

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Detección de los genes de carbapenemasas  $bla_{KPC}$  y  $bla_{NDM}$  en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala**

**Tamara Ileana Velásquez Porta**

**Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas**

**Guatemala, agosto de 2016**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Detección de los genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala

Informe de tesis presentado por

Tamara Ileana Velásquez Porta

Para optar al grado de Maestra en Ciencias

Maestría en Microbiología de Enfermedades Infecciosas

Guatemala, agosto de 2016

JUNTA DIRECTIVA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria Académica
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreína Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

CONSEJO ACADÉMICO  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.

María Ernestina Ardón Quezada, MSc.

Jorge Mario Gómez Castillo, MA.

Clara Aurora García González, MA.

José Estuardo López Coronado, MA.

## Dedicatoria

A Dios, mi fuente de fe y fortaleza.

A mi familia, especialmente a mi mamá y a mi prima Rosibel Porta.

A mi asesora y amiga Dalia Lau, esta tesis no sería posible sin ti.

A la promoción MAENFI 2014-2015, especialmente a Anna Gabriella Soto, Lily Camey, Kareen Arias, Silvia Archila, Isabel Guerra, Damaris Tinti y Mariana Herrera. Porque sus almas libres enriquecieron mi vida.

A la Dra. Carolina Arévalo, por su ayuda incondicional.

## Agradecimientos

Al Laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios, especialmente a la Licda. Laura Valenzuela, supervisora del área de Microbiología.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación de Salud Integral.

A Licda. Remei Gordillo y Licda. Rosita Cortés del hospital Roosevelt.

A la Licda. Claudia Valenzuela, del Laboratorio Nacional de Salud.

A Marina Ruano y Luis Aguirre.

## RESUMEN

La resistencia a los antibióticos constituye uno de los problemas más relevantes de salud pública en todo el mundo. Esta situación puede llevar a la pérdida de uno de los mayores avances de la medicina: el uso de antibióticos para prevenir y tratar infecciones microbianas. En el año 2015, este problema fue declarado como una crisis por diversas instituciones de salud autorizadas, incluyendo la Infectious Diseases Society of America, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Las Enterobacterias productoras de carbapenemasas representan la mayor amenaza a nivel mundial. Las carbapenemasas son potentes enzimas que inactivan los antibióticos carbapenémicos y en general, a todos los antibióticos betalactámicos. Las consecuencias para el tratamiento de las infecciones causadas por estas bacterias son relevantes, ya que los carbapenemes son una de las últimas opciones disponibles para bacterias multirresistentes.

Esta investigación tuvo como objetivos determinar la presencia de los genes de carbapenemasas *blaKPC* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) y *blaNDM* (New Delhi Metalobetalactamasa) en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, caracterizar el tipo de muestra y definir el servicio del hospital donde se aislaron este tipo de bacterias. Se utilizó el método molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. El estudio fue descriptivo, prospectivo con un muestreo por conveniencia.

Se analizaron 54 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes (imipenem y/o meropenem), de éstos, 49 (91 %), fueron portadoras del gen *blaNDM*. Esto demuestra la diseminación que han tenido estas bacterias multirresistentes desde el primer caso reportado en el hospital General San Juan de Dios. En 5 aislamientos (9 %) de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem no se detectó ninguno de los genes investigados: *blaNDM* y *blaKPC*. *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen *blaNDM* se aisló con más frecuencia en

muestras de sangre (37%) y orina (14%). Este resultado concuerda con las publicaciones a nivel mundial en donde las infecciones más frecuentes por estas bacterias son las causadas en sangre (septicemias) y orinas (infecciones urinarias). En concordancia con otros estudios, los servicios de intensivos son los más afectados por la presencia de bacterias portadoras de carbapenemasas. En esta investigación, el 53% de cepas de *Klebsiella pneumoniae* portadoras del gen de carbapenemasa *bla*NDM fue aislada de pacientes en estos servicios.

Los resultados de este estudio demuestran que *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen *bla*NDM se ha diseminado dentro del hospital General San Juan de Dios, desde el primer caso reportado hace 5 años, poniendo en riesgo de muerte a los pacientes, especialmente a los hospitalizados en los servicios de intensivos. Por lo que se recomienda implementar tecnología de biología molecular en el laboratorio clínico del hospital General San Juan de Dios, que permita realizar en forma rápida y precisa el diagnóstico y vigilancia de las principales enfermedades infecciosas y de mecanismos de resistencia bacteriana. Así mismo, recomendar el cumplimiento de las normas estándar de higiene y bioseguridad en todos los servicios del hospital, para tratar de detener la diseminación de bacterias productoras de carbapenemasas.

# ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Carbapenemasas	3
1. Definición	3
2. Origen y transmisión	3
3. Clasificación	4
B. Serincarbapenemasas	6
1. Carbapenemasas tipo KPC	6
C. Metalobetalactamasas	7
1. Carbapenemasas tipo NDM	7
D. Detección de las carbapenemasas	8
1. Concentración inhibitoria mínima (CIM)	8
2. Pruebas microbiológicas	9
3. Pruebas moleculares	11
E. Mecanismos de resistencia de las Enterobacterias a los carbapenemes	12
F. Situación actual de las carbapenemasas	12
G. Situación de las carbapenemasas en Guatemala	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. OBJETIVOS	18
V. HIPÓTESIS	19
VI. METODOLOGÍA	20
A. Universo	20
B. Muestra	20
C. Recursos	20
D. Materiales	20
E. Procedimientos	23

F. Diseño del estudio	26
G. Diseño del muestreo	26
VII. RESULTADOS	27
VIII. DISCUSIÓN	32
IX. CONCLUSIONES	39
X. RECOMENDACIONES	40
XI. REFERENCIAS	41
XII. ANEXOS	46



## I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud declaró, en abril del 2014, que la resistencia a los antimicrobianos es una crisis a nivel mundial. Un problema importante y muy preocupante es la aparición y diseminación de Enterobacterias productoras de carbapenemasas. (Horcajada, Torre-Cisneros, Peña, & Fariñas, 2014). Estos microorganismos causan infecciones asociadas a tasas altas de mortalidad, con frecuencia contienen otros genes de resistencia, por lo que las opciones de tratamiento son muy limitadas y tienen el potencial de diseminarse rápidamente, ya que las Enterobacterias son una causa común de infecciones intrahospitalarias y de la comunidad. (CDC, 2015)

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de los genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) y *bla<sub>NDM</sub>* (New Delhi Metalobetalactamasa) en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

La bacteria seleccionada para este estudio fue *Klebsiella pneumoniae*, ya que es una causa importante de infecciones nosocomiales, principalmente neumonías y septicemias en recién nacidos y en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. Para la detección de los genes *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>*, que codifican para las carbapenemasas KPC y NDM respectivamente, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. Este estudio es de los pocos en los que se han aplicado técnicas moleculares para la detección de genes específicos en aislamientos bacterianos del Hospital General San Juan de Dios. Esta investigación tuvo algunas limitaciones, dentro de las más importantes está el no contar con un laboratorio de biología molecular dentro de las instalaciones del área de microbiología del Hospital General San Juan de Dios, por lo que los procedimientos se realizaron en una institución externa. Otra limitación fue la recolección completa de datos demográficos, clínicos y epidemiológicos de los pacientes.

Los resultados obtenidos en este estudio serán de beneficio para los pacientes y el personal del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, principalmente

porque apoyan la aplicación de las recomendaciones hechas por la OPS en los años 2012 y 2014 ante la transmisión de este tipo de bacterias multirresistentes, en donde los laboratorios de microbiología son la primera línea de contención a través de la detección oportuna de los mecanismos de resistencia bacteriana, lo que permitirá determinar la magnitud del problema y así orientar las medidas de control. (Organización Panamericana de la Salud, 2012).

## II. ANTECEDENTES

### A. Carbapenemasas

#### 1. Definición

Las carbapenemasas son potentes enzimas de la familia de las betalactamasas, presentes en bacterias Gram negativo, que hidrolizan, y por lo tanto, inactivan a los antibióticos del grupo de los carbapenemes (imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem). Estas enzimas además, son capaces de hidrolizar casi todos los antibióticos betalactámicos, representando la familia más versátil de las betalactamasas. (De la Lastra, Virginia., Ulloa Teresa., Pinto Eugenia., Eugenia., Mario., & Francisco., 2010) (Tzouveleakis, Markogiannakis, Psychogiou, Tassios, & Daikos, 2012)

Las consecuencias para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias productoras de carbapenemasas son relevantes, dado que prácticamente no hay alternativas terapéuticas, ya que los carbapenemes son la última línea de defensa. (Doyle et al., 2012)

#### 2. Origen y transmisión

El diseño de los antibióticos carbapenémicos está inspirado por el producto natural tienamicina, producido por el actinomiceto del suelo *Streptomyces catleya*. De hecho, los carbapenemes y el ácido olivánico son potentes betalactamasas naturales que se han encontrado en fuentes diversas. Debido a la presencia de estas moléculas en el suelo, es lógico esperar que las enzimas que las degradan sean producidas por otros microorganismos del suelo como *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, bacterias en las cuales se ha confirmado la presencia de metalobetalactamasas, las cuales les confieren ventaja selectiva para crecer en el ambiente. Se ha descrito también que las carbapenemasas cromosomales están involucradas en mecanismos de síntesis y defensa de la pared celular bacteriana. (Queenan & Bush, 2007)

