) de la serina 70 y una alanina que se encuentra próxima. Se forma así mediante un enlace covalente irreversible, un complejo acilpenicilina (acilación). Esto produce la ruptura del grupo amida del anillo betalactámico. (Vignoli, 2016)

Ilustración 5 Esquema de la Serin Betalactamasa



Fuente: (Vignoli R. 2016, esquematización de funcionamiento de las serin betalactamasas)

2.10. Carbapenemasas.

Según (Viña, 2016) Las carbapenemasas tienen la capacidad de hidrolizar tanto a los carbapenémicos como a otros β -lactámicos. Además, presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas. Las carbapenemasas han sido principalmente aisladas en la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

2.10.1. Tipos de carbapenemasas

Las carbapenemasas se clasifican en:

2.10.1.1. Serin carbapenemasas:

Las serin carbapenemasas clase A hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Su actividad hidrolítica depende del sustrato sobre el que actúan. (Monge, 2014)

- ``Clase A: Encontramos cinco grupos según su filogenia⁵: *Serratia marccenscens* (SME), not metallo enzyme carbapenemase (NMC) e imipenem-hydrolyzing

⁵ La filogenia es la relación de parentesco entre especies o taxones en general.

β -lactamase (IMI) que están codificadas en cromosomas y genes desconocidos (GES) y KPC que están codificadas en plásmidos. (Garia, 2018)

2.10.1.2. Oxacilinasas:

Las carbapenemasas llamadas oxacilinasas se ubican dentro del grupo 2df de Bush (clase D de Ambler) y se caracterizan por su capacidad de hidrolizar cloxacilina y oxacilina, carbapenémicos, no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam (a excepción de OXA 27) y en general son inhibidas por el ácido clavulánico (menos OXA 23 que es resistente). (Monge, 2014). La mayoría de OXA se encuentran en cepas de *Acinetobacter spp.* (Garia, 2018)

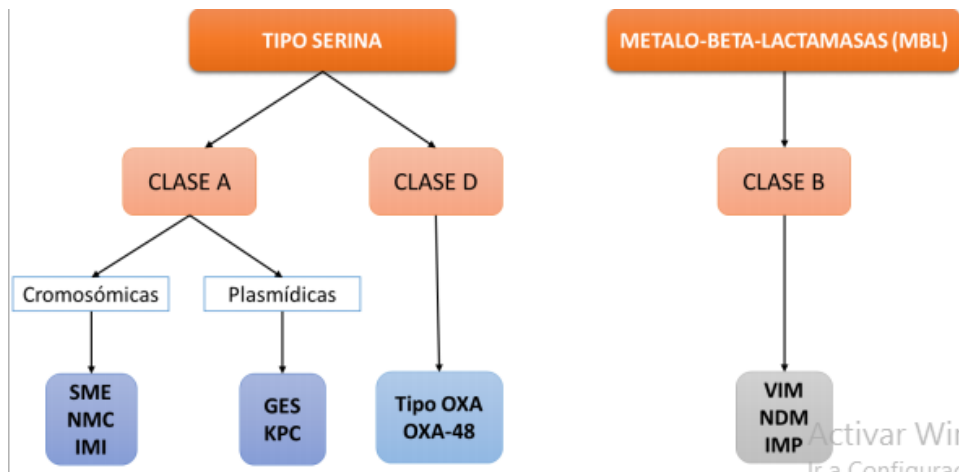
2.10.1.3. Metalobetalactamasas (MBL):

Son enzimas que típicamente hidrolizan todos los β -lactámicos excepto monobactámicos y son inhibidas por quelantes de iones metálicos tales como EDTA, ácido dipicolínico o 1,10- σ -phenantrolina, pertenecen

al grupo B de Ambler y 3a y 3b en la clasificación de Bush. (Monge, 2014)

Según (Garia, 2018) 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. Encontramos varios tipos, entre los que destacan Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM), NDM e IMP.

Ilustración 6 Esquema de Clasificación de Carbapenemasas



Fuente: (Garia, 2018) Tipos de Carbapenemasas

2.11. Epidemiología de carbapenemasas

Durante la primera década del siglo XXI se produjo una diseminación rápida y extensa de *K. pneumoniae* productora de KPC en la zona noreste de EEUU. Aunque el primer miembro de la familia KPC fue descubierto en *K. pneumoniae* en el Norte de Carolina en 1996, la variante KPC-2 se extendió a lo largo de la costa este de EEUU y en el 2004, fue detectada en Nueva York. (Viña, 2016).

En el 2005, en Francia se detectó una cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC-2 aislada de un paciente que había estado en Nueva York. Con el tiempo se han ido aislando *K. pneumoniae* productora de KPC en diversos países como en Israel, China, Grecia y América Latina. (Viña, 2016). En marzo del 2014 la Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS) subraya la importancia de reforzar la vigilancia y establecer estrategias de control para prevenir la diseminación de microorganismos con mecanismos de resistencia tipo “New Delhi metalobetalactamasa” (NDM). (Acosta, 2016).

La primera enterobacteria productora de VIM fue *K. pneumoniae* y se detectó por primera vez en los años 2001-2003 en los países del sur de Europa y fue introducida más tarde al norte de Europa y a EEUU. (Viña, 2016). *K. pneumoniae* productora de KPC-1 fue detectada por primera vez en 2001 y desde entonces se lo ha reportado en varios países incluyendo América del Sur. (Gomez, Perezoso, Bermudez, Morales, 2015).

En Brasil, la primera detección de KPC-2 fue en 2006, en el 2007, Tato et al. describieron el primer brote de VIM-1 en España. Los aislados pertenecían a distintas especies de enterobacterias, incluyendo *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli* y *K. oxytoca*. Los análisis clonales revelaron que los aislados de *K. pneumoniae* pertenecían al mismo clon mientras que los aislados de *E. cloacae* pertenecían a distintos clones. En los años siguientes, se fueron describiendo distintos brotes de enterobacterias productoras de VIM-1 en distintos hospitales españoles. También se han descrito otras MBL, como IMP-8, IMP-22, IMP-28 y en el 2011 se comunicó la primera NDM-1 en España, en un *E. coli* aislado de un portador español que viajó a la India. (Gomez, Perezoso, Bermudez, Morales, 2015).

Ilustración 7 Prevalencia de Carbapenemasas en Europa

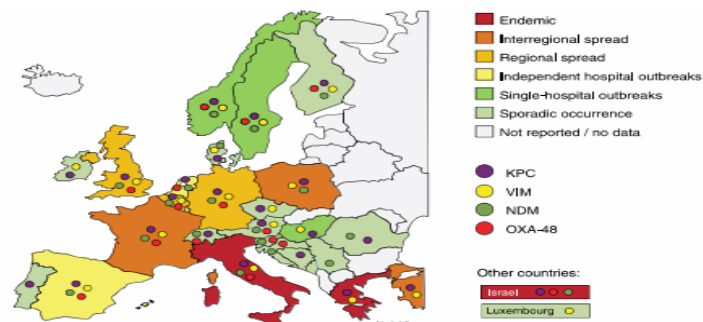


Figura 4. Distribución de las carbapenemasas más prevalentes y el nivel de expansión en los países europeos ³².

Activar Windows
Ir a Configuración de Windows.

Fuente: (Viña, 2016) Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas

En el 2008, se caracterizó una nueva MBL, la NDM-1, aislada en una *K. pneumoniae* en la India. A partir de entonces, en el subcontinente indio existe una elevada prevalencia de *K. pneumoniae* productora de NDM. La reciente diseminación de la carbapenemasa NDM a numerosos países europeos, así como a América del Norte, Australia, Japón está atribuida a pacientes relacionados con la India, Pakistán y Bangladesh. (Viña, 2016).

En el 2010, se describieron enterobacterias productoras de KPC en 2 hospitales de Madrid: 3 aislados de *C. freundii* productores de KPC-2 y varios aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC-3 pertenecientes a 2 clones no relacionados. (Viña, 2016).

Según De sanctis y cols (2018) la emergencia de β -lactamasas que hidrolizan carbapenémicos ha traído como consecuencia la aparición de bacilos gramnegativos multi-resistentes. Dentro de ellos, el grupo denominado *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas (KPC) es el de mayor relevancia clínica dentro de la clase A de carbapenemasas y sus múltiples variantes enzimáticas pueden ser transmitidas a diferentes especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp*, *Serratia spp* y *Enterobacter spp*.

2.12. Métodos de diagnóstico

Los métodos más utilizados para detección de carbapenemasas están basados en métodos fenotípicos siendo el Gold estándar el método de Kirby Bauer descrito anteriormente, basado principalmente en la difusión del antibiótico en un medio de agar, en el cual se mide el halo de inhibición principalmente del imipenem para determinar si es resistente o sensible. De la misma manera se colocan otros discos como el EDTA, Ac. Borónico y el Meropenem para determinar si es carbapenemasa o no. (Muñoz, Zumarán, González., 2017).

Dicho de otra manera, estas enzimas pueden ser identificadas por test fenotípicos basados principalmente en la acción de agentes quelantes como el etilendiaminotetracético (EDTA), el ácido dipicolínico (DPA) o derivados del ácido succínico, capaces de interaccionar con el zinc necesario para la acción catalítica de dichas enzimas. (Molin, 2016).

Los métodos basados en la inhibición por ácido borónico se utilizan para la detección de carbapenemasas de la clase A. y combinando el ácido borónico y la cloxacilina se consigue diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas clase A de las cepas productoras de AmpC. (Acosta, 2016).

Los métodos espectrofotométricos están basados en la medida de la hidrólisis del imipenem con una longitud de onda de 297 nanómetros (nm) con un extracto que contiene carbapenemasas obtenido después de 18 horas

de un caldo de cultivo. Con este método se puede diferenciar las cepas productoras de carbapenemasas de las cepas resistentes por otros mecanismos distintos. Últimamente se ha propuesto el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF para la detección de la actividad carbapenemasa, basada en el análisis del espectro de degradación de una molécula de un carbapenémico. (Acosta, 2016).

Actualmente, la detección de carbapenemasas es compleja y su confirmación requiere al menos dos días por los métodos convencionales. Además, el surgimiento de varios test, tanto fenotípicos como genotípicos, dificulta la decisión de cuál es el mejor método. Según (Molin, 2016) se han descrito al menos tres test fenotípicos basados en la hidrólisis del anillo β -lactámico del carbapenémico.

Tsakris et al. utilizan una nueva prueba fenotípica, la prueba de disco OXA-48, que está basada en un disco de imipenem y dos discos en blanco adyacentes al mismo, cargados con la cepa a testar e impregnados con EDTA Y EDTA más ácido fenilborónico (PBA), respectivamente. La prueba tiene una sensibilidad de 96% y una especificidad de 97%. (Mediavilla Concepción, Saínez Rodríguez Rocio, Valverde Miriam, De toro Inmaculada, Bermudez Pilar, Palop Begoña, 2017).

2.12.1. Carba NP

El test carba NP (CNPt) es una prueba bioquímica de detección rápida de producción de carbapenemasas en bacilos gramnegativos. Está basado en la

hidratos del imipenem por un lisado bacteriano, lo que es detectado por un cambio de pH, utilizando como indicador el rojo de fenol, que vira de rojo a naranja/amarillo, este test ha demostrado ser altamente sensible para la detección de carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) y metalobetalactamasas (MLB). (Sakurada, 2016).

2.12.2. Blue-Carba

La técnica de Blue Carba está basada fundamentalmente en la hidrólisis del imipenem, el cual está a una concentración determinada la cual es de 6 mg, esta hidrólisis es dada por un lisado bacteriano, lo que es detectado visualmente por un cambio de pH, utilizando como indicador el azul de bromotimol, el cual vira de un color verde a un azul o amarillo dependiendo en que pH se encuentra. (Sakurada, 2016).

Ilustración 8 Interpretación de Resultados Blue Carba

Color pocillo/ tubo de reacción con imipenem	Interpretación	Criterio N°
Amarillo	Carbapenemasa positivo	I
Verde	Carbapenemasa positivo	II
Amarillo	Carbapenemasa positivo	III
Azul	Carbapenemasa negativo	IV
Verde	Carbapenemasa negativo	V
Azul o Verde o Amarillo	Test inválido	VI

Fuente: Interpretación de resultados Blue carba Dr. Carlos Malbrán

De la misma manera existen kits comerciales para realizar la detección de carbapenemasas basadas en el mismo principio de la técnica de Blue Carba, por ejemplo, está el Blue Carba Disk de la marca Britania el cual da un resultado positivo por la decoloración de los discos de color verde a amarillo y sin decoloración cuando no hay la presencia de carbapenemasas (Britania, 2020).

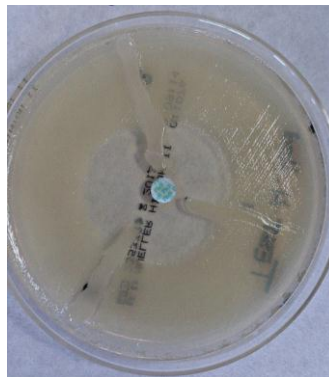
2.12.3. CarbAcineto NP

Diseñado para mejorar la detección de las carbapenemasas tipo OXA, usa como tampón una solución de cloruro de sodio (NaCl) que permite evidenciar mejor los cambios leves de pH. (Muñoz, Zumarán, González,, 2017).

2.12.4. Test de Hodge Modificado

El Test de Hodge modificado se realiza para confirmar el mecanismo de resistencia de carbapenemasa, detectando la capacidad que tiene la enzima de hidrolizar al antimicrobiano favoreciendo así el crecimiento de esta e inhibiendo el efecto del mismo. utilizando una cepa control de *E coli* American Type Culture Collection (ATCC6) 25922 en una suspensión 0,5 Mc farland, posteriormente se realiza una dilución 1/10 con solución salina y se inocula en una placa de agar Muller Hinton siguiendo las indicaciones para la técnica de difusión en disco, en el centro se coloca un disco de imipenem 10 ug y se toma 3 a 4 colonias de estudio las cuales se realiza una estría desde el borde hacia el centro de la misma. (Gómez,Gamboa, Perozo, Lugo, Bermúdez- González, Zabala, Morales, 2014).

