

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS CARRERA DE BIOQUÍMICA INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD "Dr. Nestor Morales Villazón"



"VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE DISCOS DE ÁCIDO FENIL BORÓNICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA ENZIMÁTICOS" CARBAPENEMASA TIPO KPC (Klebsiella preumoniae)

CARBAPENEMASA TIPO KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemasa*) y AmpC (Cefamicinasa)

Elaborado por:

Univ. Rodrigo Vilela López

(TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA)

LA PAZ – BOLIVIA 2019



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS CARRERA DE BIOQUÍMICA INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD "Dr. Nestor Morales Villazón"



"VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE PREPARACIÓN DE DISCOS DE ÁCIDO FENIL BORÓNICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA ENZIMÁTICOS" CARBAPENEMASA TIPO KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemasa) y AmpC (Cefamicinasa)

Elaborado por:

Univ. Rodrigo Vilela López

Asesora:

Dra. Esther Paula Damiani Moisés

Co-asesora:

Dra. Ylosva Helen Copa Peña

(TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA)

LA PAZ – BOLIVIA 2019

DEDICATORIA.

A mis amados padres: Nelly y Lytton, gracias mama por confiar en mí y enseñarme a no rendirme nunca y a ti papa por todas las enseñanzas que me diste.

A mi hermano Sayco que sin su ayuda no lo hubiera podido lograr.

A mi amada esposa: Guisela, gracias por confiar en mi ayudarme en todo momento y no abandonarme en los momentos que más necesitaba Te Amo!!!!!

A mi amado hijo que es el pilar fundamental que tengo para no rendirme te amo mucho Andre

AGRADECIMIENTOS.

- > A Dios por haberme dado esta oportunidad que tengo
- H Instituto de Nacional de Laboratorios en salud (INLASA), por haberme acogido en sus instalaciones y proporcionarme todos los recursos técnicos para la elaboración del mismo y por la experiencia adquirida.
- > A la Dra. Helen Copa, por su dedicación, apoyo incondicional y amistad en la realización del presente trabajo.
- A la Dra. Esther Damiani, por su ayuda incondicional y por permitirme ingresar a tan prestigiosa institución
- 🕨 Al Dr. Bernardo Torrico Arzady por ayudarme en la realización del presente trabajo.
- A la Dra. Erica Ruiz por el gran apoyo que me brindo y a todos los del laboratorio de bacteriología del NLASA por ese gran apoyo que me dieron

Índice

Naturaleza del Proyecto	1
1 Descripción	1
2 Justificación	3
3 Marco institucional	4
3.1 Validación	4
3.1.1Validacion Primaria	4
3.1.2 Validación Secundaria o Verificación	4
3.1.3 Tipos de métodos y grado de validación según el grado de normalización	5
3.1.4 Tipos de métodos definidos por la entidad nacional de acreditación - España (ENAC	J5
3.1.5 situaciones y obligaciones en la validación/verificación	6
3.1.6 Particularidades de los métodos microbiológicos. Características de la medición microbiológica	7
3.2 Ácido Fenil Borónico (APB)	8
3.3 Resistencia Antibiótica	8
3.5 Resistencia Antibiótica bombas de Eflujo	9
3.5 Resistencia Antibiótica por impermeabilidad	9
3.6 Resistencia Antibiótica por Alteraciones del sitio de acción	9
3.7 Resistencia Antibiótica Enzimática	9
3.8 β-lactamasas	10
3.9 Cefamicinasa AmpC	11
3.9.1 Sistema de expresión y represión del gen <i>AmpC</i>	12
3.10 Klebsiella pneumoniae carbapenemasa (KPC)	14
3.10.1 Gen <i>bla_{KPC}</i>	17
4 Operacionalización de Variables	21
5 Fines	22
6 Objetivos	22
6.1 Objetivo general	22
6.2 Objetivos Específicos	22
7 Metas	23
8 Beneficiario	23

9 Productos	23
10 Localización	23
11 Métodos, Técnicas y Procedimientos	23
11.1 Materiales	23
11.2 Reactivos	24
11.3 Equipos	24
11.4 Preparación de los discos	25
11.5 Preparación de la Solución de Ácido Fenil Borónico e inoculación en los disc	os25
11.6 Procedimiento de inoculación de las cepas y posicionamiento de discos	25
11.7 Interpretación de los resultados	26
11.8 Resultados	27
11.8.1 Resultado de Amp C y KPC	27
11.8.2 Resultados de Amp C y KPC sin considerar a Pseudomonas aeruginosa l	KPC28
11.8.3 Resultados AmpC	29
10.8.4 Resultados KPC	30
11.8.5 Resultados KPC teniendo en cuenta la recomendación del Instituto Carlos	s Malbram31
11.9 Discusión	32
12 Objetivos y metas alcanzadas	33
13 Conclusiones y recomendaciones	33
13.1 Conclusiones	33
13.2 Recomendaciones	34
14 Bibliografía	36
ANEXOS	39
15.1 Preparación de Agar Mueller Hinton	40
15.2 Recuperación de cepas	41
15.3 Reporte de las réplicas realizadas	42
15.4 Formulas para determinar los valores estadísticos	43
15.5 Clasificación de β- lactamasas	44
15.6 Preparación de discos de Ácido Fenil Borónico	47
15.7 Validación de Discos de Ácido Fenil Borónico	49

Índice de Figuras

Figura1: Ácido Fenil Borónico	8
Figura: 2 Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos	10
Figura 3. Sistema de expresión y represión del gen <i>amp</i> C	.13
Figura 4: Distribución geográfica de los productores de KPC	.16
Figura 5 : Estructura del transposón Tn4401 y sus isoformas a-f. IRL	.18
Figura 6: Estructura de la variante 1a Argentina de la plataforma genética 1a descrita	en
China, $\Delta tnpA$ -Tn3	.20
Índice de Gráficos	
Grafica 1: Clasificación de los datos obtenidos de las cepas en estudio en la búsqueda	de
las enzimas Amp C y KPC en comparación con los Gold Stándard	
Grafica 2 : Clasificación de los datos obtenidos de las cepas en estudio en la búsqueda de enzima Amp C en comparación con el Gold Standard	
Grafica 3: Clasificación de los datos obtenidos de las cepas en estudio en la búsqueda de	
enzima KPC en comparación con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (G	
Standard)	30

Índice de tablas

Tabla 1: Interpretación de Resultados.	28
Tabla 2: Resultados del test diagnóstico de AmpC y KPC	28
Tabla 3: Resultados del test diagnóstico de Amp C y KPC sin considera aeruginosa KPC	
Tabla 4: Resultados del test diagnóstico de Amp C	29
Tabla 5: Resultados del test diagnóstico de KPC	30
Tabla 6: Resultados del test diagnóstico de KPC sin considerar a Pseud KPC	

RESUMEN

La resistencia antibiótica es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico.

En 1983 se informó que el Ácido Borónico es inhibidor reversible de las enzimas de clase C. Inesperadamente, se descubrió una inhibición inusual de los organismos que poseen KPC por el Ácido Fenil Borónico (APB).

El objetivo del presente estudio es Validar el método In House de preparación de discos de Ácido Fenil Borónico para la identificación de la cefamicinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).

Es importante que nuestro país tenga claro, cuales son los mecanismos de resistencia circulantes y para esto se tiene que crear distintos tipos de pruebas que ayude a determinar los mecanismos de resistencias y una de esas pruebas para determinar la presencia de las bacterias que producen las enzimas AmpC y KPC es la inhibición de las enzimas por la presencia de Ácido Fenil Borónico que se encuentra impregnado en un disco, esta es una de las pruebas que nos ayuda a determinar de forma fenotípica la presencia de las enzimas AmpC y KPC.

Los resultados obtenidos del estudio son Sensibilidad = 75% Especificidad = 83.3% Falsos positivos = 25 % Falsos negativos = 16.67 % Eficiencia = 80 %, los que nos indican que el método es apto para su uso teniendo en cuenta las excepciones que el reactivo presenta.

Palabras clave: Ácido Fenil Borónico, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, cefamicinasa AmpC

Naturaleza del Proyecto

1 Descripción

En 1983 se informó que el Ácido Borónico es inhibidor reversible de las enzimas de clase C. Inesperadamente, se descubrió una inhibición inusual de los organismos que poseen KPC por el Ácido Fenil Borónico.

El trabajo valida el método In House de preparación de discos de Ácido Fenil Borónico para la identificación de la cefamicinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).

Validación es el conjunto de procesos desarrollados para la confirmación mediante examen y, para la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos. Es confirmar la adecuación del proceso de medida para el uso previsto y se realiza cuando se pone en marcha una técnica. Para validar un método cualitativo se hace uso del test diagnostico el cual determina la capacidad del método.

La resistencia antibiótica es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico. Esta se produce por selección a través de mutaciones producidas por azar.

La producción de enzimas es uno de los principales mecanismos de defensa en la resistencia antibiótica principalmente en la producción de β-Lactamasas, su clasificación se basa en sus características funcionales o estructura primaria, teniendo en cuenta la secuencia de proteínas se establecen cuatro grupos, A, B, C, y D. Dentro de esta clasificación se encuentran las carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar la mayor parte de β-lactámicos incluidos los carbapenémicos, las de clase A, que suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico y presentan una menor actividad frente a meropenem que a imipenem, de estas la KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) es la más ampliamente diseminada en todo el mundo. También se encuentran las β-

lactamasas AmpC pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby- Medeiros y a la clase C de la clasificación estructural de Ambler

Las Cefamicinasas Amp C se encontraron codificadas por cromosomas en una amplia variedad de bacterias Gram negativas; como (*Morganella morganii, Providencia spp., Pseudomonas aeruginosa, Proteus spp.* (indol positivo), *Citrobacter freundii, Enterobacter spp. y Serratia spp.*). También se ha encontrado AmpC mediada por plásmidos en *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp.*, especies que no tienen naturalmente expresión de AmpC cromosómico.

La KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) hidrolizan β-lactámicos de todas las clases, cefalotina, bencilpenicilinas, ampicilina y piperacilina son antibióticos siempre afectados en presencia de esta enzima. Característicamente tienen un alto potencial de diseminación debido a su localización en plásmidos transferibles, se han aislado de diferentes especies bacterianas, principalmente en las enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae*.

Los resultados de la evaluación nos muestran que el método es apto para su uso en los laboratorios con las excepciones que se encuentran en la determinación fenotípica de las enzimas AmpC y KPC.

2 Justificación

El presente trabajo valido el método de preparación de discos de Ácido Fenil Borónico para la identificación de la Cefamicinasa AmpC y la Carbapenemasa KPC, para contar con un reactivo que estará disponible para todos los laboratorios que trabajen en la identificación de mecanismos de resistencia y al producir estos se abarataran los costos.

En 1983 se demostró que el Ácido Borónico inhibe de forma reversible la acción de la enzima AmpC de forma inesperada también se comprobó que inhibe la acción de la enzima KPC, en Bolivia el método más utilizado de detectar las enzimas cefalosporinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) es por medio de discos comerciales y también se lo hace por métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Lo que se demostrara es que con la elaboración In House de discos de Ácido Fenil Borónico estos tendrán la misma capacidad de inhibir la acción de las enzimas cefalosporinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) y así demostrar la presencia de las mismas.

Al evaluar la efectividad que tienen los discos de Ácido Fenil Borónico preparados en el laboratorio, son expuestos con cepas de colección del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud, los cuales son evaluados mediante una validación para métodos cualitativos y estos nos dio resultados los que nos demostró la capacidad de nuestros discos

El estudio nos va a permitir contar con un reactivo el cual nos facilite la detección de las enzimas cefalosporinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) lo cual nos dará un panorama de los mecanismos de resistencia que circulan en nuestro medio.

3 Marco institucional

3.1 Validación

La validación se define como el conjunto de procesos desarrollados para la confirmación mediante examen, para la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos. Es confirmar la adecuación del proceso de medida para el uso previsto y se realiza cuando se pone en marcha una técnica. La validación se utiliza porque es necesario saber si el ensayo sirve para lo que quiero usar. El laboratorio tiene la responsabilidad de garantizar que los resultados que el produce sean exactos, válidos y confiables. Se valida un método para saber que sea adecuado para el propósito preestablecido. Los datos que arroja un ensayo deben permitir al operador tomar decisiones. En función del método que se emplee, el laboratorio deberá elegir un tipo de validación. Por ello es necesario las modalidades de validación y los diferentes tipos de métodos existentes, según sean normalizados o no

3.1.1 Validacion Primaria

Es un proceso que establece los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo, modificado o caracterizado en forma inadecuada, también corresponden con la caracterización que debe realizarse a una técnica que se desarrolla en un laboratorio para su propio uso (in house). Se debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas se elabora un esquema de ensayo antes de realizar la validación

3.1.2 Validación Secundaria o Verificación

Se realiza cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte, cuando se introduce un equipo diagnostico método o prueba en un laboratorio clínico y que esta validado primariamente por organizaciones internacionales como la FDA (Food and Drug Administration) y el CLIA 88 (Clinical Laboratory Improvement Ammendments), considera a este proceso como "la verificación y lo define como la demostración y documentación realizada una sola vez de que las características de una prueba son comparables a las establecidas por el fabricante antes de ser usado en el diagnóstico.

3.1.3 Tipos de métodos y grado de validación según el grado de normalización

Es necesario saber el grado de normalización de un método porque mientras más normalizado menor es la validación

✓ Métodos no normalizados

En estos casos se deberá proceder a la validación formal del método

✓ Métodos normalizados

En este caso, se presupone que el método ha sido elaborado mediante la colaboración de una serie de expertos y que han definido su rango de aplicación, equipos empleados, operatoria utilizada, etc... En este caso se realiza una verificación para ver la reproducibilidad, repetitividad y exactitud.

✓ Métodos normalizados con modificaciones en el alcance

En este caso, se presupone que el método ha sido elaborado mediante la colaboración de una serie de expertos y que han definido su rango de aplicación, equipos empleados, operatoria utilizada, etc... Por lo tanto, ya existen valores de parámetros, pero no estamos seguros que sean iguales a los obtenidos con el método modificado, por lo que es necesaria su revalidación.

✓ Métodos normalizados sin Información.

En este caso, se presupone que el método ha sido elaborado mediante la colaboración de una serie de expertos y que han definido su rango de aplicación, equipos empleados, operatoria utilizada, etc... Aunque deja en duda algunos aspectos como por ejemplo el rango de trabajo las condiciones de trabajo. Se deberá obtener una serie de parámetros para confirmar el cumplimiento de requisitos.

3.1.4 Tipos de métodos definidos por la entidad nacional de acreditación - España (ENAC)

✓ Tipo I Métodos normalizados: Estos métodos normalizados son considerados como de referencia ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados

- para la misma determinación. No requieren una validación completa, pero si la confirmación de su correcta aplicación. Se trata de métodos que el laboratorio aplica como ya está
- √ Tipo II Métodos alternativos al método de referencia: son métodos que son validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado
- ✓ Tipo III Métodos normalizados con modificaciones o basados en métodos de referencia: Son métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados claramente en métodos de referencia, y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia
- ✓ Tipo IV Otros métodos: Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio la validación de estos deberá ser tan amplia como sea necesario

El objetivo de la validación es diferente según los tipos de métodos microbiológicos, que se pueden clasificar en cualitativos y cuantitativos.

- **A. Métodos cualitativos**: son aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un microorganismo determinado, claramente especificado, en una porción de sustancia (muestra).
- **B. Métodos cuantitativos**: son aquellos en los que se desea indicar el número de unidades formadoras de colonia en una cantidad de sustancia, realizando un recuento concreto, cuantificar la concentración de anticuerpos específicos, de ácidos nucleicos (por ejemplo, carga viral, etc.). Su objetivo es detectar un valor numérico de un agente infeccioso en una muestra. (Camaro, Catala, Gimeno, Martinez, & Olmos, 2013).

3.1.5 situaciones y obligaciones en la validación/verificación

Antes de incorporar una nueva técnica a la rutina del laboratorio, los métodos y procedimientos analíticos seleccionados se deben evaluar y demostrar que aportan resultados satisfactorios antes de comenzar a utilizarlos. Estas situaciones son:

a) Cuando se incorpora un cambio en una técnica analítica que se encuentra en uso en el laboratorio, como por ejemplo cambio de un equipo para extracción, modificación de los

controles utilizados, cambios en las condiciones instrumentales del método (tiempos, temperaturas, etc.).

b) Cuando se desea comparar el desempeño entre diferentes técnicas analíticas.

Cuando se valida un procedimiento analítico es necesario cumplir tres normas básicas:

- a) Debe validarse todo el procedimiento analítico; en algunos tipos de procedimientos puede entenderse que únicamente es necesario validar la etapa de medida instrumental (por ejemplo, secuenciación), esto es un error, ya que ésta suele ser la que introduce un error menor. Se ha de tener en consideración que el componente humano es el que incorpora una mayor contribución a la incertidumbre de la medida.
- b) Debe validarse todo el intervalo de aplicación del procedimiento analítico (niveles máximo, mínimo y medio del rango de trabajo).
- c) Debe validarse teniendo en cuenta la variedad de muestras (por ejemplo, sangre, plasma, orina, etc.).

3.1.6 Particularidades de los métodos microbiológicos. Características de la medición microbiológica

Los métodos microbiológicos se han basado clásicamente y aún se basan esencialmente en la detección y cuantificación de microorganismos según su capacidad de crecer en un medio de cultivo específico y posterior confirmación del aislado mediante ensayos bioquímicos o inmunológicos

Pero con lo que estamos tratando son con microorganismos vivos y estos pueden llegarnos a producir fallas

Cepas de referencia de colección. Para demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe de utilizar cultivos de referencia de microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida o de una organización reconocida por un organismo de acreditación.

Material de referencia certificado y cepas de estudios interlaboratorio. Como ya se ha indicado son aquellos materiales o muestras suministradas por certificadores que se pueden utilizar para la evaluación de la calidad de los ensayos de métodos que exigen la cuantificación. Su importancia reside en que se dispone de un valor cuantitativo

determinado que permite compararse con un conjunto de laboratorios o con los datos dados por un certificador

3.2 Ácido Fenil Borónico (APB)

En 1983 se informó que el Ácido Borónico es inhibidor reversible de las enzimas de clase C. Inesperadamente, se descubrió una inhibición inusual de los organismos que poseen KPC por el Ácido Fenil Borónico (APB), que puede atribuirse únicamente a la presencia de esta carbapenemasa. Posteriormente, Doi y colaboradores, en un estudio posterior con una serie más grande de cepas, Tsakris y colaboradores. Demostraron la abrumadora efectividad de APB para la detección de *Klebsiella pneumoniae que* posee KPC (Corso, 2009). Aun no se conoce el mecanismo para la inhibición de la β-lactamasa tipo KPC por Ácido Fenil Borónico (APB).

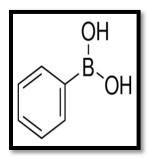


Figura 1: Ácido Fenil Borónico

3.3 Resistencia Antibiótica

La resistencia antibiótica es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico. Esta se produce por selección a través de mutaciones producidas por azar. El antibiótico, al entrar en contacto con una población bacteriana, permite solo la proliferación de aquellas bacterias que presentan aquella mutación natural que anula la acción del antibiótico. Una vez que se genera la información genética, las bacterias pueden transmitir los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos) por intercambio de plásmidos; o igualmente producto de una conversión lisogénica; Si una bacteria porta varios genes de resistencia, se la denomina multirresistentes (Gérvas, 2000).