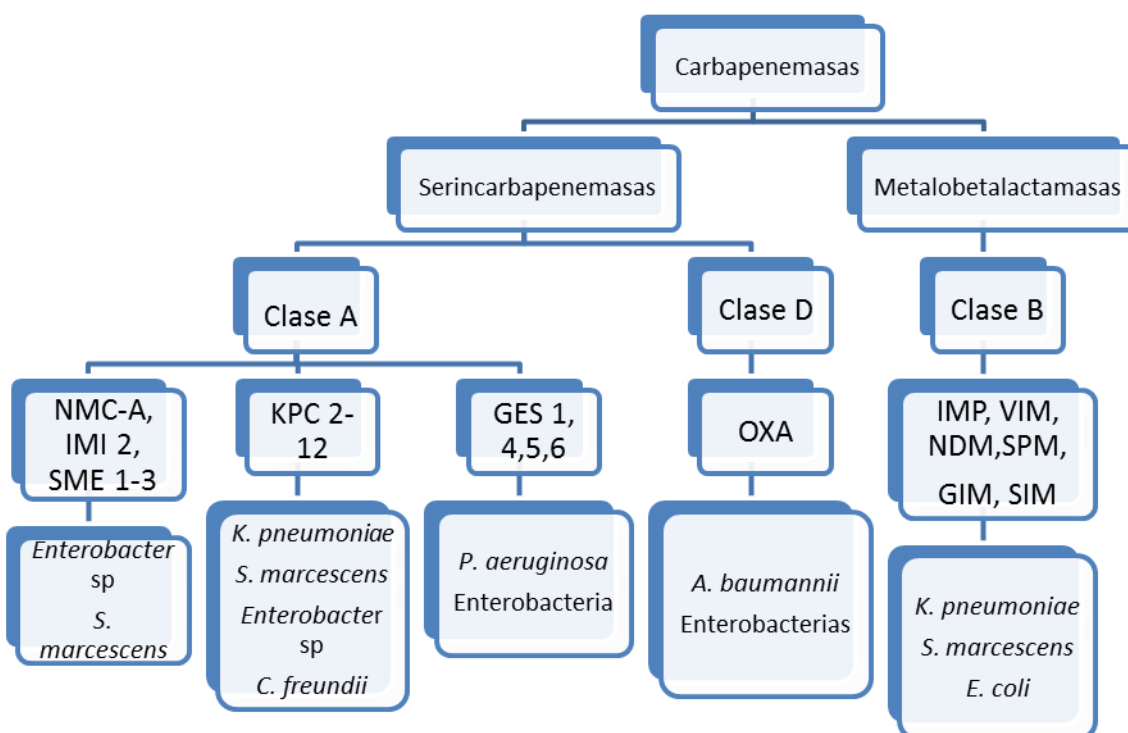
Diversos estudios han buscado los genes que codifican para las carbapenemasas en bacterias del ambiente. Por ejemplo, la carbapenemasa clase A SFC-1 fue encontrada en un aislamiento de *Serratia fonticola*. Los genes de las carbapenemasas tipo OXA han sido encontrados como componentes naturales de los cromosomas de varios bacilos Gram negativo no fermentadores. Así como se han encontrado estas enzimas en ambientes naturales, la primera carbapenemasa encontrada en un aislamiento clínico fue la VIM-2, de una *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, del sistema de aguas residuales de un hospital. Investigaciones posteriores encontraron dos cepas de *P. aeruginosa* con este gen. Todos estos hallazgos parecen confirmar que los genes de las carbapenemasas proceden en dos direcciones: los ambientes naturales proveen el material genético y las cepas clínicas dispersan la información, tanto en ambientes hospitalarios, como en la comunidad. (Queenan & Bush, 2007)

### 3. Clasificación

Las carbapenemasas se clasifican en dos familias moleculares mayores, que se distinguen por el mecanismo de hidrólisis en el sitio activo. En el primer grupo están las enzimas que poseen un residuo de serina en el sitio activo, posición 70, se les llama serincarbapenemasas. En el segundo grupo, están las carbapenemasas que en el sitio activo requieren cationes divalentes, usualmente zinc, como cofactor para su actividad enzimática y se denominan metalobetalactamasas. Estas dos familias moleculares, a su vez, se dividen en tres clases moleculares, según la homología de los aminoácidos, de acuerdo a Ambler: las clases moleculares son A, B y D (Figura 1). En la clase A se agrupan las carbapenemasas: NMC (not metalloenzyme carbapenemase), IMI (imipenem-hydrolyzing beta-lactamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) y GES (Guiana extended spectrum). Desde el punto de vista estructural, las carbapenemasas de la clase A son enzimas monoméricas que contienen entre 265 y 269 residuos de aminoácidos, con masas moleculares entre 25 y 32 kDa. (T. R. Walsh, Toleman, Poirel, & Nordmann, 2005)

En la clase D están las OXA (oxacillin-hydrolyzing). Las clases moleculares A y D son serincarbapenemasas. La clase molecular B son metallobetalactamasas y se encuentran las siguientes enzimas: IMP (active on imipenem), VIM (Verona integron-encoded metallobeta-lactamase), NDM (New Delhi metallobeta-lactamase), SPM (Sao Paulo metallobeta-lactamase), GIM (German imipenemase) y SIM (Seoul imipenemase). (T. R. Walsh et al., 2005)

**Figura No. 1. Clasificación de las carbapenemasas, según Ambler**



Fuente: (García, 2012)

## B. Serincarbapenemasas

Estas carbapenemasas fueron descubiertas hace 20 años, se han detectado en *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella* spp. Las bacterias que expresan estas enzimas se caracterizan por la reducida susceptibilidad a imipenem, aunque los resultados de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) pueden estar en un rango de susceptibilidad intermedia a totalmente resistente. Estas enzimas no pueden detectarse en las pruebas de susceptibilidad rutinarias. En la clase molecular A de las serincarbapenemasas, las mayores familias incluyen a las enzimas NMC, IMI, SME y KPC. Todas tienen la habilidad de hidrolizar a una gran variedad de antibióticos beta lactámicos, que incluyen a los carbapenemes, cefalosporinas, penicilinas y el aztreonam. Así mismo, todas son inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Otro miembro de esta familia, la enzima GES, fue identificada originalmente como una betalactamasa de espectro extendido, pero luego se observó que tenían una baja, pero medible hidrólisis del imipenem. (Queenan & Bush, 2007)

### 1. Carbapenemasas tipo KPC

La primera cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC fue aislada e identificada en el estado norteamericano de Carolina del Norte en 1996. En pocos años, probablemente a su gran movilidad genética en plásmidos, los genes responsables (*bla<sub>KPC</sub>*) de la síntesis de esta enzima se diseminaron ampliamente. Actualmente la enzima KPC es la carbapenemasa de la clase A más diseminada en el mundo, su presencia ha sido reportada en un número creciente de enterobacterias y bacilos Gram negativo no fermentadores, pero los informes siguen predominando en *K. pneumoniae* donde el clon ST258 ha sido identificado como el transportador principal para su difusión. Las KPC hidrolizan eficientemente penicilinas, cefalosporinas y monobactamas, pero son menos eficientes en hidrolizar cefamicinas y carbapenems, y están débilmente inhibidas por los inhibidores de betalactamasas. Con frecuencia las bacterias que albergan KPC expresan otras betalactamasas de espectro extendido, incluyendo betalactamasas (BLEE) tipo CTX-M (Cefotaximasa-Múnich), TEM (Temoniera) y SHV (Sulphydryl Variable). (Munoz-Price & Quinn, 2009)

A través de la detección de variantes en un aminoácido simple, se han podido dividir a las KPC en 12 isoenzimas. La KPC-2 fue identificada en 2003, y es el resultado de una mutación en la KPC-1. La KPC-3 fue reportada entre 2000 y 2001 en un brote de *Klebsiella pneumoniae* en Nueva York. (Naas et al., 2008)

### **C. Metalobetalactamasas**

Las metalobetalactamasas están incluidas en la clase molecular B, tienen dos familias importantes, la VIM y la IMP, y recientemente ha cobrado importancia por su grado de resistencia la NDM. Estas enzimas también son transferibles porque se encuentran en genes casetes localizados principalmente en integrones tipo 1 y, en algunas ocasiones, en plásmidos o transposones. Habitualmente, estas enzimas están asociadas con otros genes de resistencia, lo cual les proporciona resistencia a múltiples antibióticos. Además de los carbapenemes, la mayoría de estas enzimas hidrolizan cefalosporinas y penicilinas, pero carecen de la capacidad para hidrolizar el aztreonam. El mecanismo de la hidrólisis depende de la interacción de las betalactamasas con iones de zinc en el sitio activo de la enzima, resultantes en el rasgo distintivo de su inhibición por EDTA. (Rasmussen & Bush, 1997)

Desde la identificación inicial de las metalobetalactamasas, una considerable cantidad de trabajos de secuenciación ha demostrado alta variabilidad en las secuencias primarias y en las estructuras moleculares. Actualmente las metalobetalactamasas están diseminadas en varias especies bacterianas, tienen un grado mayor de resistencia comparadas con las serincarbapenemasas y son objeto de una intensa búsqueda en todo el mundo. (Moellering, 2010)

#### **1. Carbapenemasas tipo NDM**

En el año 2007, una persona de sexo masculino, de 59 años de edad, residente de Suecia, viajó a la India, en donde fue hospitalizado en la ciudad de Nueva Delhi, para atender un absceso en el glúteo. En enero de 2008 fue trasladado a un hospital de Suecia, donde, en

el día después de la admisión, un cultivo de orina mostró un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiples antibióticos, incluyendo los carbapenemes. El análisis de PCR de esta cepa no pudo detectar genes de metalobetalactamasas conocidos y los estudios de secuenciación indicaron posteriormente que la resistencia era debida a un nuevo tipo de enzima. La nueva metalobetalactamasa se designó New Delhi Metalobetalactamasa (NDM-1), ya que los autores del informe creen que la resistencia se originó en la India. (Johnson & Woodford, 2013). El examen molecular del aislado reveló que contenía una nueva metalobetalactamasa que hidroliza fácilmente penicilinas, cefalosporinas y carbapenems (con la excepción de aztreonam). El gen que codifica esta nueva betalactamasa se encontró en un elemento genético de 180 kb, era fácilmente transferido a otras Enterobacterias y contenía una variedad de otros determinantes de resistencia, incluyendo un gen que codifica otra betalactamasa de amplio espectro (CMY-4) y genes que inactivan a eritromicina, ciprofloxacina, rifampicina y cloranfenicol. Además, el gen codifica un mecanismo de resistencia conocido como bomba de eflujo, por lo que tiene capacidad de causar resistencia adicional a los antimicrobianos y la presencia de promotores que aseguran la transcripción de estos peligrosos genes. (Kumarasamy et al., 2010)

#### **D. Detección de las carbapenemasas**

##### **1. Concentración inhibitoria mínima (CIM)**

La detección de la actividad de las carbapenemasas en un cultivo puede ser un reto para un laboratorio de microbiología clínica. El primer motivo de sospecha de que una carbapenemasa está involucrada en una infección clínica es una CIM elevada de los carbapenemes. Entre *P. aeruginosa* cepas con VIM, IMP, GIM, SIM y SPM las CIM de imipenem se han reportado en la gama de 8 a mayor de 128 µg/ml. Sin embargo, cuando se transfirieron los genes de estas enzimas en *E. coli*, el CIM de imipenem fue observado por lo general mucho inferior, a veces tan bajo como de 0,5 µg/ml. Este efecto de bajo nivel resistencia transferible, también se ha observado en *K. pneumoniae*. (Castanheira, Toleman, Jones, Schmidt, & Walsh, 2004)



La serincarbapenemasa KPC también ha reportado dificultades para ser detectada por CIM. Generalmente, la KPC está asociada a una CIM de imipenem tan baja como 2 µg/ml y con un inóculo bajo en el caldo de microdilución, pueden obtenerse CIM con valores susceptibles. Para documentar estas inconsistencias en la detección de KPC de *Klebsiella pneumoniae*, según el método de prueba, Tenover y otros (2006), utilizaron 15 cepas bien caracterizadas como no susceptibles a imipenem y meropenem, para realizar pruebas de susceptibilidad utilizando lo siguiente: microdilución en caldo según la CLSI, Etest, MicroScan WalkAway, BD Phoenix Sensititre Autoreader, VITEK, and VITEK2. Estos sistemas automatizados reportaron la susceptibilidad a carbapenem en un rango de 6.7% a 87%, dependiendo del sistema usado. Los resultados de Etest fueron inconsistentes debido a la presencia de colonias en las zonas de inhibición. El fallo de los sistemas automatizados en detectar las cepas productoras de KPC indica la necesidad de implementar nuevas metodologías. Otra opción es hacer un tamizaje de las cepas resistentes a meropenem, que ha resultado más sensible para detectar este tipo de enzima. Sin embargo, la especificidad se ve reducida debido a la resistencia por otros mecanismos como BLEE y AmpC. (Tenover et al., 2006)