Ilustración 9 Test de Hodge Modificado



Fuente: (Molin, 2016) Detección fenotípica de carbapenemasas

6 Son microorganismos certificados utilizados en diferentes disciplinas, para el control de calidad en microbiología.

2.12.5. Detección de carbapenemasas con métodos proteómicos

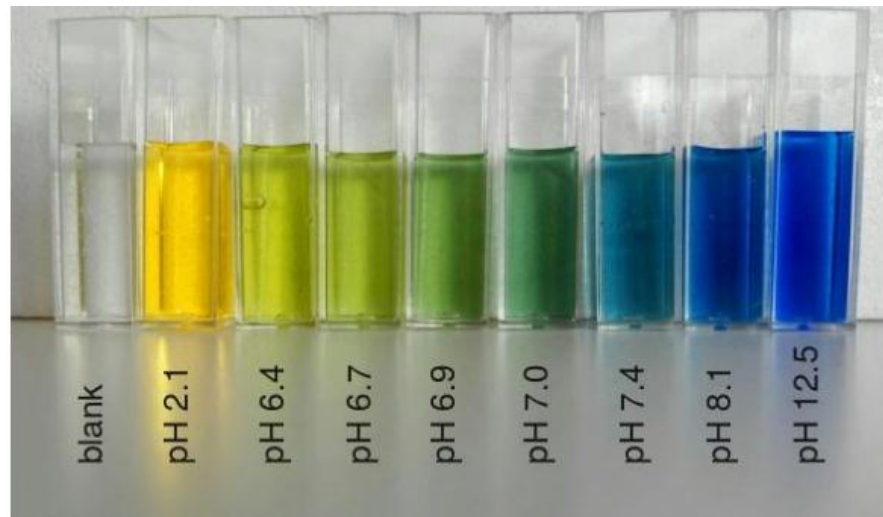
Varios estudios han descrito la detección de actividad carbapenemasa usando una plataforma de espectrometría de masas MALDI-TOF (Bou et al., 2014). Se compara el espectro generado por el carbapenémico no hidrolizado (intacto) con el obtenido, después de la hidrólisis del anillo β -lactámico por la carbapenemasa. Esta técnica se ha mostrado como una herramienta útil para la detección de carbapenemasas. (Cabrera, 2020).

2.13. Azul de Bromotimol

El azul de Bromotimol es un compuesto químico derivado del trifenilmetano, se utiliza para detectar el pH. A pesar de su nombre, el azul de bromotimol puede adoptar diferentes colores en solución ácida presenta un color amarillo, en solución básica presenta un color azul y en solución neutra presenta un color verde y actúa como un ácido débil en solución. (Bolívar, 2017).

Presenta una escala de indicación activa comprendida entre un pH 6.0 y de 7.6. A un pH del medio menor a 6.5 manifiesta una coloración amarilla. Cuando el pH del medio varía entre 6.5 y 7.6, adquiere una coloración verde. A pH mayores a 7.6 su color es azul. Esta característica le confiere gran utilidad a este indicador, ya que puede utilizarse en una escala de pH cercano a la neutralidad; precisamente donde ocurren los procesos fisiológicos. (Bolívar, 2017).

Ilustración 10 Rango de colores de pH Azul de Bromotimol



Fuente: (Bolívar, 2017) Azul de Bromotimol

El azul de Bromotimol se usa en numerosos procesos en los que se produce dióxido de carbono (CO_2), con la consecuente generación del ácido carbónico (H_2CO_3), el cual acidifica el medio; evidenciado por un cambio en la coloración del azul de Bromotimol. (Bolívar, 2017).

Para su preparación según (Bolívar, 2017) se disuelve 100 mg de azul de bromotimol en 100 ml de alcohol diluido, y se filtra si es necesario. También se puede disolver 50 mg de azul de bromotimol en una mezcla de 4 ml de

hidróxido de sodio 0,02 N y de 20 ml de alcohol, completándose a 100 ml con agua.

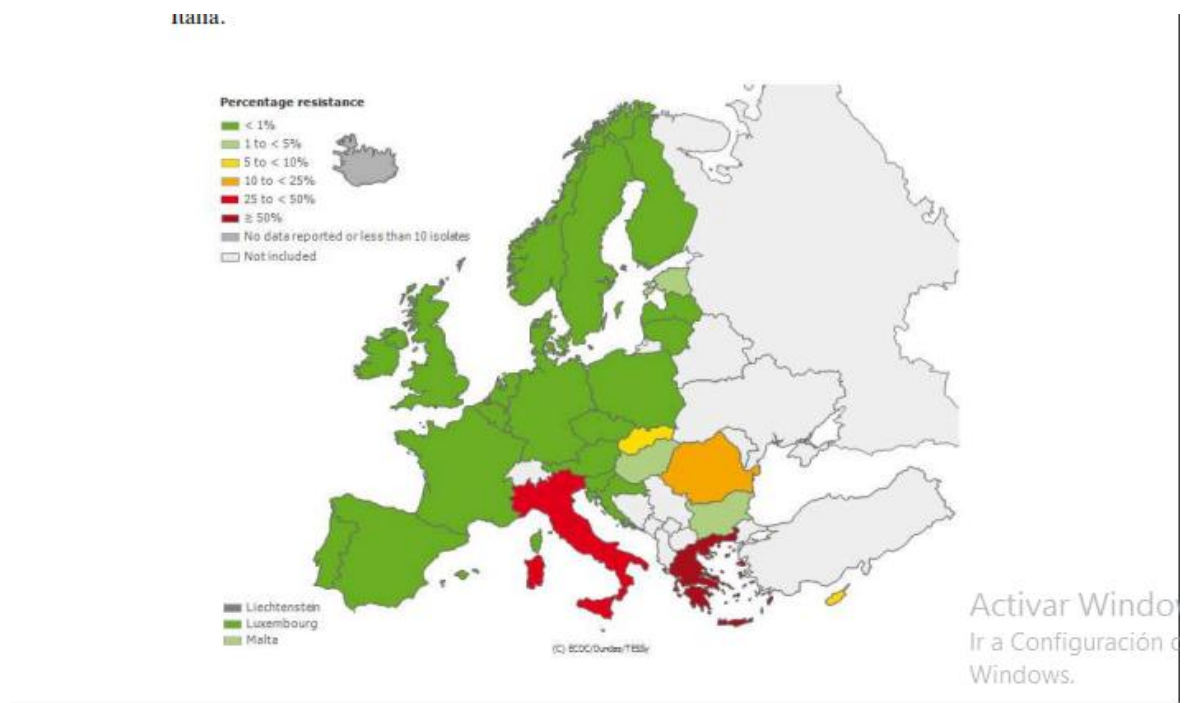
3. Antecedentes

De acuerdo con las estimaciones del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades en el año 2018, la resistencia a carbapenémicos de *Klebsiella pneumoniae* entre los países de la Unión Europea, se situaba en torno a 7,5%, con cifras entre 0 y 63,9% según los países, situándose la mayoría de ellos en niveles inferiores a 1%. En España, los primeros aislamientos de EPC se remontan al 2005, desde entonces se han identificado casos aislados y brotes siendo *K. pneumoniae* la especie más frecuente. (Antequera Alba, Saéz Carmen, Ciudad Marianela, Garía María José, Moyano Berta, Rodríguez Pablo, Roy Emilia, Aguilera María, Alonso Ester, Cárdenas María José, Castro Sara, Domingo Diego, Barrios Ana, 2020).

Desde su primer aislamiento en Japón, *K. pneumoniae* productora de IMP es muy frecuente en este país y ha sido responsable de varios brotes en China y Australia. También se han detectado otras enterobacterias productoras de IMP, como *S. marcescens* y *E. cloacae*, en Japón, Corea del Sur y Taiwan. La diseminación de enterobacterias productoras de IMP en el resto del mundo parece ser limitada con pocos casos identificados en Turquía, Líbano, Brasil y USA. (Acosta, 2016) (Eddie Angles-Yanqui,¹ Jorge Huaranga-Marcelo,² Rosa Sacsquispe-Contreras, and Luis Pampa-Espinoza, 2020).

La primera enterobacteria productora de VIM fue *K. pneumoniae* y se detectó por primera vez en los años 2001-2003 en los países del sur de Europa y fue introducida más tarde al norte de Europa y a EEUU. En el 2001, se identificó en Turquía en una *K. pneumoniae* la enzima OXA-48, la distribución en Europa es la siguiente: (Acosta, 2016).

Ilustración 11 Prevalencia de KPC en Europa



Fuente: (Acosta, 2016, pág. 44) Distribución de *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos en Europa

En un estudio realizado en Venezuela se determinó la prevalencia de carbapenemasas tipo KPC de 1,72%, similar a la reportada por otras investigaciones que refieren entre 1,2% y 3,3% en diferentes ciudades de EEUU y en Francia la prevalencia estimada por un estudio estuvo entre 3 y 5%. Sin embargo, otros estudios en ambos países han obtenido prevalencias inferiores, desde 0,03% hasta 0,16%. (Gómez, Gamboa, Perozo, Lugo, Bermúdez- González, Zabala, Morales, 2014).

En otro estudio realizado en Perú se determinó que la prevalencia de carbapenemasas cada vez está aumentando, comparando con un estudio en el mismo país realizado en 2008 la prevalencia encontrada fue de 1,57 % en 2008 y en el último estudio este subió a 15.7%. Evidenciando que está en aumento este problema de salud pública. (Acosta, 2016).

En el Perú, la frecuencia de MBL en *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos ha aumentado en la última década, variando de 15,7% en 2011 a 31,6% en 2016, lo que demuestra que este mecanismo de resistencia está presente en nuestro medio y es importante su detección rápida y certera por parte de los laboratorios de microbiología clínica. (Salinas Iván, Saldaña José Antonio, Guevara José manuel, Gonzáles Edgar, 2020).

El primer reporte en Latinoamérica fue en el año 2011 en dos pacientes pediátricos de Guatemala sin antecedentes de haber salido del país, seguidamente se presentó un brote en neonatos de Colombia, Uruguay y

Paraguay. Debido a su dispersión a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitieron alertas epidemiológicas, recomendando a los países miembros, la adopción de medidas preventivas, ante el avance de estas bacterias resistentes, especialmente en entornos hospitalarios.

En el año 2016, el primer reporte en el Perú fue el resultado de un estudio realizado en un hospital nacional de Lima con nueve pacientes que dieron positivo a *Klebsiella pneumoniae* con Carbapenemasas tipo Delhi 1 (NDM). (Camara, 2020).

Las carbapenemasas representan el principal mecanismo de resistencia a dichos antimicrobianos en enterobacterias y pueden diseminarse horizontalmente debido a que se encuentran comúnmente codificadas en elementos genéticos móviles. En la última década, se han detectado brotes epidémicos por enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en diversas regiones del mundo, incluida Latinoamérica y Argentina en particular, siendo la carbapenemasa tipo KPC una de las más frecuentemente reportadas en nuestro medio. En este contexto, las EPC son un grave desafío para la salud pública global, ya que existen escasas opciones terapéuticas disponibles para su control. (Lipari Flavio, Hernández Daniela, Vilaró Mario, Caeiro Juan, Alex Héctor, 2020).

Desde 2004 se han realizado diferentes análisis con diferentes técnicas para la detección de carbapenemasas para así poder determinar que método es ideal para su detección además de la PCR, ya que en muchos laboratorios de rutina no es accesible. Es así como Gallegos et al. (2004) detectaron carbapenemasas en clones de *A. baumannii* resistentes a imipenem. Lo realizaron utilizando la técnica de Hodge y la detección de MLB mediante un ensayo de inhibición con EDTA y mediante la tira comercial E test. (Acosta, 2016).

Díaz en 2008 utilizó el método fenotípico de doble difusión en disco con monodiscos de EDTA, se llegó a detectar 6,99% positivo para MLB, de las cuales 53,84% de la sinergia se manifestó en el disco de meropenem, 30,70% se manifestó en ambos discos (meropenem e imipenem) y solo el 15,38% se manifestó en el disco de imipenem. (Acosta, 2016).

Por otra parte, las técnicas basadas en inmunocromatografía nos permiten diferenciar el tipo de carbapenemasa presente, con una sensibilidad y especificidad reportadas del 100% en diversos estudios comparados con técnicas de biología molecular. (Sanchez Magda, Josa Diego, 2020).

En varios estudios realizados alrededor del mundo se demuestra que la técnica de blue carba es buena para la detección de carbapenemasas, es así como Muñoz y colaboradores en 2017 probaron que la mayor sensibilidad y especificidad la obtuvo el test CarbAcineto NP con 87,2 y 100%,

respectivamente. Blue-Carba mostró una sensibilidad intermedia (84,6%) y la menor especificidad (87,5%), mientras que Carba NP mostró la menor sensibilidad (79,5%) con una especificidad de 100%. (Muñoz, Zumarán, González,, 2017).

Destaca también “ los tres test fenotípicos y Xpert® Carba-R tienen buena capacidad de detección de las carbapenemasas KPC, NDM, OXA48, IMP, VIM-2 y VIM-27, independiente del género y especie bacteriana. No ocurrió lo mismo con las enzimas tipo OXA-23, 51, 58 en *A. baumannii* en que ningún test fenotípico pudo detectarlas en su totalidad. (Muñoz, Zumarán, González,, 2017).

El Blue Carba es un método simple, fácil y rápido con resultados dentro de las 2 h luego de la detección de colonias sospechosas, y que puede ser utilizado para cualquier muestra clínica con el consiguiente impacto epidemiológico y clínico de un informe temprano. (Merkt M, Bonesi L , Zanella M,Sucari A, Pennini, 2017).

Finalmente dadas las circunstancias en las que el mundo está viviendo a causa de la pandemia por COVID-19, se evidencia una vez más la importancia de la detección de carbapenemasas ya que en Argentina el servicio antimicrobiano del INE-ANLIS ha confirmado durante la primera ola la emergencia y diseminación de colonización por enterobacterias productoras de combinaciones de carbapenemasas. De 196 aislamientos el

27% de estos fue confirmado como productor de doble carbapenemasa. De los productores de doble carbapenemasa se identificó que el 60% es KPC+NDM y el 40% NDM+OXA. (Malbrán, 2021).

4. Planteamiento del problema

En los últimos años las infecciones bacterianas han ido aumentando y por tanto preocupando al personal de salud ya que las bacterias han desarrollado nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos para poder sobrevivir. Por tanto, cada vez se hace más difícil encontrar el antibiótico ideal para tratar infecciones bacterianas que presentan una sensibilidad disminuida.

El médico no puede saber si una bacteria es resistente o no a un determinado antibiótico sin antes haber realizado el antibiograma y someter al microorganismo a que exprese los mecanismos de resistencia que pueda presentar, de esta forma se sabe que una bacteria es resistente o no. Si bien la técnica de Kirby Bauer es la más utilizada para determinar sensibilidad y resistencia, además de los mecanismos de resistencia, como cualquier cultivo este tarda entre 24 y 48 horas dependiendo los resultados obtenidos a las 24 horas.