3.5 Resistencia Antibiótica bombas de Eflujo

La resistencia antibiótica por bombas de eflujo operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Vila, Martin, & Sanchez Cespedes, 2007)

3.5 Resistencia Antibiótica por impermeabilidad

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Vila, Martin, & Sanchez Cespedes, 2007)

3.6 Resistencia Antibiótica por Alteraciones del sitio de acción

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos \(\beta-lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilina (Tafur, Torres, \(\& \) Villegas, 2008)

3.7 Resistencia Antibiótica Enzimática

La resistencia bacteriana enzimática se da por producción de enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En los Gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las Gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. El mecanismo de resistencia más prevalente en las bacterias Gram negativas a los antibióticos es la producción de β- lactamasas, es importante mencionar las más prevalentes. β-lactamasas. Los antibióticos β-lactámicos tienen en común su estructura molecular con un anillo β- lactámico, el cual es responsable en gran parte de su acción antimicrobiana. Las β-lactamasas son enzimas capaces de romper el anillo β- lactámico e

inactivar estos antibióticos. Las β-lactamasas son ubicuas de las bacterias Gram negativas y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones (Jacoby GA, 2005) (Philippon A, 2002).

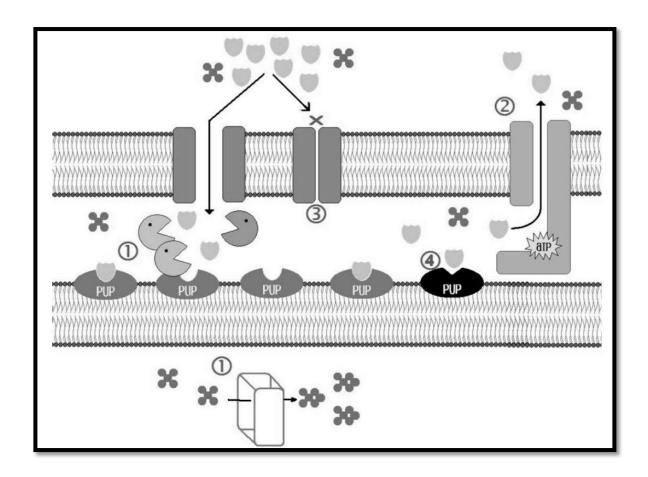


Figura: 2 Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de salida. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas unidoras de penicilinas.

3.8 **\beta-lactamasas**

La clasificación de las β-lactamasas se basa en sus características funcionales o estructura primaria, teniendo en cuenta la secuencia de proteínas se establecen cuatro grupos, A, B, C, y D. Dentro de esta clasificación se encuentran las carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar la mayor parte de β-lactámicos incluidos los carbapenémicos, las de clase A, que

suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico y presentan una menor actividad frente a meropenem que a imipenem, de estas la KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) es la más ampliamente diseminada en todo el mundo en sus variantes KPC-2 y KPC-3 (Bush & Jacoby, 2010). También se encuentran las β-lactamasas AmpC pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby- Medeiros y a la clase C de la clasificación estructural de Ambler (Seral, Gude, & Castillo, 2012)

3.9 Cefamicinasa AmpC

Las β-lactamasas AmpC pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros y a la clase C de la clasificación estructural de Ambler. Se caracterizan por ser activas frente penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas (cefoxitina y cefotetan), oximinocefaloporinas (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) y monobactams (aztreonam) con la excepción de cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y carbapenémicos. Estas enzimas se caracterizan por ser resistentes a la combinación de β-lactámico con inhibidores de β-lactamasas, con la posible excepción de piperacilinatazobactam1. Este espectro de hidrólisis puede verse ampliado (subgrupo 1e) y afectar a las cefalosporinas de cuarta generación como resultado de sustituciones, inserciones o delecciones aminoacídicas en seis regiones de la enzima, son las llamadas AmpC de espectro extendido, ESAC (Seral, Gude, & Castillo, 2012)

Estas enzimas se han encontrado codificadas por cromosomas en una amplia variedad de bacterias Gram negativas; como (*Morganella morganii, Providencia spp., Pseudomonas aeruginosa, Proteus spp.* (indol positivo), *Citrobacter freundii, Enterobacter spp. y Serratia spp.*). También se ha encontrado AmpC mediada por plásmidos en *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp.*, especies que no tienen naturalmente expresión de AmpC cromosómico (Jacoby GA, 2005) (Philippon A, 2002).

Las cefalosporinasa AmpC hidrolizan a las cefalosporinas de espectro de tercera generación, aztreonam e inhibidores de β-lactamasas. Las bacterias con producción de enzima AmpC cromosómico, bajo condiciones normales, producen esta enzima en bajas cantidades sin alterar significativamente la sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, pueden ocurrir mutaciones espontáneas (a una tasa de 10-5 a 10-

7) en los genes que regulan la producción de AmpC, lo cual lleva a la producción constitutiva de esta enzima (DM., 1995) (Hanson ND, 1999)

3.9.1 Sistema de expresión y represión del gen AmpC

Para diferenciar entre Cefamicinasa AmpC inducibles y constitutivas, es necesario conocer el mecanismo de expresión y represión del gen que codifica a estas enzimas (gen ampC). Las bacterias que poseen el gen ampC, tienen un complejo sistema molecular regulador de la expresión del mismo, el cual está íntimamente relacionado con el reciclaje del péptidoglicano. El proceso se inicia cuando los productos de degradación de la pared 1,6 anhidromuropéptidos (1,6 amp), ingresan al citoplasma bacteriano a través de una permeasa transmembrana denominada AmpG (codificada por el gen ampG). Estos productos de degradación 1,6 amp, actúan como molécula señal (promotores o inductores) del activador transcripcional AmpR (codificado por el gen ampR). Cuando el AmpR se une a los 1,6 amp se induce la expresión del gen ampC y de esta manera, se produce la enzima AmpC, la cual ejercerá su efecto hidrolítico sobre los β-lactámicos para los cuales tiene acción. El sistema represor consiste en el clivaje de los 1,6 amp por la enzima AmpD, la cual es una amidasa citoplasmática (N- acetil-anhidromuramil-lalaninamidasa) codificada por el gen ampD, hasta ácido 1,6 anhidromurámico y péptidos. Los péptidos son procesados hasta tripéptidos los cuales son reusados resultando en la formación del precursor de la pared celular UDP-Nacetilmuramilpentapéptido. Este, al unirse con el activador transcripcional AmpR, lo bloquea, reprimiendo así la transcripción del gen ampC. Otro gen involucrado es el ampE, el cual, en conjunto con ampD, forma el operón ampDE que codifica una proteína de membrana la cual se piensa actúa como molécula censora requerida para la inducción. Los β-lactámicos inducen la producción de AmpC causando un incremento en la concentración citoplasmática de los productos de degradación 1,6 amp. Todos los β-lactámicos son inductores de estas enzimas en mayor o menor grado. Las cepas salvajes productoras de AmpC, lo hacen a bajos niveles (o niveles basales), gracias al sistema represor, por consiguiente, mutaciones asociadas a los genes ampR y ampD, resultan en la hiperproducción de AmpC, un término que se ha denominado derrepresión. (Del Valle, 2009)

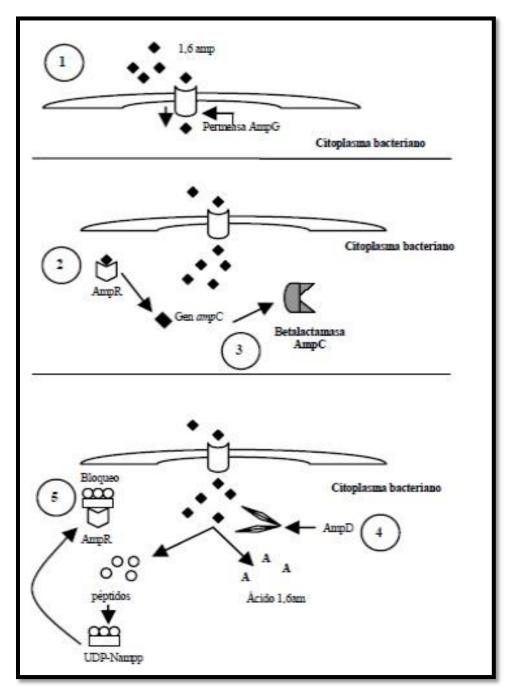


Figura 3. Sistema de expresión y represión del gen *amp*C. **1:** los 1,6 anhidromuropéptidos (1,6 amp) ingresan al citoplasma a través de la permeasa AmpG. **2:** una vez en el interior se unen al activador transcripcional AmpR iniciándose la transcripción del gen *amp*C. **3:** se produce la enzima AmpC. **4:** sistema represor; la amidasa AmpD cliva a los 1,6 amp hasta péptidos y ácido 1,6 anhidromurámico (ácido 1,6 am). **5:** los péptidos son reusados para la formación de UDP-*N*-acetilmuramilpentapéptido (UDP-Nampp), el cual se une a AmpR, bloqueándolo. En consecuencia, se reprime la transcripción del gen *amp*C.

3.10 Klebsiella pneumoniae carbapenemasa (KPC)

Hidrolizan β-lactámicos de todas las clases, cefalotina, bencilpenicilinas, ampicilina y piperacilina son antibióticos siempre afectados en presencia de esta enzima. Característicamente tienen un alto potencial de diseminación debido a su localización en plásmidos transferibles, se han aislado de diferentes especies bacterianas, principalmente en las enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae* (Queenan & Bush, 2007).