## 2. Pruebas microbiológicas

La prueba de aproximación de disco con EDTA, se utiliza a menudo como un tamizaje cepas productoras de metalobetalactamasas. En esta prueba, la zona de inhibición alrededor de un disco de antibiótico betalactámico se altera por la acción del inhibidor en la metalobetalactamasa del organismo correspondiente. El imipenem, ceftazidima y cefepima se han utilizado para esta prueba. La sensibilidad con el método de disco de imipenem-EDTA era 100% para *Pseudomonas* spp. y 95,7% para *Acinetobacter* spp. (Arakawa et al., 2000)

En un estudio que comparó diferentes combinaciones de antibióticos e inhibidores, se observó que las combinaciones imipenem-EDTA fueron las más sensibles para la detección de metalobetalactamasa que producen *Pseudomonas* spp y *A. baumannii*, mientras

ceftazidima-ácido clavulánico con EDTA era el más exacto para *K. pneumoniae* y cefepima-ácido clavulánico con EDTA era el más exacto para *E. cloacae* y *C. freundii*, con una sensibilidad global para este método de 86,7%. (Anderson et al., 2007)

Las tiras de Etest para las pruebas de metalobetaactamasa también están disponibles como combinaciones imipenem-EDTA (AB BIODISK, Solna, Suecia). Una prueba positiva para metalobetalactamasa se interpreta como una disminución triple o mayor de CMI de imipenem en la presencia de EDTA. Esta tira de prueba ha reportado una sensibilidad del 94% y una especificidad del 95%. Sin embargo, resultados falsos negativos han sido reportados para el Etest cuando un cultivo tenía una CMI de imipenem menor a 4 µg/ml. También se ha observado que el EDTA utilizado sin combinaciones de antibióticos, tiene una acción inhibitoria frente a algunas bacterias debido a la permeabilización de la membrana externa y puede conducir a resultados falsos positivos. (Timothy R Walsh, Bolmström, Qwörnström, & Gales, 2002)

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda realizar el test de Hodge modificado para la identificación de carbapenemasas en enterobacterias y bacilos Gram negativo no fermentadores, que resulten resistentes a los carbapenems en las pruebas de susceptibilidad antibiótica regulares. El test de Hodge se basa en la capacidad que tiene la carbapenemasa, presente en la cepa que se utilizará como control positivo, de hidrolizar al antibiótico del grupo de los carbapenems, favoreciendo o no el crecimiento de la cepa en estudio. Una de las limitaciones del test de Hodge es que no todas las enterobacterias productoras de carbapenemasas tienen un resultado positivo en el test de Hodge. Y algunos resultados positivos se han encontrado en cepas resistentes a los carbapenems, pero que tienen otros mecanismos de resistencia que no es la producción de carbapenemasas. Por lo que la especificidad del test de Hodge presenta resultados variables. (CLSI, 2012)

### 3. Pruebas moleculares

Las técnicas moleculares son el estándar de oro para la identificación precisa de los genes de las carbapenemasas. La mayoría de estas técnicas se basan en la PCR y puede ser seguida por una secuenciación si es necesaria la identificación precisa del gen (por ejemplo, tipo VIM, tipo KPC, el tipo NDM o OXA-48). Una prueba de PCR realizada directamente en las colonias puede dar resultados dentro de 4-6 h (o menos cuando se utiliza tecnología en tiempo real) con una excelente sensibilidad y especificidad. Las principales desventajas de las pruebas moleculares son su costo, la necesidad de microbiólogos entrenados y la incapacidad para detectar nuevos genes no identificados. La secuenciación de los genes es interesante sobre todo para la investigación y con fines epidemiológicos. La Identificación precisa del tipo de carbapenemasas no se necesita para el tratamiento de pacientes o para la prevención de brotes. (Dortet, Poirel, & Nordmann, 2012)

La identificación del gen de carbapenemasa requiere secuenciación de la región codificante entera. La caracterización de una nueva betalactamasa no es completa hasta que se obtiene una secuencia molecular y un análisis funcional de los perfiles de hidrólisis y de inhibición realizados con la proteína purificada. (Cunningham, Noorie, Meunier, Woodford, & Patel, 2013)

En la actualidad, varias pruebas de PCR multiplex “in-house”, PCR en tiempo real y ADN “microarray” han sido desarrollados para la detección eficiente de carbapenemasas en enterobacterias. Diversos estudios han publicado los “primer” utilizados en la metodología de PCR estándar para detectar todas las familias y subgrupos de carbapenemasas conocidas hasta el momento. (Doyle et al., 2012) (Kaase, Szabados, Wassill, & Gatermann, 2012) (Cole, Schuetz, Hill, & Nolte, 2009) (Queenan & Bush, 2007)

## E. Mecanismos de resistencia de las Enterobacterias a los carbapenemes

Además de la presencia de las carbapenemasas, en las Enterobacterias puede surgir la resistencia por dos mecanismos conocidos. El primero, la producción de alto nivel de una cefalosporinasa cromosómica (AmpC) combinada con una disminución de la permeabilidad de la membrana exterior debido a la pérdida o alteración de porinas. Esto ha sido mostrado para *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, y *Klebsiella pneumoniae*. El segundo mecanismo de resistencia implica cambios en la afinidad de las enzimas diana, las proteínas de unión a penicilina (PBPs) para carbapenemes. (Yigit et al., 2001)

## F. Situación actual de las carbapenemasas

Hasta principios de la década de 1990, las carbapenemasas fueron descritas como cromosómicas y específicas de la especie; sin embargo, los elementos genéticos móviles han dado lugar a la propagación entre especies, lo que se ha vuelto un problema de interés mundial. América Latina no es una excepción y aunque la información sobre la prevalencia de carbapenemasas es escasa, el Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY (Red de laboratorios centinela que vigila la resistencia antimicrobiana de bacterias causantes de infecciones nosocomiales y de la comunidad) recopiló información de centros médicos que se encuentran en Argentina, Brasil, Chile y México. Todos los organismos Gram negativo con MIC  $\geq 2$  mg/ml a imipenem o meropenem fueron seleccionados para la detección de carbapenemasas. Se detectó *bla*<sub>KPC</sub> en 54 (65,9 %) de 85 *Klebsiella pneumoniae* resistentes a los carbapenemes. En 2005, Colombia se convirtió en el primer país latinoamericano en reportar la presencia de KPC entre Enterobacteriaceae. (Villegas et al., 2006)

Posteriormente se informó en Colombia, la transferencia y difusión de *K. pneumoniae* clon ST258 productora de KPC-3. El caso índice fue rastreado a un paciente israelí, que había viajado a Colombia, y el clon fue indistinguible del clon involucrado en múltiples brotes nosocomiales en Israel. La KPC también se ha detectado en Brasil, inicialmente en 2006. Actualmente, ha habido informes de detección de KPC en varios hospitales ubicados en todos

los estados brasileños, lo que representa una gran dispersión del gen *bla<sub>kpc</sub>* en todo el país.

Los estudios de tipificación molecular de *K. pneumoniae* productora de KPC reveló no sólo la propagación del clon ST258, sino también de otros que pertenecen a dicho complejo, sobre todo ST437. En un estudio realizado en 2010 en 12 estados brasileños, se registró una prevalencia de 15 a 49% de resistencia a la polimixina y tigeciclina, respectivamente, en aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de KPC. Este informe pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública, dado que polimixin y tigeciclina se consideran como la última línea contra estos organismos. En 2008, la KPC-2 fue detectada en *K. pneumoniae* y *Citrobacter freundii*, en paciente argentino. Posteriormente, la propagación de la ST258 se informó en varios hospitales de Argentina. (Pasterán, 2008). Recientemente, Cifuentes y otros informaron la primera KPC en Chile en una *K. pneumoniae* de un paciente que había viajado desde Italia. (Maya et al., 2013)

La NDM no fue identificada en América Latina hasta 2011, cuando fue aislada en Guatemala a partir de dos cepas de *K. pneumoniae* de pacientes no relacionados entre sí. (Organización Panamericana de la Salud, 2011)

En 2013, la NDM se informó una vez más en América Latina, esta vez en Colombia, en *K. pneumoniae* de un brote que afectó a seis pacientes neonatales. El análisis molecular mostró que todos los aislamientos fueron relacionados y pertenecían a un nuevo tipo de secuencia (ST1043) que era diferente de los tipos de secuencias que previamente habían sido notificados. A pesar de que estos son los primeros informes sobre carbapenemasas en Latinoamérica, la forma de propagación y la resistencia que ya se ha visto en otros continentes plantea una grave amenaza para toda la región. (Maya et al., 2013)

## G. Situación de las carbapenemasas en Guatemala

Desde 1996, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) apoya un sistema de vigilancia regional, Red para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA), que se basa en los datos de laboratorio de rutina y el fortalecimiento de la capacidad de los laboratorios a través de la formación del personal. Esta red está integrada por 794 laboratorios, incluyendo 21 laboratorios de referencia nacional. En junio de 2010, a través de ReLAVRA, se armonizó y aplicó un protocolo regional para la detección de carbapenemasas, en el cual participó el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala y a través de esta vigilancia, confirmó un fenotipo MBL en dos *K. pneumoniae*. Este fenotipo no se había observado en *Enterobacteriaceae* en Guatemala. El primer caso corresponde a una paciente de 1 año de edad con neumonía nosocomial y choque séptico. El paciente se refiere, en enero de 2011, a un hospital de tercer nivel, a causa de una falta de respuesta al tratamiento con meropenem y vancomicina por 14 días. *K. pneumoniae* N83 (M13717) fue recuperada de un catéter. El tratamiento con vancomicina se suspendió y se añadió piperacilina/tazobactam y amikacina. Después de 14 días de tratamiento la paciente fue dada de alta con vida. El segundo caso corresponde a un paciente adulto admitido, en febrero de 2011 en un hospital de referencia de tercer nivel para adultos, por traumatismo cervical debido a arma de fuego. *K. pneumoniae* N162 (M13716) se recuperó a partir de secreciones traqueales. Seis días después de la admisión, el estado del paciente empeoró y el paciente falleció, probablemente debido a las múltiples lesiones. Las cepas fueron enviadas al laboratorio regional de referencia (Servicio antimicrobianos, INEI - ANLIS " Dr. Carlos G. Malbrán") para su posterior caracterización. (Pasteran et al., 2012)

Las cepas fueron resistentes a todos los betalactámicos probados y trimetoprim/sulfametoxazol, también mostraron susceptibilidad intermedia a la ciprofloxacina, gentamicina y chloramphenicol. Por otro lado, fueron susceptibles a amikacina, ácido nalidíxico, levofloxacina, tigeciclina, colistina y fosfomicina. En ambas cepas, se realizó la prueba de PCR y secuenciación de ADN, detectado la presencia de *bla<sub>NDM-1</sub>*. Estos aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* son los primeros de América Latina

en los que se caracteriza NDM-1. Las cepas analizadas pertenecían a un mismo clon y no había vínculos epidemiológicos entre los dos pacientes, además no tenían antecedentes de viajes al extranjero. Se puede especular que este clon se ha extendido silenciosamente en la ciudad de Guatemala. (Pasteran et al., 2012). Teniendo en cuenta esta situación, en noviembre de 2011, la OPS emitió una alerta regional, para fortalecer la vigilancia de carbapenemasas y para destacar la importancia de la detección microbiológica de la NDM.