Las infecciones producidas por bacterias multirresistentes como es el caso de las carbapenemasas se dan principalmente en pacientes hospitalizados cuyo estado es crítico y por tanto la necesidad de dar un resultado rápido no es opcional es una necesidad por el mismo hecho de que el paciente está delicado y ningún antibiótico le está haciendo efecto.

Es en estos casos donde surge la necesidad de implementar nuevas técnicas como la técnica BLUE CARBA que ayudaría a que el paciente deje de tomar antibióticos que no actúa sobre el microorganismo sino más bien está dañando la mucosa gástrica. El paciente cambiará con un mejor esquema de tratamiento o empezará a gestionar el acceso a otros antibióticos que no siempre están disponibles a la venta en Bolivia y así estos pacientes puedan sanarse y llevar una mejor calidad de vida.

5. Justificación

La identificación de mecanismos de resistencia, como se mencionó anteriormente, se realiza mediante la técnica de Kirby Bauer, la colocación de discos para la expresión de dichos mecanismos ya está estandarizado según las recomendaciones de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) que para América latina es el instituto guía en los laboratorios de microbiología.

Sin embargo, esta técnica tiene como principal desventaja el tiempo ya que como cualquier otro cultivo se debe esperar el desarrollo microbiano para poder observar dichos mecanismos, esto implica por lo menos 24 horas. De la misma forma en un laboratorio de microbiología se colocan los discos de antibiograma para infecciones no complicadas, es decir, infecciones no multirresistentes, por tanto, en un principio se identifica mecanismos tales como betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) y betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y no así carbapenemasas.

Es así que ante un microorganismo BLEE positivo se debe tomar en cuenta otros antibióticos para la terapia entre ellos a los carbapenémicos y por tanto se debe incluir otros discos de antibiótico, prolongando el tiempo del resultado hasta 72 horas lo que implica un retraso en el inicio del tratamiento o un inicio con falla terapéutica.

La mayor parte del tiempo estos microorganismos están presentes en pacientes hospitalizados lo que implica que no pueden esperar mucho tiempo para el resultado y mucho menos si se trata de microorganismos multiresistentes, ya que necesitan empezar con la terapia lo más antes posible caso contrario podría ser fatal.

La importancia de encontrar un microorganismo con estas características no solamente es epidemiológica sino es crucial para el médico ya que este debe cambiar su esquema de tratamiento para que el paciente se pueda curar. Es así como se evidencia la importancia de validar nuevas técnicas que permitan identificar este mecanismo de resistencia mucho más rápido y que al mismo tiempo sean confiables y fáciles de realizar en cualquier laboratorio en Bolivia.

Si bien existen técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), otras técnicas colorimétricas como el Carba NP donde se extrae por biología molecular la enzima carbapenemasa y por el cambio de color del indicador de pH se puede verificar que tiene o no la enzima. Estas técnicas requieren de reactivos específicos, otro tipo de laboratorios con más tecnología, equipos, etc. en nuestro medio no todos los laboratorios tienen la posibilidad de realizar estas técnicas además de que estas son muy caras.

Es por eso importante validar una nueva técnica que no requiera demasiada complejidad, los reactivos sean accesibles, sea rápida y eficaz como lo es la técnica de blue carba. Esta técnica se ha desarrollado ya en varios países como ser Argentina, España, Brasil entre otros, es una técnica fácilmente reproducible los reactivos que requiere no son costosos y las cantidades utilizadas son pequeñas entonces se puede observar la relación costo beneficio ya que no requiere mucho material y el beneficio es muy grande. Además de ser una prueba rápida esta puede ser aplicable en cualquier laboratorio de microbiología y es accesible al paciente que requiere de esta prueba ya que como mencionaba anteriormente el costo es bajo.

En cuanto al beneficio que recibe el paciente además de tener un precio accesible, el tiempo de emisión del resultado es corto no más de dos horas pudiendo así comenzar un esquema de tratamiento eficaz y rápido, no teniendo que cambiar de esquema terapéutico hasta esperar un resultado pudiendo así disminuir la frecuencia de fallo terapéutico.

6. Pregunta de investigación

¿Es posible la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores por la técnica de Blue Carba?

7. Hipótesis

Es posible detectar carbapenemasas en bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores por la técnica de Blue Carba, permitiendo obtener resultados en un periodo de tiempo más corto en relación al test de Hodge Modificado.

8. Objetivos

8.1. Objetivo General:

- Validar la técnica Blue Carba para detección de carbapenemasas en bacilos fermentadores y no fermentadores procedentes de muestras obtenidas en el laboratorio de Bacteriología y Micología del Instituto SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del año 2020.

8.2. Objetivos Específicos:

- ❖ Elaborar un protocolo de procedimiento de la técnica de Blue Carba tomando en cuenta las características demográficas para la ciudad de La Paz, Bolivia.
- ❖ Comparar los resultados obtenidos con la técnica Blue Carba en relación a los resultados obtenidos con el Gold estándar, Hodge Modificado.
- ❖ Estimar el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo.
- ❖ Determinar la especificidad y sensibilidad de la prueba.

9. Diseño metodológico

9.1 Diseño de estudio o tipo de estudio

El tipo de estudio que se utilizó fue experimental, descriptivo ya que el procedimiento se llevó a cabo aislando cepas provenientes de muestras patológicas de pacientes que acudieron al Instituto SELADIS. Realizando el experimento y como consecuencia obteniendo resultados de éste.

Al mismo tiempo es un estudio descriptivo debido a que se detalla todo el procedimiento realizado donde se describen las técnicas utilizadas para llegar al resultado final y en consecuencia llegar a una conclusión la cual fue la validación de la técnica Blue Carba para la detección de carbapenemasas en bacilos fermentadores y no fermentadores y la elaboración del protocolo de procedimientos de dicha técnica.

9.1 Sitio del Estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de bacteriología y micología del instituto SELADIS en el periodo de tiempo de Julio a Diciembre del año 2020.

10. Muestra

10.1 Tamaño de muestra

Para esta investigación se tomó en cuenta como población a aquellos bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores que presentaron una sensibilidad a los antibióticos disminuida, reflejada en el método de Kirby Bauer, más conocido como antibiograma, que ingresen al laboratorio de Bacteriología y Micología del instituto SELADIS durante los meses de Julio a Diciembre del 2020.

Una vez conocida nuestra población se realizó el muestreo para llevar a cabo la técnica de Blue Carba y el Test de Hodge Modificado, para ello se utilizó un muestreo simple aleatorio estratificado para muestras finitas, siendo que este método de muestreo es el más indicado para este tipo de estudio tomando en cuenta que se trabajó a un nivel de confianza del 95% con un error del 5% obteniendo con esto resultados estadísticamente significativos y confiables.

Para el cálculo de la muestra se tomó en cuenta los siguientes datos.

- El tamaño de la población que incluye todos los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores que presentan carbapenemasas, dicho dato se obtuvo de los registros estadísticos del laboratorio de Bacteriología y Micología del Instituto SELADIS durante el periodo de un año, representada por la letra N.
- El error en tanto por ciento aceptado que es de 5% ya que se trabajó con un nivel de confianza del 95% representado por la letra e.
- El valor crítico de nivel de confianza que es del 95% para que sea un estudio estadísticamente significativo, representado por la letra z.
- La probabilidad con la que se presenta el fenómeno o dicho de otra forma la prevalencia de carbapenemasas en Bolivia, dado que

dicho dato no está registrado se tomó la prevalencia de regiones cercanas y con características similares como Venezuela representado por la letra p. (Gomez, Perezoso, Bermudez, Morales, 2015).

- La probabilidad que no se presente el fenómeno representado por $(1-p) = q$

Utilizando la formula estadística para muestras finitas tenemos:

$$n = \frac{z^2 pqN}{e^2(N - 1) + z^2 pq}$$

Por tanto, nuestros datos son los siguientes:

$$P=1,72$$

$$Q=-0,72$$

$$N=36$$

$$E=5$$

$$Z=95$$

Reemplazando tenemos:

$$n = \frac{95^2(1,72)(-0,72)(36)}{5^2(36 - 1) + 95^2(1,72)(-0,72)}$$

$$n = 33$$

El tamaño de la muestra es igual a 33 muestras. Se toman en cuenta para esta investigación 3 estratos los cuales son:

- a) Muestras que sean carbapenemasas confirmadas por el método de aproximación de discos ya sea metalobetalactamasas o carbapenemasa tipo KPC.
- b) Muestras que presentan sensibilidad disminuida como BLEEs
- c) Muestras que presentan una resistencia a los carbapenémicos cuyo mecanismo ha sido descartado por el método de aproximación de discos.

Para realizar el cálculo de cada estrato se tomó los datos estadísticos del laboratorio de Bacteriología y Micología del Instituto SELADIS durante el periodo de tiempo de un año en el cual se obtuvieron para cada estrato la siguiente cantidad de muestras:

Para el estrato 1 se obtuvieron 20 muestras

Para el estrato 2 se obtuvieron 33 muestras

Para el estrato 3 se obtuvieron 13 muestras

Por tanto, siguiendo las recomendaciones del texto Bioestadística (García, 2019, pág. 34) se calculó el total de muestras que se deben recolectar en cada estrato para la investigación tomando en cuenta que se trabaja con el 95% de confianza. Teniendo:

Total, de población en los estratos, que es igual a la suma de los datos obtenidos del registro del laboratorio en el periodo de un año para cada estrato $(20+33+13) = 66$.

Una vez obtenido este valor que es igual a 66, se procedió a calcular el número de muestra que se debe utilizar en este estudio para cada estrato y así obtener el número total de muestras que se calculó para este estudio el cual fue de 33 muestras.

Por tanto, se procedió al cálculo estadístico de acuerdo al texto de referencia de la siguiente manera:

- Para el cálculo de muestras para el estrato 1 se dividió la cantidad de población de este estrato (20), es decir, todas las muestras que son carbapenemasas ya sea KPC o MLB. dato recolectado del registro del laboratorio, entre el número total de la población de los estratos (66), multiplicado por el número de muestras calculado por la fórmula estadística para muestras finitas (33).

$$\text{Estrato 1: } \frac{20}{66} \times 33 = 10$$

- Para el cálculo de muestras para el estrato 2 se dividió la cantidad de población de este estrato (33), es decir, todas las muestras que son betalactamasas de espectro extendido con una sensibilidad disminuida, dato recolectado del registro del laboratorio, entre el número total de la población de los estratos (66), multiplicado por el número de muestras calculado por la fórmula estadística para muestras finitas (33).

$$\text{Estrato 2: } \frac{33}{66} \times 33 = 16,5 = 16$$

- Para el cálculo de muestras para el estrato 3 se dividió la cantidad de población de este estrato (13), es decir, todas las muestras que son resistentes a carbapenémicos pero no presentan enzima carbapenemasa, dato recolectado del registro del laboratorio, entre el número total de la población de los estratos (66), multiplicado por el número de muestras calculado por la fórmula estadística para muestras finitas (33).

$$\text{Estrato 3: } \frac{13}{66} \times 33 = 6,5 = 7$$

Por tanto, la suma de las muestras calculadas para cada estrato es igual a 33 que es el total de muestras calculado por la formula estadística para muestras finitas.

10.1. Criterios de Inclusión

Se tomó en cuenta las muestras donde todos los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores que cumplan las siguientes características:

- ☞ Microorganismos que presentan una sensibilidad disminuida a los antibióticos reflejada en el antibiograma.
- ☞ Microorganismos que presentan un halo de inhibición al imipenem menor a 21 mm reflejado en el antibiograma y positivo para aproximación de discos.
- ☞ Microorganismos que presentan un halo inhibición al imipenem menor a 21 mm y/o resistente y cuya aproximación de discos de negativo al mecanismo de carbapenemasa.

10.2. Criterios de Exclusión

No se tomó en cuenta a aquellos bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores que presenten las siguientes características:

☞ Microorganismos que presentan sensibilidad a los antibióticos en el antibiograma

☞ Microorganismos sensibles al imipenem en el antibiograma.

10.3. Criterios de Eliminación

Se eliminaron a los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores que reflejen contaminación con alguna otra cepa no siendo cepas puras.

11. Descripción de las Técnicas y Procedimientos más Importantes

Una vez realizado el cálculo del tamaño de la muestra para este estudio, se procedió a la recolección de muestras con todos los criterios de inclusión y exclusión establecidos anteriormente.

11.1. Preparación de Reactivos

Se procedió a la preparación de todos los reactivos y materiales necesarios para la validación de la técnica Blue carba, de la misma forma para el Gold estándar. Tomando en cuenta las recomendaciones del Instituto de Malbrán en Argentina se procedió a la preparación de los reactivos acondicionado a nuestro país, ciudad y laboratorio, se procedió de la siguiente manera:

11.1.1. Reactivos de la técnica Blue Carba

Preparación Azul de Bromotimol Csp: 100ml

Para la preparación del azul de Bromotimol de la marca Biopack, indicador de pH, se utilizó la presentación del reactivo en polvo para lo cual se pesó 40mg de azul de bromotimol y se disolvió en 100ml de agua destilada teniendo una concentración final de 0,04%.

Preparación sol. A Csp: 100ml

Para la solución A se pesó 1,6mg de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) y se disolvió en 100 ml de azul de bromotimol previamente preparado obteniendo una concentración de 0,1mmol/L, posteriormente se midió el pH de esta solución el cual fue de 3,5, de acuerdo a las especificaciones del instituto Malbrán el pH debe ser ajustado a 7, por tanto, con ayuda de ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N e Hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N.se procedió al ajuste del mismo. Una vez obtenido el pH 7 en la solución esta puede ser almacenada en oscuridad por el lapso de 2 semanas.

Preparación de sol B csp: 10ml

Para la solución B se pesó 60 mg de imipenem/cilastatina de la marca FADA, en polvo con una concentración de 3mg/ml. Y se disolvió en 10 ml de la solución A con un pH de 7. Esta solución no puede ser almacenada.