El primer miembro de la familia KPC fue descubierto por el proyecto de ICARE (siglas de Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology) en un aislamiento clínico de *Klebsiella pneumoniae* de Carolina del Norte en 1996. Este aislamiento era resistente a todos los antimicrobianos probados, pero las CIM de los carbapenémicos disminuían en presencia de ácido clavulánico, la actividad de la primera carbapenemasa detectada fue asociada a un plásmido de 50Kb que codifica para la β-lactamasa denominada KPC-1. (Yigit, y otros, Novel carbapenem hydrolyzing beta lactamase,KPC-1, from carbapenem resistant strain of Klebsiella pneumoniae, 2001) (Vera, y otros, 2017). La detección de bacterias productoras de *Klebsiella pneumoniae carbapenemasa* (KPC) tiene gran importancia, tanto en la elección del esquema de tratamiento antibiótico adecuado, como en la implementación de medidas de control de infecciones ya que poseen gran capacidad de diseminación debido a que son codificadas por plásmidos (Lossa, 2011)

El descubrimiento de KPC-1 fue rápidamente seguido por diferentes reportes de una variante de un aminoácido (S174G) KPC-2, a lo largo de la costa este de Estados Unidos presentándose en cuatro aislamientos con CIM para imipenem de 2 a 8 μg/mL. (Smith, y otros, 2003). Sin embargo, en el año 2008 se presentó una corrección del primer reporte, del gen *bla*_{KPC-1} donde los autores indican que las variantes KPC-1 y KPC-2 son la misma enzima (Yigit, y otros, 2008)

En el año 2012 se informa por primera vez el aislamiento de *Escherichia coli* productora de KPC desde aguas costeras en Portugal (Poirel, y otros, 2012). Posteriormente, se informó el aislamiento de este tipo de cepas en agua de pozo, riveras, lagos, plantas de tratamiento de aguas residuales y producción animal.

Por lo tanto, la presencia de bacterias productoras de carbapenemasas en el ambiente es alarmante por el potencial riesgo de diseminación de genes de resistencia. Además, con estos hallazgos se refuerza la idea que el medio ambiente puede participar en la selección y diseminación de genes de resistencia (Piedra Carrasco, y otros, 2017)

La rápida diseminación mundial del gen $bla_{\rm KPC}$ ha sido atribuida a una combinación de factores sociales y microbiológicos: viajes internacionales, transmisión paciente-paciente de micro-organismos productores de KPC y transferencia horizontal de genes. Esta rápida diseminación, también varía geográficamente, determinándose así regiones que informan pocos aislados productores de KPC (Australia y África) y áreas donde KPC es considerada endémica (Estados Unidos, Puerto Rico, Colombia, Grecia, Israel y China) (Chen, Anderson, & Paterso, 2012). Entre los factores microbiológicos, se ha determinado que el transposón Tn4401 contribuye tanto a la diseminación geográfica de KPC como a la transferencia interespecie. Sin embargo, la rápida diseminación de los genes $bla_{\rm KPC}$ en múltiples especies también ha sido como consecuencia de su presencia en una amplia variedad de plásmidos que varían en tamaño, naturaleza y estructura. Otro factor involucrado es la asociación de la enzima KPC con clones de alto riesgo, los que tienen una distribución global, mayor capacidad de colonización, diseminación y persistencia en una variedad de nichos. (Nordmann & Poirel, 2014)

En la actualidad hay 19 variantes de KPC, todas ellas son derivados mutantes puntuales de una secuencia de aminoácidos común. En unos pocos años, los productores de KPC se diseminaron a nivel mundial y se identificaron en muchas especies Gram-negativas, a pesar de que las enzimas KPC se han identificado principalmente en *K. pneumoniae* (Fig.4). En América Latina, los productores de KPC son endémicos en algunas áreas, como en Colombia y Argentina. Algunos informes también han mostrado la presencia de productores de KPC en Puerto Rico y México (Fig.4). (Nordmann & Poirel, 2014)

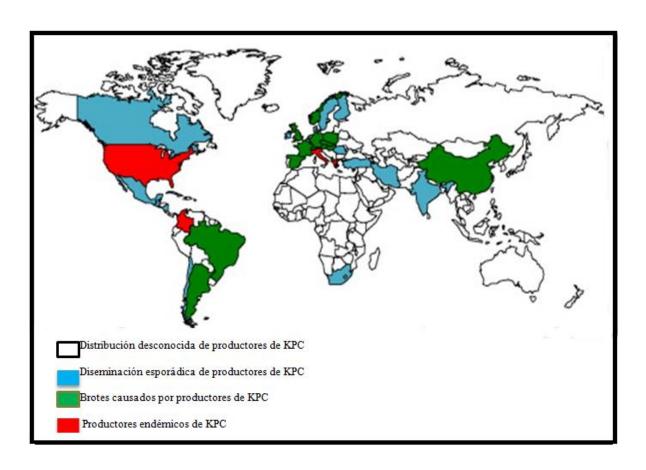


Figura 4: Distribución geográfica de los productores de KPC.

En Europa, los productores de KPC se han encontrado en casi todas partes, en su mayoría vinculados a la importación de áreas endémicas. Esas áreas endémicas en Europa son Grecia e Italia, y probablemente Polonia, donde a menudo se producen brotes nosocomiales causados por *K. pneumoniae* productor de KPC. En Israel, muchos estudios han demostrado la endemicidad de los productores de KPC, con un gran número de informes nosocomiales, pero también, notablemente, algunos casos que ocurren en la comunidad. (Nordmann & Poirel, 2014)

El alcance de la difusión de KPC en el sudeste de Asia no es bien conocido, aunque se considera que China es un país donde algunas áreas enfrentan situaciones endémicas. En India, hay muy pocos informes sobre aislamientos productores de KPC, las carbapenemasas identificadas con mayor frecuencia son enzimas NDM y similares a OXA-48 (ver a continuación). Sin embargo, hay algunos informes que muestran que los productores de KPC están ocurriendo en India. (Nordmann & Poirel, 2014)

Es digno de mención que un clon específico de *K. pneumoniae* productor de KPC-2 o productor de KPC-2 (secuencia tipo 258) ha sido ampliamente identificado en todo el mundo, lo que indica que ha contribuido significativamente a la propagación de este rasgo de resistencia. (Nordmann & Poirel, 2014)

3.10.1 Gen *bla_{KPC}*

La enzima KPC se encuentra codificada por el gen bla_{KPC} , localizado en el transposón Tn4401, derivado de Tn3, o en elementos genéticos similares a Tn4401, el que a su vez se encuentra portado, principalmente, en plásmidos aunque también ha sido informado en el cromosoma. Tn4401 tiene un tamaño aproximado de 10 Kb y está delimitado por dos secuencias de repeticiones invertidas imperfectas de 39 pb y se encuentra flanqueado por un sitio blanco de duplicación de 5 pb, lo que indicaría un reciente evento de transposición. Además, contiene los genes de la transposasa (tnpA), la resolvasa (tnpR) y dos secuencias de inserción, ISkpn6 e ISkpn7, río arriba del gen bla_{kPC} . El transposón Tn4401 es la principal plataforma de diseminación de bla_{kPC} y la frecuencia de transposición es de 4,4 x 10^{-6} /célula receptora. (Cuzon, Naas, & Nordmann, 2011).

Se han descrito ocho isoformas de Tn4401 (a-h, con dos isoformas diferentes de Tn4401d) (Figura 5). Las isoformas a, c, d y e difieren entre sí por deleciones río arriba de bla_{KPC} , de 99 pb, 215 pb, 68 pb y 255 pb, respectivamente, en comparación con la isoforma b que no presenta deleción (Naas, Cuzon, Truong, & Nordmann, 2012). Adicionalmente, se descubrió una nueva isoforma del Tn4401 la que designaron también como Tn4401d. Esta isoforma se caracteriza por tener una deleción de 5,3 Kb que incluye parte del gen bla_{KPC} ; por lo tanto, la enzima no sería funcional (Chen, y otros, 2012). Posteriormente, informaron que KPC-4 aislada desde Eterobacter cloacae y Serratia marcescens está codificada en la variante Tn4401f que contiene el gen tnpA truncado y tnpR, ISKpn7 y Tn4401 IR-L están ausentes. (Bryant, y otros, 2013). Recientemente, describieron una nueva isoforma de Tn4401, designada como Tn4401h, que se caracteriza por tener una deleción de 188 pb entre los genes istB y blaKPC, y fue identificada en K. pneumoniae y Eterobacter cloacae. (Cheruvanky, y otros, 2017)

Actualmente, se han descrito nuevas plataformas genéticas donde se encuentra el gen $bla_{\rm KPC}$, las cuales se diferencian de Tn4401 debido a otras deleciones e inserciones de otros genes y a la adición de otras secuencias de inserción. En las nuevas plataformas descritas, los principales cambios ocurren en la región río arriba del gen $bla_{\rm KPC}$, lo que sugiere que esta región es variable. Se caracterizaron una nueva plataforma genética del gen $bla_{\rm KPC}$ en cepas de enterobacterias aisladas en China. Así, al secuenciar el plásmido pK048, determinaron una región de 2.070 pb idéntica a Tn4401 que incluye el gen $bla_{\rm KPC^{-2}}$ y un fragmento parcial de la secuencia de inserción ISKpn6. Esta plataforma fue generada por la integración de un transposón del tipo Tn3 río arriba del gen $bla_{\rm KPC^{-2}}$ y la inserción de otros genes río abajo de la secuencia de inserción ISKpn6, causando la pérdida parcial de esta secuencia. Posteriormente, esta plataforma ha sido descrita con frecuencia en dicho país y, además, variantes en China, Colombia, Brasil, Argentina y Chile. (Shen, y otros, 2009).