Después del reporte de estos casos, a la fecha sólo se conocen tres estudios publicados en Guatemala, sobre la detección de carbapenemasas. El primero se llevó a cabo con cepas almacenadas en el Laboratorio Nacional de Salud y cepas de Enterobacterias aisladas en hospitales privados de la ciudad de Guatemala. Se detectó la presencia de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC-2. (Chinchilla Puente, Tomas Barrios, & Morales Santizo, 2013). Otro estudio determinó la presencia de metalobetalactamasas por métodos fenotípicos, en *A. baumannii* aislados de las unidades de cuidados intensivos del Hospital Roosevelt. (Cortés Méndez, 2013), y en un tercer estudio se determinó por métodos fenotípicos la presencia de metalobetalactamasas en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios. (Garrido Ortega, 2014)

### III. JUSTIFICACIÓN

La detección de las bacterias productoras de carbapenemasas es un asunto de preocupación mundial, dada la propagación internacional de estos microorganismos y de las resistencias que presentan a múltiples antibióticos. En Guatemala son muy pocos los datos publicados de la presencia de estas enzimas en Enterobacterias, a pesar que, en 2011, la OPS emitió una alerta epidemiológica ante el primer hallazgo en Latinoamérica de la carbapenemasa tipo New Delhi Metalobetalactamasa (NDM) en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, provenientes de hospitales públicos del país, incluyendo al Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

En el año 2013, Grazioso, et al., encontró que *Klebsiella pneumoniae* fue la bacteria más frecuente en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos (UCIN) del Hospital General San Juan de Dios, durante los años 2010 a 2013. Estas cepas fueron aisladas de hemocultivos y presentaron un patrón de multirresistencia a varios antibióticos, incluyendo el imipenem y meropenem, por lo que podrían ser portadoras de genes de carbapenemasas.

Actualmente, las carbapenemasas no se detectan de rutina en los laboratorios de microbiología de Guatemala, y los laboratorios de referencia que sí las investigan, utilizan métodos fenotípicos. Estos métodos consumen mucho tiempo y no tienen la sensibilidad y especificidad deseada, por lo que se debe favorecer el uso de técnicas moleculares como la PCR, que es el estándar de oro para la detección de genes específicos. La PCR es percibida como una técnica de alto costo, sin embargo, el beneficio que se obtiene por la rapidez y exactitud de los resultados, es invaluable, sobre todo en el caso de estas cepas multirresistentes que amenazan la vida de los pacientes.

Los objetivos de esta investigación fueron determinar la presencia de los genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, caracterizar el tipo de muestra y definir el servicio del hospital donde se aislaron este tipo de bacterias. Los resultados obtenidos en



este estudio serán de beneficio para los pacientes y el personal del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, y se pueden aplicar las recomendaciones hechas por la OPS en los años 2012 y 2014 ante la transmisión de este tipo de bacterias multirresistentes, en donde los laboratorios de microbiología son la primera línea de contención a través de la detección oportuna de los mecanismos de resistencia bacteriana, lo que permitirá determinar la magnitud del problema y así orientar las medidas de control. (Organización Panamericana de la Salud, 2012).

## IV. OBJETIVOS

### A. General:

Determinar la presencia de los genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* del hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

### B. Específicos:

1. Determinar la proporción de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem con genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>*.
2. Caracterizar el tipo de muestra en el que se aislaron cepas de *Klebsiella pneumoniae* con genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>*.
3. Definir el servicio del hospital General San Juan de Dios en el que se aislaron cepas de *Klebsiella pneumoniae* con genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>*.

## **V. HIPÓTESIS**

Este es un estudio descriptivo por lo que no requiere la formulación de una hipótesis.

## VI. METODOLOGÍA

### A. Universo

Ciento sesenta y cinco cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a imipenem aisladas de los servicios del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, de enero a julio del 2014.

### B. Muestra

Cincuenta y cuatro cepas de *Klebsiella pneumoniae*, resistentes a imipenem y/o meropenem, seleccionadas por conveniencia.

### C. Recursos

#### 1. Recursos Institucionales

- a. Área de Microbiología del Laboratorio Clínico del hospital General San Juan de Dios
- b. Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación de Salud Integral

### D. Materiales

#### 1. Equipo e insumos

- a. Refrigerador
- b. Congelador a -70°C marca Thermo
- c. Incubadora a 35°C
- d. Termociclador Applied Biosystems 9700
- e. Cámara de electroforesis Owl B1A Class II
- f. Fuente de poder 300V
- g. Microcentrífuga Minispin Ultra Eppendorf

- h. Campana de Flujo Laminar clase II Nuairé
- i. Vortex
- j. Transiluminador
- k. Horno de microondas
- l. Balanza semianalítica
- m. Pipetas automáticas de 0.5-2.5 ul, 2 a 20 ul, 100 ul y 1000 ul
- n. Puntas bloqueadas con filtro de 10, 100 y 1000 ul
- ñ. Espectrofotómetro de DNA y cubetas
- o. Tubos plásticos de reacción de 1.5 y 2 ml libres de DNAsas y RNAsas
- p. Tubos plásticos de reacción para PCR libres de DNAsas y RNAsas
- q. Bloque seco a 80°C
- r. Bloque seco a 37°C
- s. Guantes desechables de nitrilo sin talco

## 2. Reactivos

- a. Cajas de Petri con agar sangre
- b. Cajas de Petri con agar MacConkey
- c. Caldo BHI
- d. Hisopos de almacenamiento y transporte de cepas bacterianas
- e. Buffer TBE 1X
- f. Isopropanol

g. Etanol al 70%

h. Bromuro de etidio

i. Agarosa

j. Agua grado molecular

k. Agua desmineralizada

l. Kit de extracción de ADN para bacterias Gram negativo (Promega®), que contiene: solución de lisis de núcleos, RNAasa, solución de precipitación de proteínas y solución de rehidratación de ADN. (Kit Wizard® Genomic)

m. GoTaq® Green Master Mix (Promega®), que contiene: TaqDNA, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y buffer (Promega Corporation, 2009)

n. Primers:

(KPC-Forward, secuencia 5'-3' AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG; KPC-Reverse, secuencia 5'-3' AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA)

(NDM-Forward, secuencia 5'-3' AGC ACA CTT CCT ATC TCG AC; NDM-Reverse secuencia 5'-3' GGC GTA GTG CTC AGT GTC)

(Servicio Antimicrobianos, 2008) (Servicio Antimicrobianos, 2012)

## **E. Procedimientos**

### 1. Obtención de cepas:

Se recolectaron las cepas identificadas como *Klebsiella pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem, provenientes de diversas muestras clínicas, aisladas de los pacientes del hospital General San Juan de Dios.

## 2. Determinación de la susceptibilidad antibiótica:

Se utilizó la información del antibiograma obtenida del equipo automatizado MicroScan® WalkAway (Merck). Seleccionando las cepas de *K. pneumoniae* que presentaron un resultado de imipenem y/o meropenem CIM mayor o igual a 2-4 ug/mL. Estos valores se interpretan como intermedios y resistentes, respectivamente.

## 3. Preparación de las cepas:

Las cepas almacenadas en hisopos con agar Ames, se cultivaron en agar sangre y se incubaron a 35°C por 24 horas. Se efectuó un segundo cultivo en agar MacConkey que se incubó a 35°C por 24 horas. Por último, se tomaron una o dos colonias crecidas en el agar MacConkey y se trasladaron a microtubos de 2 ml con 1.5 ml de caldo BHI, los cuales se incubaron por otras 24 horas a 35°C. Posteriormente se procedió a congelar a -20°C estos tubos conteniendo las cepas.

## 4. Extracción de ADN de las cepas en estudio con el Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), para bacterias Gram negativo.

### a. Lisis de células

- Se centrifugó 1.5 ml del cultivo bacteriano que se encontraba en caldo BHI, durante 2 minutos a 13,000-16,000×g. Se eliminó el sobrenadante.
- Se añadió 600µl solución de lisis de núcleos, mezclando suavemente para suspender el sedimento que contiene a las bacterias.
- Se incubó durante 5 minutos a 80°C, para lisar las bacterias, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente.
- Se añadió 3µl de la solución de RNasa. Se mezcló por inversión suavemente de 3-5 veces.
- Se incubó a 37°C durante 15-60 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente.

b. Precipitación de Proteínas

- Se añadió 200µl de Solución de Precipitación de Proteínas, se mezcló vigorosamente con vortex por 20 segundos.
- Se incubó en hielo durante 5 minutos.
- Se centrifugó a 13,000-16,000×g durante 3 minutos.

c. ADN Precipitación y rehidratación

- Se transfirió el sobrenadante a un tubo de reacción de 1.5 ml que contenía 600µl de isopropanol frío. Se mezcló suavemente por inversión hasta visualizar las hebras de ADN.
- Se centrifugó a 13,000-16,000×g durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante.
- Se permitió que el tubo se seque al aire para que se evapore el isopropanol.
- Se añadió 600µl de etanol al 70% frío. Se mezcló suavemente por inversión, para lavar las hebras de ADN.
- Se centrifugó durante 2 minutos a 13,000-16,000×g.
- Se aspiró el etanol y se permitió que el precipitado seque al aire durante 10-15 minutos, invirtiendo los tubos sobre papel absorbente.
- Se añadió 100ul de solución de rehidratación, se mezcló suavemente. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente.
- Se almacenó el ADN a 2-8°C, hasta su uso.

5. Medición del ADN

- Al finalizar la extracción de ADN, se seleccionaron 15 muestras al azar para determinar la concentración del ADN extraído, 5ul de ADN se mezclaron con 45ul de agua grado molecular y se determinó la absorbancia a una longitud de onda



de 260nm en un espectrofotómetro.

#### 6. Preparación de la GoTaq® Green Master Mix:

Todos los reactivos estaban a temperatura ambiente y se mezclaron con vortex y se centrifugaron muy brevemente, por unos segundos. Se preparó la siguiente mezcla en un bloque de hielo:

GoTaq = 12.5ul

Primer Forward (5NMol) = 1ul

Primer Reverse (5NMol) = 1ul

ADN de cada bacteria = 5ul

Agua grado molecular = 5.5ul

Volumen Total = 25ul

#### 7. Protocolo de amplificación:

Se colocaron los tubos de reacción para PCR que contienen la mezcla del master mix, en el termociclador correspondiente. Se programó para realizar 35 ciclos, con una desnaturalización inicial de 5 minutos y una extensión final de 7 minutos.

KPC: Tamaño de ampliación 916pb

Desnaturalización inicial = 94°C por 5 minutos

Ciclado = 35 ciclos; 94°C, 30 segundos--53°C, 30 segundos--72°C, 60 segundos

Extensión final = 72°C por 7 minutos

NDM: Tamaño de ampliación 512pb

Desnaturalización inicial = 94°C por 5 minutos

Ciclado = 35 ciclos; 94°C, 30 segundos--53°C, 30 segundos--72°C, 60 segundos

Extensión final = 72°C por 7 minutos

#### 8. Electroforesis:

Los productos de PCR se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, a una corriente constante de 99V y 50 amp por 45 min.