De la misma manera se procedió a la preparación de los Reactivos para realizar el Test de Hodge Modificado, los medios de cultivo utilizados tanto para aislamiento primario, Test de Hodge Modificado y el almacenamiento de las cepas. Ver anexo 1

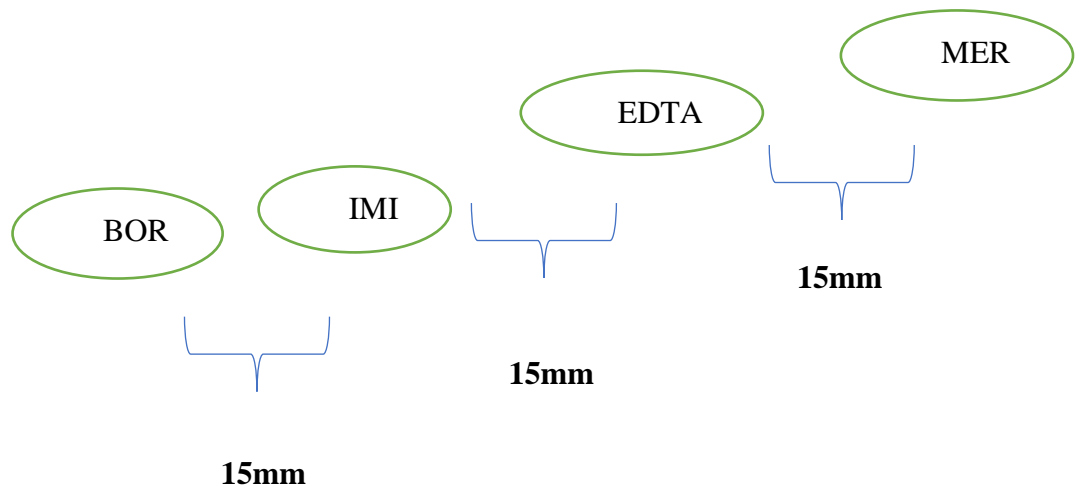
11.2. Clasificación de muestras por el método de Aproximación de discos:

Para la clasificación de las muestras en los distintos estratos establecidos en el cálculo de la muestra se observó en el antibiograma realizado de forma rutinaria que cepas presentaban una sensibilidad disminuida a los antibióticos como ser las betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) o un halo de inhibición menor a 21 mm al imipenem.

Posteriormente, se procedió a realizar la técnica de aproximación de discos en la cual se realizó la escala 0,5 Mac Farland de las muestras y se inoculó en

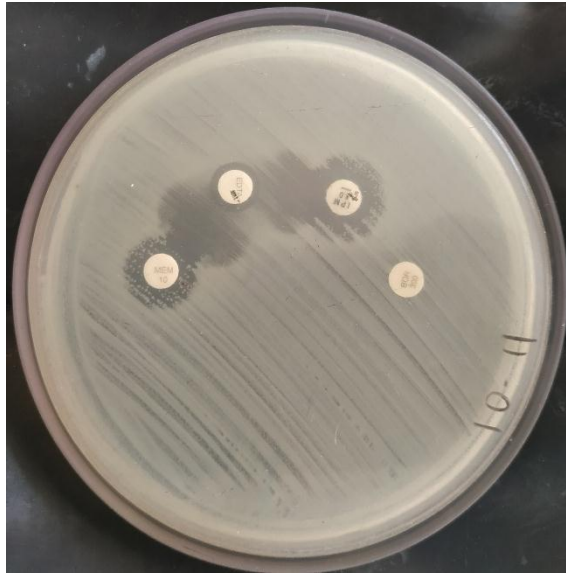
agar Muller Hinton, posteriormente se colocaron los discos de ácido borónico, imipenem, EDTA y meropenem a 15mm de distancia entre ellos respectivamente como se puede apreciar en el siguiente esquema:

Gráfico 1 Técnica de Aproximación de Discos



Fuente: Elaboración propia

Ilustración 12 Técnica de Aproximación de discos



Fuente: Elaboración propia

Una vez colocados los discos se incubó por 24hrs a 37°C. transcurrido este tiempo se buscó la existencia de sinergia en el halo de inhibición entre el imipenem y el EDTA para carbapenemasas de tipo metalobetalactamasas o un achatamiento entre el imipenem y el ácido borónico para una carbapenemasas de tipo KPC. De esta manera se pudo clasificar las cepas obtenidas en los tres distintos estratos establecidos anteriormente.

11.3. Procedimiento Blue Carba:

Primero se realizó la técnica de Blue carba para lo cual se utilizaron tubos epperdorfs donde se inocularon las muestras, teniendo ya preparado los reactivos se identificaron los tubos como:

- ✓ Control positivo para el cual se utilizó una cepa ATCC carbapenemsasa de *Klebsiella pneumoniae* BAA-1705.
- ✓ Control negativo se utilizó una cepa de *E. coli*.
- ✓ Muestra 1 y así sucesivamente hasta la muestra 33, cepas obtenidas en laboratorio en agar nutritivo.

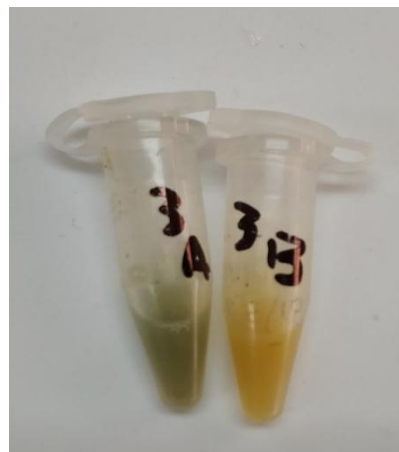
Para cada muestra se utilizaron 2 tubos epperdonrff los cuales se identificaron como solución A y solución B, respectivamente. El tubo A contiene la solución A que es azul de bromotimol más ZnSO₄ y 5ul de cepa en estudio y el tubo B contiene la solución B que es azul de bromotimol, ZnSO₄ e imipenem más 5ul de cepa en estudio. Tomando en cuenta que la solución B debe ser preparada antes de ser utilizada.

Una vez inoculada la cepa en los tubos respectivos se procedió a agitar con la ayuda del vórtex y se incubó a 37°C por el lapso de 2 horas, sin embargo, cada 15 min se realizó la agitación en el vórtex.

Los tubos incubados inicialmente son de color verde azulado pasado el lapso de tiempo se pudo evidenciar el cambio de pH con el cambio de color del indicador que en un principio a un pH de 7 es un tono verde, por tanto de acuerdo al cambio de color en el tubo eppendorff se puede identificar si la cepa en estudio presenta una carbapenemasa de tipo KPC presentando una coloración azul/verde o una metalobetalactamasa presentando una coloración verde/amarillo o si bien no presenta ninguna carbapenemasa sin ningún cambio de color.

Esto se pudo identificar ya que el cambio de color evidenciado por el cambio de pH en la solución, Para metalobetalactamasas se observa el primer tubo verde y el segundo tubo que contiene el carbapenémico amarillo debido a la ruptura del anillo. (Cols, 2015).

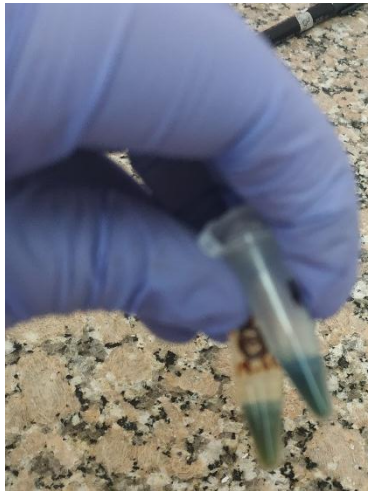
Ilustración 13 Metalobetalactamasa



Fuente: Elaboración propia

Para una carbapenemasa tipo KPC se observa el primer tubo 3A de color azul y el segundo 3B de color verde de igual manera debido a la ruptura del carbapenémico (Cols, 2015).

Ilustración 14 Carbapenemasa Tipo KPC



Fuente: Elaboración propia

En resumen, tenemos:

Es positivo cuando la reacción puede ser de las siguientes maneras:

Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
AZUL	AMARILLO

Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
AZUL	VERDE

Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
VERDE	AMARILLO

Es negativo cuando:

Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
AZUL	AZUL

Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
VERDE	VERDE

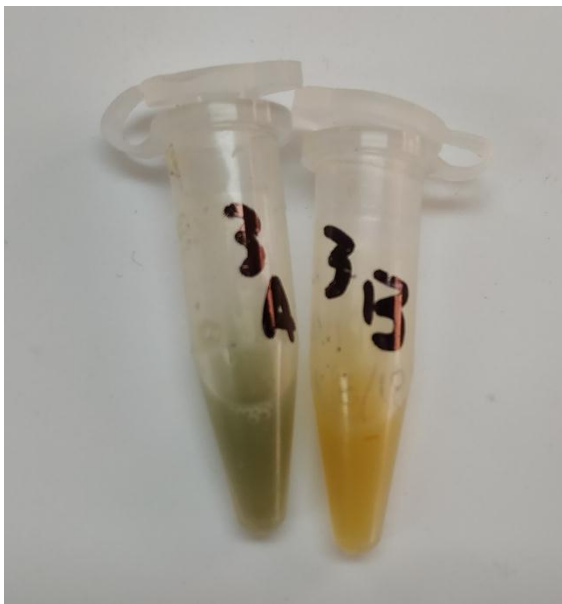
Es inválido cuando:

Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
AMARILLO	VERDE

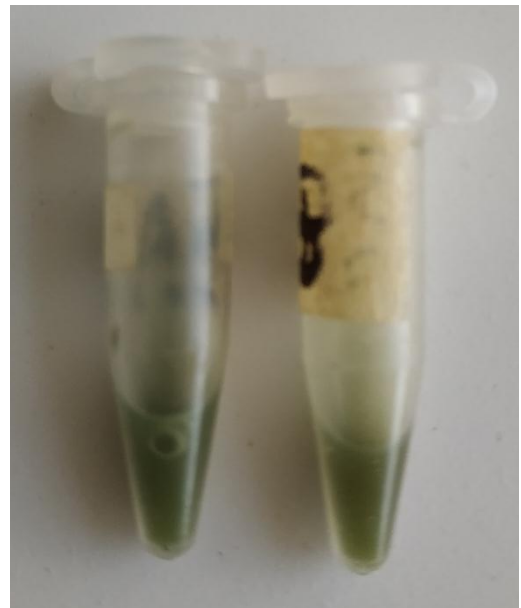
Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
AMARILLO	AZUL

Reacción Tubo A	Reacción Tubo B
AMARILLO	AMARILLO

Ilustración 15 Resultado Positivo y Negativo



POSITIVO



NEGATIVO

Fuente: Elaboración propia

De la misma manera en la siguiente figura se puede observar la coloración inicial al momento de la inoculación.

Ilustración 16 Tubos inoculados con las cepas en estudio



Fuente: Elaboración propia

11.4. Procedimiento Hodge Modificado

Para el test de Hodge modificado se utilizaron cajas Petri grandes con agar Muller Hinton, cepa ATCC de *E coli* 25922, disco de meropenem y los mismos controles positivos y negativos que se utilizaron en la técnica de Blue Carba.

Por tanto, se procedió de la siguiente manera: se realizó la escala 0,5 de Mac Farland con la cepa ATCC *E coli* 25922, una vez obtenida la escala se hizo una dilución 1:10 y se inoculó en agar Muller Hinton como cualquier antibiograma. Se colocó el disco de meropenem en el centro de la placa y se procedió a inocular el control positivo desde el extremo superior de la placa

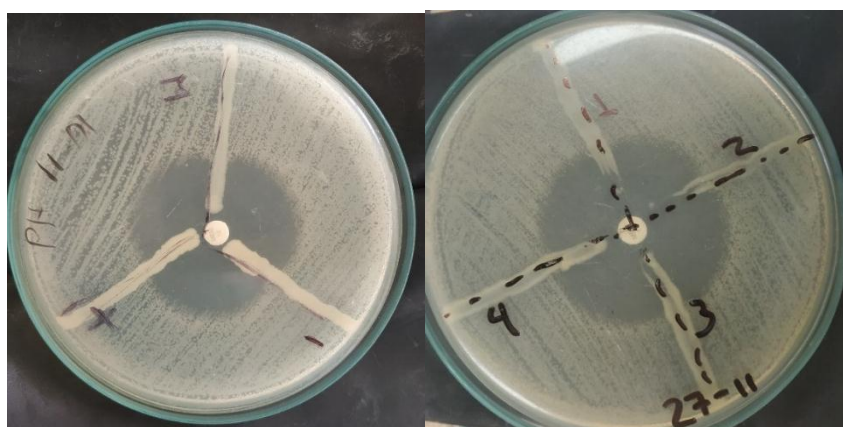
hacia el centro del disco sin tocar el mismo, de la misma manera se inoculo el control negativo y posteriormente las muestras, por cada placa se inoculo 3 muestras. Una vez inoculadas se incubo a 37°C por 24 horas y se observó el resultado.

Un resultado positivo es cuando aparece crecimiento de la cepa de *E. coli* en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por el antibiótico y la estría de la cepa productora de carbapenemasa formando una hendidura en la parte proximal al disco y una imagen en hoja de trébol. La liberación de las carbapenemasas es la responsable del crecimiento de la cepa de *E. coli*

Un resultado negativo es cuando se observa la zona de inhibición inalterada en su intercesión con la estría de la cepa en estudio.

Un resultado inválido es cuando se observa una zona clara a lo largo de la estría de la cepa en estudio.