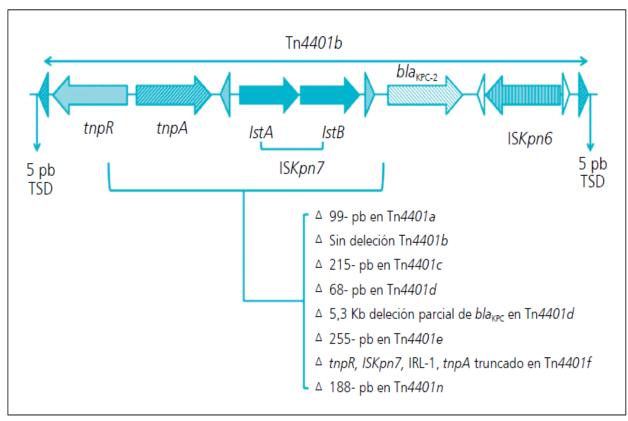


Figura 5: Estructura del transposón Tn4401 y sus isoformas a-f. IRL: repetición invertida izquierda; *tmpR*: gen que codifica la resolvasa; *tmpA*: gen que codifica la transposasa; *istA* e *istB*: genes que conforman la secuencia de inserción ISK*pn7*; ISK*pn6*: secuencia de inserción; TSD: sitio de duplicaciones diana. Los triángulos negros representan las secuencias repetidas invertidas. Adaptado de Nordmann y cols

En el año 2011, determinaron una variante de la plataforma descrita en China, a la que denominaron variante 1a Argentina (Figura 6). En esta plataforma se encontró la inserción de un transposón compuesto, río arriba de *tmpA*, que provocó la deleción parcial de este último y, además, la inserción de un fragmento del gen *bla*_{TEM-1} truncado (671 pb) entre ISK*pn8* y *bla*_{KPC}. Cabe destacar que Barría-Loaiza y cols., determinaron tanto la presencia de la plataforma Tn*4401*a como de la variante 1a en cepas de enterobacterias productoras de KPC-2 aisladas en hospitales chilenos, siendo la variante 1a la más común (11/17 cepas). Por otra parte, describieron un elemento genético móvil de 17.003 pb que albergaría el gen *bla*_{KPC-2}. Este elemento se encuentra flanqueado por repeticiones invertidas de 38 pb del Tn*3*, que incluye el gen *tmpA*-Tn*3*, el operón de resistencia a macrólidos (*mphA-mrx-mphR*) y un fragmento del gen *bla*TEM-1. (Ageevets, y otros, 2017)

El Tn4401 ha sido detectado en aislados de diferentes orígenes geográficos, distintos ST, variadas especies de enterobacterias y también en *Pseudomonas aeruginosa*. Una característica importante es su capacidad de insertarse en diferentes plásmidos de bacterias Gram negativas y ha sido identificado en plásmidos conjugativos y no conjugativos movilizables. Los plásmidos que albergan el gen *bla*_{KPC} suelen estar asociados con otros determinantes genéticos, los cuales confieren resistencia a otros antimicrobianos como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cotrimoxazol. En relación a los tipos de plásmidos que contienen el gen *bla*_{KPC} en aislados del ST258, se ha determinado que pertenecen a diferente grupo de incompatibilidad IncF (replicones FIIK1, FIIK2 y FIA), Incl2, IncX, IncA/C, IncR, IncL/M y ColE1, siendo el grupo de incompatibilidad IncF, con el replicón FIIK, el predominante. Estos plásmidos tienen una amplia distribución geográfica que incluye Canadá, Polonia, E.U.A., Italia, Israel, Brasil y Noruega. Adicionalmente, en la caracterización de los primeros aislados de enterobacterias productoras de KPC en Chile, se identificó que el gen *bla*_{KPC-2} está asociado a variantes de plásmidos del grupo IncF, lo que concuerda con lo descrito en los países anteriormente mencionados (Geisse, 2007).

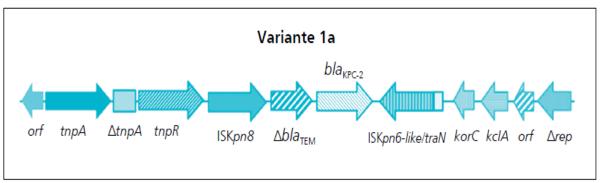


Figura 6: Estructura de la variante 1a Argentina de la plataforma genética 1a descrita en China, $\Delta tnpA$ -Tn3: gen que codifica la transposasa delecionado; Δbla TEM-1: gen que codifica la β-lactamasa TEM-1 delecionado. Adaptado de Barría-Loaiza y cols.

El reconocimiento precoz de las bacterias productoras de carbapenemasas se ha vuelto obligatorio, ya que la falla clínica asociada con estas enzimas es un problema desafiante y el reconocimiento es crucial para controlar la propagación de bacterias productoras de carbapenemasas. (Pasteran, Mendez, Guerriero, Rapoport, & Corso, 2009)

4 Operacionalización de Variables

Objetivo	Tipo de variable	Indicador
Determinar la enzima KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemasa) <i>utilizando</i> los discos de Ácido Fenil Borónico preparados en el laboratorio al enfrentarlos con patógenos Gram negativos de diferentes características.	Cualitativa dicotómica	KPC (positivo) KPC (Negativo)
Determinar la enzima cefamicinasa AmpC utilizando los discos de Ácido Fenil Borónico preparados en el laboratorio al enfrentarlos con patógenos Gram negativos de diferentes características.	Cualitativa dicotómica	AmpC (positivo) AmpC (Negativo)
Efectuar los diferentes Test diagnostico que muestran los discos de Ácido Fenil Borónico en la determinación de la enzima cefamicinasa AmpC.	Cualitativa continua	Sensibilidad=a/((a+b))*100 Especificidad=d/((c+d))*100 Falsos positivos=c/((a+c))*100 Falsos negativos=b/((b+d))*100 Eficiencia=((a+d))/n*100
Efectuar los diferentes Test diagnostico que muestran los discos de Ácido Fenil Borónico en la determinación de la enzima Klebsiella pneumoniae carbapenemasa (KPC).	Cualitativa continua	Sensibilidad=a/((a+b))*100 Especificidad=d/((c+d))*100 Falsos positivos=c/((a+c))*100 Falsos negativos=b/((b+d))*100 Eficiencia=((a+d))/n*100

5 Fines

Poner al alcance de los laboratorios de bacteriología del País un disco de Ácido Fenil Borónico que permita determinar la detección de las enzimas cefalosporinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Validar el método In House de preparación de discos de Ácido Fenil Borónico para la identificación de la cefamicinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).

6.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar la presencia de la enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) utilizando los discos de Ácido Fenil Borónico preparados en el laboratorio al enfrentarlos con patógenos Gram negativos de diferentes características.
- ✓ Determinar la presencia de la enzima cefamicinasa AmpC utilizando los discos de Ácido Fenil Borónico preparados en el laboratorio al enfrentarlos con patógenos Gram negativos de diferentes características.
- ✓ Efectuar los diferentes Test diagnósticos que muestran los discos de Ácido Fenil Borónico en la determinación de la enzima cefamicinasa AmpC.
- ✓ Efectuar los diferentes Test diagnósticos que muestran los discos de Ácido Fenil Borónico en la determinación de la enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).

7 Metas

Elaborar el protocolo de preparación de discos de Ácido Fenil Borónico para la identificación de la cefamicinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).

Elaborar el protocolo de validación de discos de Ácido Fenil Borónico para la identificación de la cefamicinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) preparados en el laboratorio.

8 Beneficiario

- Los laboratorios que procesan muestras para estudios bacteriológicos.
- Los pacientes que requieran la detección de las enzimas cefalosporinasa AmpC y *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC).
- El sistema de salud para conocer los mecanismos de resistencia circulantes.

9 Productos

Protocolo de preparación de discos de Ácido Fenil Borónico.

Protocolo de Validación de discos de Ácido Fenil Borónico preparados en el Laboratorio.

Discos de Ácido Fenil Borónico aptos para la identificación de mecanismos de resistencia.

10 Localización

Instituto Nacional de Laboratorios en Salud "Dr. Nestor Morales Villazón (INLASA) en el Laboratorio de Bacteriología en LRNCB. Ubicado en la Ciudad de La Paz.

11 Métodos, Técnicas y Procedimientos

11.1 Materiales

20 Cajas de Petrí

1 Probeta de 20mL

1 Matraz de Erlenmeyer

- 1 Vaso de precipitado 500mL
- 20 Tubos de lectura
- 20 Hisopos
- 1 Gradilla
- 1 Regla
- 1 Par de Guantes
- 1 Barbijo
- 1 Propipeta
- 2 Asas bacteriológicas
- 1 Frasco de Vidrio
- 1 Micropipeta 10 μL

11.2 Reactivos

Agar Mueller Hinton

Solución Fisiológica

Discos de Imipenem (IMP) 10µg

Discos de Meropenem (MER) 10µg

Discos de Cefotaxima (CTX) 30µg

Discos de Ceftazidima (CAZ) 30µg

Discos de Cefoxitima (FOX) 30µg

50mL de Hipoclorito de Sodio al 1%

500 mL Etanol 70 %

11.3 Equipos

Campana de Flujo laminal de Flujo Horizontal

Estufa Bacteriologica

Refrigerador

Mechero Bunsen

Balanza Analitica

Agitador vórtex

11.4 Preparación de los discos

- ✓ Perforar el papel Watman N 3 con la ayuda de una perforadora, aproximadamente 6mm de diámetro para la obtención de los discos.
- ✓ Colocar en envases de vidrio con tapa rosca y autoclavar por 15 min.
- ✓ Limpiar la cabina de flujo laminar con alcohol al 70 % para desinfectar.
- ✓ Colocar los materiales dentro de la cabina de flujo laminar
- ✓ Irradiar por 15 min con luz UV los materiales

11.5 Preparación de la Solución de Ácido Fenil Borónico e inoculación en los discos

- ✓ En un frasco color ámbar pesar 31.6 mg de APB (cálculos se encuentran en anexos14.6), añadir al frasco 500 μL de DMSO y 500 μL de agua destilada estéril (proporción de 1:1), inmediatamente homogenizar con la ayuda de un agitador vórtex.
- ✓ Colocar los discos en soportes (se utilizó racks de tips)
- ✓ Dispensar 10µL de la solución de APB a cada disco
- ✓ Esperar por el lapso de 1 hora a que los discos sequen a temperatura ambiente (dentro la cabina de flujo laminal)
- ✓ Almacenar los discos en viales color ámbar con cierre hermético y que contengan desecante (gel silica)
- ✓ Poner los recipientes en el refrigerador a -20°C que es su temperatura de almacenaje (no exceder más de 1 año el almacenaje), hasta su uso o poner a 2-8°C durante 7 días.

11.6 Procedimiento de inoculación de las cepas y posicionamiento de discos

- ✓ En cajas Petri con agar Mueller Hinton
- ✓ Inocular las cepas en las cajas de Petri empapando un hisopo en el tubo con el inoculo, eliminando el excedente en las paredes del tubo, inoculando en la caja de Petri de forma que se gire en tres direcciones a 65° determinando de esta forma la buena distribución del inoculo.
- ✓ Las cepas son de colección por lo que están identificadas y con su perfil de antibiograma

- ✓ Poner los discos utilizando la fórmula de D=r1+r2+5 en la que nos indica la distancia para posicionar los discos.
- ✓ Incubar de 18 a 24 Horas.
- ✓ Observar e interpretar el resultado.