#### 9. Secuenciación de Sanger:

Para asegurar la calidad del proceso, los productos de PCR de 20 cepas seleccionadas al azar, se enviaron a MacroGen Inc.USA para la secuenciación respectiva y asegurar que se amplificaron las secuencias de los genes *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>*, que codifican para la producción de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae*.

#### 10. Obtención de datos:

##### a. Datos de las cepas de estudio:

La información correspondiente como tipo de muestra, servicio del hospital, susceptibilidad antibiótica, etc., se obtuvo directamente de la base de datos almacenada en el MicroScan WalkAway. Los datos fueron analizados con programa Epi Info 7. (Anexo 1)

##### b. Datos demográficos del paciente:

Se procedió a solicitar los expedientes clínicos correspondientes al Departamento de Registros Médicos del Hospital General San Juan de Dios. La información fue analizada con el programa Epi Info 7. (Anexo1)

**F. Diseño del estudio:** descriptivo, prospectivo, no probabilístico.

**G. Diseño del muestreo:** por conveniencia.

## VII. RESULTADOS

Se analizaron 54 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem del Hospital General San Juan de Dios durante el año 2014. De éstos, 49 (91 %) presentaron el gen  $bla_{NDM}$ , mientras que en 5 aislamientos (9 %) no se detectó ninguno de los genes investigados:  $bla_{NDM}$  y  $bla_{KPC}$ . (Anexo 2, Figuras 1 y 2)

De las 54 cepas estudiadas, 52 (94.5%) fueron resistentes al imipenem y 2 cepas presentaron un valor intermedio de CIM. En 49 (91 %) de estas cepas se detectó la presencia del gen  $bla_{NDM}$ . Los resultados de susceptibilidad a meropenem estuvieron disponibles únicamente para 39 cepas (72 %) y todas fueron resistentes a este antibiótico, 34 (62%) de estas cepas presentaron el gen  $bla_{NDM}$ . Las 5 cepas en las que no se detectaron los genes en estudio, fueron resistentes al imipenem y al meropenem (Tabla 1).

**Tabla 1. Resultados de susceptibilidad a carbapenemes en cepas de *Klebsiella pneumoniae* analizadas para la presencia de genes de carbapenemasas (N=54).**

Carbapenemes	$bla_{NDM}$ positivo n (%)	$bla_{NDM}/bla_{KPC}$ negativo n (%)	Total n (%)
<b>Imipenem</b>			
Resistente CIM > 8 ug/ml	47 (87 %)	5 (9 %)	52 (94.5 %)
Intermedio CIM = 8 ug/ml	2 (4 %)	0 (0 %)	2 (4 %)
Subtotal	49 (91 %)	5 (9 %)	54 (100 %)
<b>Meropenem</b>			
Resistente CIM > 8 ug/ml	34 (63 %)	5 (9 %)	39 (72 %)
Intermedio CIM = 8 ug/ml	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
No determinado	15 (28 %)	0 (0 %)	15(28 %)
Subtotal	49 (91 %)	5 (9 %)	54 (100 %)

En la tabla 2, se observa la variedad de muestras en las que se aisló *K. pneumoniae* portadora del gen  $bla_{NDM}$ . La mayor frecuencia de aislamientos se obtuvo de muestras de sangre (37%) y orina (14%). Otra fuente importante fueron las secreciones varias (10%).

**Tabla 2. Muestras en las que se aisló *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen *bla*<sub>NDM</sub> (n=49)**

Tipo de muestra	n	%
Sangre	18	37
Orina	7	14
Secreciones varias	5	10
Líquidos <sup>1</sup>	4	8
Secreción orotraqueal	4	8
Herida operatoria	3	6
Cultivo de catéter	3	6
Otros <sup>2</sup>	5	10
Total	49	100

<sup>1</sup>Líquido cefalorraquídeo, líquido biliar, líquido pleural, líquido peritoneal.

<sup>2</sup>Cultivo de gramo por tejido, esputo, úlcera, aspirado bronquial.

Las 5 cepas que fueron negativas para los dos genes investigados, se aislaron de herida operatoria, orina, esputo y secreciones orotraqueales.

Los intensivos fueron los servicios del Hospital General San Juan de Dios en el que se aislaron con mayor frecuencia cepas de *Klebsiella pneumoniae* portadoras del gen de carbapenemasas *bla*<sub>NDM</sub>. En este estudio, 26 (53%) aislamientos realizados correspondieron a estos servicios y 13 (27%) a los servicios de hospitalizados no intensivos. También se encontraron 10 (20%) cepas en las emergencias (Tabla 3).

**Tabla 3. Servicios hospitalarios en los que se aisló *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen *bla*<sub>NDM</sub> (n=49)**

Servicio del hospital	n	%
Intensivos	26	53
Hospitalizados no Intensivos	13	27
Emergencias	10	20
Total	49	100

La tabla 4 muestra los resultados de susceptibilidad a otros antibióticos distintos al grupo de los carbapenemes. Los aislamientos de *K. pneumoniae* analizados muestran

susceptibilidad importante a la amikacina y a la tigeciclina. Todas las cepas fueron resistentes al aztreonam.

**Tabla 4. Resultados de susceptibilidad a otros antibióticos distintos a carbapenemes de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen  $bla_{NDM}$**

Antibiótico	n	%
Amikacina (n= 48)		
Resistente CIM >32 ug/ml	3	6
Intermedio CIM =32 ug/ml	1	2
Susceptible CIM <8 ug/ml	44	92
Levofloxacina (n=48)		
Resistente CIM >4 ug/ml	18	39
Intermedio CIM =4 ug/ml	4	8
Susceptible CIM <2 ug/ml	26	53
Tigeciclina (n=22)		
Resistente CIM >2 ug/ml	0	0
Intermedio CIM =2 ug/ml	1	4
Susceptible CIM <2 ug/ml	21	96

Los datos demográficos y clínicos de las personas de las que se aisló *K. pneumoniae* portadora del gen  $bla_{NDM}$ , fueron recolectados únicamente de 23 registros a los cuales se tuvo acceso. La mayor parte de aislamientos de *K. pneumoniae* fue en mujeres (59%); el 48% de los pacientes tenía menos de 1 año de edad. La utilización de catéter central (96%) y ventilación mecánica (61%) fueron los procedimientos médicos más utilizados en este grupo de pacientes. La mediana del tiempo de hospitalización en este grupo de pacientes fue de 38 días (IQR=22.5 a 93.5). El 74% de las personas egresaron vivas y el 26% falleció (Tabla 5).

**Tabla 5. Datos demográficos y clínicos de pacientes con aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen  $bla_{NDM}$ .**

Datos demográficos	n	%
Sexo (n=49)		
Femenino	29	59
Masculino	20	41
Edad (n=23)		
< 1 año	11	48
1-80 años	12	52
Datos clínicos (n=23)		
Catéter central	22	96
Ventilación mecánica	14	61
Sonda urinaria	11	48
Infección de sitio quirúrgico	3	13
Mediana días de hospitalización	38	
Egreso (n=23)		
Vivo	17	74
Fallecido	6	26

La detección de los genes de carbapenemasas  $bla_{NDM}$  y  $bla_{KPC}$ , se realizó por medio de PCR de punto final. Los resultados fueron confirmados por medio de secuenciación realizada a 20 cepas de *K. pneumoniae*. En este grupo de 20 cepas se incluyeron los controles positivos y negativos, así como una cepa con presencia de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y al azar se seleccionaron las cepas: 1, 5, 9, 14, 18, 24, 29, 31, 34, 36, 41, 49, 51, 52, 58 y 60.

La secuencia del gen  $bla_{NDM}$  detectada fue:

```
CGCTTCACGGTTTGATCGTCAGGGATGGCGGCCGCGTGCTGGTGGTTCGATACCG
CCTGGACCGATGACCAGACCGCCAGATCCTCAACTGGATCAAGCAGGAGATC
AACCTGCCGGTTCGCGCTGGCGGTGGTGA CTACGCGCATCAGGACAAGATGGG
CGGTATGGACGCGCTGCATGCGGCGGGGATTGCGACTTATGCCAATGCGTTGT
CGAACCAGCTTGCCCCGCAAGAGGGGATGGTTGCGGCGCAACACAGCCTGACT
TTCGCCGCAATGGCTGGGTGCAACCAGCAACCGCGCCCAACTTTGGCCCCGCTC
AAGGTATTTACCCCGGCCCGGCCACACCAGTGACAATATCACCGTTGGGATC
GACGGCACCGACATCGCTTTTGGTGGCTGCCTGATCAAGGACAGCAAGGCCAA
GTCGCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACNNNCACCTAAGCCA
```

Los controles y la mayoría de las cepas concordaron en los resultados de ambas pruebas. En las cepas 52 y 58 no se detectó el gen *bla<sub>NDM</sub>* por PCR punto final, sin embargo la secuenciación permitió evidenciar la presencia del gen. Estas dos cepas fueron registradas como positivas para el gen *bla<sub>NDM</sub>* tomando como válido el resultado de la secuenciación (Tabla 6).

**Tabla 6. Comparación entre resultados de PCR punto final y secuenciación (n=20)**

Identificación de cepa	PCR punto final	Secuenciación Sanger
BLEE	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
Control negativo	Negativo	Negativo
Control positivo	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
1	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
5	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
9	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
14	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
18	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
24	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
29	Negativo	Negativo
31	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
34	Negativo	Negativo
36	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
41	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
49	Negativo	Negativo
51	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
52	Negativo	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
58	Negativo	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>
60	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>	Positivo para gen <i>bla<sub>NDM</sub></i>

## VIII. DISCUSIÓN

En los años 2011 y 2014, la OPS emitió una actualización epidemiológica en la que se establece que: “ante la diseminación de microorganismos con mecanismos de resistencia tipo -New Delhi Metalobetalactamasa- tanto entre distintas especies bacterianas como a nivel geográfico, la OPS/OMS subraya la importancia de reforzar la vigilancia y establecer estrategias de control para prevenir la diseminación de este mecanismo de resistencia”. (Organizacion Panamericana de la Salud, 2011) (Organizacion Panamericana de la Salud, 2012) (Organizacion Panamericana de la salud, 2014).

Los resultados obtenidos en esta investigación exponen que 91 % (49) cepas de *K. pneumoniae* presentan el gen *bla*<sub>NDM</sub>. Esto demuestra la diseminación que ha tenido este mecanismo de resistencia en 4 años desde el primer caso reportado en el hospital General San Juan de Dios en Guatemala. (Pasteran et al., 2012). Estos resultados, además, concuerdan con los reportes de varios países del mundo sobre la rápida propagación de las Enterobacterias productoras de carbapenemasas, especialmente del tipo NDM. (Johnson & Woodford, 2013).