Ilustración 17 Test de Hodge Modificado



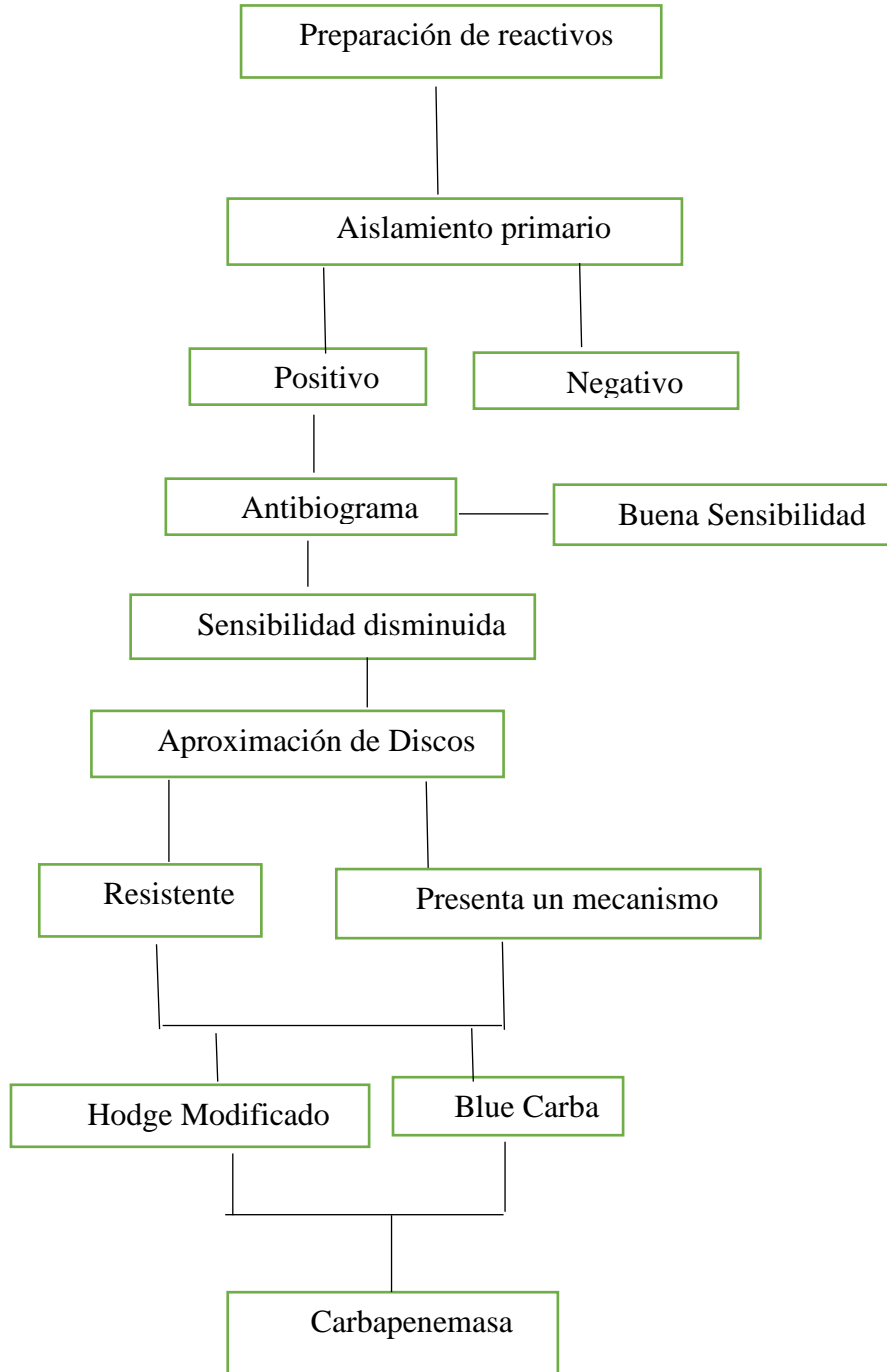
POSITIVO

NEGATIVO

Fuente: elaboración propia

Al igual que en la técnica de Blue Carba, en esta se puede diferenciar los dos tipos de carbapenemasa debido al achatamiento que presenta, en este caso para metalobetalactamasa se produce un achatamiento no muy visible, en cambio para carbapenemasa tipo KPC se produce un achatamiento más visible dando la forma de hoja de trébol (Garia, 2018).

Gráfico 2 Esquema de



12. Análisis Estadístico

Se realizó el análisis estadístico utilizando chi cuadrado para determinar si las variables son dependientes o independientes, dicho de otra manera, si la técnica de Blue Carba está relacionada con la técnica de Hodge Modificado y así de esta manera se pudo evidenciar si la técnica es apta o no para la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos, para ello se utilizó el software SPSS versión 25.

La tabulación de los datos obtenidos se puede ver en Anexos 2.

13. Aspectos Bioéticos.

Para este estudio se realizó un consentimiento informado de los pacientes aprobado por el comité de bioética de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) para la utilización de las cepas aisladas procedentes de muestras biológicas de pacientes que acudieron al instituto SELADIS al servicio de Bacteriología y Micología. Dicho consentimiento puede ser observado en Anexos 6.

14. Resultados

En este estudio se tomaron muestras de bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores durante el periodo de Julio a Diciembre

del año 2020, dichas cepas de microorganismos provenían de muestras ingresadas al Laboratorio de Bacteriología y Micología del instituto SELADIS, las cuales fueron aisladas de muestras de orina y secreciones purulentas principalmente.

14.1. Determinación de la Frecuencia de Microorganismos Aislados:

Estas cepas fueron clasificadas e identificadas en principio de forma rutinaria identificando el género y la especie de cada cepa, posteriormente se las clasificó de acuerdo a la sensibilidad o resistencia que presentaban, tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión que se tomaron para este estudio.

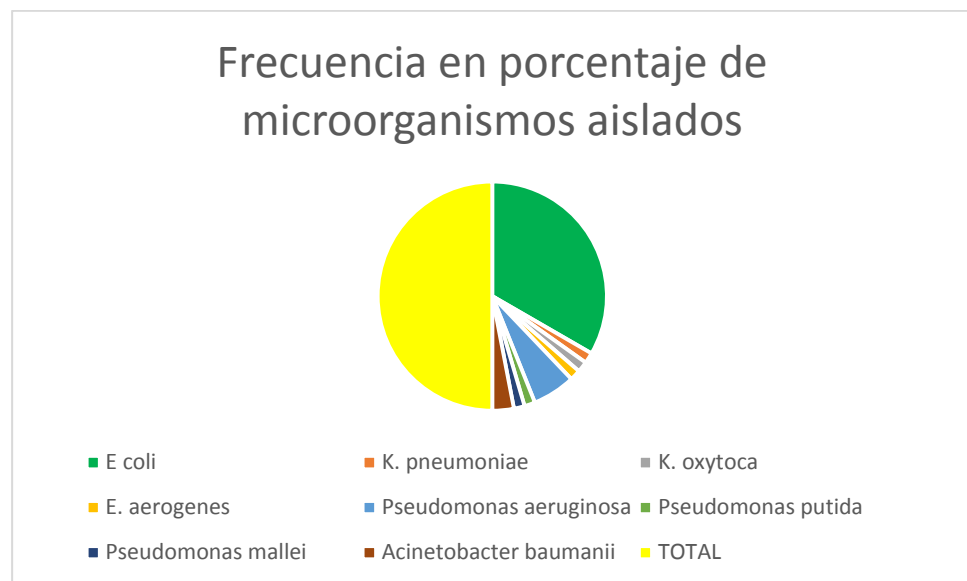
Al mismo tiempo se las clasificó en los distintos estratos propuestos para el desarrollo de la investigación. Con toda esta información se pudo evidenciar que la cepa más aislada en este estudio y que estaba distribuida en los tres estratos fue *Escherichia coli* representando el 66,66% del total de muestras analizadas, de la misma manera el segundo microorganismo con mayor frecuencia aislado fue *Pseudomonas aeruginosa* representando el 12,12% del total de muestras analizadas como se puede ver en el siguiente cuadro:

Tabla 1 Frecuencia de Microorganismos aislados en el estudio

Microorganismo	Frecuencia	Porcentaje
<i>E coli</i>	22	66,66
<i>K. pneumoniae</i>	1	3,03
<i>K. oxytoca</i>	1	3,03
<i>E. aerogenes</i>	1	3,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	12,12
<i>Pseudomonas putida</i>	1	3,03
<i>Pseudomonas mallei</i>	1	3,03
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	6,06
TOTAL	33	100

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 3 Frecuencia en porcentaje de microorganismos aislados en el estudio



Fuente: Elaboración propia

14.2. Determinación de la Frecuencia de Microorganismos con Carbapenemasas Identificados por el Método de Hodge Modificado

Las muestras fueron procesadas por dos técnicas: la técnica de Blue carba y la técnica de Hodge Modificado. Tomando en cuenta que esta última es el Gold estándar para la detección de carbapenemasas de tipo KPC y metalobetalactamasas se analizaron los resultados obtenidos en cada técnica. Para la técnica de Hodge modificado se pudo encontrar 10

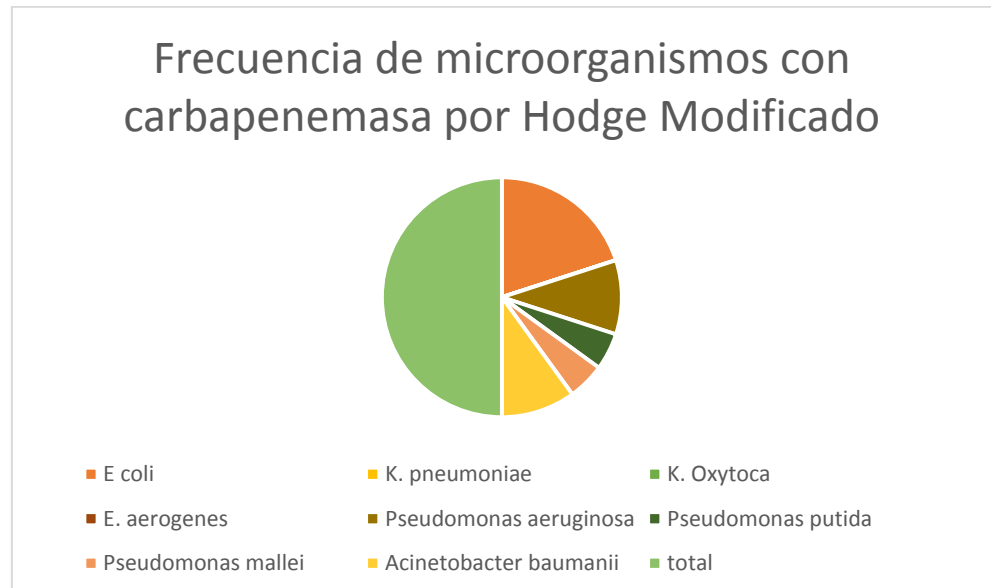
cepas productoras de Carbapenemasas de las cuales el 40% fueron encontradas en el microorganismo *E. coli*, representando el mayor porcentaje aislado seguido de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Como se puede ver en el siguiente cuadro:

Tabla 2 Frecuencia de microorganismos con carbapenemasas identificados por la técnica de Hodge Modificado

Microorganismo	Carbapenemasa
<i>E coli</i>	4
<i>K. pneumoniae</i>	0
<i>K. Oxytoca</i>	0
<i>E. aerogenes</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Pseudomonas putida</i>	1
<i>Pseudomonas mallei</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
total	10

Fuente: Elaboración propia

Gráfico 4 Frecuencia en porcentaje de microorganismos con carbapenemasas identificados por la técnica de Hodge Modificado



Fuente: Elaboración propia

De la misma manera las muestras fueron procesadas por la técnica de Blue Carba y se pudo identificar 9 cepas productoras de carbapenemasas, de las cuales 8 fueron metalobetalactamasas y 1 tipo KPC.

En cuanto a la técnica de Hodge Modificado de las 10 cepas productoras de carbapenemasas 9 fueron metalobetalactamasas y 1 fue tipo KPC.

De las 23 muestras que dieron negativo tanto en el test de Hodge Modificado como en el de Blue Carba 7 muestras presentaron resistencia

al imipenem obteniendo un halo de inhibición menor a 21mm. Sin embargo, no presentaron mecanismo alguno y las 16 muestras restantes presentaron sensibilidad disminuida y el mecanismo de resistencia BLEE, es decir, betalactamasa de espectro extendido.

En el test de Blue Carba tanto el primer tubo como el segundo presentaron una coloración verde que es la misma con la que se inicia la prueba.

14.3. Elaboración del Protocolo de Procedimientos de la Técnica Blue Carba tomando en cuenta las Características Demográficas para la Ciudad de La Paz, Bolivia:

En el presente trabajo se elaboró un protocolo de procedimientos para la técnica de Blue Carba de acuerdo a las características demográficas de la ciudad de La Paz y de acuerdo al laboratorio, basándose en el protocolo establecido por el instituto del Dr Malbrán de la ciudad de Buenos Aires Argentina, obteniendo el siguiente protocolo:

Protocolo de procedimiento de la Técnica Blue Carba

Preparación de Reactivos

- a) Pesar 40mg de Azul de Bromotimol (Biopack) y disolver en 100ml de agua destilada ultrapurificada, medir el pH.
- b) Pesar 1,6mg de $ZnSO_4$ y disolver en 100ml de azul de Bromotimol.
- c) Ajustar el pH a 7 utilizando NaOH 0,1N y HCl 0,1N (Sol. A).
- d) Pesar 60mg de imipenem/cilastatina (FADA) y disolver en 10ml de la solución A previamente preparada (Sol B).

Procedimiento

- a) Identificar dos tubos eppendorff como A y B.
- b) Inocular 100ul de la solución A en el tubo A y 100ul de la solución B en el tubo B.
- c) Inocular 5ul de colonia en estudio en cada tubo.
- d) Homogenizar los tubos hasta que la colonia se disuelva.
- e) Incubar a 37°C por 2hrs con agitación cada 15 min.

Resultados

- a) Es un resultado positivo si el tubo A presenta una coloración verde o azul y el tubo B amarillo
- b) Es un resultado negativo si el tubo A y el tubo B presentan una coloración verde.

14.4. Comparación de los Resultados Obtenidos con la Técnica de Blue Carba en Relación a los Resultados Obtenidos con la Técnica de Hodge Modificado:

En cuanto a los cálculos estadísticos se sacó el valor de chi cuadrado utilizando el programa estadístico SPSS versión 25, teniendo dos variables la técnica de Blue Carba y la técnica de Hodge Modificado el cual fue nuestro Gold estándar ya que en varios estudios el test de Hodge Modificado para la detección de carbapenemasas en especial carbapenemasas tipo KPC dio muy buenos resultados con una sensibilidad del 95% y una especificidad de 90% (Gomez, Perezoso, Bermudez, Morales, 2015).

Por tanto, al someter estas dos variables en el estudio se podrá evidenciar si hay dependencia o relación entre ambas o si no hay dependencia o relación alguna, o dicho de otra manera si la nueva técnica, Blue Carba, detecta las enzimas carbapenemasas de la misma forma que lo hace el Test de Hodge Modificado o no, para ello tenemos:

Variable test de Blue Carba con sus categorías

1= Positivo

2= Negativo

Variable test de Hodge Modificado con sus categorías

1= Positivo

2= Negativo

Teniendo las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: Los resultados de la prueba de Blue Carba son independientes o no están relacionados con los resultados del test de Hodge Modificado.

Hipótesis alterna: Los resultados de la prueba de Blue Carba son dependientes o están relacionados con los resultados del test de Hodge Modificado.