11.7 Interpretación de los resultados

Observación del halo de inhibición del desarrollo microbiano:

Presencia de enzimas β -lactamasas tipo AmpC: agrandamiento o deformación de la zona de inhibición del desarrollo alrededor de uno o de los dos discos de antibiótico β -lactámico hacia el disco de Ácido Borónico (a este fenómeno de agrandamiento, se lo llama comúnmente "Efecto Huevo").

Ausencia de enzimas β-lactamasas tipo AmpC y KPC: no se encuentran alteraciones ni deformaciones en la zona de inhibición del desarrollo alrededor de los discos de los antibióticos β-lactámicos hacia el disco de Ácido Borónico

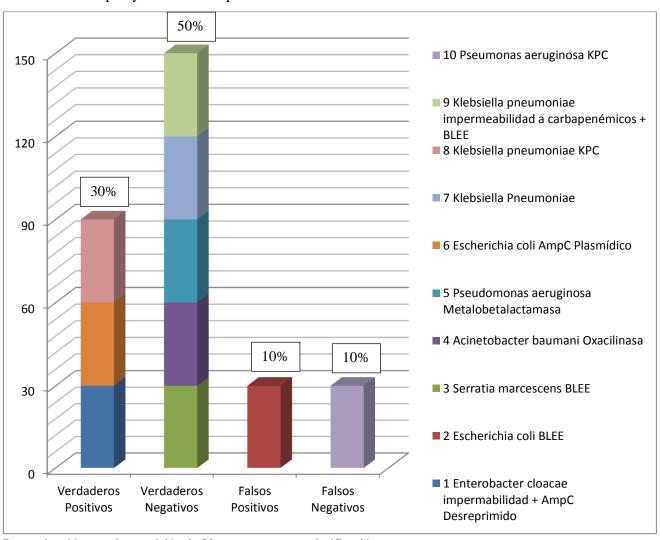
Presencia de enzimas β-lactamasas tipo KPC: agrandamiento o deformación de la zona de inhibición del desarrollo alrededor de uno o de los dos discos de carbapenemes hacia el disco de Ácido Borónico (a este fenómeno de agrandamiento, se lo llama comúnmente "Efecto Huevo").

11.8 Resultados

Fueron incluidas en este estudio un total de 10 cepas procedentes de las cepas de colección del laboratorio de bacteriología INLASA

11.8.1 Resultado de Amp C y KPC

Grafica 1: Clasificación de los datos obtenidos de las cepas en estudio en la búsqueda de las enzimas Amp C y KPC en comparación con los Gold Standard



Datos obtenidos tras la repetición de 30 veces por cepa y clasificación.

El gold estándar para la determinación de KPC es la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el caso de AmpC son métodos fenotípicos(Cloxacilina, EDTA y test de Hodge modificado).

Tabla 1: Interpretación de Resultados

	Resultados o Stano			
		Negativo	Positivo	Total general
Resultados del Disco preparado en el	Negativo	150	30	180
laboratorio de APB	Positivo	30	90	120
		300		

Clasificación de resultados

Tabla 2: Resultados del test diagnóstico de AmpC y KPC

a) Verdaderos Positivos = 90	• Sensibilidad = 75%
b) Falsos Negativos= 30	• <i>Especificidad</i> = 83.3%
c) Falsos Positivos = 30	• Falsos positivos = 25 %
d) Verdaderos Negativos = 150	• <i>Falsos negativos</i> = 16.67 %
	• <i>Eficiencia</i> = 80 %

Con los datos obtenidos y utilizando las fórmulas de anexo 14.4 se obtuvo los resultados.

11.8.2 Resultados de Amp C y KPC sin considerar a Pseudomonas aeruginosa KPC

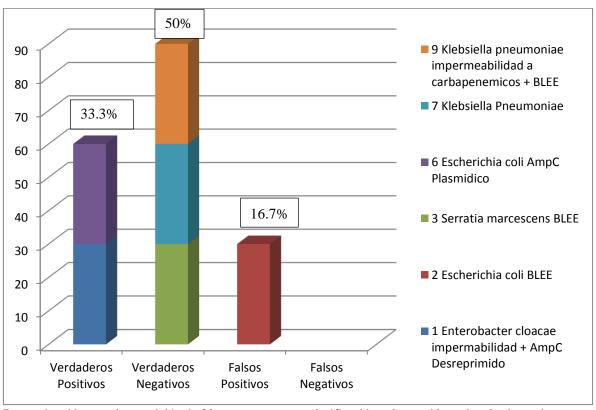
Tabla 3: Resultados del test diagnóstico de Amp C y KPC sin considerar a *Pseudomonas aeruginosa* KPC

a) Verdaderos Positivos = 90	• Sensibilidad = 100%
b) Fasos Negativos= 0	• <i>Especificidad</i> = 83.3%
c) Falsos Positivos = 30	• Falsos positivos= 25 %
d) Verdaderos Negativos = 150	• Falsos negativos =0 %
	• <i>Eficiencia</i> = 88.89 %
	,

Resultados considerando la recomendación del instituto Carlos Malbran en la que nos indica que no se debe utilizar discos de Ácido Fenil Borónico para la detección de KPC en *Pseudomonas aeruginosa*, se utilizó las fórmulas de Anexo 14.4.

11.8.3 Resultados AmpC

Grafica 2: Clasificación de los datos obtenidos de las cepas en estudio en la búsqueda de la enzima Amp C en comparación con el Gold Standard



Datos obtenidos tras la repetición de 30 veces por cepa y clasificación solo considerando a las bacterias expuestas la acción de cefalosporinas.

La detección de AmpC son por métodos fenotípicos (Cloxacilina, EDTA y test de Hodge modificado).

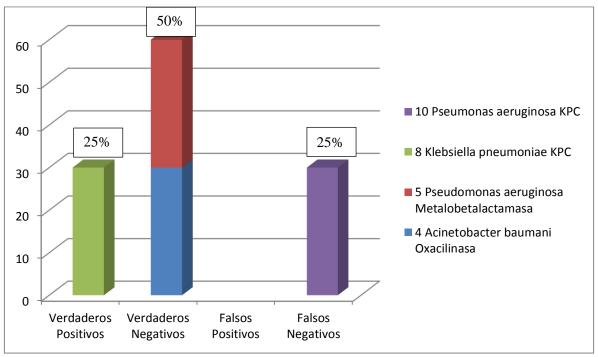
Tabla 4: Resultados del test diagnóstico de Amp C

a) Verdaderos Positivos = 60	• Sensibilidad = 100%
b) Fasos Negativos= 0	• <i>Especificidad</i> = 75 %
c) Falsos Positivos = 30	• <i>Falsos positivos</i> = 33.3 %
d) Verdaderos Negativos = 90	• Falsos negativos =0 %
	• <i>Eficiencia</i> = 83.3 %

Con los datos obtenidos y utilizando las fórmulas de anexo 14.4 se obtuvo los resultados.

10.8.4 Resultados KPC

Grafica 3: Clasificación de los datos obtenidos de las cepas en estudio en la búsqueda de la enzima KPC en comparación con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Gold estándar)



Datos obtenidos tras la repetición de 30 veces por cepa y clasificación solo considerando a las bacterias expuestas a la acción de carbapenemicos.

Tabla 5: Resultados del test diagnóstico de KPC.

a) Verdaderos Positivos = 30	• Sensibilidad = 50%
b) Fasos Negativos= 30	• Especificidad = 100 %
c) Falsos Positivos = 0	• Falsos positivos = 0 %
d) Verdaderos Negativos = 90	• Falsos negativos =25 %
	• <i>Eficiencia</i> = 80 %

Sesgo por presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Con los datos obtenidos y utilizando las fórmulas de anexo 14.4 se obtuvo los resultados.

11.8.5 Resultados KPC teniendo en cuenta la recomendación del Instituto Carlos Malbram.

Tabla 6: Resultados del test diagnóstico de KPC sin considerar a *Pseudomonas aeruginosa* KPC.

• Sensibilidad = 100%
• Especificidad = 100 %
• Falsos positivos = 0 %
• Falsos negativos =0 %
• <i>Eficiencia</i> = 100 %

Resultados considerando la recomendación del instituto Carlos Malbran en la que nos indica que no se debe utilizar discos de Ácido Fenil Borónico para la detección de KPC en *Pseudomonas aeruginosa*, se utilizó las fórmulas de Anexo 14.4

11.9 Discusión

Desde 1983 se dice que el Ácido Borónico inhibe la acción de la enzima AmpC e inesperadamente se vio que también inhiben a la enzima KPC lo cual se pudo demostrar en el trabajo realizado puesto que estos presentan un sinergismo entre los discos de antibióticos y el disco de Ácido Fenil Borónico.

Es importante que nuestro país tenga claro, cuales son los mecanismos de resistencia circulantes y para esto se tiene que crear distintos tipos de pruebas que ayude a determinar los mecanismos de resistencias y una de esas pruebas para determinar la presencia de las bacterias que producen las enzimas AmpC y KPC es la inhibición de las enzimas por la presencia de Ácido Fenil Borónico que se encuentra impregnado en un disco, esta es una de las pruebas que nos ayuda a determinar de forma fenotípica la presencia de las enzimas AmpC y KPC.

Las cepas trabajadas fueron identificadas tanto de forma fenotípica como de forma genotípica con métodos moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se tiene la certeza de que los microorganismos poseen los mecanismos de resistencia con las que se las caracterizo y además forman parte de las cepas de colección que poseen en el INLASA.

La necesidad que se tiene por contar con un reactivo que esté al alcance de todos los laboratorios del país, puesto que se cuenta con reactivos comerciales los cuales no se encuentran a disposición de todos los laboratorios por que la demanda es muy poca y lo cual obliga a que las importadoras no las importen con frecuencia por esta razón es la que estamos en la necesidad de crear un reactivo que se tenga a disposición. Esto paralelamente nos obliga al hecho de validar el reactivo creado en el laboratorio de bacteriología del INLASA.