La transferencia genética horizontal, también conocida como transferencia genética lateral, es un proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente. La transferencia de genes horizontal es común entre las bacterias, incluso entre aquellas que son distantes. Esta transferencia se realiza principalmente por medio de plásmidos. Este movimiento de plásmidos cargados de genes de resistencia antibiótica ha sido fundamental para el reciente y rápido aumento de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial. (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011)

La diversidad de características genéticas asociadas con el gen *bla*<sub>NDM</sub> puede explicar su elevada tasa de expansión en todo el mundo. Este gen posee gran diversidad clonal y se encuentra en diferentes tipos de plásmidos, como: IncA/C, IncF, IncL/M o incluso en algunos que no han podido ser tipificados. Los estudios de epidemiología molecular indican que el



plásmido IncA/C es el responsable de la diseminación del gen *bla*<sub>NDM</sub> entre las Enterobacterias. Otra característica del gen *bla*<sub>NDM</sub> es que alberga una variedad de determinantes de resistencia, incluyendo genes de betalactamasas, genes de resistencia a quinolonas, genes 16S ARN metilasa, que codifican la resistencia a aminoglucósidos y el gen *qepA* que codifica la bomba de eflujo. Estas características sugieren que los productores de NDM han sido seleccionados por los antibióticos de amplio espectro. (Martínez-Martínez & González-López, 2014).

Estudios enfocados en *Acinetobacter baumannii* han localizado el gen *bla*<sub>NDM</sub> entre dos copias de una estructura genética conservada (IS*Aba125*) formando el transposón Tn125. Este transposón ha sido identificado también en el grupo de las Enterobacterias, lo que sugiere fuertemente que *Acinetobacter* ha sido reservorio de estos genes y los ha transferido a la familia Enterobacteriaceae. (Pitout, Nordmann, & Poirel, 2015) (Dortet, Poirel, & Nordmann, 2014) (Poirel, Dortet, Bernabeu, & Nordmann, 2011).

Cortés, RL., encontró en 127 aislamientos de *A. baumannii*, carbapenemasas tipo Metalobetalactamasas, estas cepas provenían de las unidades de cuidados intensivos del Hospital Roosevelt en Guatemala y fueron recolectadas en el año 2010. Lo que confirma la presencia de genes de carbapenemasas en cepas bacterianas hospitalarias. (Cortés Méndez, 2013). En el año 2011, se realiza un estudio con el objetivo de determinar la presencia de carbapenemasas por métodos fenotípicos en 62 aislamientos de *Klebsiella sp* y *Escherichia coli* resistentes a carbapenemes, provenientes del Hospital General San Juan de Dios. Los resultados mostraron que 14 (23%) aislamientos de *Klebsiella sp*. con presencia de carbapenemasas, de los cuales 13 (93%) eran productores de carbapenemasa tipo MBL (Metalobetalactamasa) y 1 (7%) productor de carbapenemasa tipo KPC. De éstos, la única especie del género *Klebsiella* que se identificó fue *K. pneumoniae*, de *E. coli* no se obtuvo ningún aislamiento con presencia de carbapenemasas. (Garrido Ortega, 2014). Estos hallazgos son congruentes con los resultados obtenidos en este estudio.

Aunque se han reportado aproximadamente 30 genes de carbapenemasas, este estudio investigó la presencia de dos: *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>. El gen *bla*<sub>NDM</sub> se seleccionó porque fue el reportado en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, en 2010, en el mismo hospital en el que se realizó este estudio y es de interés conocer la diseminación de las bacterias portadoras de este gen en los años posteriores. El gen *bla*<sub>KPC</sub> se seleccionó porque codifica a la carbapenemasa de la clase A, la más diseminada en el mundo, su presencia ha sido reportada en un número creciente de Enterobacterias y bacilos Gram negativo no fermentadores, pero los informes siguen predominando en *K. pneumoniae*, por lo que también era importante conocer si bacterias portadoras de este gen estaban presentes en el hospital General San Juan de Dios.

En 5 aislamientos de *K. pneumoniae*, de los 54 analizados, no se detectó la presencia de ninguno de los genes mencionados, a pesar que fenotípicamente estos aislamientos demostraron ser resistentes a imipenem y meropenem. Esto podría ser explicado por la presencia de otros mecanismos de resistencia que no sea la producción de carbapenemasas o por la existencia de otros genes codificadores de carbapenemasas que deberían ser investigados en el futuro, como: OXA-48, SME, IMI, GES, etc. (Martínez-Martínez & González-López, 2014).

Los diferentes genes de carbapenemasas que circulan en *K. pneumoniae* son transportados por estructuras móviles, incluyendo plásmidos y transposones, y por lo tanto pueden propagarse de forma eficiente a diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae. El transposón Tn4401 es la principal estructura genética portadora del gen *bla*<sub>KPC</sub>, pero su transposición no es muy eficiente y la frecuencia de transmisión se ha cuantificado en el  $4.4 \times 10^{-6}$ . Sin embargo, la existencia de clones de alto riesgo como el ST258, encontrado sólo en *K. pneumoniae* con el gen *bla*<sub>KPC</sub>, han impulsado la pandemia de la resistencia a los carbapenemes. (Naas et al., 2008) (Pitout et al., 2015).

Además de la adquisición horizontal de genes que codifican las carbapenemasas y la diseminación de clones productores de estas enzimas, el otro factor importante que contribuye a la rápida propagación de estas bacterias multirresistentes, son los reservorios.

Los reservorios más importantes identificados son los individuos hospitalizados colonizados o infectados y los productos sanitarios que se utilizan para la atención de estos pacientes. (López-Cerero & Almirante, 2014). Para controlar esta propagación, los hospitales deben contar con un plan estratégico de vigilancia epidemiológica que incluya varias acciones, como: cumplir con estricto apego las precauciones estándar, reforzar y optimizar la higiene de manos, los pacientes afectados deben ser aislados en una habitación individual o cohorte, designar personal en función de la evaluación de riesgos, número de casos y de viabilidad, así como optimizar y revisar los métodos de laboratorio para la detección de portadores, mediante siembra de hisopos rectales, heridas de piel, catéteres, etc. (Asensio, Cantero, Shaw, & Vergara-López, 2014). La implementación de éstas y otras acciones necesitan la voluntad política de las autoridades sanitarias y los recursos económicos correspondientes.

Actualmente el hospital atraviesa una crisis financiera sin precedentes, todos los insumos y recursos son escasos, desde la comida que se ofrece a los pacientes hasta el más costoso de los antibióticos. (Coronado, 2015) (Rosales, 2015). Esta situación, además del tamaño y complejidad del hospital, han hecho difícil la vigilancia y el control de las infecciones, lo que resulta en la diseminación de bacterias con mecanismos de resistencia tan complicados como las encontradas en la presente investigación.

Las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas se pueden presentar con diferentes cuadros clínicos, aunque suelen ser más frecuentes las infecciones respiratorias, urinarias y septicemias, ya sea primaria o asociada a catéter. Su adquisición es habitualmente nosocomial. (Paño Pardo, Villar, Ramos Ramos, & Pintado, 2014). Esta información concuerda con lo que muestran los resultados obtenidos respecto al tipo de muestra en el que fueron encontradas las 49 cepas de *K. pneumoniae* con el gen *bla<sub>NDM</sub>*, en donde la sangre (37%) y la orina (14%) fueron las más frecuentes.

Al igual que otras bacterias en entornos sanitarios *K. pneumoniae* puede propagarse fácilmente entre los pacientes, la transmisión de microorganismos entre un hospedero susceptible y una persona colonizada es frecuente en actividades que impliquen contacto directo, dando lugar a brotes nosocomiales. Esta situación ocurre en las unidades de cuidados

intensivos y de atención neonatal (Pitout et al., 2015), como se evidencia con los resultados obtenidos en este estudio, en el que el 53% de las cepas de *K. pneumoniae* portadoras del gen *bla<sub>NDM</sub>* provenían de los servicios de intensivos, tanto de adultos como de niños.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las Enterobacterias productoras de carbapenemasas son resistentes a la mayoría de antibióticos conocidos, sin embargo, se ha reportado susceptibilidad total o parcial a ciertos antibióticos. En esta investigación se encontró que el 92% de cepas de *K. pneumoniae* portadoras del gen *bla<sub>NDM</sub>*, fue susceptible a la amikacina y el 96% susceptibles a la tigeciclina. Estos resultados concuerdan con lo reportado internacionalmente, en donde se ha encontrado que los aminoglucósidos (amikacina) y la tigeciclina no son afectados por las carbapenemasas. No obstante, no tienen resultados exitosos si son utilizados como monoterapia. (Rodríguez-Baño et al., 2015). La mejor alternativa es una terapia combinada en la que, sorprendentemente, una de las drogas es siempre un carbapenem. El más adecuado es meropenem, que debe ser administrado a dosis altas (2g/8h) con una infusión prolongada (hasta 3 horas) para mejorar su farmacocinética y propiedades farmacodinámicas. Los agentes que se combinan con meropenem pueden ser: colistina, tigeciclina, fosfomicina, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, e incluso nitrofurantoína en las infecciones del tracto urinario, todos estos con resultados variables. (Camargo et al., 2015).

Las carbapenemasas son descritas como una gran y diversa familia de enzimas bacterianas que hidrolizan a los carbapenemes y otros antibióticos betalactámicos, con excepción del aztreonam. (Munoz-Price & Quinn, 2009) (Dortet et al., 2014). Sin embargo, en esta investigación, todas las cepas analizadas fueron resistentes al aztreonam. Este hallazgo también fue reportado en los primeros aislamientos de *K. pneumoniae* con el gen *bla<sub>NDM</sub>*, en el año 2010 en Guatemala y en el estudio con cepas de esta misma especie recolectadas en 2011 en el Hospital General San Juan de Dios (Pasteran et al., 2012) (Garrido Ortega, 2014). No hay experiencia clínica con aztreonam para el tratamiento de infecciones invasivas por Enterobacterias productoras de carbapenemasas. (Rodríguez-Baño et al., 2015).

Los objetivos del presente estudio se enfocaron en detectar la presencia de los genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>* en aislamientos de *K. pneumoniae* y caracterizar el tipo de muestra y servicios hospitalarios de los que provenían estas cepas. Ante los hallazgos encontrados, se revisaron los expedientes de las personas que padecían infecciones por estas bacterias, para conocer otra información clínica. Sólo se tuvo acceso a 23 expedientes de 54 solicitados. Los datos más importantes fueron que el 48% de los pacientes tenía menos de 1 año de edad. La utilización de catéter central (96%) y ventilación mecánica (61%) fueron los procedimientos médicos más utilizados en este grupo de pacientes. Todas recibieron tratamiento antibiótico, con los antibióticos que estuvieran disponibles en el Hospital General San Juan de Dios. El 74% de las personas egresaron vivas y el 26% falleció. No se pudo establecer si el fallecimiento fue debido a la infección por las cepas de *K. pneumoniae* portadoras del gen *bla<sub>NDM</sub>*.

El riesgo de presentar infección por Enterobacterias productoras de carbapenemasas se relaciona con factores individuales como la duración de la estancia hospitalaria y la exposición a procedimientos invasivos o diversos antibióticos, además de los carbapenemes. Estos factores individuales se deben valorar teniendo en cuenta la epidemiología local de estas cepas bacterianas multirresistentes. (Paño Pardo et al., 2014).