Tabla 3 Tabla Cruzada Blue Carba vs Test de Hodge Modificado

Tabla cruzada Blue Carba*Hodge Modificado

			Hodge Modificado		Total
			Positivo	Negativo	
Blue	Positiv	Recuento	9	0	9
Carba	o	% dentro de Blue Carba	100,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Hodge Modificado	90,0%	0,0%	27,3%
		% del total	27,3%	0,0%	27,3%
	Negativ	Recuento	1	23	24
	o	% dentro de Blue Carba	4,2%	95,8%	100,0%
		% dentro de Hodge Modificado	10,0%	100,0%	72,7%
		% del total	3,0%	69,7%	72,7%
Total		Recuento	10	23	33
		% dentro de Blue Carba	30,3%	69,7%	100,0%
		% dentro de Hodge Modificado	100,0%	100,0%	100,0%

% del total	30,3%	69,7%	100,0%
-------------	-------	-------	--------

En la tabla cruzada podemos interpretar de la siguiente manera:





-  Dentro del 100% de muestras que han dado un resultado positivo en la prueba de Blue carba el 0% de muestras han dado un resultado negativo en la prueba de Hodge modificado y el 100% han dado un resultado positivo en la prueba de Hodge modificado.
-  Del 100% de muestras que han dado un resultado negativo en la prueba de Blue carba el 95,8% de las muestras han dado un resultado negativo en la prueba de Hodge modificado y un 4,2% han dado un resultado positivo en la prueba de Hodge Modificado.
-  Del 100% de muestras que han dado un resultado positivo en la prueba de Hodge Modificado el 90% ha dado un resultado positivo en la prueba de Blue carba, el 10% ha dado un resultado negativo en la prueba de Blue Carba.
-  Del 100% de muestras que han dado un resultado negativo en la prueba de Hodge Modificado el 0% ha dado un resultado positivo en la prueba de Blue Carba y el 100% ha dado un resultado negativo en la prueba de Blue Carba.

Tabla 4 Chi Cuadrado

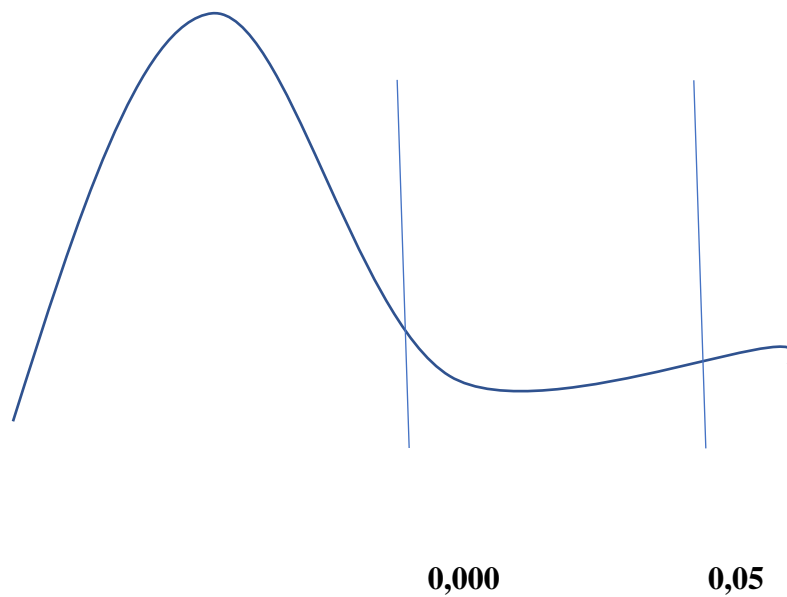
Pruebas de chi-cuadrado

		Valor	Df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	de ^a	28,463	1	,000		
Corrección de continuidad ^b	de	24,106	1	,000		
Razón de verosimilitud		32,171	1	,000		
Prueba exacta de Fisher					,000	,000
Asociación lineal por lineal		27,600	1	,000		
N de casos válidos		33				

Por tanto, el valor de chi cuadrado calculado es de 28,463, los grados de libertad de 1 y la significación asintótica bilateral de 0,000, realizando el esquema con un nivel de significancia de 0,05 tenemos que el valor de

la significación asintótica está por debajo de 0,05 o ubicado a su izquierda por lo que se acepta la hipótesis alterna.

Gráfico 5 Nivel de Significancia



Fuente: Elaboración propia

Dicho de otra forma, se calcula los grados de libertad de la siguiente manera:

$$GL = (h - 1)(k - 1)$$

$$GL = (2-1)(2-1)$$

$$GL = 1*1$$

$$GL = 1$$

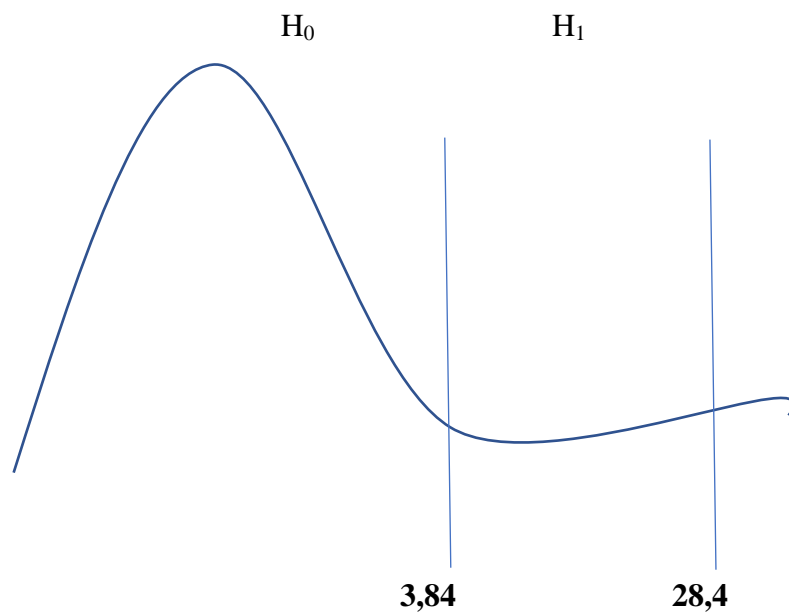
Por tanto, los grados de libertad tiene un valor de 1, con un nivel de significancia del 95% y un alfa de 0,05 ($\alpha = 0.05$ ($1 - 0.95 = 0.05$)), el valor de chi cuadrado tabulado es de 3,84 y siguiendo la regla de decisión tenemos:

$Xc^2 > Xt^2 \rightarrow H1: (Son\ dependientes)$

$Xc^2 < Xt^2 \rightarrow H0: (Son\ independientes)$

El valor de chi cuadrado calculado es de 28,463 (ver anexos 4) y el valor de chi cuadrado tabulado es de 3,84, por tanto, el valor de chi cuadrado calculado es mayor que el valor de chi cuadrado tabulado lo que significa que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna la cual dice que los resultados de la prueba de Blue Carba son dependientes o están relacionados con los resultados del test de Hodge Modificado.

Gráfico 6 Chi Cuadrado



Fuente: Elaboración propia

14.5. Cálculo de Sensibilidad

Tanto para calcular la sensibilidad como la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos, primero se estableció los valores correspondientes a verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y negativos, para que con estos datos se pudieran reemplazar en las diferentes fórmulas establecidas para los cálculos.

Se analizaron un total de 33 muestras por la técnica de Hodge Modificado de las cuales 10 dieron positivas para carbapenemasas ya sea metalobetalactamasas o carbapenemasas tipo KPC y 23 muestras dieron negativo para carbapenemasas.

Las mismas muestras se analizaron con la técnica de Blue carba de las cuales 9 muestras dieron positivas para carbapenemasas ya sea metalobetalactamasas o carbapenemasas tipo KPC y 24 muestras dieron negativo para carbapenemasas.

Las 33 muestras se analizaron por la técnica de Blue Carba, de las 10 muestras que dieron positivas en la técnica de Hodge modificado, que evidencia la presencia de una carbapenemasa, según la prueba de Blue Carba 9 muestras dieron positivo siendo los verdaderos positivos **VP**.

De las 10 muestras que presentan la característica de poseer una carbapenemsasa 1 muestra dio negativo por lo que representa los falsos negativos **FN**.

De las 23 muestras que no presentan la característica de poseer una carbapenemasa según el test de Hodge Modificado ninguna dio resultado positivo que representa los falsos positivos **FP**.

De las 23 muestras que no presentan la característica de poseer una carbapenemsa todas dieron negativo que son los verdaderos negativos **VN**.

Entonces tenemos:

VP= 9

FN = 1

FP= 0

VN = 23

Para calcular la sensibilidad tenemos la siguiente fórmula:

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

$$S = \frac{9}{9 + 1}$$

$$S = \frac{9}{10}$$

$$S = 90\%$$

Por tanto, tenemos una sensibilidad del 90% tomando en cuenta que la sensibilidad nos permite conocer qué probabilidad hay de que la prueba dé resultado positivo para alguien que presenta la característica. Dicho de otro modo, de todas las muestras que tienen la característica de poseer una carbapenemasa, qué proporción dará resultado positivo, Si obtenemos 90%, entonces la sensibilidad es bastante buena.

Las pruebas con una buena capacidad de detección poseen una alta sensibilidad porque te permiten registrar a todos aquellos que presentan la característica. Además, las pruebas con gran sensibilidad son muy útiles para descartar enfermedades o características si dan resultado negativo en la prueba.

En este caso la técnica de Blue Carba tiene una sensibilidad del 90% para la detección de carbapenemasas de tipo KPC y metalobetalactamasas, dicho de otra manera, de 10 muestras sometidas a la técnica de Blue Carba 9 son detectadas.

14.6. Cálculo de Especificidad:

$$\mathbf{VP= 9}$$

$$\mathbf{FN = 1}$$

$$\mathbf{FP= 0}$$

$$\mathbf{VN = 23}$$

Para calcular la especificidad tenemos la siguiente formula:

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

$$\mathbf{E = \frac{23}{0 + 23}}$$

$$\mathbf{E = \frac{23}{23}}$$

$$\mathbf{E = 100\%}$$

Por tanto, tenemos una especificidad del 100% tomando en cuenta que la especificidad nos permite saber qué probabilidad hay de que la prueba dé resultado negativo para alguien que no tiene la característica. En otras palabras, de todas las muestras sin la característica de poseer una carbapenemasa, qué proporción dará resultado negativo. Si obtenemos 100%, entonces la especificidad es bastante buena.

Las pruebas con una buena confirmación tienen una alta especificidad porque permiten que tu prueba sea específica y que no etiquete erróneamente a aquellos que no presentan la característica como si la tuvieran. Las pruebas con gran especificidad son útiles para descartar enfermedades o características si dan resultado positivo. ("SPIN": SPecificity-rule IN).

En este caso la técnica de Blue Carba tiene una especificidad del 100%, dicho de otra manera, de 10 muestras que poseen carbapenemasas procesadas por la técnica de Blue Carba en las 10 muestras se detecta la presencia de carbapenemasa.

14.7. Cálculo del Valor Predictivo Positivo:

$$\mathbf{VP= 9}$$

$$\mathbf{FN = 1}$$

$$\mathbf{FP= 0}$$

$$\mathbf{VN = 23}$$

Para calcular el valor predictivo positivo tenemos la siguiente fórmula:

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

$$\mathbf{VPP = \frac{9}{9 + 0}}$$

$$\mathbf{VPP = \frac{9}{9}}$$

$$\mathbf{VPP = 100\%}$$

Por tanto, tenemos un valor predictivo positivo del 100% tomando en cuenta que el valor predictivo positivo nos permite conocer qué probabilidad hay de que alguien tenga la característica si da resultado positivo en la prueba. Dicho de otro modo, de todas las cepas que dieron

resultado positivo en la prueba, qué proporción realmente tiene la característica. Si obtenemos 100% como valor predictivo positivo (VPP), ello significa que una cepa que dé resultado positivo en la prueba, tiene un 100% de probabilidad de tener realmente la característica de poseer una carbapenemasa.

14.8. Cálculo del Valor Predictivo Negativo:

$$\mathbf{VP= 9}$$

$$\mathbf{FN = 1}$$

$$\mathbf{FP= 0}$$

$$\mathbf{VN = 23}$$

Para calcular el valor predictivo negativo tenemos la siguiente formula:

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

$$\mathbf{VPN = \frac{23}{23 + 1}}$$

$$\mathbf{VPN = \frac{23}{24}}$$

$$\mathbf{VPN = 95,83\%}$$

Por tanto, tenemos un valor predictivo negativo del 95,83% tomando en cuenta que el valor predictivo negativo nos permite saber qué probabilidad hay de que alguien no tenga la característica si da resultado negativo en la prueba. En otras palabras, de todas las cepas que dieron resultado negativo en la prueba, qué proporción no tiene realmente la característica. Si obtenemos 95,83% como valor predictivo negativo (VPN), ello significa que una cepa que dé resultado negativo en la prueba, tiene un 95,83% de probabilidad de no tener la característica de poseer una carbapenemasa.

14.9. Cálculo de la Precisión:

$$\mathbf{VP= 9}$$

$$\mathbf{FN = 1}$$

$$\mathbf{FP= 0}$$

$$\mathbf{VN = 23}$$

Para calcular la precisión tenemos la siguiente formula:

$$\mathbf{P} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

$$\mathbf{P} = \frac{9+23}{9+23+0+1}$$

$$\mathbf{P} = \frac{32}{33}$$

$$\mathbf{P} = 96,9\%$$

La precisión o eficiencia es el porcentaje de los resultados de la prueba que han sido identificados correctamente. Por tanto, el 96,9% de los resultados han sido correctamente identificados.

Tabla 5 Resumen de valores obtenidos

Sensibilidad	90%
Especificidad	100%
Valor predictivo positivo	100%
Valor predictivo negativo	95,83%
Precisión	96,9%

15. Discusión

- ☞ En el presente estudio se validó la técnica de Blue Carba en la ciudad de La Paz Bolivia, se pudo evidenciar la frecuencia con la que se encuentra microorganismos que poseen carbapenemasas y que género y especie son más comunes, al mismo tiempo se pudo observar que el Test de Hodge Modificado da buenos resultados en cuanto a la identificación de carbapenemasas y como fue de gran ayuda en la validación del método.
- ☞ El protocolo establecido por Instituto Dr Malbrán establece que el azul de Bromotimol debe estar a una concentración de 0,04%, el cual ya viene preparado comercialmente, sin embargo en este estudio se pudo

evidenciar que al adquirir el producto no se obtenía una estabilidad del reactivo y cuando se inoculaba la cepa en estudio el viraje de color en función del pH no era muy evidente, es decir, no se podía observar un amarillo sino un color naranja amarillento, como tampoco un color verde azulado.