Los datos obtenidos nos dan a entender que el método presenta una alta sensibilidad claro con las recomendaciones que nos da el instituto Carlos Malbrán en la que nos indica que no es recomendable realizar la prueba de difusión de discos de Ácido Fenil Borónico para la identificación de KPC en *Pseudomonas aeruginosa* debido a que la hiper-producción de la enzima AmpC inhibe la acción del Ácido Fenil Borónico, al tomar en cuenta esta

consideración la sensibilidad se incrementa. La especificidad del método es baja esto nos muestra que tenemos que apoyarnos en otras técnicas para la identificación de las bacterias productoras de enzimas KPC y AmpC puesto que con el método que se realizó no es un diagnóstico definitivo para la determinación de la presencia de las Enzimas mencionadas.

12 Objetivos y metas alcanzadas

Se elaboraron los discos bajo un protocolo aprobado en la que nos indica en detalle cómo preparar los mismos y se los comparo con los discos comerciales su acción dándonos resultados muy favorables.

Se elaboró el protocolo de preparación de discos, en la que se dan los puntos a conocer en un POE aprobado y presentado al laboratorio de Bacteriología del Inlasa.

Se elaboró el protocolo de validación de discos preparados en el laboratorio, en la que se dan los puntos a conocer en un POE aprobado y presentado al laboratorio de Bacteriología del Inlasa

Se prepararon los discos de Ácido Fenil Borónico que nos da un resultado incluso mejor en comparación con los discos comerciales en las pruebas nos da un buen resultado lo que nos indica que sus resultados son confiables.

13 Conclusiones y recomendaciones

13.1 Conclusiones

Se validó el método de preparación de discos de Ácido Fenil Borónico la cual nos sirve en la identificación fenotípica de las enzimas AmpC y KPC.

Se determinó la presencia de la enzima KPC esta se dio al observar en la prueba de difusión por disco la presencia de un sinergismo ente los discos de carbapenemicos y el disco comercial de Ácido Fenil Borónico, se mostró un resultado falso negativo cuando se usa la técnica para determinar la enzima KPC en *Pseudomonas aeruginosa* que se da a causa de la hiper-producción de la enzima AmpC que presenta la cepa, por esa razón el instituto Carlos Malbrán nos indica que no es recomendable utilizar la técnica para la determinación de la

enzima KPC en *Pseudomonas aeruginosa* para lo cual se deberá hacer el uso de métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se determinó la presencia de la enzima cefamicinasas AmpC esta se dio al observar en la prueba de difusión por disco la presencia de un sinergismo ente los discos de cefalosporinas y el disco comercial de Ácido Fenil Borónico, aunque la teoría nos indica de que varias bacterias cuentan en su cromosoma el gen que codifica la enzima AmpC por eso es que de forma natural tienen resistencia a varios antibióticos pero existen cepas que adquieren el gen en plásmidos y es necesario la detección de estos.

Los datos que nos da el test diagnóstico para la detección de la enzima AmpC son aceptables pero no idóneos esto a que el reactivo no es especifico puesto que nos dio un resultado del 75 % en la detección de la enzima AmpC y teniendo en cuenta el reactivo también detecta KPC y puede tener sinergia con BLEE como se vio en los resultados debido a que el reactivo no es especifico.

Los datos que nos da el test diagnóstico para la detección de la enzima KPC nos da una sensibilidad del 50 % esto se da por las pocas bacterias que se utilizó en el diagnóstico y teniendo en cuenta que se utilizó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en la cual según las recomendaciones del Instituto Carlos Malbrán nos indica que no es recomendable utilizar la técnica para la determinación de la enzima en esta cepa.

13.2 Recomendaciones

- 1) El Ácido Fenil Borónico se disuelve en solventes orgánicos por eso es necesario el uso de DMSO para preparar la solución que se inoculara a los discos.
- 2) En la determinación de *Pseudomonas aeruginosa* KPC no se recomienda el uso de la prueba fenotípica esto debido a que se podría dar un resultado Falso negativo debido a la impermeabilidad de su pared externa del microorganismo, para lo cual se tendrá que utilizar métodos moleculares, en la determinación de esta cepa productora de KPC.
- 3) El Instituto Carlos Malbrán nos facilita la formula (Distancia = Radio1 + Radio 2 +5) en la que nos indica a la distancia que se pone el disco de Ácido Fenil Borónico.

Pero si no contamos con el dato de los radios se recomienda usar una distancia de 15 mm.

4) El uso del papel para la preparación de los discos es ampliamente importante, este tiene que presentar un espesor de 7mm puesto que si es menos corremos el riesgo de perder el reactivo de los discos con el pasar del tiempo.

14 Bibliografía

- Alba, J., Ishii, Y., Thomson, K., Smith, E., & Yamaguchi, K. (2005). Kinetics Study of KPC-3, a Plasmid Encoded Class A Carbapenem Hydrolyzing B-Lactamase. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 4760–4762.
- Ausina Ruiz V, P. P. (2006). Principales grupos de seres vivos con capacidad patógena para el hombre. En M. G. Auxina Ruiz V, *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (págs. 1-18). Madrid: Panamericana.
- Bauernfeind, A., Chong, S., & Schweighart, S. (1989). Amplió la β-lactamasa de amplio espectro en Klebsiella pneumoniae incluyendo resistencia a cefamicinas. 316-321.
- Bush, K., & Jacoby, G. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 969-976.
- Cai, J. C., Zhou, H. W., Zhang, R., & Chen, G. X. (2008). Emergence of Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, and Escherichia coli Isolates Possessing the Plasmid Mediated Carbapenem Hydrolyzing B-Lactamase KPC-2 in IntensiveCare Units of a Chinese Hospital. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2014–2018.
- Camaro, M., Catala, V., & Martinez, R. (2013). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. Madrid: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Camaro, M., Catala, V., Gimeno, C., Martinez, R., & Olmos, P. (2013). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. Madrid: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
- Chen, L., Anderson, D., & Paterso, D. (2012). Overview of the epidemiology and the threat of Klebsiella pneumonia carbapenemases (KPC) resistance. *Infect and Drug Resistance*, 133-141.
- Corso, A. (2009). Sensitive Screening Tests for Suspected Class A CarbapenemaseProduction in Species of Enterobacteriaceae. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 1631–1639.
- Cuzon, G., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in blaKPC Gene Mobilization. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 5370-5373.
- Del Valle, D. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 78-83.
- DM., L. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical. lin Microbiol Rev., 557-584.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. inlfuenzae. *British Journal of Experimental Pathology*, 226-236.
- Gérvas, J. (2000). La resistencia a los antibióticos, un problema. Atención Primaria, 589-596.

- Hanson ND, S. C. (1999). Regulation of inducible. Curr Pharm Des., 881-894.
- Jacoby GA, M.-P. L. (2005). The new beta-lactamases. N Engl J Med, 352-380.
- Jarpan, S. (2013). Ficha Tecnica para Estudio Screening para busqueda de Carbapenemasas . Santiago.
- Knott Hunziker, V., Jaurint, B., & Grundstromt, T. (1983). The inhibition of class C B-lactamases by boronic acids. *Biochem. J.*, 229-233.
- Leavitt, A., Carmeli, Y., Chmelnitsky, I., Goren, M., Ofek, I., & Navon, S. (2010). Molecular Epidemiology, Sequence Types, and Plasmid Analyses of KPC-Producing Klebsiella pneumoniae Strains in Israel. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 3002–3006.
- Lossa. (1 de abril de 2011). *Intramed*. Obtenido de Intramed: http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=69279
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*, 821-830.
- Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, L., & Corso, L. (2009). Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 1631-1639.
- Philippon A, A. G. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 46-57.
- Piedra Carrasco, N., Fàbrega, A., Calero Caceres, W., Cornejo, T., Brown Jaque, M., Mir Cros, A., . . . Gonzalez Lopez, J. J. (2017). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLOS ONE*, 1-11.
- Poirel, L., Barbosa Vasconcelos, A., Rocha Simões, R., Martins Da Costa, P., Liu, W., & Nordmann, P. (2012). Environmental KPC-Producing Escherichia coli Isolates in Portugal. Antimicrob Agents Chemother, 1662 - 1663.
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile B Lactamases. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 440–458.
- Seral, C., Gude, J., & Castillo, J. (2012). Emergencia de β-lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas):origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Esp Quimioter*, 89-99.
- Smith, E., Hanson, N., Herrera, V., Black, J., Lockhart, T., Hossain, A., . . . Thomson, K. (2003). Plasmid-mediated carbapenemhydrolysing hydrolysing B-lactamase KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from Switzerland. *J Antimicrob Chemother*, 711-714.

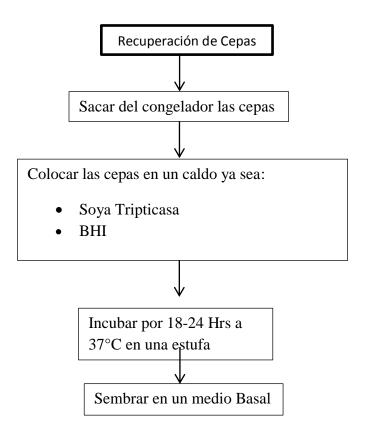
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Centro Internacional de Investigaciones Médicas (CIDEIM), 223-233.
- Tsakris, A., Krsito, I., & Poulou, A. (2009). Evaluacion de pruebas de disco de acido boronico para diferenciar KPC-poseyendo aislados de Klebsiella Pneumoniae en el laboratorio. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 362-367.
- Vera, A., Barriga, C., Carrasco, s., Lima, C., Aguayo, A., Dominguez, M., . . . Gonzalez, G. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Infectol*, 476-484.
- Vila, J., Martin, S., & Sanchez Cespedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1210–1215.
- Woodford, N., Tierno, P., Young, K., Tysall, L., & Palepou, M. F. (2004). Outbreak of Klebsiella pneumoniae Producing a New Carbapenem Hydrolyzing Class A B-Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 4793–4799.
- Woodford, N., Tierno, P., Young, K., Tysall, L., Palepou, M., Ward, E., . . . Livermore, D. (2014). Outbreak of Klebsiella pneumoniae Producing a New Carbapenem Hydrolyzing Class A B-Lactamase, KPC-3, in a Hydrolyzing. *American Society for Microbiology*, 4793–4799.
- Yagi, T., Wachino, J.-i., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., & Arakawa, Y. (2005). Métodos prácticos que utilizan compuestos de ácido borónico para la identificación de Klebsiella pneumoniae productora de β-Lactamasa de clase C y Escherichia coli. *J Clin Microbiol*, 2551-2558.
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G., Domenech, A., Biddle, J., Steward, C., . . . Tenover, F. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*, 1151-1161.
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G., Domenech, A., Biddle, J., Steward, C., . . . Tenover, F. (2008). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 809.
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G., Domenech, A., Biddle, J., Steward, C., . . . Tenover, F. (2008). Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 809.