Las tasas de mortalidad son altas, oscilando entre el 18 y el 60% en casos de infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas, siendo las tasas más altas entre pacientes con bacteriemia y se relaciona con factores del hospedero (edad, inmunodepresión y enfermedades subyacentes), la infección (localización y gravedad) y el tratamiento antibiótico. El tratamiento antibiótico empírico inadecuado incrementa la probabilidad de una peor evolución clínica, mientras que las terapias con una combinación de antibióticos y la retirada o control del foco de infección se asocian con mejor supervivencia de los pacientes. (Oteo et al., 2014)

Esta investigación tuvo algunas limitaciones, dentro de las más importantes está el no contar con un laboratorio de biología molecular dentro de las instalaciones del área de microbiología del Hospital General San Juan de Dios, por lo que los procedimientos se realizaron en una institución externa. Otra limitación fue la recolección completa de datos demográficos, clínicos y epidemiológicos de los pacientes. Actualmente, el registro de todos estos datos se hace en forma manual y el almacenamiento de las historias clínicas es en forma física, no digital, por lo que se dificulta el acceso a las mismas. El trámite para solicitar las historias clínicas es engorroso y muchas veces los expedientes clínicos se pierden sin ninguna explicación. Todo esto limita la calidad de la información epidemiológica requerida.

A pesar de las limitaciones señaladas, el impacto de los resultados de esta investigación son muy importantes, ya que demuestran que en 4 años la diseminación de *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen *bla<sub>N</sub>DM* ha estado sin control dentro del hospital, poniendo en riesgo de muerte a los pacientes, especialmente a los hospitalizados en los servicios de intensivos. Esta diseminación sin control llevará en un futuro cercano a la aparición de infecciones adquiridas en la comunidad debidas a bacterias portadoras de carbapenemasas y en este caso específico a portadoras del gen *bla<sub>N</sub>DM*. Para prevenir una epidemia en Guatemala, por estas bacterias multirresistentes es necesaria una respuesta rotunda, bien coordinada y protocolizada de todos los profesionales sanitarios y autoridades nacionales implicadas. Iniciando donde todo empezó, el hospital General San Juan de Dios.

## IX. CONCLUSIONES

- 1) En esta investigación, de 54 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem, 49 (91 %), fueron portadoras del gen *bla<sub>NDM</sub>*. Esto demuestra la diseminación que ha tenido este mecanismo de resistencia en 4 años desde el primer caso reportado en el hospital General San Juan de Dios. (Pasterán et al., 2012).
- 2) En 5 aislamientos (9 %) de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a imipenem y/o meropenem no se detectó ninguno de los genes investigados: *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>*.
- 3) *K. pneumoniae* portadora del gen *bla<sub>NDM</sub>* se aisló con más frecuencia en muestras de sangre (37%) y orina (14%).
- 4) En concordancia con otros estudios, los servicios de intensivos son los más afectados por la presencia de bacterias portadoras de carbapenemasas. En esta investigación, el 53% cepas de *Klebsiella pneumoniae* portadoras del gen de carbapenemasa *bla<sub>NDM</sub>*, fue aislada de pacientes en estos servicios.

## X. RECOMENDACIONES

- 1) Implementar tecnología de biología molecular en el laboratorio clínico del hospital General San Juan de Dios, que permita realizar en forma rápida y precisa el diagnóstico y vigilancia de las principales enfermedades infecciosas y de mecanismos de resistencia bacteriana presentes en el hospital.
- 2) Investigar la presencia de otros genes de carbapenemasas en Enterobacterias, para establecer la epidemiología local del hospital General San Juan de Dios.
- 3) Establecer un mecanismo de registro de datos demográficos, clínicos y de laboratorio, que permita la información total requerida para los estudios de investigación.
- 4) Socializar a las autoridades correspondientes del hospital General San Juan de Dios, los resultados obtenidos en este estudio, para exponer el riesgo en el que se encuentran los pacientes, debido a la diseminación sin control de *Klebsiella pneumoniae* portadora del gen *bla<sub>NDM</sub>*.
- 5) Recomendar en forma enérgica el cumplimiento de las normas estándar de higiene y bioseguridad en todos los servicios del hospital, para tratar de detener la diseminación de bacterias productoras de carbapenemasas.
- 6) Disponer siempre de los antibióticos recomendados en el tratamiento de infecciones debidas a bacterias productoras de carbapenemasas.



## XI. REFERENCIAS

- Anderson, K. F., Lonsway, D. R., Rasheed, J. K., Biddle, J., Jensen, B., McDougal, L. K., ... Patel, J. B. (2007). Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*, 2723–2725. <http://doi.org/10.1128/JCM.00015-07>
- Arakawa, Y., Shibata, N., Shibayama, K., Kurokawa, H., Yagi, T., Fujiwara, H., & Goto, M. (2000). Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*, 40–43.
- Asensio, Á., Cantero, M., Shaw, E., & Vergara-López, S. (2014). Control strategies for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at different levels of the healthcare system. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *32 Suppl 4*(Supl 4), 61–6. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70176-4](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70176-4)
- Camargo, J. F., Simkins, J., Beduschi, T., Tekin, A., Aragon, L., Pérez-Cardona, A., ... Cantón, R. (2015). Successful Treatment of Carbapenemase-Producing Pandrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 5903–5908. <http://doi.org/10.1128/AAC.00655-15>
- Castanheira, M., Toleman, M. a, Jones, R. N., Schmidt, F. J., & Walsh, T. R. (2004). Molecular Characterization of a  $\beta$ -Lactamase Gene, bla GIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- $\beta$ -Lactamase Molecular Characterization of a  $\beta$ -Lactamase Gene, bla GIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- $\beta$ -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* <http://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4654>
- CDC. (2015). Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE).
- Chinchilla Puente, A. M., Tomas Barrios, B. E., & Morales Santizo, R. D. (2013). *Detección de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC-2 en Enterobacterias BLEE+: evaluación fenotípica con confirmación genotípica*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- CLSI. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement* (Vol. 32).
- Cole, J. M., Schuetz, A. N., Hill, C. E., & Nolte, F. S. (2009). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*, 322–326. <http://doi.org/10.1128/JCM.01550-08>
- Coronado, E. (2015, July). Salvar vidas en un hospital en donde no sirve ni el ascensor. *Revista Contrapoder*.
- Cortés Méndez, R. L. (2013). *Detección de carbapenemasas tipo metalobetalactamasas en la población de Acinetobacter baumannii resistente a imipenem y/o meropenem aislados en las unidades de cuidados intensivos del hospital Roosevelt*. (tesis de

licenciatura) Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala

- Cunningham, S. a., Noorie, T., Meunier, D., Woodford, N., & Patel, R. (2013). Rapid and simultaneous detection of genes encoding klebsiella pneumoniae carbapenemase (*bla<sub>KPC</sub>*) and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (*bla<sub>NDM</sub>*) in gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*, 1269–1271. <http://doi.org/10.1128/JCM.03062-12>
- De la Lastra, Virginia., Ulloa Teresa., Pinto Eugenia., V. M., Eugenia., P., Mario., V., & Francisco., S. (2010). Serinocarapenemasas de clase A en enterobacterias, (1).
- Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(11), 3773–3776. <http://doi.org/10.1128/JCM.01597-12>
- Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Research International*, *2014*. <http://doi.org/10.1155/2014/249856>
- Doyle, D., Peirano, G., Lascols, C., Lloyd, T., Church, D. L., & Pitouta, J. D. D. (2012). Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(12), 3877–3880. <http://doi.org/10.1128/JCM.02117-12>
- García, P. (2012). Qué sabemos de las carbapenemasas? Del laboratorio a la clínica. In *Ponencia recuperada on-line* (p. 41). Santiago, Chile. Retrieved from [http://www.serchile.cl/sitio/images/stories/Foll\\_Antimicrobianos.pdf](http://www.serchile.cl/sitio/images/stories/Foll_Antimicrobianos.pdf)
- Garrido Ortega, M. A. (2014). *Determinación de carbapenemasas en aislamientos de Escherichia coli y Klebsiella sp. aisladas en el Hospital General San Juan de Dios.* (tesis de licenciatura) Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Horcajada, J. P., Torre-Cisneros, J., Peña, C., & Fariñas, M. C. (2014). Future alternatives for the treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: What is in the pipeline? *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *32 Suppl 4*(Supl 4), 56–60. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70175-2](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70175-2)
- Hospital General San Juan de Dios, Departamento de Informática. (2015). *Reporte 2015 de producción Hospital General San Juan de Dios.* Guatemala.
- Johnson, A. P., & Woodford, N. (2013). Global spread of antibiotic resistance: The example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*, *62*(PART4), 499–513. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.052555-0>
- Kaase, M., Szabados, F., Wassill, L., & Gatermann, S. G. (2012). Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*, 3115–3118. <http://doi.org/10.1128/JCM.00991-12>

- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. a., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., ... Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *10*, 597–602. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
- López-Cerero, L., & Almirante, B. (2014). Epidemiology of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Reservoirs and transmission mechanisms. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *32 Suppl 4*(Supl 4), 10–6. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70169-7](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70169-7)
- Martínez-Martínez, L., & González-López, J. J. (2014). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *32 Suppl 4*(Supl 4), 4–9. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70168-5](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70168-5)
- Maya, J. J., Ruiz, S. J., Blanco, V. M., Gotuzzo, E., Guzman-Blanco, M., Labarca, J., ... Villegas, M. V. (2013). Current status of carbapenemases in Latin America. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *11*(7), 657–67. <http://doi.org/10.1586/14787210.2013.811924>
- Moellering, R. (2010). NDM-1 A cause for Worldwide Concern. *New England Journal of Medicine*, 2377–2379. <http://doi.org/10.1056/NEJMp1002530>
- Munoz-Price, L. S., & Quinn, J. P. (2009). The spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *49*, 1739–1741. <http://doi.org/10.1086/648078>
- Naas, T., Cuzon, G., Villegas, M. V., Lartigue, M. F., Quinn, J. P., & Nordmann, P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*, 1257–1263. <http://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(10), 1791–8. <http://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
- Organizacion Panamericana de la Salud. (2011). *Alerta epidemiológica: Primer hallazgo de carbapenemasa tipo New Delhi metalobetalactamasa (NDM) en Latinoamerica.*
- Organizacion Panamericana de la Salud. (2012). *Alerta epidemiológica: Transmisión de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud* (Vol. 1).
- Organizacion Panamericana de la salud, organizacion mundial de la salud. (2014). *Actualización epidemiológica: carbapenemasas tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM).*