- ☞ Es por eso que para este estudio se utilizó azul de Bromotimol en polvo y se preparó a la concentración indicada con agua destilada ultrapurificada teniendo una estabilidad del reactivo y pudiéndose evidenciar el viraje de color de una manera más precisa obteniendo un color amarillo y un color azul en el caso de las carbapenemasas tipo KPC.
- ☞ Por otra parte, según las recomendaciones del Instituto Dr Malbrán, la incubación en la técnica de Blue Carba debía realizarse en agitación, sin embargo, en este estudio se realizó la incubación y cada 15 minutos se agitó con ayuda del vórtex. Ya que si no se realizaba la agitación se podía observar dos colores en el tubo eppendorff uno en la parte inferior de color amarillo y otro en la parte superior de color verde.
- ☞ En este estudio se utilizaron cepas provenientes de muestras de pacientes ambulatorios entre muestras de orina, secreciones y heridas purulentas, sin embargo, no se obtuvieron muestras provenientes de pacientes hospitalizados y eso se reflejó en la cantidad de muestras utilizadas que poseían carbapenemasas ya que en un paciente

ambulatorio es menos frecuente encontrar este tipo de microorganismos, no así en pacientes intrahospitalarios.

- ☞ De la misma manera, se pudo evidenciar que la carbapenemasa tipo KPC no fue muy frecuente y tampoco el microorganismo *Klebsiella pneumoniae*, que se conoce que es la principal portadora de este mecanismo, como en el caso del estudio de la Universidad Nacional de Nordeste donde se realizó el estudio de `` Detección de cepas productoras de carbapenemasas KPC en enterobacterias en el hospital San Bernardo de Salta`` donde el 92,5% de KPC fue encontrado en *Klebsiella pneumoniae*.
- ☞ Como las muestras provinieron de pacientes ambulatorios los microorganismos más aislados fueron *E coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* respectivamente, de los cuales *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* presentaron mayor cantidad de carbapenemasa al igual que en el estudio de Gastelo y Cols `` Carbapenemasas en bacterias gram negativas no fermentadores aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque`` se identificó 23 cepas productoras de carbapenemasas procedentes de *Acinetobacter baumannii* que representó el 42% y 24 cepas productoras de carbapenemasas procedentes de *Pseudomonas aeruginosa* que representó el 58% del total de cepas estudiadas. Es así como en este estudio y en

otros estos microorganismos son aislados con mayor frecuencia cuando se busca carbapenemasas.

☞ Por otra parte, en este estudio se utilizó para el muestreo tres estratos ya que se utilizó el muestreo aleatorio estratificado para muestras finitas, dentro de los tres estratos el tercero fueron muestras que presentaban sensibilidad disminuida como ser betalactamasas de espectro extendido (BLEE), la razón por la que se tomó este estrato es porque como se menciona en varios estudios como por ejemplo el realizado en la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca ``Carbapenemasas, mecanismos de resistencia y métodos fenotípicos de detección`` donde menciona que durante los últimos años, siendo más específicos desde 2015 hubo un aumento en la asociación de BLEE`s con carbapenemasas, es decir, un microorganismo ya no solo presentaba el mecanismo BLEE sino también presentaba el mecanismo carbapenemasa. La asociación más frecuente se vio en OXA-48 y en KPC.

☞ Es así como en un laboratorio de Bacteriología de rutina se busca el mecanismo BLEE no así el mecanismo carbapenemasa, entonces se puede tratar de microorganismos BLEE asociados a carbapenemasas que no han sido detectados, es así que se consideró este estrato y se pudo observar que los microorganismos BLEE dieron negativo a Blue Carba y a excepción de uno que dio un resultado inválido pero negativo en la aproximación de discos y el test de Hodge Modificado, tomándolo como

un resultado negativo ya que como se recomienda se volvió a realizar la prueba obteniendo un resultado negativo.

☞ Los resultados obtenidos en este estudio se basaron en resultado positivo y resultado negativo, sin embargo al momento de realizar la validación del protocolo de procedimiento se tomaron en cuenta factores como el medio primario para realizar la técnica, ya que se pudo evidenciar que una cepa tomada de agar Nutritivo, Muller Hinton y/o Sangre no presentaba ninguna alteración al momento de ser inoculada en los tubos para Blue Carba, sin embargo si la cepa era tomada de un agar Mac Conkey está al ser inoculada presentaba una alteración en el color del tubo de reacción virándolo a un color café no pudiendo evidenciarse el color final, por tanto dando un resultado invalido, de la misma manera ocurría con *Pseudomonas* que producían pigmento ya que el propio color de la colonia alteraba el tubo de reacción.

☞ En cuanto al test de Hodge modificado en este estudio se utilizó la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* teniendo buenos resultados, al mismo tiempo se utilizó el disco de meropenem en vez de imipenem, los resultados obtenidos fueron claros al momento de la interpretación obteniendo la hoja en forma de trébol de forma clara, sin embargo según la CLSI se recomienda utilizar agar Mac Conkey en microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* para tener un mejor resultado. En este caso no se utilizó este medio, pero no se tuvo ningún inconveniente.

- ☞ La técnica de Blue Carba permitió detectar 9 carbapenemasas de 33 cepas en estudio, los controles positivos y negativos fueron los mismos que se utilizaron para la técnica de Hodge Modificado. En el caso de los resultados de Hodge Modificado se detectaron 10 cepas carbapenemasas de 33 cepas en estudio. Hubo una variación en cuanto a una cepa la cual dio un falso negativo en la técnica de Blue Carba ya que esa cepa fue sometida a la técnica de aproximación de discos dando un resultado positivo. Las razones por las que dio un resultado negativo probablemente se deben a que pudo haberse inoculado insuficiente cantidad de muestra o bien la cepa ya había envejecido.
- ☞ Finalmente se pudo evidenciar estadísticamente que la técnica de Blue Carba es sensible y específica para la detección de carbapenemasas de tipo KPC y metalobetalactamasas obteniendo resultados similares a los del test de Hodge Modificado, en este estudio se detectó 9 carbapenemasas de 33 muestras y el test de Hodge modificado detectó 10 carbapenemasas de 33 muestras, muy similar al estudio realizado por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en Lambayeque Perú donde se detectaron 24 carbapenemasas por la técnica de Blue Carba y 23 carbapenemasas por la técnica de Hodge Modificado.
- ☞ De la misma manera se puede contrastar con el estudio llevado a cabo por Muñoz y Colaboradores en 2017 donde se compararon los diferentes métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas teniendo como

resultados una sensibilidad y especificidad de 84,6% y 87,5% respectivamente para Blue Carba. Sin embargo, en este estudio con todas las modificaciones realizadas al protocolo del Instituto del Dr. Malbrán y comparando con el Gold estándar, Hodge Modificado, lo que no se comparó en el estudio de Muñoz. La sensibilidad y especificidad de la técnica de Blue Carba fue de 90% y 100% respectivamente. Por tanto, se puede observar que estas aumentaron con respecto al año 2017 y las modificaciones realizadas fueron productivas.

16. Conclusiones

- ❖ En este estudio se logró validar la técnica de Blue Carba para la detección de carbapenemasas en bacilos fermentadores y no fermentadores ya que se obtuvo cepas de ambos grupos procedentes de muestras de pacientes ambulatorios que acudieron al Instituto SELADIS en el periodo de tiempo de Julio a Diciembre del 2020. Se obtuvieron bacilos fermentadores como *E coli* que fue con más frecuencia aislada y también se aisló *Pseudomonas aeruginosa* en el grupo de no fermentadores.
- ❖ Se demostró estadísticamente que la técnica de Blue Carba detecta carbapenemasas en bacilos fermentadores y no fermentadores al igual que lo hace la técnica de Hodge Modificado, esto gracias a la herramienta estadística de chi cuadrado, la cual determina si dos

variables están relacionadas o no, en este caso el valor de chi cuadrado demostró que las dos técnicas estaban relacionadas y al haber trabajado con un nivel de confianza del 95% podemos concluir que los resultados obtenidos son estadísticamente significativos y confiables.

- ❖ Como producto de este estudio se elaboró un protocolo de procedimientos para la técnica de Blue Carba acondicionado al país, al departamento y al laboratorio en el cual se ha trabajado. Para dicho protocolo se tomó como base el protocolo utilizado en Argentina del Instituto del Dr Malbrán, realizando modificaciones en cuanto a la preparación de los reactivos y a la forma de incubación. Dicho protocolo se lo puede ver en Anexo 3.
- ❖ Comparando los resultados de ambas técnicas más los valores de sensibilidad y especificidad de la técnica se puede concluir que son similares y es una buena herramienta al momento de realizar la detección de carbapenemasas, por ser fácil, rápida y con un costo bajo.
- ❖ Los resultados obtenidos fueron tabulados y se procedió al cálculo del valor predictivo positivo el cual fue de 100% lo que significa que una cepa que dé resultado positivo en la prueba, tiene un 100% de probabilidad de tener realmente la característica de poseer una carbapenemasa. Y el valor predictivo negativo fue de 95,83% que significa que una cepa que dé resultado negativo en la prueba, tiene un

95,83% de probabilidad de no tener la característica de poseer una carbapenemasa.

- ❖ De la misma manera con los resultados se puede calcular la especificidad que fue del 100% que significa que de 10 muestras que poseen carbapenemasas procesadas por la técnica de Blue Carba en las 10 muestras se detecta la presencia de carbapenemasa y se obtuvo una sensibilidad del 90% que significa que de 10 muestras procesadas por la técnica de Blue Carba 9 son detectadas con carbapenemasas.

17. Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios con mayor cantidad de muestras tomando en cuenta varios centros hospitalarios para poder así obtener la prevalencia de carbapenemasas en Bolivia.
- Se recomienda realizar un estudio en la preparación del reactivo de Azul de Bromotimol y utilizar NaOH 0,1N, en vez de utilizar agua destilada y determinar la estabilidad de dicho reactivo.
- Se recomienda realizar la incubación en un thermoshaker a 37°C y en constante agitación para poder calcular los tiempos en que se presenta el viraje de color de acuerdo a la carbapenemasa encontrada ya que si no se incuba en agitación o no se agita cada 15 min el viraje de

color no se puede evidenciar debido a que se forma un precipitado amarillo.

18. Referencias bibliográficas

Huato Pacheco, Alejandra Grace Hidalgo Alvear, Bryan Marcelo. (2017). Prevalencia de bacilos gram negativos resistentes a carbapenémicos de pacientes hospitalizados en el Hospital General Enrique Garcés de Quito en el año 2017. *Prevalencia de bacilos gram negativos resistentes a carbapenémicos de pacientes hospitalizados en el Hospital General Enrique Garcés de Quito en el año 2017*. QUITO, ECUADOR: Quito: UCE.

Acosta, R. M. (2016). Bacterias gram negativas no fermentadoras productoras de carbapenemasas, aisladas de los servicios de cuidadoscríticos UCI – UCIN y emergencias, Hospital RegionalLambayeque - Diciembre 2014 - Julio 2015. Lambayaque, Peru.

Antequera Alba, Saéz Carmen, Ciudad Marianela, Garía Maria José, Moyano Berta, Rodriguez Pablo, Roy Emilia, Aguilera María, Alonso Ester, Cárdenas Maria José, Castro Sara, Domingo Diego, Barrios Ana. (2020). Epidemiología, Tratamiento y mortalidad en pacientes infectados por enterobacterias productoras de carbapenemasas: estudio retrospectivo. *Revista Chilena de infectología* , 295-303.

Bolivar. (2017). azul de bromotimol, propiedades, preparacion y uso. carabobo.

Britania. (2020). *britannialab.com*. Obtenido de britannialab.com: www.britnialab.com

- Cabrera, N. (Septiembre de 2020). Métodos de detección rápida de carbapenemasas en enterobacteriaceae. Tenerife, España.
- Camara, I. (2020). Carbapenemasa nueva Delhi tipo 1 (NDM): Descripción fenotípica y epidemiológica. Lima, Perú.
- Carlos, M. (Abril de 2021). Alerta epidemiológica emergencia de enterobacterias doble productoras de carbapenemasa. Buenos Aires, Argentina.
- Carroll, Morse, Mietzner, Miller, Jawetz, Melnick. (2016). *microbiología médica*. México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.
- Colls, P. J. (2015). Detección rápida de carbapenemasas directamente de placas de cultivo. *Detección rápida de carbapenemasas directamente de placas de cultivo*. Argentina.
- Colls, P. J. (s.f.). Detección rápida de carbapenemasas directamente de placas de cultivo. *Detección rápida de carbapenemasas directamente de placas de cultivo*. Argentina.
- De Sanctis Gonzalo, Ferraris Augusto, Ducatzenzeiler Laura, Benso José, Fernández Lucas, Angriman Federico. (2018). Factores predictores de mortalidad intrahospitalaria en pacientes adultos con infecciones por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos y colistín: un estudio de cohorte retrospectivo. *Revista chilena de Infectología*, 239-245.
- Eddie Angles-Yanqui,¹ Jorge Huaranga-Marcelo,² Rosa Sacsquispe-Contreras, and Luis Pampa-Espinoza. (2020). Situación epidemiológica de carbapenemasas en Perú. *Revista Panamericana de la Salud*, 44-61.

Fresnadillo, García , García Sánchez. (2010). *www.elsevier.com*. Obtenido de *www.elsevier.com*: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-los-carbapenems-disponibles-propiedades-diferencias-S0213005X10700318>

García. (abril de 2019). bioestadística. la paz, bolivia.

García. (junio de 2018). carbapenemasas, mecanismos de resistencia y métodos fenotípicos de detección . salamanca.

Gómez, Pérezoso, Bermúdez, Morales. (2015). carbapenemasas KPC en enterobacterias aisladas en un hospital de maracaibo, venezuela. MARACAIBO, VENEZUELA.

Gómez, Gamboa, Perozo, Lugo, Bermúdez- González, Zabala, Morales. (19 de julio de 2014). Carbapenemasas KPC en Enterobacteriaceae aisladas en un Hospital de Maracaibo, Venezuela. maracaibo, venezuela.

Lipari Flavio, Hernández Daniela, Vilaró Mario, Caeiro Juan, Alex Héctor. (8 de junio de 2020). Caracterización clínica, epidemiológica y microbiológica de bacteriemiias producidas por enterobacterias resistentes a carbapenemas en un hospital universitario de Córdoba, Argentina. *Revista Chilena de Infectología* , 362-370.

March-Rosselló, G. A. (5 de diciembre de 2016). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos*. valladolid, españa: elsevier.