ANEXOS

15.1 Preparación de Agar Mueller Hinton

- ✓ Disolver el agar en la cantidad de agua que requiera de acuerdo a los cálculos realizados.
- ✓ Medir el pH (En caso de que el pH del agar no esté en los parámetros (7.2-7.4) ajustar el mismo con NaOH 0,1 Normal o HCl 0,1 Normal).
- ✓ Esterilizar en autoclave por 15 minutos.
- ✓ Esperar a que salga de la autoclave
- ✓ Enfriar a una temperatura aproximada de 60°C y proceder a plaquear.
- ✓ Al momento de plaquear verificar que el espesor del agar sea de 4mm.
- ✓ Controlar los cationes (Ca: 20 25 mg/L Mg: 10 12.5 mg/L) el control se realiza con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y gentamicina 10 µg su haló tiene que estar entre 16 21 mm.
- ✓ Controlar el zinc con una cepa ya conocida su sensibilidad a carbapanemicos definido y determinar si el halo se repite.

15.2 Recuperación de cepas



15.3 Reporte de las réplicas realizadas

	Resultados Obtenidos									
Numero de Replica	1 Enterobacter cloacae impermabilidad + AmpC Desreprimido	2 Escherichia coli BLEE	3 Serratia marcescens BLEE	4 Acinetobacter baumani Oxacilinasa	5 <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> Metalobetalactamasa	6 Escherichia coli AmpC Plasmidico	7 Klebsiella Pneumoniae	8 Klebsiella pneumoniae KPC	9 Klebsiella pneumoniae impermeabilidad a carbapenemicos + BLEE	10 Pseudomonas aeruginosa KPC
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
6	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
7	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
11	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
12	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
13	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
14	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
15	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
16	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
17	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
18	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
19	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
20	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
21	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
22	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
23	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
24	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
25	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
26	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
27	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
28	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
29	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
30	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

Resultados obtenidos en las 30 repeticiones

15.4 Formulas para determinar los valores estadísticos

• Sensibilidad =
$$\frac{a}{(a+b)} * 100$$

•
$$Especificidad = \frac{d}{(c+d)} * 100$$

• Falsos positivos =
$$\frac{c}{(a+c)} * 100$$

• Falsos negativos =
$$\frac{b}{(b+d)} * 100$$

•
$$Eficiencia = \frac{(a+d)}{n} * 100$$

Después de n ensayos, los resultados pueden dividirse en cuatro categorías:

- $a = n^{\circ}$ de presuntivos positivos encontrados como positivos (verdaderos positivos)
- $b = n^o$ de presuntivos negativos encontrados como positivos (falsos negativos)
- $c = n^o$ de presuntivos positivos encontrados como negativos (falsos positivos)
- $d = n^{\circ}$ de presuntivos negativos encontrados como negativos (verdaderos negativos)

15.5 Clasificación de β- lactamasas

Los esquemas de clasificación de β -lactamasas bacterianas, ampliadas a partir de Bush y colaboradores.

Grupo	Grupo	Grupo Bush- Clase Inhibido por		do por			
Bush- Jacoby (2009)	Jacoby- Medeiros (1995)	molecular (subclase)	Sustrato (s) distintivo (s)	CA or TZB	EDTA	Definir característica(s)	Enzimas representativas
1	1	do	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que bencilpenicilina; hidroliza cefamicinas	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX- 1, MIR-1
1e	NI b	do	Cefalosporinas	No	No	Aumento de la hidrólisis de ceftazidima y, a menudo, otras oxiimino- β-lactamas	GC1, CMY-37
2a	2ª	UN	Penicilinas	Sí	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilina que las cefalosporinas	PC1
2b	2b	UN	Penicilinas, primeras cefalosporinas	Sí	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilina y cefalosporinas	TEM-1, TEM- 2, SHV-1
2be	2be	UN	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	Sí	No	Aumento de la hidrólisis de oxyimino-β-lactamas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	UN	Penicilinas	No	No	Resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	UN	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	No	No	Aumento de la hidrólisis de oxyimino-β-lactamas combinado con resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50
2c	2c	UN	Carbenicilina	Sí	No	Aumento de la hidrólisis de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	UN	Carbenicilina, cefepima	Sí	No	Aumento de la hidrólisis de carbenicilina, cefepima y cefpirome	RTG-4

2d	2d	re	Cloxacilina	Variable	No	Aumento de la hidrólisis de cloxacilina u oxacilina	OXA-1, OXA- 10
2de	NI	re	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	Hidroliza cloxacilina o oxacilina y oxiimino-β- lactama	OXA-11, OXA- 15
2df	NI	re	Carbapenems	Variable	No	Hidroliza cloxacilina u oxacilina y carbapenémicos	OXA-23, OXA- 48
2e	2e	UN	Cefalosporinas de espectro extendido	Sí	No	Hidroliza las cefalosporinas. Inhibido por ácido clavulánico pero no aztreonam	CepA
2f	2f	UN	Carbapenems	Variable	No	Aumento de la hidrólisis de carbapenémicos, oxiimino-β-lactamas, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Sí	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenémicos pero no monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Sí	Hidrólisis preferencial de carbapenémicos	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconocido	. // 11	100	7. 1°		

(G. Jacoby y K. Bush, http://www.lahey.org/Studies/)

Principales familias de β-lactamasas de importancia clínica

Enzima familia (a)	Grupo o subgrupo funcional	No. de enzimas (b),(c)	Enzimas representativas
CMY	1, 1e	50	CMY-1 a CMY-50
TEM	2b, 2be, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
	2ber	9	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
SHV	2b, 2be, 2br	127	

^a CA, ácido clavulánico; TZB, tazobactam.

^b NI, no incluido.

	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72
CTX-M	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) a CTX-M-92
POR	2be	5	PER-1 a PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 a VEB-7
GES	2f	15 (d)	GES-2 a GES-7 (IBC-1) a GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 a KPC-10
SME	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
OXA	2d, 2de, 2df	158	
	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
DIABLILLO	3a	26	IMP-1 a IMP-26
EMPUJE	3a	23	VIM-1 a VIM-23
INDIANA	3a	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 a IND-7

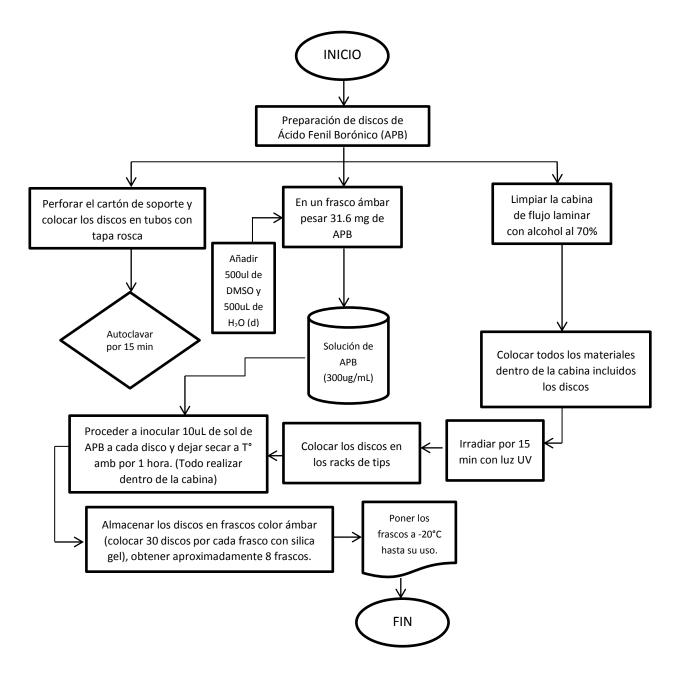
a Las familias de enzimas incluyen aquellas para las cuales se han asignado números basados en estructuras primarias de aminoácidos (G. Jacoby y K. Bush, http://www.lahey.org/Studies/).

b Compilado hasta diciembre de 2009.

c La suma de los subgrupos en cada familia no siempre es igual a la cantidad total de enzimas en cada familia, porque algunos números de enzimas han sido retirados, y algunos investigadores no han asignado una designación funcional a los enzimas que proporcionaron la secuencia de aminoácidos.

d GES-1, a diferencia de otros miembros de la familia GES, tiene poca interacción detectable con imipenem.

15.6 Preparación de discos de Ácido Fenil Borónico



Cálculos para la obtención del peso de Ácido Fenil Borónico

$$\frac{30mg}{1mL}*\frac{1mL}{1000\mu L}*\frac{1\mu g}{0.001mg}*\frac{30\mu g}{1\mu L}=30\,\mu g/\mu L*10\mu L\,disco=300\mu g\,en\,cada\,disco$$

Ajuste del peso para el Ácido Fenil Borónico por su concentración de 95% de pureza

30mg Ácido Fenil Borónico......95% Xmg Ácido Fenil Borónico......100% $X = \frac{30mg \text{ Ácido Fenil Borónico } x \text{ } 100\%}{95\%} = 31,6mg \text{ Acido fenil boronico}$

15.7 Validación de Discos de Ácido Fenil Borónico