- Oteo, J., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Oliver, A., Hornero, A., Ruiz-Garbajosa, P., ... Salavert, M. (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: Documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 32(10), 666–670. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.011>
- Paño Pardo, J. R., Villar, S. S., Ramos Ramos, J. C., & Pintado, V. (2014). Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 32 Suppl 4(Supl 4), 41–8. [http://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70173-9](http://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70173-9)
- Pasterán, F. (2008). Alerta Epidemiológica: Diseminación de carbapenemasas. Buenos Aires: Servicio de Antimicrobianos INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán.”
- Pasteran, F., Albornoz, E., Faccone, D., Gomez, S., Valenzuela, C., Morales, M., ... Corso, A. (2012). Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1795–1797. <http://doi.org/10.1093/jac/dks101>
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance: TABLE 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 5873–5884. <http://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>
- Poirel, L., Dortet, L., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). Genetic Features of bla<sub>NDM-1</sub>-Positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5403–5407. <http://doi.org/10.1128/AAC.00585-11>
- Promega Corporation. (2009). Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA. *Solutions*.
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile betalactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–458. <http://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Rasmussen, B. a, & Bush, K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(2), 223–232.
- Rodríguez-Baño, J., Cobos-trigueros, N., Fresco, G., Francisco, C. N., Gudiol, C., Pablo, J., ... Pe, C. (2015). Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae . Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology Jesús Rodríguez-Ba no, 33(5).
- Rosales, M. (2015). Crisis hospitalaria en Guatemala es la peor de su historia. Recuperado por <http://www.telesurtv.net/news>
- Servicio Antimicrobianos, I. N. de E. I.-A. "Dr. C. G. M. (2008). Protocolo de PCR para la detección del gen KPC en aislamientos de bacilos gram-negativos. *Instituto de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán.”* Retrieved from

<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Detección-KPC.pdf>

- Servicio Antimicrobianos, I. N. de E. I.-A. "Dr. C. G. M. (2012). Protocolo de PCR para la detección del gen ndm en aislamientos de bacilos gram-negativos. *Instituto de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán,"* 2012. Recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Detección-NDM.pdf>
- Tenover, F. C., Kalsi, R. K., Williams, P. P., Carey, R. B., Stocker, S., Lonsway, D., ... Hanna, B. (2006). Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8), 1209–1213. <http://doi.org/10.3201/eid1708.060291>
- Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, a., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 682–707. <http://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>
- Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Suarez, C. J., Lopez, J. a., Vallejo, M., & Quinn, J. P. (2006). First detection of the plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2880–2882. <http://doi.org/10.1128/AAC.00186-06>
- Walsh, T. R., Bolmström, A., Qwörnström, A., & Gales, A. (2002). Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2755–2759. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2755>
- Walsh, T. R., Toleman, M. a., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo- -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 306–325. <http://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
- Yigit, H., Queenan, a. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., ... Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1151–1161. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>

## XII. ANEXOS

**Anexo 1:** Cuestionario del programa Epi Info 7 para la digitación de datos demográficos y clínicos.

**Detección de los genes blaKPC y blaNDM en *K. pneumoniae***

Nombre  Apellidos  Edad

Sexo   
 Femenino

Fecha de Ingreso al hospital

Fecha de Egreso al hospital

Diagnósticos presuntivos

Lugar de residencia   
 País  Departamento

Aldea  Municipio

Registros clínicos

**Antecedentes clínicos**

tabaquismo  Diabetes mellitus

Asma  Alcoholismo

HIV  Enfermedad autoinmune

EPOC  Falla cardíaca?

Malignidad hematológica  corticosteroides

Trasplante  Quimioterapia por cancer

Malnutricion  Hepatitis

Aterosclerosis  Cirrosis o falla hepática

Fibrosis quística  Cancer

**Factores de Riesgo para infección nosocomial**

Infección de sitio quirúrgico  Tiempo en días (SQ)

Sonda Urinaria  Tiempo en días (SU)

Catéter central  Tiempo en días (CC)

Ventilación Mecánica  Tiempo en días (VM)

Infección por *C. difficile*  Tiempo en días (Cd)

Otros  Tiempo en días (otros)

### Datos de cepas de *K. pneumoniae*

Fecha de cultivo

Tipo de muestra

Otra bacteria aislada

Servicio del hospital

Cual?

Tipo de gen detectado

### Antibiograma (CIM)

Amicacina CIM valor

Ampicilina/Sulbactam valor

Ampicilina CIM valor

Aztreonam CIM valor

Cefazolina CIM valor

Cefepima CIM valor

Cefotaxima CIM valor

Ciprofloxacina CIM valor

Gentamicina CIM valor

Imipenem CIM valor

Levofloxacina CIM valor

Meropenem CIM valor

Moxifloxacina CIM valor

Pip/Tazobactam CIM valor

## Anexo 2: Figura 1

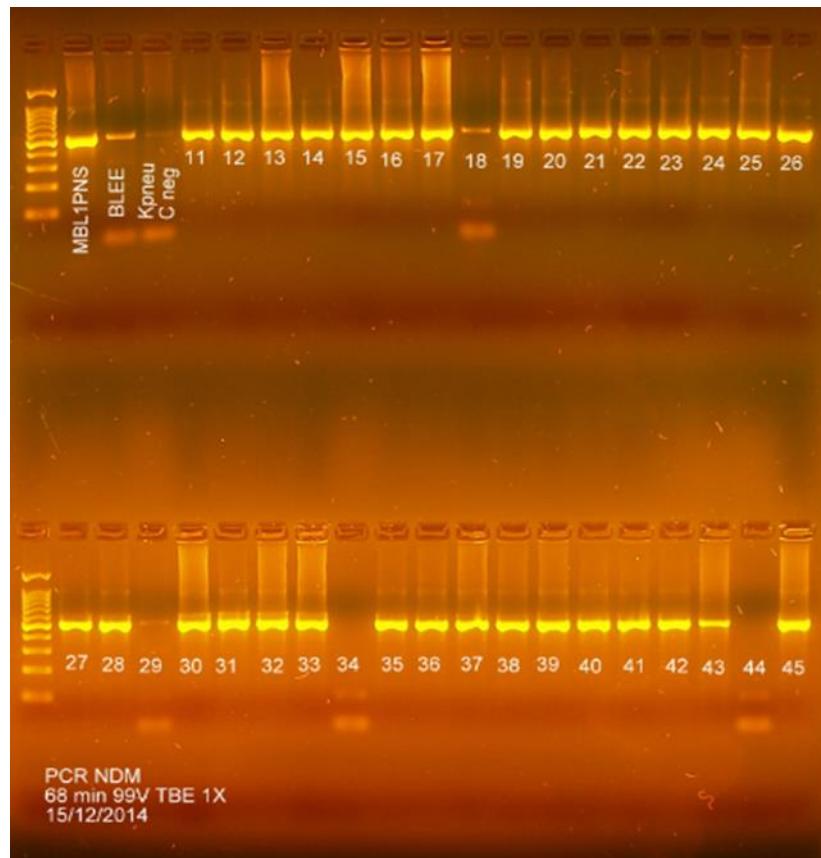


Figura 1. Resultados de los productos de PCR de punto final en gel de agarosa. Gen *bla*NDM, tamaño del amplicón 512 pb. Se muestran los resultados de las cepas de *K. pneumoniae* de la 11 a 45. En las cepas 29, 34 y 44 no se detectó el gen. MBL1PNS = control positivo, BLEE = cepa con betalactamasa de espectro extendido y gen *bla*NDM, Kpneu = control negativo.



Figura 2

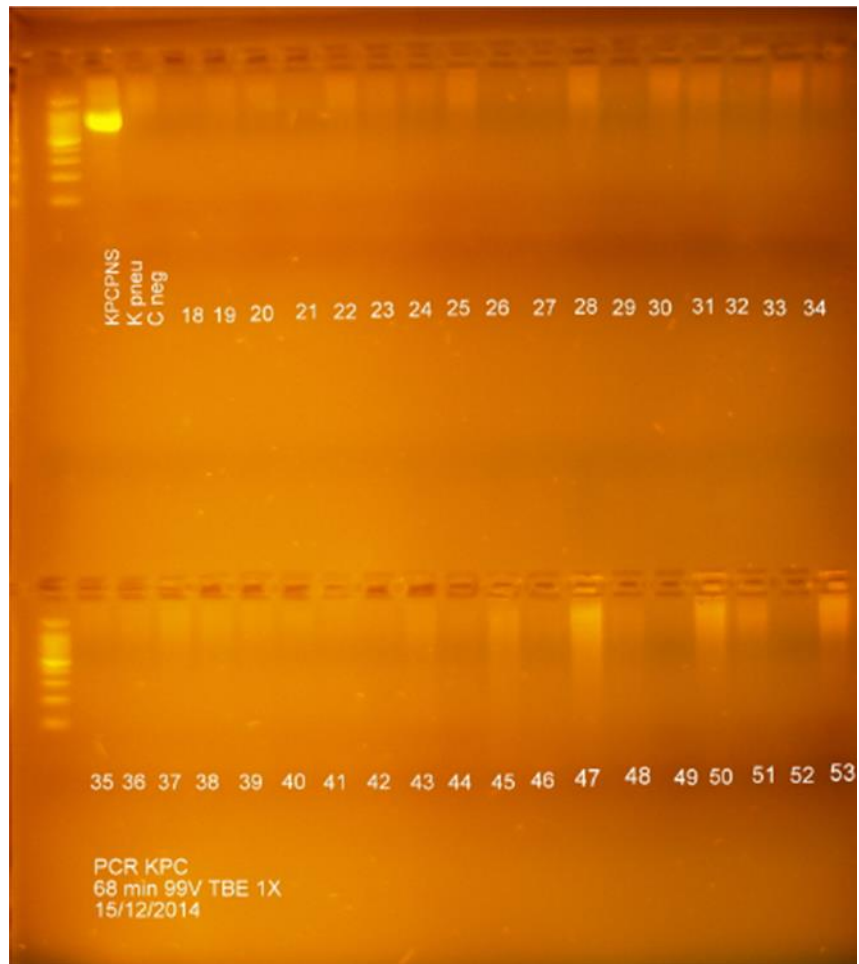
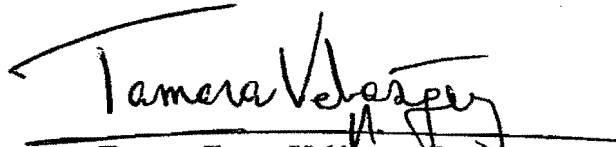


Figura 2. Resultados de los productos de PCR de punto final en gel de agarosa. Gen *blaKPC*, tamaño del amplicón 916 pb. Se muestran los resultados de las cepas de *K. pneumoniae* de la 18 a 53, en ninguna se detectó el gen *blaKPC*. KPCPNS = control positivo, Kpneu = control negativo.



Tamara Ileana Velásquez Porta

Estudiante



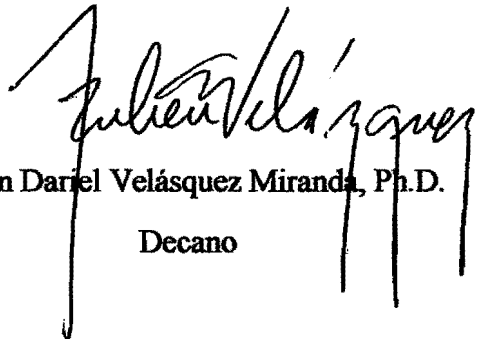
Dalia Mei Ling Chau Bonilla, Ph.D.

Asesora



María Ernestina Ardón Quezada, MSc.

Directora Escuela Estudios de Postgrado



Rubén Daniel Velásquez Miranda, Ph.D.

Decano