- Mediavilla Concepción, Saínz Rodríguez Rocio, Valverde Miriam, De toro Inmaculada, Bermudez Pilar, Palop Begoña. (2017). Evaluación de un ensayo inmunocromatográfico para la detección de carbapenemasa OXA 48. *Especialidades Quimoter*, 45-49.
- Merkt M, Bonesi L , Zanella M, Sucari A, Pennini. (2017). UTILIDAD DEL MÉTODO BLUE CARBA PARA REDUCIR EL TIEMPO DE INFORME DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS EN HISOPADOS RECTALES. Argentina.
- Molin. (2016). Detección Fenotípica de Carbapenemasas en Pseudomonas aeruginosa en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. *Detección Fenotípica de Carbapenemasas en Pseudomonas aeruginosa en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013*. ASUNCION , PARAGUAY.
- Monge, K. M. (2014). Carbapenemicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista Medica de costa rica y centroamerica LXX*, 599-605.
- Muñoz, Zumarán, González,. (15 de junio de 2017). Evaluación de test rápidos y diseño de una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos. *Evaluación de test rápidos y diseño de una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos*. santiago de chile, chile: Rev Chilena Infectol.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. (2017). Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

Procop, Church, Hall, Janda, Koneman, Woods, Schreckenberger. (2018). *diagnostico microbiologico* . barcelona: wolters kluwer.

Quiñones, D. (2017). Resistencia microbiana:evolución y perspectivas actuales ante el enfoque `` una salud``. *Instituto de medicina tropical Pedro Kouri*.

R, V. (2016). PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIBIOTICA.

RedLabRa. (2 de Febrero de 2021). Detección fenotípica de enterobacterias productoras de carbapenemasas y pruebas de hidrólisis antibiotica e inmunocromatográfica. Guadalajara, México.

Sakurada. (2016). Protocolo simplificado de carba np para la detecion de carbapenemasas directamente de cultivos . *revista chilena de infectologia*, 53.

Salinas Iván, Saldaña José Antonio, Guevara José manuel, Gonzáles Edgar. (2020). Utilidad de la citometria de flujo para la detección de Pseudomonas aeruginosa productoras de metalobetalactamasas. *Revista Peruana de Medicina experimental y salud pública*, 374.

Sanchez Magda, Josa Diego. (2 de Septiembre de 2020). Detección rápida de enterobacterias productoras de carbapenemasas en hisopados rectales de pacientes neonatos colonizados. *Infectio*, 89-92.

Viña, I. P. (2016). Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología.

Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología. Madrid,
España.

19. Anexos

Anexo 1 Reactivos Hodge Modificado

Preparación de medios de cultivo.

Para el estudio se utilizaron varios medios de cultivo ya sea para aislamiento primario como para la técnica del Gold estándar en sí, dichos medios de cultivo se prepararon en el laboratorio de bacteriología y micología del instituto SELADIS de la siguiente manera:

Agar Mac Conkey (OXOID)

Se pesaron 10g para 200ml de medio de cultivo el cual se lo llevo a la autoclave por 20 min a 121°C y 1 atm de presión, se plaquearon en cajas Petri pequeñas para el aislamiento primario de las muestras.

Agar Nutritivo (OXOID)

Se pesaron 5,6g para 200ml de medio cultivo el cual se lo llevo a la autoclave por 20 min a 121°C y 1 atm de presión, se plaqueó en cajas Petri medianas para el aislamiento previo a la técnica de Blue Carba y Hodge Modificado.

Agar Muller Hinton (OXOID)

Se pesaron 7,6g para 200ml de medio de cultivo el cual se lo llevo a la autoclave por 20 min a 121°C y 1 atm de presión, se plaqueó en cajas Petri grandes siguiendo las recomendaciones de las CLSI para este medio el cual debe tener 4 mm de profundidad, no tener vapores de condensación entre otros. Se utilizó para el antibiograma tanto de selección como para la sinergia de discos y el Test de Hodge modificado.

Agar profundo (OXOID)

Se pesaron 5,6g para 200ml de medio de cultivo el cual se lo llevo a la autoclave por 20 min a 121°C y 1 atm de presión, se utilizó para conservar las cepas utilizadas en este estudio.

Anexos 2 Tabulación de datos

Muestras Blue Carba

Muestra	Microorganism o	Tubo A	Tubo B	Blue Carba	Hodge Modifica do	Mecanismo
Positivo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BAA-1705	Azul	Amarillo	+	+	KPC
Negativo	<i>E. coli</i>	Verde	Verde	-	-	S/ mecanismo
1	<i>Pseudomonas mallei</i>	Amarillo	Amarillo	-	+	MLB
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Verde	Verde	-	-	<21S/M

5	<i>E. coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
6	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	<21S/M
7	<i>E coli</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB
8	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	<21S/M
9	<i>Acinetobacter baumanii</i>	Azul	Verde	+	+	KPC
10	<i>Pseudomonas putida</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB
11	<i>Acinetobacter baumanii</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Verde	Verde	-	-	<21S/M
13	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	<21S/M
14	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
16	<i>E coli</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB

17	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
18	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
19	<i>E coli</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB
20	<i>E coli</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB
21	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
22	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
23	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
24	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
25	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
26	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Verde	Verde	-	-	<21S/M
27	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	<21 S/M
28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Verde	Amarillo	+	+	MLB
29	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE

30	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
31	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
32	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE
33	<i>E coli</i>	Verde	Verde	-	-	BLEE

Anexos 3 **Protocolo de procedimiento de la Técnica Blue Carba**

1. Preparación de Reactivos

- e) Pesar 40mg de Azul de Bromotimol y disolver en 100ml de agua destilada ultrapurificada, medir el pH.
- f) Pesar 1,6mg de $ZnSO_4$ y disolver en 100ml de azul de Bromotimol.
- g) Ajustar el pH a 7 utilizando NaOH 0,1N y HCl 0,1N (Sol. A).
- h) Pesar 60mg de imipenem/cilastatina y disolver en 10ml de la solución A previamente preparada (Sol B).

2. Procedimiento

- f) Identificar dos tubos eppendorff como A y B.
- g) Inocular 100ul de la solución A en el tubo A y 100ul de la solución B en el tubo B.
- h) Inocular 5ul de colonia en estudio en cada tubo.
- i) Homogenizar los tubos hasta que la colonia se disuelva.
- j) Incubar a 37°C por 2hrs con agitación cada 15 min.

3. Resultados

- Es un resultado positivo si el tubo A presenta una coloración verde o azul y el tubo B amarillo

- Es un resultado negativo si el tubo A y el tubo B presentan una coloración verde.

- Es un resultado inválido si el tubo A presenta una coloración amarilla y el tubo B amarilla o verde.

TABLA 3-Distribución Chi Cuadrado χ^2

P = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado, v = Grados de Libertad

v/p	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
1	10,8274	9,1404	7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742	0,8735	0,7083	0,5707	0,4540
2	13,8150	11,9827	10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079	2,0996	1,8326	1,5970	1,3863
3	16,2660	14,3202	12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649	3,2831	2,9462	2,6430	2,3660
4	18,4602	16,4238	14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784	4,4377	4,0446	3,6871	3,3567
5	20,5147	18,3854	16,7406	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644	5,5731	5,1319	4,7278	4,3515
6	22,4575	20,2491	18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311	6,6948	6,2108	5,7652	5,3481
7	24,3213	22,0402	20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0770	10,7479	9,8032	9,0771	8,3834	7,8061	7,2832	6,8000	6,3458
8	26,1239	23,7742	21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245	8,9094	8,3595	7,8325	7,3441
9	27,8767	25,4625	23,5893	21,6690	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564	10,0060	9,4136	8,8632	8,3428
10	29,5879	27,1119	25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	15,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807	11,0971	10,4732	9,8922	9,3418
11	31,2635	28,7291	26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987	12,1836	11,5298	10,9199	10,3410
12	32,9092	30,3182	28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111	13,2661	12,8038	11,9463	11,3403
13	34,5274	31,8830	29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9289	15,1187	14,3451	13,6356	12,9717	12,3998
14	36,1239	33,4262	31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4862	18,1508	17,1169	16,2221	15,4209	14,6853	13,9961	13,3993
15	37,6978	34,9494	32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2481	17,3217	16,4940	15,7332	15,0197	14,3889
16	39,2518	36,4555	34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179	17,5646	16,7795	16,0425	15,3885
17	40,7911	37,9462	35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7890	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110	18,6330	17,8244	17,0646	16,3882
18	42,3119	39,4220	37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6040	20,6014	19,6993	18,8679	18,0860	17,3879
19	43,8194	40,8847	38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891	20,7638	19,9102	19,1069	18,3376
20	45,3142	42,3358	39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745	21,8265	20,9514	20,1272	19,3374
21	46,7963	43,7749	41,4009	38,9322	35,4789	32,6706	29,6151	27,6620	26,1711	24,9348	23,8578	22,8876	21,9915	21,1470	20,3372
22	48,2676	45,2041	42,7957	40,2894	36,7807	33,9245	30,8133	28,8224	27,3015	26,0393	24,9390	23,9473	23,0307	22,1663	21,3370
23	49,7276	46,6231	44,1814	41,6383	38,0756	35,1725	32,0069	29,9792	28,4288	27,1483	26,0184	25,0055	24,0689	23,1852	22,3369
24	51,1790	48,0336	45,5584	42,9798	39,3641	36,4150	33,1962	31,1325	29,5533	28,2412	27,0960	26,0625	25,1064	24,2037	23,3367
25	52,6187	49,4351	46,9280	44,3140	40,6465	37,6525	34,3816	32,2825	30,6752	29,3388	28,1719	27,1183	26,1430	25,2218	24,3366
26	54,0511	50,8291	48,2898	45,6416	41,9231	38,8851	35,5632	33,4295	31,7946	30,4346	29,2463	28,1730	27,1789	26,2395	25,3365
27	55,4751	52,2152	49,6450	46,9628	43,1945	40,1133	36,7412	34,5736	32,9117	31,5284	30,3193	29,2266	28,2141	27,2569	26,3363
28	56,8918	53,5939	50,9936	48,2782	44,4608	41,3372	37,9159	35,7150	34,0266	32,6285	31,3909	30,2791	29,2486	28,2740	27,3362
29	58,3006	54,9662	52,3355	49,5878	45,7223	42,5569	39,0875	36,8538	35,1394	33,7109	32,4612	31,3308	30,2825	29,2908	28,3361

Anexos 5 Reactivos

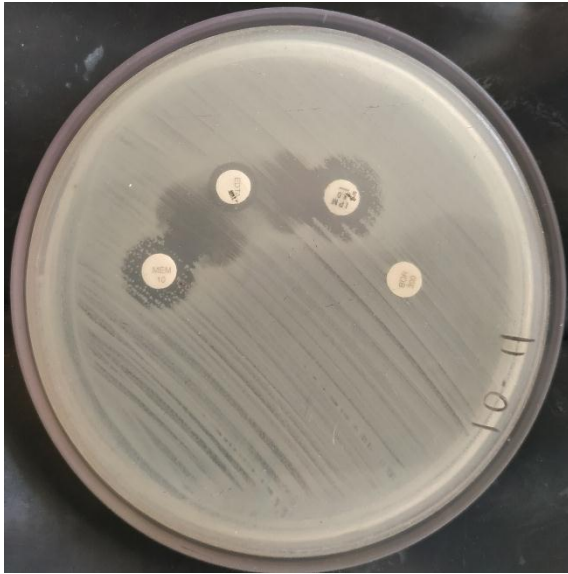
Azul de Bromotimol



Imipenem/cilastatina



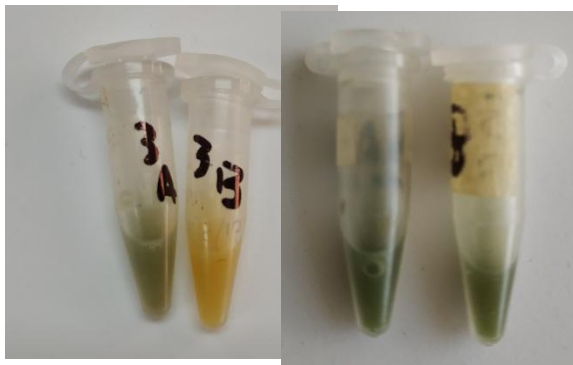
Aproximación de discos



Test de Blue Carba

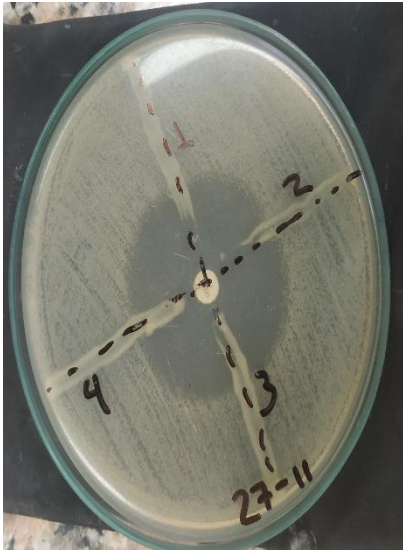
Positivo

Negativo

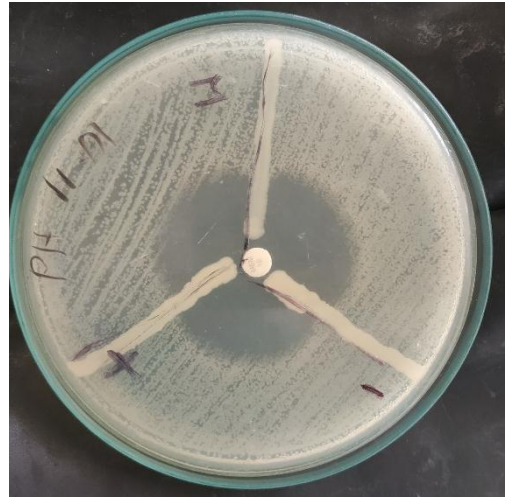


Test de Hodge Modificado

Negativo



Positivo



Anexos 6

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo..... con C.I..... con número de teléfono..... he sido invitado a participar de la investigación que lleva por nombre “ VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE BLUE CARBA PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS ” entiendo que la muestra que se me ha tomado y/o he entregado al laboratorio de Bacteriología y Micología del instituto SELADIS será proceda de acuerdo las técnicas establecidas y el microorganismo hallado en dicha muestra será utilizado para el presente estudio. He sido informado de que los riesgos son nulos además también he sido informado acerca de lo que pasara con mi muestra, he leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin consecuencia alguna y que se me proporcionara una copia del documento.

Firma del participante y/o testigo

Fecha